

厚生労働科学研究費補助金（腎疾患対策研究事業）
分担研究報告書

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
—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—

研究分担者

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

研究要旨

糖尿病性腎症患者の総合的な症例登録システムに登録するために，岡山大学病院に通院している該当患者への説明文書と同意文書を作成した。また，岡山大学大学院医歯薬学総合研究科倫理委員会に倫理審査を申請し，承認を得た。今後は，平成 22 年 12 月 31 日までに，ウェブ上のシステムに該当症例を新規登録する。

A. 研究目的

糖尿病性腎症（腎症）患者の実態把握，病態の解析および予後改善はいまだ不十分である。腎症例を対象とした予後，合併症，治療に関する観察研究として，全ての病期の腎症の総合的な症例登録システム（レジストリー）を構築することにより，コホートを形成する。適格症例を登録し，経年的な臨床情報を追跡して，腎症に関する以下の項目を評価する。主要評価項目は，蛋白尿・アルブミン尿あるいは糸球体濾過量（GFR）による経時的な腎障害進展，病期別死亡，心血管イベントや腎症以外の糖尿病合併症の発症である。副次的評価項目は，腎機能障害進展に関するリスク因子解析，治療目標達成度である。これらにより，①予後と合併症の実態解析，②早期腎症，病

期分類に関する新たな提言，③現在行われている治療，生活指導の効果の評価を目的とする。

B. 研究方法

20 歳以上の腎症発症前の症例および糖尿病性腎症第 1 期から第 5 期の症例を対象とする。除外基準は，20 歳未満の症例，1 型糖尿病の症例，二次性糖尿病の症例（ステロイド投与例，クッシング症候群など），糖尿病性腎症以外の明らかな腎疾患を有する場合である。岡山大学病院（腎臓・糖尿病・内分泌内科）で実施する。

（倫理面への配慮）

人権および個人情報については，GCP，ヘルシンキ宣言，臨床研究に関する倫理指針に準拠する。主任研究者

は、患者から試験参加の同意を得るために用いる説明文書及び同意文書を作成する。また、被験者の同意に関連し得る新たな情報を入手した場合等、説明文書及び同意文書を改訂する必要があると認めた場合は、これらを改訂する。被験者により同意の撤回があった場合、その他主治医が試験続行困難と判断した場合は、その症例の試験を中止する。患者の個人情報、研究症例番号により連結可能匿名化する。登録の際に使用する対応表は、情報登録の終了後は専用キャビネットで施錠して保管する。

C. 結果

研究のための症例登録のために、患者への説明文書と同意文書を作成した。

D. 考察

登録するための腎症患者は、当該診療科である岡山大学病院内科外来（腎臓・糖尿病・内分泌内科）では、第1期から第5期までの患者を診療対象としている。今後は、選択基準に該当する症例の中から、十分な説明を行って同意を得て、また、他の臨床研究とも重複しないように、新規症例として登録することが可能となった。

E. 結論

腎症患者の総合的な症例登録システムに登録するために、患者への説明文書と同意文書を作成した。また、岡山大学大学院医歯薬学総合研究

科倫理委員会に倫理審査を申請し承認を得た。今後は、ウェブ上のシステムに該当症例を新規登録するとともに、本学の関連施設にも本システムを周知して新規登録を推進する。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

別紙

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（腎疾患対策研究事業）
分担研究報告書

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
—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—

研究分担者

草野英二 自治医科大学腎臓内科

研究要旨

この調査は栃木県下の病院および診療所に対し、入院・外来で診察されているCKD患者(糖尿病性腎症を含む)の実態を平成22年2月のある1日(One day)にしぼって調査し、今後の問題点の抽出、対応等の研究等を行うことを目的に調査を行うものである。今後、栃木県にどの程度のCKD患者(糖尿病性腎症を含む)が存在し、病診連携を効果的に行うための基礎資料とする。この研究は栃木県医師会と栃木県病院協会の協力のもとに行う。

