

200927002A

厚生労働科学研究費補助金  
腎疾患対策研究事業

糖尿病性腎症の病態解明と新規治療法確立のための  
評価法の開発 (H21-腎疾患-一般-002)

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 和田隆志

平成22 (2010) 年3月

## 目次

### I. 総括研究報告

- 糖尿病性腎症の病態解明と新規治療法確立のための評価法の開発 …………… 1  
和田 隆志

### II. 全体研究報告

1. 尿検体収集を伴った糖尿病性腎症レジストリーの運用 …………… 15  
和田 隆志
2. 腎臓病総合レジストリー（糖尿病性腎症）の構築とその解析 …………… 21  
横山 仁 金沢医科大学医学部 腎機能治療学
3. 糖尿病性腎症の臨床病理学的検討 …………… 28  
古市 賢吾 金沢大学附属病院血液浄化療法部

### III. 分担研究報告

#### 【分科会：糖尿病性腎症の病期分類ならびに病態の解析】

1. 糖尿病性腎症の病期分類ならびに病態の解析に関する研究 …………… 31  
羽田 勝計 旭川医科大学
2. 糖尿病性腎症の病態解明と新規治療法確立のための評価法の開発 …………… 34  
—糖尿病性腎症例を対象とした予後，合併症，治療に関する観察研究—  
榎野 博史 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科腎・免疫・内分泌代謝内科学
3. 糖尿病性腎症の病態解明と新規治療法確立のための評価法の開発 …………… 36  
—栃木県のCKD患者（糖尿病性腎症を含む）に関する実態調査票（One day）調査—  
草野 英二 自治医科大学腎臓内科
4. 糖尿病性腎症の病態解明と新規治療法確立のための評価法の開発 …………… 38  
—糖尿病性腎症例を対象とした予後，合併症，治療に関する観察研究—  
鈴木 芳樹 新潟大学保健管理センター

5. 「糖尿病性腎症の病態解明と新規治療法確立のための評価法の開発」に関する研究 …… 40  
加藤 哲夫 福島県立医科大学腎臓高血圧・糖尿病内分泌代謝内科学講座  
佐藤 博亮 福島県立医科大学腎臓高血圧・糖尿病内分泌代謝内科学講座
6. 糖尿病性腎症例を対象とした予後, 合併症, 治療に関する観察研究(メタ解析) … 43  
井関 邦敏 琉球大学医学部附属病院血液浄化療法部  
田仲 秀明 田仲医院
7. 糖尿病患者における GFR 低下と脳卒中発症との関連に関する研究 …… 46  
坊内 良太郎 東京女子医科大学糖尿病センター  
馬場園 哲也 東京女子医科大学糖尿病センター  
岩本 安彦 東京女子医科大学糖尿病センター

**【分科会：糖尿病性腎症の評価のためのバイオマーカー開発】**

1. 糖尿病性腎症の評価のためのバイオマーカー開発に関する研究 …… 49  
湯澤 由紀夫 名古屋大学大学院病態内科学講座腎臓内科
2. 糖尿病性腎症の病態解明と新規治療法確立のための評価法の開発に関する研究 …… 57  
安部 秀斉 徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部病態情報医学講座腎臓内科学
3. 糖尿病腎症のバイオマーカーに関する研究 …… 59  
篁 俊成 金沢大学医薬保健研究域医学系 恒常性制御学

**【分科会：糖尿病性腎症の新規治療法の開発】**

1. 糖尿病性腎症に対する新規治療法の開発に関する研究 …… 71  
奥田 誠也 久留米大学医学部内科学講座腎臓内科部門
2. 糖尿病性腎症の新規治療法の開発に関する研究 …… 79  
古家 大祐 金沢医科大学内分泌代謝制御学

3. “AGEs-DNA aptamer による糖尿病性腎症進展抑制の可能性”に関する研究 ……	82
深水 圭	久留米大学医学部内科学講座腎臓内科部門
4. 糖尿病性腎症に対するケモカイン受容体阻害薬の検討 ……	84
和田 隆志	金沢大学医薬保健研究域医学系血液情報統御学
原 章規	金沢大学附属病院検査部
IV.研究成果の刊行に関する一覧 ……	89
V.研究成果の刊行物・別刷 ……	95
VI.プログラム・抄録集 ……	381

