

### C. 研究結果

ARB 内服時と、ACEI 内服時において、糖尿病コントロールや血圧の間に有意な差は認めなかった。

RAS において ACEI 内服時に、ACE 活性の有意な低下を認めたが、その他のパラメーターは変化がなかった。

血中と尿中のパラメーターでは、血中の NO、TGF- $\beta$  値が ACEI 内服時において ARB 内服時と比べ高い傾向を示した。

### D. 考察

ARB で ACEI に比し、血中の TGF- $\beta$  の上昇を認めた原因として、AT1 受容体を介して TGF- $\beta$  の産生を亢進する経路に対する効果の差異が考えらる。

ARB の方が ACEI に比し、chymase を介して産生されるアンギオテンシン 2 作用を抑え、また、活性化された AT2 受容体からの負のシグナルが働き、TGF- $\beta$  の産生を低下させたと考えられた。

また、NO については、ACEI は kininase である ACE を阻害することにより、bradykinin の分解を阻害し、血中濃度を上昇させ、このことが、NO 値を上昇させると考えられた。

一方、ARB により AT2 受容体が活性化されることによる、bradykinin を介する、NO 値上昇の経路も存在する。今回、ACEI 内服時において ARB 内服時と比べ血中の NO 値の上昇を認めたことから bradykinin を介する NO への影響は ACEI の方が強いと考えられた。

また、ACEI 内服時に、尿中アルブミン・クレアチニンクリアランスが、有意ではないが、上昇する傾向を認めたことの原因として、NO の血管拡張作用による腎糸球体の過剰濾過の機序の報告と一致すると考えら

れた。

### E. 結論

早期腎症までにおいては ARB の方が糖尿病性腎症に対して有用である可能性が示唆された。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

なし

#### 2. 学会発表

第 17 回日本糖尿病合併症学会

第 13 回日本病態生理学会大会

難治性腎疾患の進展抑制の為の新たな指標作成とそれに基づく治療指針作成に関する研究

分担研究者 今井 潤  
東北大学大学院薬学研究科医療薬学講座臨床薬学分野

研究要旨 中枢性降圧薬グアナベンズあるいはクロニジンの就寝前投与は高血圧患者における早朝の家庭血圧を有意に低下させ、早朝高血圧の治療に有効であることが示された。

A. 研究目的

腎疾患の予後を決定する最大の危険因子は血圧である。早朝の高血圧は、慢性腎不全患者における腎障害進展や心肥大と密接に関連することが明らかにされている。本研究では①腎疾患を有する患者における朝・就寝前の家庭血圧値を調べ、②早朝の血圧上昇を示す本態性高血圧症患者において中枢性降圧薬の就寝前投与の効果を検討した。

B. 研究方法

①糖尿病性腎症あるいはIgA腎症を有する患者9人において、朝・就寝前の家庭血圧を測定し、さらにアンジオテンシンII受容体拮抗薬(ARB)の効果を調べた。②早朝高血圧を有する患者133人をグアナベンズ群(n=83)およびクロニジン群(n=50)に分け、2週間の観察期の後それぞれグアナベンズ2mgまたは4mg、クロニジン75μgまたは150μgを1日1回就寝前に4週間にわたって投与した。朝および就寝前の降圧効果を、自己測定された家庭血圧に基づいて評価した。また、観察期の就寝前血圧レベルにより対象者をサブグループに分類し、就寝前血圧に対する効果をサブグループ間で比較した。さらに、2つの中枢性降圧薬の薬効持続度を評価するため、家庭血圧の早朝降圧度に対する就寝前降圧度の割合として算出される evening/morning (E/M)比を調べた。

C. 研究結果

①腎障害を有する患者における家庭血圧値は、朝 140±11/80±8 mmHg、就寝前 131±13/70±5 mmHg で、朝が有意に高値であった。ARB投与4週後、朝の家庭血圧は 134±13/76±9 mmHg に有意に低下した。②グアナベンズあるいはクロニジンの就寝前投与により、朝の家庭血圧は有意に低下した。就寝前の家庭血圧は、いずれの薬剤の投与でも、観察期就寝前血圧が高値を示すサブグループでは低下し、観察期就寝前血圧が正常のサブグループでは不変であった。グアナベンズの E/M

比は、就寝前血圧正常群に比較して就寝前血圧高値群において有意に大きかったが、クロニジンの E/M 比は両群間で同等であった。治療早期では、就寝前拡張期血圧が高値を示す患者における拡張期の E/M 比はクロニジンに比較してグアナベンズで有意に高値を示した。

D. 考案

これまでα遮断薬の就寝前投与による早朝血圧低下作用が報告されており、本研究の結果から、交感神経抑制性薬剤ないし就寝前投与の早朝高血圧に対する有効性が示唆される。中枢性降圧薬の効果持続度は患者の血圧レベルに依存すると考えられ、また E/M 比を用いた検討からグアナベンズは、ある状況下においては比較的長時間作用すると推測される。

E. 結論

中枢性降圧薬の就寝前投与は、高血圧患者の早朝の血圧上昇を抑制することが推測された。この治療が腎不全患者においても同様の効果をもたらすか、かつ腎障害進展の抑制に寄与するか否かに関しては、さらなる検討が必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

Hashimoto J, Chonan K, Aoki Y, et al. Therapeutic effects of evening administration of guanabenz and clonidine on morning hypertension: evaluation using home-based blood pressure measurements. J Hypertens 2003 (in press).

2. 学会発表

長南謙一、橋本潤一郎、青木洋平、ほか。中枢性交感神経抑制性降圧薬酢酸グアナベンズおよび塩酸クロニジンの就寝前投与による早朝高血圧の治療—家庭血圧による評価—。第25回日本高血圧学会総会、2002(東京)。

## 難治性腎疾患の進展抑制の為の新たな指標作成とそれに基づいた治療指針作成に関する研究

-腎ネットワークを活用した半月体形成性腎炎（急速進行性糸球体腎炎症候群）の発症・進展機序解明とその予防・治療法の確立に関する研究-

研究者 木田 寛 国立金沢病院副院長（内科）

**研究要旨** 病理学的に半月体形成を特徴とするヒト半月体形成性腎炎は臨床的に急速進行性糸球体腎炎症候群を呈し予後不良な疾患群である。その病態にはTh1 サイトカイン/ケモカイン優位性が報告されているが、病態のさらなる解明と予後改善にむけた治療法の確立は臨床上の課題である。本研究では、1) 半月体形成性腎炎の発症・進展にはたすケモカイン(MIP-1 $\alpha$ ), その受容体 CCR5 および p38 マップキナーゼ (MAPK) の関与ならびに 2) p38 MAPK 選択的阻害剤による治療効果を検討した。その結果、ヒト半月体形成性腎炎において糸球体を中心に産生される MIP-1 $\alpha$  により CCR5 陽性細胞が遊走・活性化され、p38 MAPK や核内転写因子 (NF- $\kappa$ B) 活性化を介して半月体形成に関与することが推測された。さらに p38 MAPK 選択的阻害は半月体形成抑制を介して長期の腎機能保持効果が示された。かかる MIP-1 $\alpha$ -CCR5-p38MAPK リン酸化-NF- $\kappa$ B 活性化の増幅経路は半月体形成性腎炎の発症・進展を考えるうえで重要であり、p38 MAPK が治療標的分子になりうることを示された。

研究協力者 金沢大学医学部附属病院血液浄化療法部 和田 隆志（助手）、横山 仁（助教授）国立金沢病院内科 吉村 光弘（医長）、伊勢 拓之

### A. 研究目的

半月体形成性腎炎に代表される進行性腎疾患は糸球体硬化・間質線維化という共通の病理所見を示し腎不全に至る。この過程において、半月体形成の発症・進展機序を明らかにすることは病態のさらなる理解とともに治療法の確立にむけ意義深いものと考えられる。