A. 研究目的

栃木県においてはCKD患者の実態調査はこれまで行われていなかったが、県医師会と病院協会の協力のもと行なうことになった。糖尿病性腎症(腎症)を含むCKD患者の実態把握、病態の解析および予後改善は栃木県ではいまだ不十分である。従って、今回の調査により県全体にCKDの患者がどのように分布し病診連携を如何に構築するかが問題である。糖尿病性腎症例に関してもその分布が把握できれば、効果的な病診連携関係も構築できるし、その病態、予後、合併症、治療に関しても検討が可能となる。この調査を通して今後糖尿病性腎症例をピックアップして観察研究として、全ての病期の腎症の総合的な症例登録システム(レジストリー)を構築し

たいと考えている。

B. 研究方法

栃木県下の病院および診療所に対し、入院・外来で診察されているCKD患者(糖尿病性腎症を含む)の実態を平成22年2月のある1日(One day)にしぼって調査し、実態調査を行う。CKD患者の中で糖尿病性腎症に関しては、別に病期分類、糖尿病のコントロールの良否、合併症の有無について調査する。

(倫理面への配慮)

今回は匿名での調査であり、倫理面での配慮はしていない。

C. 結果

アンケート用紙はすでに回収して

おり、今後結果を解析する予定である。

D. 考察、E. 結論

アンケート調査を解析して、問題点が抽出できたら、糖尿病性腎症の病態、予後、合併症、治療に関する検討に進む予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

2つ

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（腎疾患対策研究事業）
分担研究報告書

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
—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—

研究分担者

鈴木芳樹 新潟大学保健管理センター

研究要旨

糖尿病性腎症患者の総合的な症例登録システムに登録するために，新潟大学医歯学総合病院に通院している該当患者への説明文書と同意文書を作成した。また，新潟大学医学部倫理審査委員会に倫理審査を申請し，承認を得た。さらに，新潟大学利益相反マネジメント委員会に利益相反自己申告を行い，承認を得た。今後は，平成22年12月31日までに，ウェブ上のシステムに該当症例を新規登録する。また，本学の関連施設にも本システムを周知し，新規登録を推進する。

A. 研究目的

糖尿病性腎症（腎症）患者の実態把握，病態の解析および予後改善はいまだ不十分である。腎症例を対象とした予後，合併症，治療に関する観察研究として，全ての病期の腎症の総合的な症例登録システム（レジストリー）を構築することにより，コホートを形成する。適格症例を登録し，経年的な臨床情報を追跡して，腎症に関する以下の項目を評価する。主要評価項目は，蛋白尿・アルブミン尿あるいは糸球体濾過量（GFR）による経時的な腎障害進展，病期別死亡，心血管イベントや腎症以外の糖尿病合併症の発症である。副次的評価項目は，腎機能障害進展に関するリスク因子解析，治療目標

達成度である。これらにより，①予後と合併症の実態解析，②早期腎症，病期分類に関する新たな提言，③現在行われている治療，生活指導の効果の評価を目的とする。

B. 研究方法

20歳以上の腎症発症前の症例および糖尿病性腎症第1期から第5期の症例を対象とする。除外基準は，20歳未満の症例，1型糖尿病の症例，二次性糖尿病の症例（ステロイド投与例，クッシング症候群など），糖尿病性腎症以外の明らかな腎疾患を有する場合である。新潟大学医歯学総合病院内科外来（第二内科）で実施する。

(倫理面への配慮)

人権および個人情報については、GCP、ヘルシンキ宣言、臨床研究に関する倫理指針に準拠する。主任研究者は、患者から試験参加の同意を得るために用いる説明文書及び同意文書を作成する。また、被験者の同意に関連し得る新たな情報を入手した場合等、説明文書及び同意文書を改訂する必要があると認めた場合は、これらを改訂する。被験者により同意の撤回があった場合、その他主治医が試験続行困難と判断した場合は、その症例の試験を中止する。患者の個人情報は、研究症例番号により連結可能匿名化する。登録の際に使用する対応表は、情報登録の終了後は専用キャビネットで施錠して保管する。