# 総括研究報告書

# 厚生労働省科学研究費補助金（腎疾患対策事業）

## 総括研究報告書

### 糖尿病性腎症の病態解明と新規治療法確立のための評価法の開発

#### 研究代表者

和田 隆志 金沢大学医薬保健研究域医学系血液情報統御学

#### 研究分担者

羽田 勝計 旭川医科大学内科学講座病態代謝内科学分野

槇野 博史 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・免疫・内分泌代謝内科学

草野 英二 自治医科大学内科学講座腎臓内科学部門

鈴木 芳樹 新潟大学保健管理センター

加藤 哲夫 福島県立医科大学医学部腎臓高血圧・糖尿病内分泌代謝内科学講座

湯澤 由紀夫 名古屋大学大学院医学系研究科病態内科学講座腎臓内科学

安部 秀斉 徳島大学医学部・歯学部附属病院検査部

篁 俊成 金沢大学医薬保健研究域医学系恒常性制御学

奥田 誠也 久留米大学医学部内科学講座腎臓内科部門

古家 大祐 金沢医科大学内分泌代謝制御学

#### 研究要旨

糖尿病性腎症は慢性腎臓病の最大の疾患であり、新規透析導入の原因疾患として最も多い。さらに、糖尿病患者は透析療法導入後の生命予後が不良である。したがって、糖尿病とその合併症の克服は厚生労働行政、医学的、社会的ならびに医療経済上の重要な課題であり、その克服は国民の強い願いである。そこで本研究の目的は予後改善にむけて、1) 糖尿病性腎症レジストリーによるデータベース構築、2) 病期分類改訂にむけた取り組み、3) バイオマーカー、新規治療法開発を行うことである。このうち糖尿病性腎症レジストリーが最も必要性が高い。また、最終的な目標は、予後改善を視野に入れ、病態・予後をより反映する糖尿病性腎症の病期分類の改定にむけて取り組むことである。本研究は厚生労働省の関連班研究、日本腎臓学会はじめ関連学会と密接に連携していることが大きな特徴である。さらに、本研究の全体研究として、尿検体収集を伴った糖尿病性腎症レジストリーを構築し、運用を開始したことが初年度の活動の大きな成果である。これは日本腎臓学会が推進しているウェブを用いた腎臓病総合レジストリーシステム（JRBR=Japan Renal Biopsy Registry、JKDR=Japan Kidney Disease Registry）と密接に連携し、本研究の調査研究の推進、データの蓄積を行うこととした。これにより、糖尿病性腎症の現状、病態の把握が可能であり、本邦の糖尿病性腎症のデータベースの基盤が整備された。今後、症例を追加登録し、データベースの拡充をはかるとともに、病態・予後を包括的に検討する。さらに、糖尿病性腎症の病態・予後を反映する病期

分類を目指し、本年度より多施設共同のコホート研究を開始した。本邦を代表するコホートが参加し、これによるメタ解析を主体とする解析準備が進行している。また、本研究では、糖尿病性腎症の評価のためのバイオマーカー開発を行っている。本年度よりすでに有力シーズの検討を開始した。現在、末梢血トランスクリプトーム解析、尿中エクソゾーム解析、尿のメタボローム解析が進行している。今後、シーズの選択・解析を進める予定である。くわえて、糖尿病性腎症の新規治療法の開発も重要な課題である。すでに、本年度よりシーズの検討を開始し、これまでにカロリー制限模倣薬、ケモカイン受容体阻害薬ならびに AGEs-DNA アプタマーの解析が進行している。今後、これらシーズの治療標的としての有用性をさらに検証する予定としている。

#### 研究協力者

井関 邦敏	琉球大学医学部附属病院血液浄化療法部
馬場園 哲也	東京女子医科大学糖尿病センター
原 茂子	虎ノ門病院腎センター
原 章規	金沢大学附属病院検査部
深水 圭	久留米大学医学部内科学講座腎臓内科部門
古市 賢吾	金沢大学附属病院血液浄化療法部
守屋 達美	北里大学病院内分泌代謝内科
山本 格	新潟大学大学院医歯学総合研究科附属腎研究施設
横山 宏樹	自由が丘横山内科クリニック
横山 仁	金沢医科大学腎機能治療学

#### A. 研究目的

本研究では、糖尿病性腎症の診療に関わる腎臓内科医、糖尿病内科医、透析医ならびに先端的研究を展開する基礎研究者からなる学際的な研究組織を構築している。研究分担者ならびに研究協力者全員からなる全体研究に加え、1) 糖尿病性腎症の病期分類ならびに病態の解析分科会（分科会長：羽田）2) 糖尿病性腎症の評価のためのバイオマーカー開発分科会（分科会長：湯澤）、3) 糖尿病性腎症の新規治療法の開発分科会（分科会長：奥田）の3つの分科会から構成されている。それぞれ分担して研究を進めるとともに、本研究の事業全体の全体研究には統合してあたる。

#### (1) 全体研究（尿検体収集を伴った糖尿病性腎症レジストリーの運用）

透析患者は増加の一途をたどっている。透析導入患者の4割以上を占め、透析導入原疾患の第1位を占める糖尿病性腎症の病態解明と予後改善は、透析導入患者を減らすための取り組みとして重要かつ喫緊の課題である。この観点から、早期腎症を含めて糖尿病性腎症のレジストリーを構築し、データベースの基盤を整備することは、有効な予後改善にむけた総合的な取り組みにつながる。このことにより、将来的に糖尿病性腎症例の福音となり、透析医療に費やされている医療費の削減、生命予後の改善をはじめ国民の福祉向上に寄与する可能性がある。以上より、全体研究にお

いて、糖尿病性腎症レジストリーを運用し、本邦のデータベースの基盤を整備し病態・予後を包括的に検討することを目的とする。

## (2) 糖尿病性腎症の病期分類ならびに病態の解析分科会

本分科会では、現在用いられている糖尿病性腎症病期分類（蛋白尿（アルブミン尿）とGFR（Ccr）による分類）とCKDステージ分類（eGFRによる分類）との整合性を検討し、より病態や予後を反映する新たな糖尿病性腎症病期分類への改訂にむけた提言を行う事を目的としている。

## (3) 糖尿病性腎症の評価のためのバイオマーカー開発分科会

トランスクリプトーム解析、尿中エクソソームを用いた糸球体上皮細胞（ポドサイト）関連タンパク解析ならびにメタボローム解析を柱として開発研究を行う。

1) 分科会の全体研究として、既報の糖尿病性腎症の尿バイオマーカーである、CCN2, Collagen IV, Angiotensinogen (AGT), MCP-1, L-FABP の5種類のバイオマーカーを同時に測定可能なシステム開発を行うことを目的とする。

2) トランスクリプトーム解析では、2型糖尿病における生体ストレス・炎症や過栄養、多臓器由来液性因子など多因子ネットワークを解明するため、末梢血単核球(PBMC)を用いて、糖尿病の有無、および高血糖を反映するPBMC発現遺伝子パスウェイを抽出し、それらの意義を検証することを目的とする。

3) 尿中エクソソームを用いた糸球体上皮細胞（ポドサイト）の解析において、ポドサイト内における障害を非侵襲的かつ継続的に評価するマーカーを同定し、侵襲性の高い腎生検によらない、診断かつ予後予測に有用なバイオマーカー測定法を樹

立することを目的とする。

4) オミクス解析法のひとつであるメタボローム解析では、キャピラリー電気泳動装置+質量分析機(CE+MS)による細胞内の全イオン性代謝物(～1k Da)を網羅的かつ高速に直接定量する手法を用い、糖尿病性腎症の病態を反映するバイオマーカーの網羅的解析を行うことを目的とする。