半月体形成性腎炎は Th1 サイトカイン優位性ならびに免疫グロブリン IgG1, 3 の産生亢進から Th1 優位と考えられている。一方、Th1 ヘルパーT細胞クローンの表面マーカーとして macrophage inflammatory

protein (MIP)-1 $\alpha$  の受容体 CCR5 が特異的に発現し Th1 優位の病態を制御している可能性が示されている。しかしながら、半月体形成性腎炎において MIP-1 $\alpha$  ならびに CCR5 の関与は十分に検討されていない。

さらに CCR5 の細胞内シグナル伝達機構ならびに MIP-1 $\alpha$  産生に p38 マップキナーゼ (MAPK) 活性化の重要性が示されている。

そこで本研究においては、1) 半月体形成性腎炎の発症・進展機序にはたす MIP-1 $\alpha$ , その受容体 CCR5 および関連機能分子 (p38 MAPK, nuclear factor (NF)- $\kappa$ B) の意義を明かとする。2) p38 MAPK 選択的阻害剤 FR167653 投与による半月体形成性腎炎抑制効果を検討し、かかる病態への治療効果を検討した。

## B. 研究方法

### 1. ヒト半月体形成性腎炎例における検討

対象は腎生検にて半月体形成性腎炎と診断された34例（男18例, 女16例, 平均61歳）とした。尿MIP-1 $\alpha$ 値はenzyme linked immunosorbent assay (ELISA)で測定した。さらに腎内のMIP-1 $\alpha$ , CCR5ならびに関連機能分子(p38MAPK, NF- $\kappa$ B)の局在を確認し, 病理学的指標とともに検討した。

### 2. ラット半月体形成性腎炎モデルにおける検討

ウィスター・京都(WKY)ラット半月体形成性腎炎モデルにおけるp38MAPK選択的阻害剤FR167653の効果を検討した。腎炎惹起後, FR167653 32mg/kg/ラットを6日間連日経口投与し6, 56日目に屠殺した。半月体形成, 腎機能保持効果ならびに糸球体硬化への影響を検討した。

## C. 研究結果

### 1. ヒト半月体形成性腎炎例における検討

尿MIP-1 $\alpha$ 値は半月体形成性腎炎例において正常対照群, 微小変化型ネフローゼ症候群例に比し有意に増加していた。さらに尿中MIP-1 $\alpha$ 値は細胞性半月体形成率ならびに糸球体内CD68陽性マクロファージ数と正相関した。MIP-1 $\alpha$ は糸球体半月体形成部を中心に発現が確認された。CCR5は糸球体ことに半月体部ならびに間質の浸潤細胞に陽性所見が得られ, 二重染色によりCD3陽性T細胞ならびに一部マクロファージであることを確認した。ヒト半月体形成性腎炎におけるリン酸化p38MAPKならびに活性化NF- $\kappa$ Bの局在を検討したところ, 半月体部を中心に陽性であった。病理学的にはリン酸化p38MAPK陽性細胞数は糸球体病変ことに細胞性半月体形成率と相関し, さらに糸球体内CD68陽性マク

ロファージ数, 活性化NF- $\kappa$ Bならびに尿中MIP-1 $\alpha$ 値と相関した(表1)。加えてパルス療法を含むステロイド療法前後の腎生検施行例において糸球体内リン酸化p38MAPK, 活性化NF- $\kappa$ B陽性細胞数(図1)ならびに尿MIP-1 $\alpha$ 値は疾患活動性の低下に一致して低下した(図1)。なお, 二重染色によりCCR5陽性細胞の大部分はリン酸化p38MAPK陽性であった。

### 2. ラット半月体形成性腎炎モデルにおける検討

腎炎惹起後6日目においてFR167653投与により糸球体病変ことに半月体形成は対照37.8%に比し, 0.6%と著明に抑制された。さらに蛋白尿はFR167653投与によりほぼ正常化した(図2)。対照群では半月体部を中心にリン酸化p38MAPK発現を認め, かかる陽性細胞数は細胞性半月体形成率および糸球体内ED1陽性細胞数と正相関を示した。一方, FR群ではリン酸化p38MAPKは著明に減少し, 腎内MIP-1 $\alpha$ 発現は低下した。腎炎惹起後5-6日目の腎組織において, FR167653投与により硬化性病変を伴う半月体形成性腎炎の改善とともに間質線維化の抑制が確認された(表2)。56日までの蛋白尿ならびにCcrはFR167653投与により改善された(図2, 表2)。

## D. 考察

ヒト半月体形成性腎炎においては, 半月体形成を伴った増殖性・壊死性糸球体病変を認めるとともにマクロファージ, T細胞を中心とした腎組織への細胞浸潤を特徴とする。かかる細胞はライソゾーム酵素の分泌やスーパーオキシドの産生に加えて, 腎固有細胞との相互作用により腎組織障害を引き起こす。本研究により糸球体内リン酸化p38MAPK陽性細胞数は細胞性半月

体形成率, 糸球体内 CD68 陽性細胞数, 活性型 NF- $\kappa$ B 陽性細胞数および尿中 MIP-1 $\alpha$  値と正相関を示した. MIP-1 $\alpha$  は NF- $\kappa$ B により発現調節を受け, かつ NF- $\kappa$ B 活性化は p38MAPK リン酸化に密接に関与することが報告されている. したがって今回の結果からヒト半月体形成性腎炎では, 腎局所における p38MAPK リン酸化による NF- $\kappa$ B 活性化を介した MIP-1 $\alpha$  発現が, マクロファージ, T 細胞を遊走・活性化させることで病態形成に関与することが示唆された.

最近, MIP-1 $\alpha$  の受容体, CCR5 は, その情報伝達系に p38MAPK リン酸化が関与していることが判明してきた. 本研究において, CCR5 陽性細胞の大部分はリン酸化 p38MAPK 陽性細胞であることが明らかとなった. 以上の結果より半月体形成性腎炎において, p38MAPK リン酸化が NF- $\kappa$ B 活性化を介して MIP-1 $\alpha$  産生亢進をもたらすこと, さらに浸潤した CCR5 陽性細胞が p38MAPK を介したシグナル伝達により活性化することが推測された. これらより腎局所での MIP-1 $\alpha$ -CCR5-p38MAPK リン酸化-NF- $\kappa$ B 活性化という増幅経路が存在する可能性が考えられた (図 3).

ステロイド治療による疾患活動性の低下とともに, リン酸化 p38MAPK 陽性細胞, 活性型 NF- $\kappa$ B 陽性細胞ならびに尿中 MIP-1 $\alpha$  値の低下が確認された. 近年, ステロイドは NF- $\kappa$ B を不活性化する細胞質阻害蛋白, I $\kappa$ B $\alpha$  を誘導する事で NF- $\kappa$ B 活性化を阻害する事が報告されている. このことよりステロイド剤投与による NF- $\kappa$ B 抑制から, この増幅経路が遮断され, 半月体形成低下を介して治療に有用であった可能性も考えられた.

さらに MIP-1 $\alpha$ -CCR5-p38MAPK リン

酸化-NF- $\kappa$ B 活性化の増幅経路の意義をさらに明確にするため, p38 MAPK 選択的阻害剤 FR167653 を用いて抑制実験を行った. FR167653 投与によりリン酸化 p38MAPK, 腎組織障害は著明に抑制され, MIP-1 $\alpha$  発現は低下した. このことより, FR167653 投与による p38MAPK リン酸化抑制を介した上記の増幅経路遮断が半月体形成性腎炎抑制に有用であった可能性を考えた.