C. 研究結果

研究のための症例登録のために、患者への説明文書と同意文書を作成した。また、倫理審査および利益相反自己申告を行い、新潟大学の該当委員会から承認を得た。

D. 考察

登録するための腎症患者は、当該診療科である新潟大学医歯学総合病院内科外来（第二内科）では、第1期から第5期までの患者を診療対象としている。今後は、選択基準に該当する症例の中から、十分な説明を行って同意を得て、また、他の臨床研究とも重複しないように、新規症例として登録することが可能となった。

E. 結論

腎症患者の総合的な症例登録システムに登録するために、患者への説明文書と同意文書を作成した。また、新潟大学倫理審査委員会に倫理審査を申請し承認を得た。さらに、新潟大学利益相反マネジメント委員会に利益相反自己申告を行い承認を得た。今後は、ウェブ上のシステムに該当症例を新規登録するとともに、本学の関連施設にも本システムを周知して新規登録を推進する。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表
別紙
2. 学会発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金（腎疾患対策研究事業）
分担研究報告書

「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」に関する
研究

研究分担者

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

研究要旨

糖尿病性腎症の発症・進展には、インスリン抵抗性が深く関連していると考えられる。インスリン抵抗性に深く関与しているアディポネクチンが、糖尿病性腎症の発症・進展に関しても重要な役割を果たしていると考え、アディポネクチンが糖尿病性腎症の発症・進展抑制に果たす役割を解明することを目的として、最初にストレプトゾトシン（STZ）糖尿病モデルラットを用いて検討した。STZ 糖尿病モデルラットにアデノウイルスを用いてアディポネクチンを過剰発現させたラットにおいて、1) 蛋白尿の減少、2) その腎皮質における TGF β mRNA の発現の減少及び nephrin mRNA の発現の増加、3) その腎皮質における eNOS mRNA の発現の増加及び iNOS, ET-1, PAI-1 mRNA の減少、を新たに確認し、アディポネクチンの糖尿病腎症進展抑制機序を解明した。

A. 研究目的

アディポネクチンがインスリン抵抗性改善や抗動脈硬化作用を有することが知られている。アディポネクチン受容体は腎臓にも発現していることが報告されている。アディポネクチンが糖尿病性腎症の発症・進展に関与しているかどうかを検討するために、最初に糖尿病動物モデルを用いて検討した。

後に血糖測定し血糖値350mg/dlのラットを実験に用いた。STZ投与10週間後にアディポネクチンアデノウイルスベクター(Ad-Adipo)もしくはAd-LacZを尾静脈より注射した。アデノウイルス投与2週間後に、metabolic cageを用いて尿蛋白量を測定した。さらに腎皮質からRNAを抽出し、関連遺伝子の発現をQRT-PCR解析にて検討した。

B. 研究方法

Wistarラット(雄, 6週齢)にSTZ(80mg/dl)を腹腔内注射し、2日

C. 研究結果

Ad-Adipo ラット群では、コントロール群と比較して、体重、空腹時血糖

値、空腹時インスリン値及び血清クレアチニン値に有意差を認めなかったが、尿蛋白量は約 24%有意に減少($P < 0.05$)し、糖尿病性腎症の改善効果を認めた。また、Ad-Adipo ラット群では、腎皮質における TGF- β の発現が約 32%有意に減少し($P < 0.01$)、neph rin の発現が約 68%有意に増加し($P < 0.01$)、腎糸球体硬化の抑制、上皮細胞の改善が認められた。さらに Ad-Adipo ラット群では、腎皮質における ET-1, PAI-1 の発現が約 33%($P < 0.01$)、約 34%($P < 0.01$)、有意に減少し、eNOS の発現は約 2 倍($P < 0.01$)に増加し、腎皮質の血管内皮の改善効果も認めた。