## (4) 糖尿病性腎症の新規治療法の開発分科会

糖尿病性腎症の病期、病態に基づいた新規治療戦略の構築を研究目的とする。

### 1) カロリー制限模倣薬

カロリー制限は線虫からサルを含む哺乳類にいたるまで多くの生物種において寿命延長をもたらすこと、さらに哺乳類においては動脈硬化、悪性疾患などの発症予防効果を有することが知られている。そこで、本研究ではカロリー制限およびその模倣薬により、糖尿病性腎症に対する効果を検証することを目的とする。

### 2) ケモカイン受容体(CCR2)阻害薬

臓器線維化と密接に関連する骨髄由来細胞, fibrocyteはケモカイン・ケモカイン受容体を介して腎線維化に関与する。本研究では、CCR2を介したfibrocyteならびにマクロファージの制御による糖尿病性腎症の治療の可能性を検討することを目的とする。

### 3) AGE-DNA アプタマー

AGEs-DNA アプタマーの投与により、糖尿病性腎症が治療しうるかについて検討する。アプタマーを使用した糖尿病性腎症治療はいままで例がなく、独創的である。また、臨床応用できれば安価に作成でき、経済的にも有用でありこれを包括的に検討することを目的とする。

## B. 研究方法

### (1) 全体研究

尿検体収集を伴った糖尿病性腎症レジストリーの運用（全員）

対象は、非腎生検例も含め、早期腎症から進行した腎症まで幅広く設定し、糖尿病性腎症の全体像をとらえる事とした。その際、尿検体の保存・集約システムも構築し、糖尿病性腎症の臨床・研究の基盤を整備することとした。レジストリーに関しては、日本腎臓学会が構築・運営している腎臓病総合レジストリーを用い、これの二次研究という形で運営する事とした。検体収集に関しては、現時点では測定項目が具体的でないため、各施設において検体管理とし、検体収集の有無をレジストリー内で表示する事とした。

### (2) 糖尿病性腎症の病期分類ならびに病態の解析分科会

（羽田、榎野、草野、鈴木、加藤）

本分科会の研究目的を達するためには、種々の進行度の症例を長期に観察する研究が必要である。本研究では、この問題に対処するため、日本腎臓学会の腎臓病総合レジストリーを用いた前向き研究を開始し、全国的な大規模コホートを作成すべく登録を開始した。くわえて、本分科会では、全国に存在する長期に観察されたコホートの協力を得て、メタ解析をあわせて進める研究を行う。

対象は早期腎症から進行した腎症まで幅広く設定し、糖尿病性腎症の全体像をとらえる事とした。このうち、糖尿病性腎症病期分類とCKDステージ分類との乖離が存在する、蛋白尿が陰性でeGFRが低下した症例、および蛋白尿が多いにも関わらずeGFRが保たれている症例等の予後も検討

することにしている。病期分類を策定するに当たり、病期が反映すべき項目として、蛋白尿・アルブミン尿の進展および糸球体濾過量（GFR）の経時的な進展が基本である。さらに、死亡率および心血管イベントや腎症以外の糖尿病合併症の発症も病期が適切に反映する必要があると考え、これらを主要評価項目とした。試験デザインとしては、多施設共同による事前登録のコホート研究とし、各施設の解析結果を提出してもらい、そのメタ解析を行うこととした。なお、可能な場合には、連結不可能匿名化のうえ、必要なデータ解析することとした。なお、各コホートの倫理委員会の判断を尊重する事とした。

### (3) 糖尿病性腎症の評価のためのバイオマーカー開発分科会

（湯澤、安部、篁）

#### 1) 分科会全体研究

既報の糖尿病性腎症の尿バイオマーカーとして、CCN2 (connective tissue growth factor)、Collagen IV、AGT (Angiotensinogen)、MCP-1、L-FABPを最終候補として選定し、それぞれの特異抗体を購入し、これら5種類のバイオマーカーを同時に測定可能なシステム開発を開始した。測定サンプルは、本年度は、名古屋大学医学部糖尿病研究室および腎臓研究室で採取したサンプルを用いた。

#### 2) トランスクリプトーム解析

同意を得た2型糖尿病患者18名（男10名、女8名、55±17才）、若年健常者16名（男14名、女2名、26±2才）よりPBMCを単離した。PBMCサンプルからantisense RNAを抽出・合成し、約3万遺伝子を搭載したDNAチップを用いて差異のある発現遺伝子およびパスウェイを抽出した。

#### 3) 尿中エクソゾームを用いたpodocyte関連タンパク解析

本研究では、病態の明確な動物モデルお

よび実際の腎生検で確定診断のついたヒトのさまざまな腎疾患において尿中エクソゾームタンパクを抽出し、その解析によって、ポドサイト障害の詳細を分子レベルで明らかにし、腎疾患の非侵襲的診断法の開発にむけて検討した。

#### 4) メタボローム解析

名古屋大学で収集した患者尿サンプルを用いて尿中代謝産物の一斉解析に着手し、その第一段階として患者尿サンプルのメタボローム解析法の分析プロトコールの確立を目指し検討した。さらに、キャピラリー電気泳動-質量分析装置 (CE-MS) を用いて患者尿中の代謝産物を測定できるかパイロットアッセイを行った。

### (4) 糖尿病性腎症の新規治療法の開発分科会

(奥田、古家、和田)

糖尿病性腎症の病期、病態に基づいた新規治療戦略の構築を研究目的とする。初年度は3つのシーズにつき検討を開始している。

#### 1) カロリー制限模倣薬

2型糖尿病モデルマウスであるdb/dbマウスに、摂餌中にレスベラトロール0.3%を添加して8週間飼育した。その後、代謝マーカー、尿アルブミン量、腎組織検査、酸化ストレス、Mn-SOD活性と発現量を検討した。