腎炎惹起後 6 日間の FR167653 投与により 56 日目において蛋白尿を抑制し, かつ腎機能障害, 糸球体硬化および間質線維化の抑制が確認された. 形質転換増殖因子 (transforming growth factor, TGF)- $\beta$  は腎固有細胞や活性化マクロファージから産生され, 線維芽細胞の活性化を介して細胞外基質増加をもたらす, 糸球体硬化や間質障害形成に重要な役割をはたす事が知られている. 近年培養メサンギウム細胞を用いた検討において TGF- $\beta$  発現には p38MAPK 活性化が重要である事が明らかとなった. 今回 FR167653 投与による p38MAPK リン酸化抑制が直接的に TGF- $\beta$  産生を阻害し, 糸球体硬化や間質障害を抑制した可能性も考えられたが詳細な機序は目下のところ不明である. またマクロファージを遊走・活性化するケモカインの MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) はマクロファージを活性化させ TGF- $\beta$  を産生させる事が報告されている. 近年, 培養条件下において, MCP-1 発現に対し p38MAPK リン酸化が必須の調節機序である事が明らかとなっている. また, ラット実験半月体形成性腎炎モデルにおいて MCP-1 中和活性をもつ抗 MCP-1 抗体の投与により, 糸球体上皮細胞足突起の癒合が抑制され蛋白尿が減少する事が報告されている. さらに長期にわたる糸球体硬化

抑制ならびに間質線維化抑制効果が示されている。したがって、FR167653 投与による MCP-1 抑制が、直接あるいは TGF- $\beta$  低下を介して糸球体硬化および間質線維化の制御をしている可能性も推測され、さらなる機序の解明が必要と考えられた。さらに、蛋白尿に含まれる補体成分、鉄やトランスフェリンは、直接的にあるいは活性酸素などの生理活性物質を介して間接的に糸球体硬化や間質障害をひきおこすことが知られている。よって FR167653 投与により蛋白尿が減少したことにより、間接的に糸球体硬化や間質障害を抑制した可能性も考えられた。以上より腎炎早期の p38MAPK リン酸化抑制が長期にわたる腎機能保護作用を示すことが判明した。これは p38MAPK の腎炎治療上の標的分子としての重要性を示唆するものと考えられた。

#### E. 結論

ヒト半月体形成性腎炎では MIP-1 $\alpha$ -CCR5-p38MAPK リン酸化-NF- $\kappa$ B 活性化の増幅経路が発症・進展機序に関与することが推測された。このうち p38MAPK リン酸化制御は半月体形成性腎炎に対する新たな治療戦略として有用であることが示された。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文

Wada T, Furuichi K, Sakai N, Iwata Y, Yoshimoto K, Shimizu M, Kobayashi K, Matsushima K, Yokoyama H. A new anti-inflammatory compound, FR167653, ameliorates crescentic glomerulonephritis in Wistar-Kyoto rats.

J Am Soc Nephrol 2000; 11: 1534-1541.

Wada T, Furuichi K, Sakai N, Hisada

Y, Kobayashi K, Tomosugi N, Mukaida N, Matsushima K, Yokoyama H. Involvement of p38 mitogen-activated protein kinase followed by chemokine expression in crescentic glomerulonephritis.

Am J Kidney Dis 2001; 38:1169-1177.

Sakai N, Wada T, Furuichi K, Kitagawa K, Kokubo S, Kobayashi M, Takeda S, Kida H, Kobayashi K, Mukaida N, Matsushima K, Yokoyama H. p38 MAPK phosphorylation and NF- $\kappa$ B activation in human crescentic glomerulonephritis.

Nephrol Dial Transplant 2002; 17:998-1004.

Wada T, Matsushima K, Yokoyama H. Chemokines as the therapeutic targets for renal diseases.

Curr Med Chem in press

##### 2. 学会発表

第 42 回日本臨床化学会

平成 14 年 10 月 20 日-23 日 (京都)

シンポジウム II-1

ケモカイン

一腎疾患の病態診断と治療への応用

和田隆志, 小林健一, 横山仁

表1 糸球体内リン酸化p38マップキナーゼと病理学的  
指標ならびに尿中MIP- $\alpha$ 値との関連

Parameters	r	p
Glomerulus		
Total crescents	0.118	NS
Cellular	0.551	<0.01
Fibrocellular/fibrous	-0.366	NS
CD68 positive cells	0.587	<0.01
NF- $\kappa$ B positive cells	0.639	<0.01
Urinary MIP-1 $\alpha$	0.689	<0.01

NS; not significant

表2 FR167653による長期腎機能保持ならびに組織学的改善効果

Parameters	Normal rats		Day 56	
	(n=6)		Vehicle (n=4)	FR (n=4)
24hr Ccr (ml/min)	1.9 ± 0.1		0.2 ± 0.04 <sup>a)</sup>	1.4 ± 0.1 <sup>c)</sup>
BUN (mg/dl)	13.6 ± 0.6		69.9 ± 24.9 <sup>b)</sup>	14.8 ± 1.1 <sup>d)</sup>
U-protein (mg/day)	12.6 ± 1.0		145.0 ± 23.6 <sup>b)</sup>	38.4 ± 23.3 <sup>d)</sup>
Glomerulus				
Glomerular sclerosis index	0		1.1 ± 0.1	0.4 ± 0.1 <sup>c)</sup>
Interstitialium				
Fibrosis	0		2.4 ± 0.2	0.5 ± 0.1 <sup>c)</sup>
Tubular atrophy	0		2.3 ± 0.3	0.6 ± 0.1 <sup>c)</sup>

Values are given as  $\bar{X} \pm \text{SEM}$ .

Statistical analysis are based on ANOVA test.

<sup>a)</sup>p<0.01 compared to normal rats. <sup>b)</sup>p<0.05 compared to normal rats.

<sup>c)</sup>p<0.01 compared to vehicle. <sup>d)</sup>p<0.05 compared to vehicle.