D. 考察

アディポネクチン蛋白を過剰発現させることにより、尿蛋白量は減少し、糖尿病性腎症の進展を抑制することが示唆された。その分子機序を解明するために、摘出腎の皮質部分から RNA を抽出し、関連因子の mRNA 発現を検討した。

間質線維化因子である TGF- β mRNA の発現を減少させ、糸球体での蛋白透過を抑制する neph rin mRNA の発現を増加させ、さらに、血管内皮機能増悪因子である iNOS, ET-1, PAI-1 mRNA を減少させ、血管弛緩因子である eNOS mRNA の発現を増加させることにより、糖尿病性腎症の進展を抑制していると考えられる。さらにそれは AdipoR1 を介している可能性

が示唆された。

E. 結論

アディポネクチンは、種々血管内皮分泌因子の改善により腎間質線維化を抑制し、上皮細胞を保護することにより糖尿病性腎症の進展を抑制することが考えられる。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

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)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（腎疾患対策研究事業）
分担研究報告書

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）

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
研究協力者 田仲 秀明 田仲医院

研究要旨：

沖縄県下の糖尿病専門クリニック（田仲医院）に通院中の2型糖尿病患者867例（男504、女363）、平均年齢59.1才、平均eGFR 76.2ml/min/1.73m²のコホートを作成した。登録期間は2005年9月開院より2007年11月の27カ月間。登録時の試験紙法による蛋白尿（-）75.1%、（±）15.2%、（1+）4.6%、（2+）2.5%、（≥3+）2.5%、eGFRではステージ1, 2, 3～5の順に22.7%、55.9%、21.3%であった。微量アルブミン尿検査の結果は全体（およびCKDステージ3～5）で正常 70.1%（53.5%）、ミクロ 20.0%（25.4%）、マクロ 9.9%（21.1%）で、正常アルブミン尿であるにも関わらず約半数に患者がeGFRの低下（<60ml/min/1.73m²）を認めた。2009年度末まで通算52カ月のアウトカム（死亡、透析導入、eGFR低下）を調査している。

A. 研究目的

世界的に糖尿病性に起因する透析患者が増加の一途をたどっている。本邦においても糖尿病性腎症は1998年以降、慢性血液透析導入の原因疾患の第1位である。2007年には新規血液透析導入患者約38,000人のうち43%を占めた。透析導入後も糖尿病患者の予後は極めて不良である。したがって、糖尿病ならびに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る。沖縄県は本邦においても有数の糖尿病による透析導入の多発地域である。糖尿病患者のコホートを作成し、経過観察・予後を他の地域と比較検討する。

B. 研究方法

沖縄県下の糖尿病クリニック（田仲医院）の患者データベース（TIIDA: Tanaka Iin Diabetes Ambulatory

Patients Registry）を構築する。2005年9月開院より2007年11月（27カ月）にて治療中のDM患者を登録した。原則として全員、血清クレアチニンおよび微量アルブミン尿（試験紙法で陰性または1+の患者を対象）を測定し、定期的に観察を行う。

（倫理面への配慮）

本研究は、ヘルシンキ宣言（2008年改訂版）に基づく倫理的原則、並びに本研究実施計画書を遵守し、さらに臨床研究に関する倫理指針、「臨床研究に関する倫理指針」（平成20年厚生労働省告示第415号）を遵守して実施する。個人の特定ができない数値化されたデータベースを用いる。また琉球大学倫理委員会による審査、承認の後、実施する。