#### 2) ケモカイン受容体 (CCR2) 阻害薬

CCR2 ノックアウトマウス (CCR2<sup>-/-</sup>群) および対照マウスにストレプトゾトシンを投与し糖尿病性腎症モデルを作成した。作成後、対照マウスには CCR2 阻害薬プロパゲルマニウム (PG<sup>+</sup>群) または対照薬 (PG<sup>-</sup>群) を投与した。投与 16 週後に腎における fibrocyte ならびに単球・マクロファージ数、糸球体硬化・間質線維化

およびそれに関連する分子群、腎機能およびアルブミン尿を検討した。

#### 3) AGE-DNA アプタマー

KK-Ay/Ta マウスと、そのコントロールである C57BL/6j マウスを腎障害 (結節性病変)、尿中 albumin が出現すると思われる 16 週令まで観察する。AGE-DNA アプタマーを 8 週令のマウスに浸透圧ポンプにて持続的に投与し、16 週まで観察しと殺する。血清; AGE-2、ADMA、sRAGE、尿; アルブミン、L-FABP、蛋白、RNA; PEDF、RAGE、VEGF、TGF、CTGF、TNF- $\alpha$ 、免疫染色; AGE-2、8-OHdG にて AGE-DNA アプタマーの効果を検討する。

## C. 研究結果

### (1) 全体研究

尿検体収集を伴った糖尿病性腎症レジストリーの運用

レジストリーの登録する情報内容、検体収集に関する倫理的な問題等に関して、委員間での頻繁なメール交換および3回の全体会議を経て、プロトコールを作成し、運用を開始した。平成 21 年 7 月 22 日に金沢大学での倫理委員会の承認を得た。このプロトコールを日本腎臓学会のホームページに掲載し、広く周知すると共に、各研究分担者および協力者においては、各施設、日本腎臓学会での倫理委員会での審査を進めている。本年度よりこのレジストリーの運用を開始したことが初年度の活動の大きな成果のひとつである。これにより、糖尿病性腎症の現状、病態の把握が可能であり、本邦の糖尿病性腎症のデータベースの基盤が整備された。登録開始は始まったばかりではあるが、平成 22 年 2 月 20 日現在で 50 例の登録が行われており、システムが順調に稼働する事が確認された。なお、

糖尿病性腎症関連登録例としては組織診断確定、代謝性疾患に伴う腎障害あるいはCRF/CKD登録の糖尿病診断有とDM登録から458例(J-RBR334例, J-KDR109例, CRF/CKD登録5例, DM登録10例;男性325例, 女性133例;年齢14~91歳, 平均60.5歳)であった。今後、本研究班の分担研究である、病期分類やバイオマーカー検索、および治療法開発の研究と連携して、本レジストリーが有効に活用されるよう一層の充実をはかる予定である。

## (2) 糖尿病性腎症の病期分類ならびに病態の解析分科会

初年度において、本邦を代表するコホートの協力のもと、全体研究のプロトコールを作成した。特に、情報提供に関する倫理的な問題に十分な配慮を行う点を繰り返し議論した。同時にメタ解析を行うに当たり、統計解析が可能になるように専門的に助言を受けた。これまでに金沢大学での倫理審査が終了し、情報提供施設の倫理審査を経て、今後さらにメタ解析を進める予定である。蛋白尿(アルブミン尿)とGFR(Ccr)を基準に分類されている現行の糖尿病性腎症病期分類、およびeGFRを基準に分類されているCKDステージ分類の両者の優れた点を検証し、より病態、予後を反映する新規病期分類を今後検討する。

## (3) 糖尿病性腎症の評価のためのバイオマーカー開発分科会

### 1) 分科会全体研究

尿中ではCCN2、Collagen IV、AGT、MCP-1、L-FABPを、さらに、血清中では炎症系マーカーとしてIL-6、IL-1 $\beta$ 、CRP、MCP-1、を、内皮障害系マーカーとしてVCAM (vascular cellular adhesion molecules)-1、E-selectin、vWF(von

Willebrand factor)を、凝固系マーカーとしてPAI (plasminogen activator inhibitor)-1、Fibrinogenを、その他としてSerotonin、5-HIAA

(5-hydroxyindole-3-acetic acid)、ADMA (asymmetric dimethylarginine)を、応用可能で簡便・高精度・高再現性なバイオマーカー候補として選定した。

流路型免疫分析チップを用いた尿中バイオマーカー測定の実験的検証の確認に着手した。すなわち、既知の尿中バイオマーカー群からモデルバイオマーカーとして5種類のバイオマーカーを選出し、それらに対する流路型分析チップ内の反応場に固相化する補足用抗体、検出用抗体および検量線作成用の標品を購入して、フィジビリティスタディ用の流路型免疫分析チップの作成に着手した。

### 2) トランスクリプトーム解析

糖尿病の有無で大きく発現変動していたパスウェイの中で、血糖コントロールによって改善したMAPキナーゼ経路(MAPK)を同定した。一方、糖尿病の有無で有意に変動し、血糖コントロールによって変動しないミトコンドリア酸化的リン酸化経路(OXPHOS)を同定した。各々の遺伝子群からP値の低い10遺伝子を選択してアルゴリズムを作成したところ、MAPK経路は血糖コントロール前後を、OXPHOS経路は糖尿病の有無を、80-90%の高い確率で、いずれも有意に診断し得た。さらに、糖尿病状態では、アポトーシス経路を構成する遺伝子群が協調的に発現亢進し、血糖コントロールにより、健常人のパターンに近づいた。このプロファイルの機能的意義を確認するために、単離PBMCを用いて解析した。PBMCの中でもCD14+ Monocyteが選択的にアポトーシス感受性が高まり、遊走能等の機能も低下していることが判明した。

### 3) 尿中エクソゾームを用いたpodocyte 関連タンパク解析

尿中エクソゾーム解析では正常および腎機能低下を伴わないネフローゼではほとんど検出されず、糖尿病性腎症において検出される候補タンパク (X) を同定した。

### 4) メタボローム解析

-30°Cで冷凍保存していた患者尿サンプルを解凍して、500  $\mu$ l を分取し、そこへ内部標準品として L-Methionine sulfone および MES を各々55  $\mu$ M となるように添加した後、5 kDa 以上の分子群をフィルターで除去してから Agilent 社製 CE-MS システムにダイレクトインジェクションして分析した結果、患者尿中の 1 kDa 以下の代謝産物を再現性良く網羅的に一斉測定できることが判明した。