図1 ステロイド療法による糸球体内リン酸化p38マップキナーゼ、  
活性化NF-κB陽性細胞数の推移

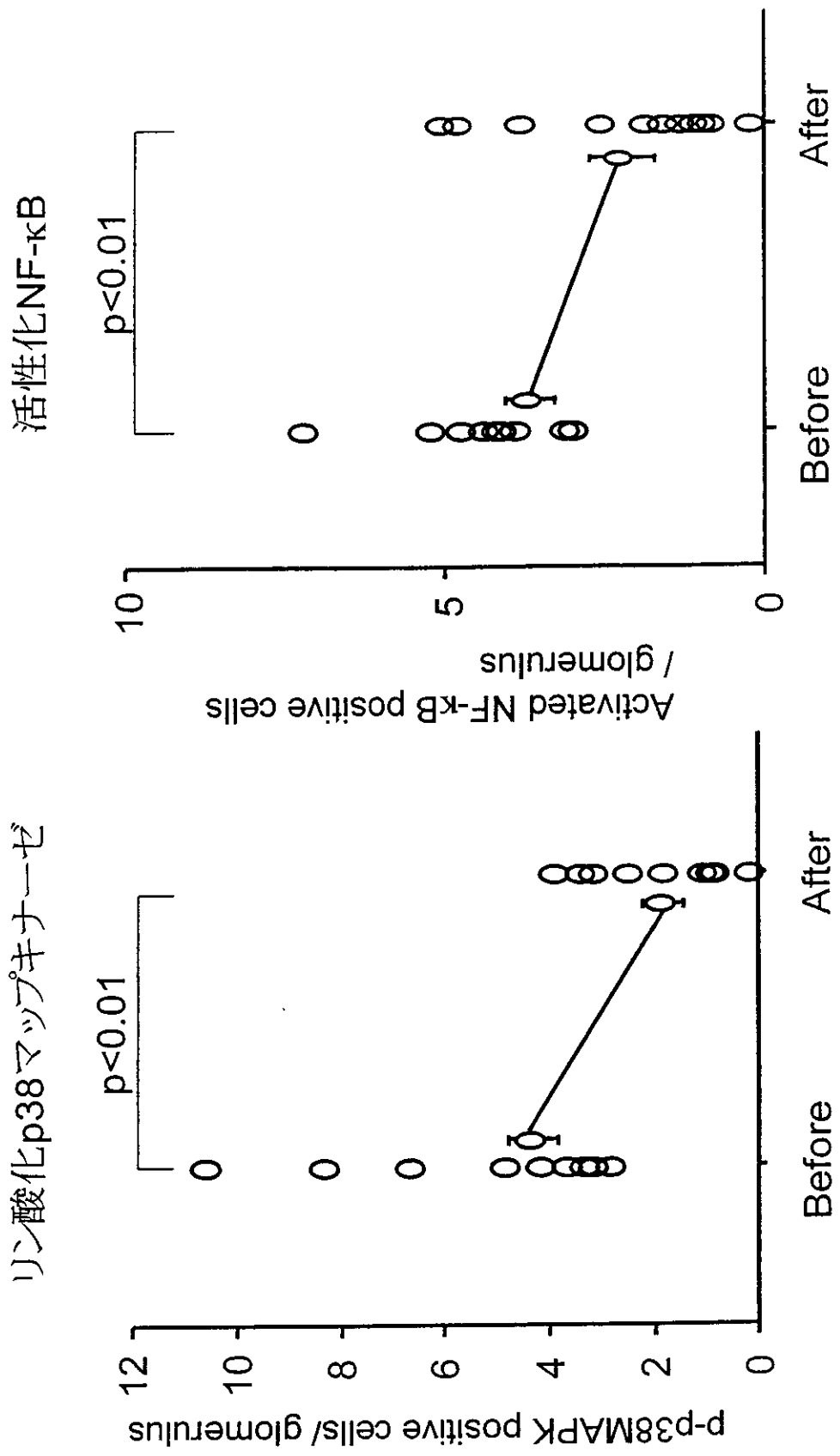


図2 FR167653によるタンパク尿抑制効果

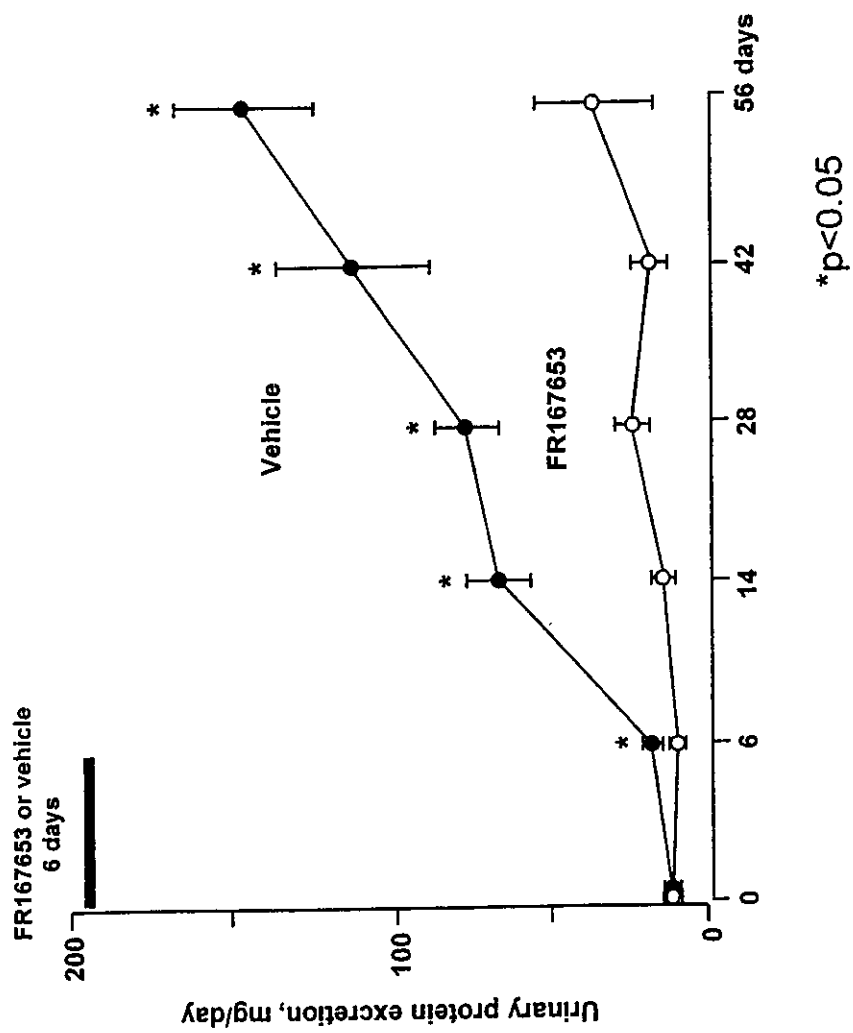
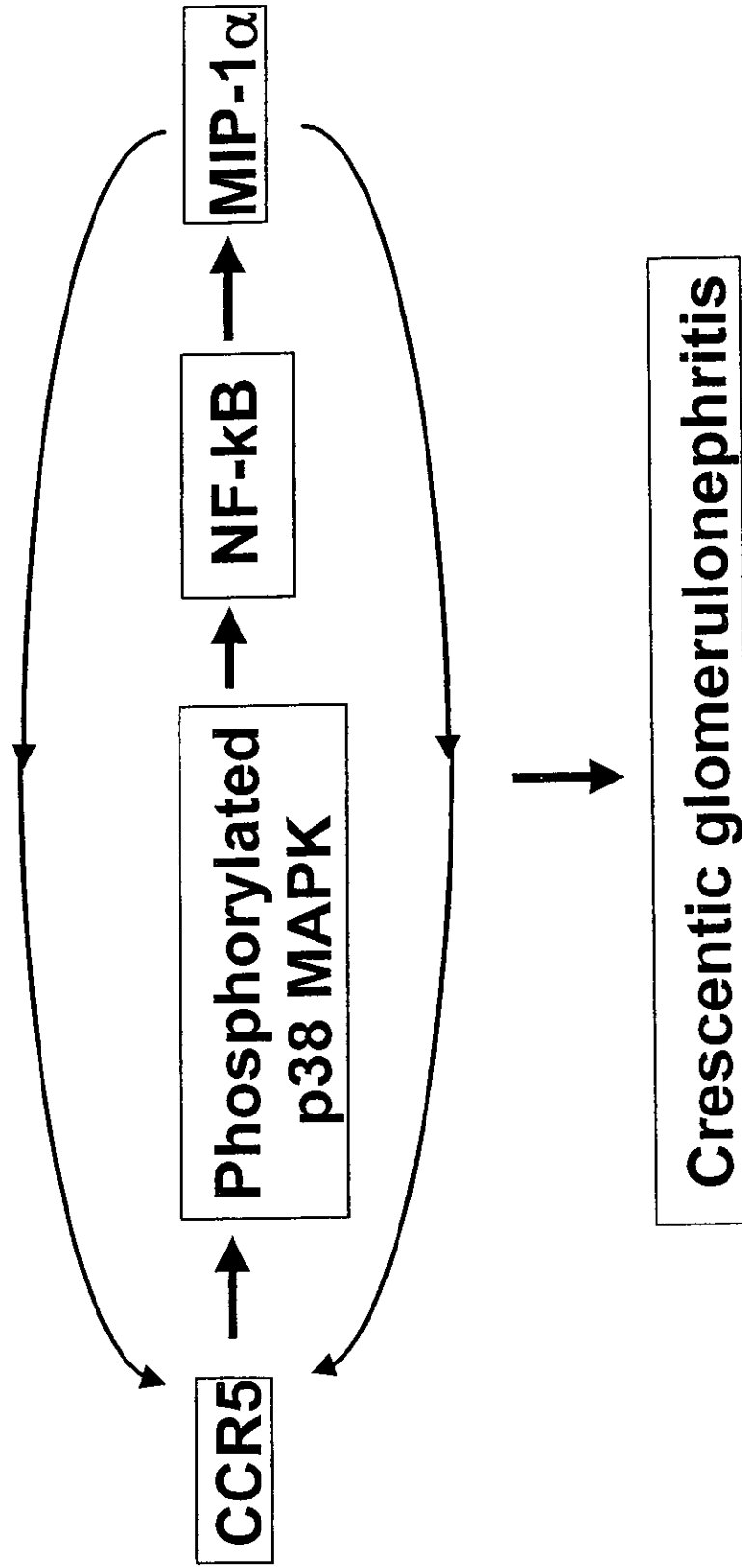