C. 研究結果

登録した2型DM患者は867例（男504、女363）、年齢59.1（SD 11.4

才、eGFR 76.2 (21.1) ml/min/1.73m² (22.5~232.4) (表1)。検尿結果では (-) 75.1%, (±) 15.2%, (1+) 4.6%, (2+) 2.5%, (≥3+) 2.5%、eGFRではステージ1, 2, 3~5の順に22.7%, 55.9%, 21.3%であった。微量アルブミン尿検査の結果は全体(およびCKDステージ3~5)で正常70.1% (53.5%)、ミクロ20.0% (25.4%)、マクロ9.9% (21.1%)で、正常アルブミン尿であるにも関わらず約半数の患者がeGFRの低下 (<60ml/min/1.73m²) を認めた(図1)。レニン・アンジオテンシン系(RAS)抑制薬の使用は登録時49.5%であり、使用者の方に蛋白尿陽性者が多い傾向にあった(図2)。現在、2009年度末(52カ月)まで観察期間を延長し、アウトカム(死亡、透析導入など)を調査している。

表1. 登録時データ (N=867)

Variables	Mean (SD)	range
Age, years	59.1 (11.4)	15 - 91
Men, %	504 (58.1%)	
Body mass index, kg/m ²	26.6 (4.2)	18.2 - 62.2
Abdominal circumference, cm	92.9 (10.4)	65.5 - 156.0
Systolic blood pressure, mmHg	128.8 (14.6)	86 - 204
Diastolic blood pressure, mmHg	74.3 (10.4)	47 - 114
Serum creatinine, mg/dl	0.8 (0.2)	0.32 - 2.02
eGFR, ml/min/1.73m ²	76.2 (21.1)	22.5 - 232.4
Uric acid, mg/dl	5.3 (1.3)	0.5 - 10.2
Total cholesterol, mg/dl	201.5 (37.2)	93 - 642
Triglyceride, mg/dl	201.2 (217.9)	20 - 4023
Fasting blood glucose, mg/dl	182.5 (79.4)	70 - 637
Hemoglobin A1c, %	7.5 (1.6)	4.9 - 14.9
Hematocrit, %	38.0 (5.7)	29.0 - 50.9
Hemoglobin, g/dl	12.4 (2.2)	8.4 - 17.3
Albuminuria, mg/g creatinine	32.8 (77.6)	0 - 908

図1. 腎機能別の微量アルブミン尿の頻度

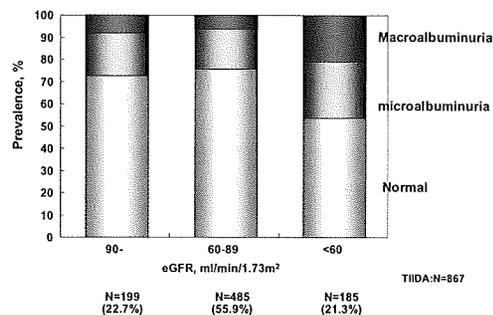
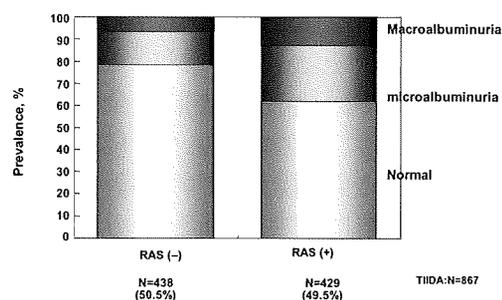


図2. RAS抑制薬使用の有無と微量アルブミン尿



D. 考察

微量アルブミン尿を伴わない低GFR患者の病態は不明である。eGFRの低下にはRAS抑制薬の関与および何らかの間質障害などが考えられる。今後、アウトカムとの関連も含め検討する必要がある。

E. 結論

単一の施設のコホートであるが、症例数は十分確保され、悉皆性の高い観察研究が可能である。DM専門医の診療施設であることが予想される。すでに追跡期間も5年近く経過しており有益な情報が期待できる。

G. 研究発表

1. 論文発表

1 Tanaka H, Shiohira Y, Uezu Y, Higa A, and Iseki K. Metabolic syndrome and chronic kidney disease in Okinawa, Japan. *Kidney Int* 69; 369-374, 2006