## (4) 糖尿病性腎症の新規治療法の開発分科会

### 1) カロリー制限模倣薬

2型糖尿病性腎症モデルマウスにレスベラトロールを投与して、代謝マーカー、腎組織病変、酸化ストレス、および Mn-SOD に対する効果を非投与群と比較検討した。レスベラトロール投与によって、血糖、脂質異常の改善とともに、尿アルブミン排泄の減少、酸化ストレスの抑制、組織所見の改善がみられた。その分子機構として、糖尿病状態におけるミトコンドリア Mn-SOD の活性低下を、レスベラトロールが改善することを見出した。以上より、レスベラトロールは抗老化作用として、Sirt1 活性化を介することが報告されているが、本研究では、抗酸化作用を Mn-SOD 活性化を介していることが明らかとなった。

### 2) ケモカイン受容体 (CCR2) 阻害薬

本研究において、CCR2 を阻害することにより、糸球体硬化率、間質線維化は低下し

た。CD45 および 1 型コラーゲンの 2 重陽性細胞として同定した fibrocyte は糖尿病腎に浸潤し、その数は PG-群に比して CCR2-/- および PG+群で低下した。腎内マクロファージ数ならびに線維化に関連する分子発現も PG-群に比して CCR2-/- および PG+群で低下した。臨床的には、PG-群に比して CCR2-/- および PG+群でアルブミン尿ならびに腎機能 (尿素窒素、血清クレアチニン値) に改善傾向を認めた。

### 3) AGE-DNA アプタマー

初年度は AGE-DNA アプタマーを作成した。直接腹腔内にアプタマーを投与すると、極度の下痢が生じたため、現在浸透圧ポンプを使用し投与を行っている。その結果、下痢はおきていない。また、血中におけるアプタマーの測定を PCR にて確認中である。さらに、RPTEC を使用した vitro の実験も同時進行している。現在、AGE-DNA アプタマーの投与により、自然発症 2 型糖尿病モデルマウス (KKay/Ta) における尿中アルブミン排泄、腎臓における硬化像などが改善する可能性があるか、検討を進めている。

## D. 考察

### (1) 全体研究

尿検体収集を伴った糖尿病性腎症レジストリーの運用

早期腎症を含めてレジストリーの運用が開始された。この取り組みにより、コホートが形成され、病態把握、治療法開発ならびに予後改善にむけた総合的なシステムの構築につながる可能性がある。今後、一層の拡充をはかることで、生命予後の改善はじめ国民の福祉向上に寄与する可能性があり、その社会貢献度は高いと考える。

## (2) 糖尿病性腎症の病期分類ならびに病態の解析分科会

本邦を代表するコホート研究のメタ解析を中心に検討を進めていくことにより、糖尿病性腎症の病期、病態、合併症、予後等の包括的な理解が深まることが推測される。今後、糖尿病性腎症の病態・予後をより反映する病期分類の改定にむけて取り組みを継続していく。

## (3) 糖尿病性腎症の評価のためのバイオマーカー開発分科会

### 1) 分科会全体研究

本分科会の最終目標は、バイオマーカーのソースを尿に絞り込み、既存のマーカーに加え、現在網羅的に検索中のマーカー群から有望な候補を絞り込み、糖尿病性腎症の予防・治療に貢献可能なパネル化モデルの提唱を行うことである。同時に、この成果を一般臨床に広く応用させるためには、低コスト・ハイスループットなマルチバイオマーカー測定系が必要となるため、この技術開発も合わせて行っていく予定である。

### 2) トランスクリプトーム解析

末梢血単核球における発現遺伝子プロファイルは2型糖尿病患者の病態を映し出す。MAPK 遺伝子群の協調的発現亢進は高血糖による酸化ストレスを反映しうる。一方、OXPHOS 遺伝子群の協調的発現低下は2型糖尿病患者にもとより内在し、発症予知マーカーとなる可能性がある。

### 3) 尿中エクソゾームを用いたpodocyte 関連タンパク解析

糖尿病によるポドサイトの障害は、他の原因によるものと分子機序として異なっていることが、尿中エクソゾーム蛋白のプロファイルの違いにより示唆された。本病態を反映したマーカーは糖尿病性腎症の評価のための非侵襲的バイオマーカーとして有用であると考えられる。

## 4) メタボローム解析

現在、糖尿病性腎症の各病期に特異的な複数のマーカー群が確認されており、糖尿病性腎症の早期診断・予後推測・治療効果予測等を可能とするバイオマーカー検索に有用な手法と考えられる。

## (4) 糖尿病性腎症の新規治療法の開発分科会

### 1) カロリー制限模倣薬

レスベラトロールは抗老化作用として、Sirt1 活性化を介することが報告されている。本研究では、抗酸化作用をMn-SOD 活性化を介していることが明らかとなった。

### 2) ケモカイン受容体(CCR2)阻害薬

本研究では、CCR2 阻害により、fibrocyte ならびに単球・マクロファージ浸潤は減少し腎線維化が抑制された。これらの結果は、fibrocyte が CCR2 を介して腎に浸潤し糖尿病性腎症の進展に関与することを示唆している。今後は、試験管内にて fibrocyte の高血糖および MCP-1 によるサイトカイン・ケモカイン産生能を検討する予定としている。

### 3) AGE-DNA アプタマー

*in vitro* の実験系では AGE-DNA アプタマーの効果は我々の1報のみの報告である。今後の実験結果により AGE-DNA アプタマーが糖尿病性腎症の進展抑制に有用であることを証明し、新たな治療薬として臨床応用していく予定である。