図3 半月体形成性腎炎における  
MIP-1 $\alpha$ -細胞内シグナル伝達機構活性化の増幅経路



「難治性腎疾患の進展抑制の為の新たな指標作成とそれに基づく治療指針作成に関する研究」

分担研究者 安田 和基 国立国際医療センター研究所

研究要旨

糖尿病性腎症の遺伝子解析を行うため、候補遺伝子/SNPの選択を行った。特に臨床情報として得られている炎症・酸化ストレス関連のデータと比較検討可能な候補を重視した。ゲノムの quality をチェックし、候補 SNP の整理、シークエンサーや WAVE システムによる SNP 同定、及びタイピングの準備を行った。

A. 研究目的

年間1万人程度が糖尿病性腎症により透析治療を開始しており、糖尿病患者の生命予後や QOL だけでなく、医療経済上も大きな問題となっている。

糖尿病性腎症の発症進展には、遺伝的背景の関与が強く疑われているため、本研究により、日本人における遺伝因子を同定し、腎症進展のハイリスク群に対するより効果的な患者管理を可能にし、また、腎症抑制の新たな創薬への道を拓くことを目的とする。

B. 研究方法

対象として「糖尿病性腎症」の「腎症」に関係する因子は非常に多岐にわたるため、1つの遺伝因子が腎症に寄与する効果は必ずしも強くなく、症例によって遺伝的に不均一性が存在するため、腎症全体ではなかなか有意な結果を得られにくい。

本研究は、この点を克服するために「腎症」の非進展例、進展例の比較、という従来の方法だけでなく、いわゆる「中間形質」(inter mediate traits)にあたる検査所見をも遺伝子解析の対象とし、候補遺伝子を選択する。具体的には尿中サイトカイン、ケモカイン、尿中 NOx、尿中 IV 型コラーゲンなど、主に炎症、酸化ストレス関連のデータがそろっている。

解析すべき多型は、既報の文献及び日本人 SNP データベース(JSNP)を参考とし、報告のない遺伝子については、日本人 24 人を用いて SNP discovery を行う。さらに薬物反応性、特に ARB などの腎症抑制効果に関与する遺伝因子の同定を行う予定である。

タイピングは PCR-RFLP 法、TaqMan 法を中心とし、これらが有効でないものは PCR-直接シークエンス法による。SNP、及び挿入/欠失多型の同定には、特殊なプライマーの修飾やラベルを必要としない WAVE システム(hetero duplex 法)を併用する。

C. 研究結果

現在までに、腎症の病態に関する基礎知見、及び文献を参考に、第一次解析予定の候補遺伝子を約 10 個選択した。これらのうち、PCR-RFLP が設定できるものは、その系を構築しつつあり、また TaqMan プローブの設計も準備している。

WAVE システムについては多型のスクリーニングやミトコンドリア遺伝子異常のヘテロプラスミー検出に応用して成果を挙げており、本研究の予備実験において挿入/欠失の検出についても有効性を確認している。ゲノムの定量、及び quality check もほぼ完了した。

\* (倫理面への配慮) 本研究は「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針(平成 13 年 3 月 29 日 文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示

第1号)」を遵守する。すなわち、すべての検体は文書を用いて遺伝子解析研究を含む臨床研究(糖尿病性腎症の研究)について説明を受け、文書で同意を得ている。検体はすべて「既取得試料」であるが、国立佐倉病院で匿名化されて国立国際医療センターに送られ、遺伝子多型の決定の後、その結果は国立佐倉病院へ返却され、臨床情報と合わせて解析が行われる。

一連の研究は、統括研究責任者の所属する国立佐倉病院の倫理委員会で承認を受けているほか、国立国際医療センターの倫理委員会でも承認を得ている(平成14年9月13日)。

#### D. 考察

選択した候補遺伝子の中には既に腎症との関連の可能性を報告されたものもある一方、否定的な報告も多い。我々は多彩な因子の関与する「腎症」だけでなく、尿中サイトカインほか病態を表現する形質との相関を検討できることから、パネル及び研究デザイン、検出力は従来にまさると思われる。

本研究に平成14年度から参加したため、倫理審査委員会の承認など手続きに時間がかかり、候補遺伝子の選択及び解析の予備実験、解析用ゲノムの調製などに時間がかかった。しかし、SNPの同定及びタイピングのシステムは、必要な機器とともに構築されており、平成15年度よりタイピングをスタートすれば、解析は順調に進むと思われ成果が期待される。

#### E. 結論

糖尿病性腎症遺伝子解析のパネル作成及びゲノム液調製、候補遺伝子及びSNPの選定、解析準備をほぼ完了した。今後速やかにタイピングを開始し、国立佐倉病院に解析を行う。

#### F. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
なし

#### G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

厚生科学研究費補助金（21世紀型医療開拓推進研究事業）  
分担研究報告書

難治性腎疾患の進展抑制の為の新たな指標作成とそれに基づく治療指針作成に関する研究  
—難治性腎疾患の経年変化に関する疫学・統計—

分担研究者 島 正之 千葉大学大学院医学研究院公衆衛生学助教授

**研究要旨** 本研究は、糖尿病性腎症進展に関わる疾病特性と遺伝的因子を明らかにすることを目的として、全国規模で構築された国立病院・療養所の腎疾患ネットワークシステムに登録されたⅡ型糖尿病性腎症の症例を対象に、登録後2年目までの経年変化を観察した。2年間の観察期間中に血清クレアチニン2.0 mg/dl以上となったものは10名、透析導入となったものは3名であり、これらはいずれも登録時に顕性腎症のものであった。糖尿病性腎症の悪化に関連する因子として、登録時の高血圧、高脂血症、凝固系亢進、尿中fibronectin、MIG高値が見いだされた。登録時から2年目までHbA1Cが8.0以上と高値が持続していたものは糖尿病性腎症の悪化がやや高率であり、ACE阻害剤を使用していたものは微量アルブミン尿からの改善が高率であったが、いずれも有意ではなかった。遺伝子多型については、顕性腎症から悪化した群では、vWF (Hph I)のAG genotypeが有意に高率であり、AA genotypeは改善群、不変群ではみられず、悪化群でのみ認められた。以上より、vWF (Hph I)遺伝子多型が糖尿病性腎症の進展に関与している可能性が示唆された。糖尿病性腎症の進展を抑制するためには、高血圧、高脂血症、凝固系亢進を改善することが必要であると考えられた。

A. 研究目的

わが国では生活習慣の急速な欧米化に伴い、腎疾患も生活習慣に関連した成人病型が急増している。特に糖尿病性腎症の進展による腎不全・透析が急増し、新規透析導入患者の原因疾患の第一位を占めるようになった。腎疾患の進展には患者の環境因子と遺伝因子が関与していると考えられ、糖尿病性腎症の進展速度、治療内容と予後を明らかにするためには経年的な観察を行うことが必要であるが、こうした研究はこれまでにほとんど行われていない。

本研究では、全国規模で構築された国立病院・療養所の腎疾患ネットワークシステムを活用して、日本人のⅡ型糖尿病性腎症の病態特性、特に進展速度とそれに関連する要因を明らかにすることを目的として、糖尿病性腎症の経年的な観察を行っている。

本年度は、平成12年度までにこのネットワークシステムに登録された症例について、登録後1年目、2年目における臨床所見および血液、尿検査結果を収集し、糖尿病性腎症の経年的変化と患者の環境因子、遺伝因子との関連性を検討した。