## E. 健康危険情報

なし

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

全体研究：糖尿病性腎症症例のレジストリーの運用

- 1) 横山仁：腎臓病総合レジストリー. 日医雑誌 (2009) 138 (8) : 1570, 2009

分科会：糖尿病性腎症の病期分類ならびに病態の解析

- 1) Shikata K, Haneda M, Koya D, Suzuki Y, Tomino Y, Yamada K, Maeda S, Kawakami N, Uzu T, Nishimura M, Sato C, Ogawa D, Makino H; DNETT-Japan Study Group. Diabetic Nephropathy Remission and Regression Team Trial in Japan (DNETT-Japan): Rationale and study design. *Diabetes Res Clin Pract* 87: 228-232, 2010
- 2) Tamba K, Kusano E, Tabei K, Kajii E, Asano Y. Physicians make different decisions from nephrologists at serum creatinine 2.0 mg/dl. *Clin Exp Nephrol* 13(5):447-51, 2009
- 3) Hosojima M, Sato H, Yamamoto K, Kaseda R, Soma T, Kobayashi A, Suzuki A, Kabasawa H, Takeyama A, Ikuyama K, Iino N, Nishiyama A, Thekkumkara TJ, Takeda T, Suzuki Y, Gejyo F, Saito A. Regulation of megalin expression in cultured proximal tubule cells by angiotensin II type 1A receptor- and insulin-mediated signaling cross talk. *Endocrinology* 150:871-878, 2009
- 4) Koya D, Haneda M, Inomata S, Suzuki Y, Suzuki D, Makino H, Shikata K, Murakami Y, Tomino Y, Yamada K, Araka S, Kashiwagi A, Kikkawa R. Long-term effect of modification of dietary

protein intake on the progression of diabetic nephropathy: a randomised controlled trial. *Diabetologia* 52:2037-2045, 2009

- 5) 鈴木芳樹, 山本佳子: 尿病性腎症の疫学, 新しい診断と治療のABC 糖尿病性腎症, 最新医学社 大阪, 2009;13-23
- 6) Bouchi R, et al. Is a reduced estimated glomerular filtration rate a risk factor for stroke in patients with type 2 diabetes? *Hypertens Res* 32: 381-386, 2009
- 7) 小川大輔, 槇野博史: INNOVATION DATA UPDATE (循環系 第4版) 先端医学社 東京 2009: 270-271
- 8) 小川大輔, 槇野博史 INNOVATION 日本臨床 増刊号 高血圧(第4版)下 日本臨床社 東京 2009: 673-676
- 9) 俵田亮平, 鈴木芳樹: インスリン製剤の注意点と処方例, 腎と透析 腎と透析 増刊号: CKDのすべて 東京医学社 東京 2009; 434-438
- 10) 馬場園哲也, 他. 糖尿病性腎症病期とCKD ステージの使い分け. 腎と透析 67:173-177, 2009

分科会：糖尿病性腎症の評価のためのバイオマーカー開発

- 1) Kosugi T, Heinig M, Nakayama T, Connor T, Yuzawa Y, Li Q, Hauswirth WW, Grant MB, Croker BP, Campbell-Thompson M, Zhang L, Atkinson MA, Segal MS, Nakagawa T. Lowering blood pressure blocks mesangiolysis and mesangial nodules, but not tubulointerstitial injury, in diabetic eNOS knockout mice. *American Journal of Pathology* 174(4):1221-1229, 2009

- 2) Hobo A, Yuzawa Y, Kosugi T, Kato N, Asai N, Sato W, Maruyama S, Ito Y, Kobori H, Ikematsu S, Nishiyama A, Matsuo S, Kadomatsu K. Regulation of the renin-angiotensin system by the growth factor midkine. *Journal of Clinical Investigation* 119 (6): 1616-1625, 2009
- 3) Kosugi T, Nakayama T, Heinig M, Zhang L, Yuzawa Y, Sanchez-Lozada LG, Roncal C, Johnson RJ, Nakagawa T. Effect of lowering uric acid on renal disease in the Type 2 diabetic db/db mice. *American Journal of Physiology Renal Physiology* 297: F481-484, 2009
- 4) Ishikura K, Takamura T, Takeshita Y, Nakagawa A, Imaizumi N, Misu H, Taji K, Kasahara K, Oshinoya Y, Suzuki S, Ooi A, Kaneko S: Cushing's syndrome and big IGF-II-associated hypoglycaemia in a patient with adrenocortical carcinoma. *BMJ Case Reports*, in press
- 5) Hamaguchi E, Takamura T, Sakurai M, Mizukoshi E, Zen Y, Takeshita Y, Kurita S, Arai K, Yamashita T, Sasaki M, Nakanuma Y, Kaneko S: Histological course of nonalcoholic fatty liver disease in Japanese patients: tight glycemic control, rather than weight reduction, ameliorates liver fibrosis. *Diabetes Care* 33:284-286, 2010
- 6) Ando H, Ushijima K, Kumazaki M, Takamura T, Yokota N, Saito T, Irie S, Kaneko S, Fujimura A: Influence of age on clock gene expression in peripheral blood cells of healthy women. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 65:9-13, in press
- 7) Sakurai M, Takamura T, Miura K, Kaneko S, Nakagawa H: Middle-aged Japanese women are resistant to obesity-related metabolic abnormalities. *Metabolism* 58:456-459, 2009
- 8) Sakurai M, Miura K, Takamura T, Ishizaki M, Morikawa Y, Nakamura K, Yoshita K, Kido T, Naruse Y, Kaneko S, Nakagawa H: J-shaped relationship between waist circumference and subsequent risk for Type 2 diabetes: an 8-year follow-up of relatively lean Japanese individuals. *Diabet Med* 26:753-759, 2009
- 9) Nakamura S, Takamura T, Matsuzawa-Nagata N, Takayama H, Misu H, Noda H, Nabemoto S, Kurita S, Ota T, Ando H, Miyamoto K, Kaneko S: Palmitate induces insulin resistance in H4IIEC3 hepatocytes through reactive oxygen species produced by mitochondria. *J Biol Chem* 284:14809-14818, 2009
- 10) Komura T, Sakai Y, Honda M, Takamura T, Matsushima K, Kaneko S: CD14+ monocytes are vulnerable and functionally impaired under ER stress in patients with type 2 diabetes. *Diabetes*, 2009 Dec 3. [Epub ahead of print]
- 11) Ando H, Ushijima K, Yanagihara H, Hayashi Y, Takamura T, Kaneko S, Fujimura A: Clock gene expression in the liver and adipose tissues of non-obese type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats. *Clin Exp Hypertens* 31:201-207, 2009
- 12) Ando H, Takamura T, Matsuzawa-Nagata

- N, Shima KR, Nakamura S, Kumazaki M, Kurita S, Misu H, Togawa N, Fukushima T, Fujimura A, Kaneko S: The hepatic circadian clock is preserved in a lipid-induced mouse model of non-alcoholic steatohepatitis. *Biochem Biophys Res Commun* 380:684-688, 2009
- 13) Ando H, Takamura T, Matsuzawa-Nagata N, Shima KR, Eto T, Misu H, Shiramoto M, Tsuru T, Irie S, Fujimura A, Kaneko S: Clock gene expression in peripheral leucocytes of patients with type 2 diabetes. *Diabetologia* 52:329-335, 2009
- 14) Sakurai M, Takamura T, Miura K, Kaneko S, Nakagawa H: Abnormal liver function tests and metabolic syndrome--is fatty liver related to risks for atherosclerosis beyond obesity? *Intern Med* 48:1573-1574, 2009
- 15) 篁 俊成, TeamDiET: 相談コーナー・せんせい教えてください 「糖尿病を持っている人は、コーヒーをどのくらい飲んでいいのでしょうか」。日本糖尿病協会誌「さかえ」 49:22, 2009
- 16) 篁 俊成, TeamDiET: ほんの少しから始めよう 食事のヒント20. 日本糖尿病協会誌「さかえ」 49:38-43, 2009
- 17) 篁 俊成, TeamDiET: 特別企画 あなたの手帳を見せてください. 日本糖尿病協会誌「さかえ」 49:18-23, 2009
- 18) 篁 俊成: 肝脂肪化-炎症-インスリン抵抗性のリンク. *日本内科学会雑誌* 98:206-212, 2009
- 19) 篁 俊成: 糖尿病からみた肝障害. *Medicament News*:11-13, 2009
- 20) 篁 俊成:  $\alpha$ 細胞機能. *Islet Equality* 1:15-19, 2009
- 21) 竹下有美枝, 篁 俊成: NASHとインスリン抵抗性. *Vascular Medicine* 5:82-85, 2009
- 22) 竹下有美枝, 篁 俊成: 速効型インスリンから超速効型インスリンへの変更メリットは. *Diabetes Frontier* 20:174-178, 2009
- 23) 竹下有美枝, 篁 俊成: 1型糖尿病におけるインスリン複数回注射療法 (グルルギン1回+リスプロ3回注射) とCS II (リスプロ) の比較: 多施設無作為並行群間試験. *プラクティス* 26:539-543, 2009
- 24) 篁 俊成: 内分泌・代謝系 糖尿病治療薬. In ナーシングムック56「みてわかる 薬の作用メカニズム&服薬指導」藤村昭夫, Ed. 東京, 学研メディカル秀潤社, 2009
- 25) 金沢大学附属病院Team DiET. 金沢大学附属病院Team DiET式ランチョンマット法 満腹ダイエットレシピ. 第1版. 金沢: 北國新聞社, 2009: 1-84.
- 26) 御簾博文, 篁 俊成: 活性酸素がインスリンシグナル伝達に与える影響とその二面性. 病態解明に迫る活性酸素シグナルと酸化ストレス—癌、神経変性疾患、循環・代謝異常にかかわるレドックス制御機構と最新の技術開発—谷口直之, 赤池孝章, 鈴木敬一郎, 内田浩二, Eds. 東京, 羊土社, 2009, p. 212-217
- 分科会: 糖尿病性腎症の新規治療法の開発
- 1) Kume S, Uzu T, Kashiwagi A, Koya D. SIRT1, a Calorie Restriction Mimetic, in a New Therapeutic Approach for Type 2 Diabetes Mellitus and Diabetic Vascular Complications. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 2010 in press

- 2) Araki S, Matsuno H, Haneda M, Koya D, Kanno Y, Itho J, Kishi A, Isshiki K, Sugimoto T, Maegawa H, Kashiwagi A, Uzu T. Correlation between albuminuria and spontaneous platelet microaggregate formation in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care*. 32 2062-7, 2009
- 3) Koya D, Haneda M, Inomata S, Suzuki Y, Suzuki D, Makino H, Shikata K, Murakami Y, Tomino Y, Yamada K, Araki SI, Kashiwagi A, Kikkawa R; Low-Protein Diet Study Group. Long-term effect of modification of dietary protein intake on the progression of diabetic nephropathy: a randomised controlled trial. *Diabetologia* 52 2037-45, 2009
- 4) Kei Fukami, Sho-ichi Yamagishi, Seiya Okuda. Development of enzyme-linked immunosorbent assay system for PEDF and its clinical utility. In press 2010
- 5) Yoshida Y, Yamagishi S, Matsui T, Jinnouchi Y, Fukami K, Imaizumi T, Yamakawa R. Protective role of pigment epithelium-derived factor (PEDF) in early phase of experimental diabetic retinopathy. *Diabetes Metab Res Rev* 25:678-86, 2009
- 6) Nagano M, Fukami K, Yamagishi S, Ueda S, Kaida Y, Matsumoto T, Yoshimura J, Hazama T, Takamiya Y, Kusumoto T, Gohara S, Tanaka H, Adachi H, Okuda S. *Am J Nephrol*. Circulating matrix metalloproteinase-2 is an independent correlate of proteinuria in patients with chronic kidney disease. 29:109-15. 2009
- 7) Matsui T, Yamagishi SI, Takeuchi M, Ueda S, Fukami K, Okuda S. Irbesartan inhibits advanced glycation end product (AGE)-induced proximal tubular cell injury in vitro by suppressing receptor for AGEs (RAGE) expression. *Pharmacol Res*. 25. 2009
- 8) Nakamura T, Sato E, Fujiwara N, Kawagoe Y, Ueda Y, Suzuki T, Yamada S, Takeuchi M, Fukami K, Ueda S, Adachi H, Matsui T, Okuda S, Yamagishi SI. Positive association of serum levels of advanced glycation end products and high mobility group box-1 with asymmetric dimethylarginine in nondiabetic chronic kidney disease patients. *Metabolism*. 3. 2009
- 9) Jones LK, O'Sullivan KM, Semple T, Kuligowski MP, Fukami K, Ma FY, Nikolic-Paterson DJ, Holdsworth SR, Kitching AR. IL-1RI deficiency ameliorates early experimental renal interstitial fibrosis. *Nephrol Dial Transplant*. 24:3024-32. 2009.
- 10) Coughlan MT, Thorburn DR, Penfold SA, Laskowski A, Harcourt BE, Sourris KC, Tan AL, Fukami K, Thallas-Bonke V, Nawroth PP, Brownlee M, Bierhaus A, Cooper ME, Forbes JM. RAGE-Induced Cytosolic ROS Promote Mitochondrial Superoxide Generation in Diabetes. *J Am Soc Nephrol*. 20:742-52, 2009
- 11) Matsui T, Yamagishi S, Takeuchi M, Ueda S, Fukami K, Okuda S. Nifedipine, a calcium channel blocker, inhibits advanced glycation end product (AGE)-elicited mesangial cell damage by suppressing AGE recepto