B. 研究方法

平成12年度までに全国国立病院・療養所腎疾患ネットワークシステム「腎ネット」に登録された症例のうち登録時にデータ欠損等のものを除外した218例を追跡調査の対象とし、登録後1年目、2年目における臨床所見、血液、尿検査所見を収集した。

登録時の病期は尿中アルブミン量により、正常アルブミン尿群（尿中アルブミン量30 mg/g Cr以下）、微量アルブミン尿群（尿中アルブミ

ン量 30~300 mg/g Cr), 顕性腎症 (尿中アルブミン量 300 mg/g Cr を超える) の 3 群に分類した。経年観察 1 年目, 2 年目については, 上記の 3 群に加えて, 血清クレアチニンが 2.0mg/dl 以上あるいは透析導入についても評価した。

次に, 糖尿病性腎症の病期の進展に関連する要因を検討するため, 登録時と経年観察 2 年目の結果が得られたものについて, 不変群 (登録時と 2 年目の病期が同一), 改善群 (登録時に微量アルブミン尿で 2 年目に正常群となったもの, 登録時に顕性腎症で 2 年目に正常群あるいは微量アルブミン尿となったもの), 悪化群 (登録時に正常群で 2 年目に微量アルブミン尿となったもの, 登録時に微量アルブミン尿で 2 年目に顕性腎症となったもの, 登録時に顕性腎症で 2 年間に血清クレアチニン 2.0mg/dl 以上あるいは透析導入となったもの) に分類し, それぞれの要因, 検査所見を比較した。

尿中 IV 型コラーゲン量については, 基準上限値とされている  $7.6 \mu\text{g/g Cr}$  (日本人健常者の随時尿測定結果の上限 5% の値) を超えるものと  $7.6 \mu\text{g/g Cr}$  以下のものの 2 群に分けて, 経年的変化を比較した。

(倫理面への配慮)

すべての対象者に対して, 本研究の主旨を説明した上で文書による同意を得た。解析に当たってはすべての結果を符号化し, 氏名等の個人を特定できる情報は一切使用していないため, 個人情報には完全に保護されている。

## C. 研究結果

### (1) 解析対象者数

平成 12 年度までに登録され, 登録時にデータ欠損等のあるものを除いた 218 例のうち, 同意取り消し, 転居, 転院等による脱落があったため, 登録後 1 年目, 2 年目の対象者数は, それぞれ 204 名, 161 名であった。このうち血液, 尿検査結果が得られなかった症例を除き, 登録後 1 年目には 175 名, 2 年目には 118 名を解析対象とした。1 年目, 2 年目ともに有効な結果

が得られたものは 102 名である。尿中 IV 型コラーゲン量については, 1 年目 167 名, 2 年目 68 名, 両年ともに有効な結果が得られたものは 63 名であった。

### (2) 尿中アルブミン量, IV 型コラーゲン量の比較

登録時, 1 年目, 2 年目の尿中アルブミン量の関連を図に示した。登録時と 1 年目, 1 年目と 2 年目の尿中アルブミン量の関係は, いずれも高い相関関係が認められた (それぞれ  $R^2=0.8263, 0.8369$ )。登録時と 2 年目の相関も有意であったが, 相関係数はやや小であった ( $R^2=0.7638$ )。

病期別の年次推移を表 1 に示した。血清クレアチニン 2.0 mg/dl 以上となったものは, 1 年目 7 名, 2 年目 3 名, 透析導入となったものはそれぞれ 2 名, 1 名であり, これらはいずれも登録時に顕性腎症のものであった。登録時から 2 年目まで追跡できたものは 118 名であり, 正常群であった 47 名のうち 6 名は微量アルブミン尿となっていた。微量アルブミン尿であった 29 名のうち, 5 名は正常群, 8 名は顕性腎症となり, 顕性腎症であった 42 名のうち, 2 名は正常群, 3 名は微量アルブミン尿となっていた。

尿中 IV 型コラーゲン量の比較は表 2 に示した。血清クレアチニン 2.0 mg/dl 以上または透析導入となったものはいずれも登録時に尿中 IV 型コラーゲン量が  $7.6 \mu\text{g/g Cr}$  を超えていた。

### (3) 尿中アルブミン量の経年変化に関連する因子の検討

登録時の尿中アルブミン量に基づく病期別に, 2 年目の病態を改善群, 不変群, 悪化群に分類し, それぞれの経年変化に関連する因子を検討した。

年齢, 糖尿病の病態及び血圧の比較は表 3-1 に示した。登録時顕性腎症であったもののうち, 2 年目に改善がみられたものは, 2 年目の収縮期血圧が不変群及び悪化群に比して有意に低く, 拡張期血圧も不変群よりも低かった。登録

時及び1年目のBMIは、不変群が改善群、悪化群よりも有意に高かった。性、糖尿病の病態、高血圧症の有無別には有意な差は認められなかった(表3-2)。

登録時に顕性腎症であったもののうち悪化したものは、登録時及び1年目の尿中IV型コラーゲン量が改善群及び不変群よりも有意に高かった(表4)。

脂質代謝状況については、登録時に顕性腎症であったもののうち悪化したものは、1年目の総コレステロール値が改善群よりも有意に高く、登録時及び1年目のLp(a)値が不変群よりも有意に高かった。2年目の中性脂肪は、不変群が悪化群よりも有意に高かった。登録時に正常あるいは微量アルブミン尿であったものについては、いずれも経年変化との有意な関連は認められなかった(表5)。

凝固系機能については、登録時に顕性腎症であったもののうち悪化したものは、2年目の血漿tPAが不変群よりも有意に低く、PA-I/tPA比が改善群及び不変群よりも有意に高かった。1年目の血漿fibrinogenは悪化群が不変群よりも有意に高値であった。また、登録時に正常群であったもののうち悪化したものは2年目の血漿fibrinogenが不変群よりも有意に高く、登録時に微量アルブミン尿であったもののうち改善したものは、登録時の血漿fibrinogenが不変群及び悪化群よりも有意に高かった(表6)。

腎機能については、登録時に顕性腎症であったもののうち悪化したものは血清クレアチニン(3年間とも)、登録時の尿NAG、 $\beta$ 2-MG、1年目の血漿NOxがいずれも改善群、不変群よりも有意に高値であった。登録時に微量アルブミン尿であったもののうち悪化したものは不変群に比べて1年目の血漿NOxが有意に高かった(表7)。

登録時に顕性腎症であったものの尿NOxは、1年目には不変群が改善群よりも有意に高く、2年目には不変群が悪化群よりも有意に高かった。登録時に正常群であったものでは、悪化群が不変群に比べて1年目の尿NOxが有意に高

かった。登録時に微量アルブミン尿であったもののうち不変群は改善群及び悪化群よりも2年目の尿NOxは有意に低かった(表8)。

尿中ケモカイン(登録時のみ)については、登録時に顕性腎症であったもののうち悪化したものは、fibronectin、MIG値がいずれも改善群及び不変群よりも有意に高かった。登録時に正常あるいは微量アルブミン尿であったものについては、いずれも経年変化との有意な関連は認められなかった(表9)。

1日尿排泄量の比較では、顕性腎症より悪化したものは改善群及び不変群よりも尿中タンパク量が有意に高かったが、その他には有意な差が認められなかった(表10)。

顕性腎症より悪化したものは、糖尿病のインスリン治療を行っているものが92.3%と有意に高率であった(表11)。ATII受容体拮抗薬、利尿剤を使用しているものも有意に高率であった(表12)。高脂血症の治療との関係はみられなかった(表13)。

#### (4) 血糖管理状況と尿中アルブミン量の経年変化との関連

糖尿病の管理状況が糖尿病性腎症の進展に及ぼす影響を評価するため、HbA1cと経年変化との関連を検討した。登録時にHbA1cが8.0以上であったもののうち2年目に8.0未満となったものは、2年目も8.0以上であったものに比して改善が21.1%と高率であり、悪化が10.5%と低率であったが、その差は有意ではなかった。登録時にHbA1cが8.0未満であり2年目に8.0以上となったものは、悪化が28.6%であり、2年目も8.0未満であったものに比して高率であったが、有意ではなかった(表14-1)。登録時の病期別にみても、いずれも有意な差は認められなかった(表14-2)。

#### (5) ACE阻害剤使用と尿中アルブミン量の経年変化との関連

ACE阻害剤が糖尿病性腎症の進展に及ぼす影響を評価するため、登録時及び1年目ともに



ACE 阻害剤を使用していたものの経年変化を検討した。登録時に微量アルブミン尿であったもののうち、ACE 阻害剤を使用したものは改善が 42.9%であり、使用しなかったものの 10.0%に比して高率であったが、有意ではなかった。登録時に正常群、顕性腎症群でも ACE 阻害剤の使用と尿中アルブミン量の経年変化との関連は認められなかった (表 15)。

#### (6) 高脂血症の有無と尿中アルブミン量の経年変化との関連

登録時に顕性腎症であったもののうち高総コレステロール血症または高 TG 血症があったものは、2 年目に悪化したものがそれぞれ 37.1%、39.3%といずれも有意に高率であった。低 HDL-コレステロール血症のもの、Lp(a)高値のものも悪化したものが高率であったが、有意ではなかった。登録時に正常群、微量アルブミン尿群では、高脂血症と尿中アルブミン量の経年変化との関連は認められなかった (表 16)。

#### (7) 凝固系亢進の有無と尿中アルブミン量の経年変化との関連

凝固系の指標として、vWF×Fibrinogen×PAI-1/(t-PA×1000) を用いて、尿中アルブミン量の経年変化との関連を検討した。この指標が 250 (登録時における上位四分位) を超えるものを凝固系亢進とし、250 以下のものと比較した。

登録時に正常群で凝固系が亢進していたものは悪化したものが 40.0%と亢進していないもの (9.5%) よりも高率であったが、有意ではなかった。登録時に顕性腎症であったもののうち、1 年目の凝固系が亢進していたものは 46.2%が悪化しており、亢進していないもの (10.3%) よりも有意に高率であった。2 年目の凝固系が亢進していたものも悪化が 25.0%と高率であったが、有意ではなかった。登録時に微量アルブミン尿であったものは凝固系亢進と尿中アルブミン量の経年変化との関連は認められなかった (表 17)。

#### (8) 尿中アルブミン量の経年変化と遺伝子多型の分布との関係

尿中アルブミン量の経年変化と遺伝子多型の分布との関係を表 18 に示した。登録時に顕性腎症であったもののうち悪化したものは、vWF (Hph I) の AG genotype が 72.7%であり、改善群及び不変群よりも有意に高率であった。AA genotype は改善群、不変群ではみられず、悪化群でのみ 9.1%認められた。また、登録時に微量アルブミン尿であったものでも、AA genotype は悪化群でのみ認められ、改善群、不変群ではみられなかったが、その差は有意ではなかった。その他の遺伝子多型はいずれも経年変化に関連した有意な差はみられなかった。

尿中アルブミン量の経年変化との関連が認められた遺伝子多型である vWF (Hph I) 遺伝子多型の genotype 別に尿中ケモカイン、尿 NOx、血漿 vWF の比較を行った。

AA または AG genotype は、GG genotype のものよりも登録時の尿中 fibronectin が有意に高値であり、1 年目及び 2 年目の血漿 vWF が有意に低かった。その他の尿中ケモカイン、尿 NOx は vWF (Hph I) 遺伝子多型による差は認められなかった (表 19)。

#### D. 考察

平成 12 年度までに全国国立病院・療養所腎疾患ネットワークシステム「腎ネット」に登録された症例データベースを用いて、登録後 2 年目までの経年的な変化を観察し、糖尿病性腎症の進展に関連する因子についての検討を行った。

2 年間の観察期間中に血清クレアチニン 2.0 mg/dl 以上となったものは 10 名、透析導入となったものは 3 名であり、これらはいずれも登録時に顕性腎症のものであった。一方、登録時に顕性腎症であっても、5 名は 2 年目に尿中アルブミン量が 300 mg/g Cr 以下と改善していた。

顕性腎症の悪化に関連する因子を検討したところ、収縮期血圧、拡張期血圧が高いこと、尿中 IV 型コラーゲン量、総コレステロール、

Lp(a), PA-I/tPA 比, 血漿 fibrinogen, 血清クレアチニン, 尿 NAG, 尿  $\beta$ 2-MG, 血漿 NOx, 尿中 fibronectin, 尿中 MIG がそれぞれ高値であることが見いだされた。

悪化群ではインスリン治療, AT II 受容体拮抗薬, 利尿剤の使用も高率であったが, これらは糖尿病や高血圧症の病態を反映した結果であると考えられる。

血糖管理状況と糖尿病性腎症の経年変化との関連では, 登録時から2年目まで HbA1C が 8.0 以上と高値が持続していたものは糖尿病性腎症が悪化するものがやや高率であったが, 有意な差ではなかった。また, 登録時, 1年目ともに ACE 阻害剤を使用していたものは微量アルブミン尿からの改善が高率であったが, やはり有意ではなかった。今回の検討では, 観察期間が2年間と限られており, この間に悪化したものが少数であったためと考えられる。血糖管理などの治療の意義を明らかにするためには, さらに長期間の観察を行う必要がある。

登録時の高コレステロール血症, 高 TG 血症, 1年目の凝固系亢進は, 顕性腎症の悪化との関連が有意であった。顕性腎症の進展を抑制するためには, これらの病態を改善することが必要であると思われた。

遺伝子多型については, 顕性腎症から悪化したものは, vWF (Hph I) の AG genotype が改善群及び不変群よりも有意に高率であった。また, AA genotype は改善群, 不変群ではみられず, 悪化群でのみ 9.1%認められた。AA または AG genotype のものは, GG genotype のものよりも登録時の尿中 fibronectin が有意に高値であり, 1年目及び2年目の血漿 vWF が有意に低かった。これらより, vWF (Hph I) 遺伝子多型が顕性腎症の進展に関与している可能性が示唆された。

## E. 結論

全国国立病院・療養所腎疾患ネットワークシステムに登録された症例を対象に経年的変化を観察し, 糖尿病性腎症の進展に関連する病態

特性及び遺伝因子について検討した。

2年間に血清クレアチニン 2.0 mg/dl 以上となったものは10名, 透析導入となったものは3名であり, これらはいずれも登録時に顕性腎症のものであった。顕性腎症の悪化に関連する因子として, 登録時の高血圧, 高脂血症, 凝固系亢進, 尿中 fibronectin, MIG 高値が見いだされた。

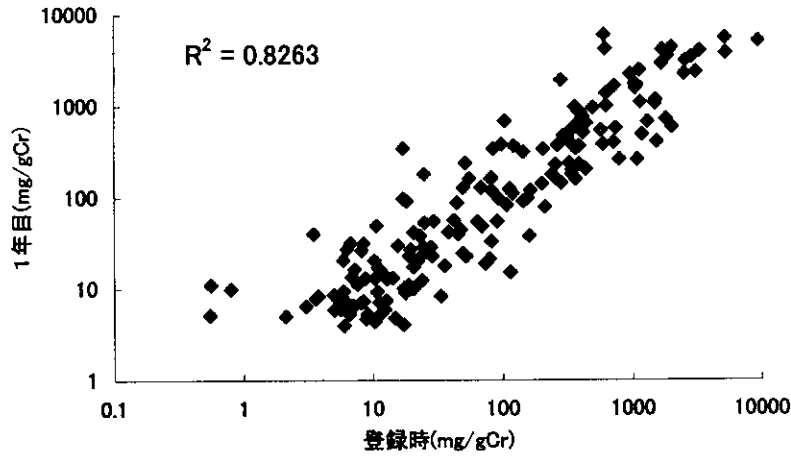
登録時から2年目まで HbA1C が 8.0 以上と高値が持続していたものは糖尿病性腎症が悪化するものがやや高率であり, ACE 阻害剤を使用していたものは微量アルブミン尿からの改善が高率であったが, いずれも有意ではなかった。