r (RAGE) expression via peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  activation. *Biochem Biophys Res Commun.* 385:269-72. 2009

- 12) Koya D, Haneda M, Inomata S, Suzuki Y, Suzuki D, Makino H, Shikata K, Murakami Y, Tomino Y, Yamada K, Araki SI, Kashiwagi A, Kikkawa R; Low-Protein Diet Study Group. Long-term effect of modification of dietary protein intake on the progression of diabetic nephropathy: a randomised controlled trial. *Diabetologia* 52:2037-45, 2009
- 13) 古家大祐: メタボリックシンドローム-肥満, CKDのすべて 東京医学社 東京 2009: 413-416
- 14) 古家大祐: 糖尿病性腎症, 専門医のための腎臓病学 第2版 医学書院 東京 2009:490-499
- 15) 坂井宣彦、和田隆志:線維化関連細胞: Fibrocyte 医学の歩み 228, 1193-1194, 2009

## 2. 学会発表

全体研究:糖尿病性腎症症例のレジストリーの運用

- 1) 横山仁, 田口尚, 杉山斉, 榎野博史: 腎臓病総合レジストリーシステムについて 日本腎臓学会誌 (2009) 51 (3) : 229, 2009 (学会報告抄録)
- 2) 今井圓裕: 日本ネフローゼ症候群コホート研究. 日本腎臓学会誌 (2009) 51 (3) : 221, 2009 (学会報告抄録)

分科会:糖尿病性腎症の病期分類ならびに病態の解析

- 1) Hiroaki Satoh, Shintaro Nakamaki, Akihiro Kudoh, Hiroyuki Hirai,

Satoru Yamazaki, Yoshiyuki Sugaya, Koji Hasegawa, Makoto Fujiwara, Miyuki Honma, Shinichi Nakajima, Sanae Midorikawa, Tsuyoshi Watanabe. Adenovirus-mediated chronic expression of adiponectin improves early stage diabetic nephropathy in STZ induced diabetic Wistar rats. (784-P) 69th American Diabetes Association Scientific Sessions. (2009. 06. 05-09 in New Orleans, LA.)

- 2) 佐藤博亮、平井裕之、工藤明宏、中牧慎太郎、長谷川浩司、藤原淳、本間美優樹、中嶋真一、緑川早苗、渡辺毅. “アディポネクチンのSTZ糖尿病ラットにおける蛋白病減少効果とその機序の検討” 第13回日本心血管内分泌代謝学会学術総会(2009. 10. 23-24、さいたま市)

分科会:糖尿病性腎症の評価のためのバイオマーカー開発

- 1) Toshinari Takamura, Hirofumi Misu, Shuichi Kaneko: Clinical and molecular pathology of type 2 diabetic liver. The 15th Korea-Japan Symposium on Diabetes Mellitus シンポジウム. Jeju. 2009年11月20-21日
- 2) 篁 俊成, 御簾博文, 金子周一: 2型糖尿病患者の病態と酸化的リン酸化遺伝子群の協調的発現異常. 第52回日本糖尿病学会年次学術集会 シンポジウム. 大阪. 2009年5月 (糖尿病 2009; 52 (Suppl. 1): S-39に掲載)
- 3) 篁 俊成: 糖尿病学と肝臓病学の接点としての非アルコール性脂肪性肝疾患. 第52回日本糖尿病学会年次学術集会 教育講演. 大阪. 2009年5月 (糖尿病 2009; 52 (Suppl. 1): S-101に掲載)

分科会：糖尿病性腎症の新規治療法の開発

1) The 9th World Congress on  
Inflammation GA07.20 Involvement of  
fibrocytes in diabetic kidney  
injury in streptozotocin-treated  
mice. Akinori Hara, Norihiko Sakai,  
Kiyoki Kitagawa, Kengo Furuichi,  
Shuichi Kaneko, Takashi Wada 平成  
21年7月7日 於東京

2) 第21回日本糖尿病性腎症研究会 一般  
演題10. 糖尿病性腎症に進展におけ  
る fibrocyte の関与 原章規、山内博  
行、北川清樹、坂井宣彦、古市賢吾、  
和田隆志 平成21年12月5日 於東  
京

G. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

謝辞

本研究を遂行するにあたり、厚生労働省、  
分担研究者、協力研究者、レジストリー登  
録にご協力頂きました皆様に深甚なる謝  
意を表します。

【全体研究：尿検体収集を伴った糖尿病性腎症  
レジストリーの運用】