遺伝子多型については, 顕性腎症から悪化した群では, vWF (Hph I) の AG genotype が有意に高率であった。また, AA genotype は改善群, 不変群ではみられず, 悪化群でのみ認められた。

以上より, vWF (Hph I) 遺伝子多型が糖尿病性腎症の進展に関与している可能性が示唆された。糖尿病性腎症の進展を抑制するためには, 高血圧, 高脂血症, 凝固系亢進を改善することが必要であると考えられた。血糖管理状況や高血圧治療等が糖尿病性腎症の進展抑制に与える効果を評価するためには, さらに長期間にわたって経過を観察することが必要であろう。

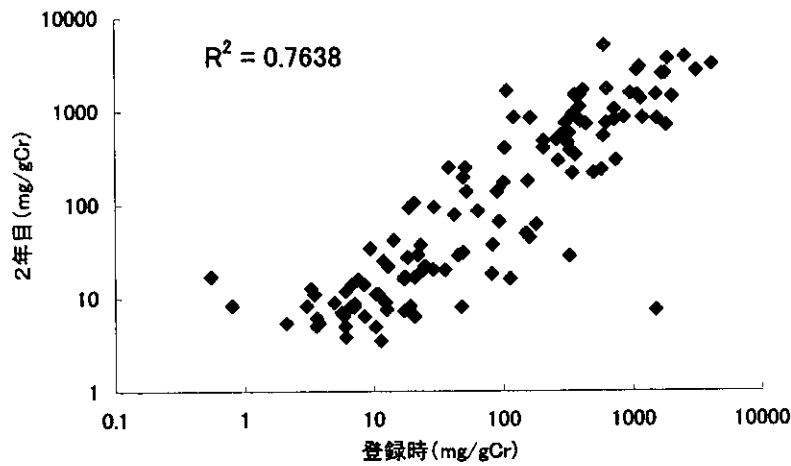
図 尿中アルブミン量(mg/gCr)の関係(登録時, 1年目, 2年目)

a. 登録時と1年目の比較



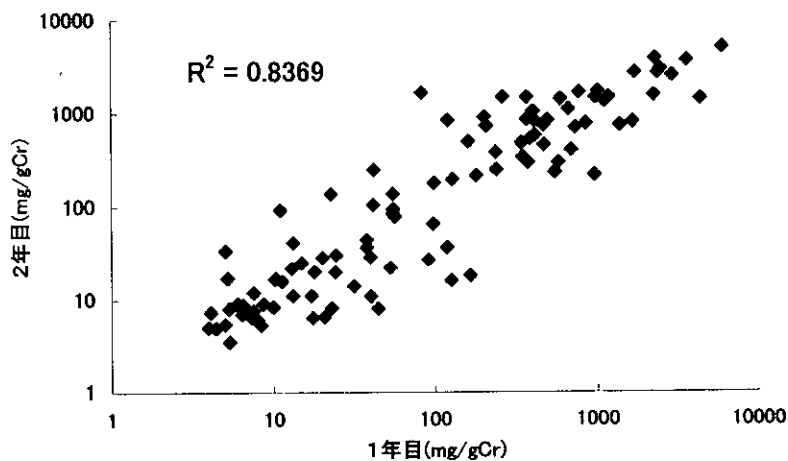
1年目尿中アルブミン量(mg/gCr)の対数値 =  $0.8995 \times (\text{登録時尿中アルブミン量(mg/gCr)の対数値}) + 0.2698$

b. 登録時と2年目の比較



2年目尿中アルブミン量(mg/gCr)の対数値 =  $0.8917 \times (\text{登録時尿中アルブミン量(mg/gCr)の対数値}) + 0.3068$

c. 1年目と2年目の比較



2年目尿中アルブミン量(mg/gCr)の対数値 =  $0.9608 \times (\text{1年目尿中アルブミン量(mg/gCr)の対数値}) + 0.1463$

表1 尿中アルブミン量の経年変化

正常群:尿中アルブミン≦30mg/gCr, 微量アルブミン尿:30-300mg/gCr, 顕性腎症:>300mg/gCr

(1) 登録時と1年目の比較

登録時	1年目			血清クレアチニン ≧2.0mg/dl	透析導入
	N	正常群	微量アルブミン尿		
正常群	71	59	11	1	0
(%)		(83.1)	(15.5)	(1.4)	(0.0)
微量アルブミン尿	46	7	30	9	0
(%)		(15.2)	(65.2)	(19.6)	(0.0)
顕性腎症	58	0	8	41	7
(%)		(0.0)	(13.8)	(70.7)	(12.1)
合計	175	66	49	51	7
(%)		(37.7)	(28.0)	(29.1)	(4.0)

(2) 登録時と2年目の比較

登録時	2年目			血清クレアチニン ≧2.0mg/dl	透析導入
	N	正常群	微量アルブミン尿		
正常群	47	41	6	0	0
(%)		(87.2)	(12.8)	(0.0)	(0.0)
微量アルブミン尿	29	5	16	8	0
(%)		(17.2)	(55.2)	(27.6)	(0.0)
顕性腎症	42	2	3	33	1
(%)		(4.8)	(7.1)	(78.6)	(2.4)
合計	118	48	25	41	3
(%)		(40.7)	(21.2)	(34.7)	(2.5)

(3) 1年目と2年目の比較

1年目	2年目			血清クレアチニン ≧2.0mg/dl	透析導入
	N	正常群	微量アルブミン尿		
正常群	37	32	5	0	0
(%)		(86.5)	(13.5)	(0.0)	(0.0)
微量アルブミン尿	30	9	14	7	0
(%)		(30.0)	(46.7)	(23.3)	(0.0)
顕性腎症	35	0	3	30	1
(%)		(0.0)	(8.6)	(85.7)	(2.9)
合計	102	41	22	37	1
(%)		(40.2)	(21.6)	(36.3)	(1.0)

表2 尿中IV型コラーゲン量の経年変化

正常群:尿中IV型コラーゲン≦7.6μg/gCr, 高値群:>7.6μg/gCr

(1) 登録時と1年目の比較

登録時	1年目			血清クレアチニン ≧2.0mg/dl	透析導入
	N	正常群	高値群		
正常群	106	81	25	0	0
(%)		(76.4)	(23.6)	(0.0)	(0.0)
高値群	61	19	34	7	2
(%)		(31.1)	(55.7)	(11.5)	(3.3)
合計	167	100	59	7	2
(%)		(59.9)	(35.3)	(4.2)	(1.2)

(2) 登録時と2年目の比較

登録時	2年目			血清クレアチニン ≧2.0mg/dl	透析導入
	N	正常群	高値群		
正常群	48	38	10	0	0
(%)		(79.2)	(20.8)	(0.0)	(0.0)
高値群	20	4	12	3	1
(%)		(20.0)	(60.0)	(15.0)	(5.0)
合計	68	42	22	3	1
(%)		(61.8)	(32.4)	(4.4)	(1.5)

(3) 1年目と2年目の比較

1年目	2年目			血清クレアチニン ≧2.0mg/dl	透析導入
	N	正常群	高値群		
正常群	42	34	8	0	0
(%)		(81.0)	(19.0)	(0.0)	(0.0)
高値群	21	4	15	1	1
(%)		(19.0)	(71.4)	(4.8)	(4.8)
合計	63	38	23	1	1
(%)		(60.3)	(36.5)	(1.6)	(1.6)