2. 学会発表

ASN 41th Annual Meeting & Scientific Exposition. (Philadelphia) High Prevalence of chronic kidney disease (CKD) without micro- and macroalbuminuria among outpatients DM clinic in Okinawa, Japan: Tanaka Iin Diabetes Ambulatory Study (TIIDA-S). Iseki K, Tanaka H. *J Am Soc Nephrol* 19; 534A, 2008

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（腎疾患対策研究事業）
協力研究報告書

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

研究協力者

坊内良太郎，馬場園哲也，岩本安彦 東京女子医科大学糖尿病センター

研究要旨

日本人 2 型糖尿病患者において，アルブミン尿が脳卒中の独立した危険因子であることが明らかとなったが，eGFR の低下の影響は小さいと考えられた。

A. 研究目的

近年慢性腎臓病（CKD）は，一般住民における心血管疾患の発症に対する独立した危険因子として注目されている。

本研究は，2 型糖尿病患者における CKD の合併，特に eGFR の低下が，新規脳卒中発症におよぼす影響を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

2002 年から 2003 年までに当科に入院した成人 2 型糖尿病患者のうち，脳卒中の既往がなく，eGFR が 15 mL/min/1.73 m² 以上であった 1,300 名（年齢 63±13 歳，男性 58%）を対象とした。

患者を観察開始時の尿中アルブミンによって 3 群，eGFR によって 4 群に分類，2007 年 8 月 31 日までの脳卒中発症について追跡調査し，尿中アルブミンおよび eGFR と脳卒中発症との関連を検討した。

C. 研究結果

平均 3.7±1.4 年，4,784 人・年の観察期間中に 91 名が脳卒中を発症した。

Kaplan-Meier 法による脳卒中累積発症率は，eGFR 低値群およびアルブミン尿の多い群で有意に高かった。多変量 Cox 回帰分析で eGFR の有意性は消失したが，顕性アルブミン尿の脳卒中発症に対する有意性は維持された。

D. 考察

本研究は，2 型糖尿病患者において，eGFR の低下がアルブミン尿と独立して脳卒中発症に影響をおよぼすかを検討した結果，eGFR 低値群は非低値群に比し，脳卒中累積発症率が有意に高値であったが，アルブミン尿を共変量に入れた多変量解析ではその有意差は消失した。一方アルブミン尿，特に顕性アルブミン尿は，eGFR にかかわらず脳卒中発症の独立した危険因子であることが確認された。

本研究において，eGFR 低下と脳卒

中発症に有意な関連が認められなかった理由は不明であるが、eGFRの低下は出血性脳卒中発症と関連するが、虚血性脳卒中発症とは関連しないとする報告が見られる。すなわち、eGFRの低下が各脳卒中サブタイプ発症におよぼす影響が異なる可能性が示唆され、今後さらに多数例における各脳卒中サブタイプ別の解析が必要と思われる。

E. 結論

日本人2型糖尿病患者において、eGFRの低下が脳卒中発症におよぼす影響は小さく、一方アルブミン尿は、脳卒中中の独立した危険因子であることが明らかとなった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

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

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

2. 学会発表

坊内良太郎, 他. 2型糖尿病患者における推定GFRと大血管障害発症の関連. 第51回日本糖尿病学会年次学術

集会 (糖尿病 51 巻増刊号 S328, 2008)

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

【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】

厚生労働科学研究費補助金（腎疾患対策研究事業）
分担研究報告書

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

分科会長

湯澤 由紀夫 名古屋大学大学院病態内科学講座腎臓内科

研究分担者

篁 俊成 金沢大学医薬保健研究域医学系恒常性制御学

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

研究要旨

全世界で糖尿病性腎症ならびにそれに起因する透析患者が増加の一途をたどっており、本邦においても、糖尿病性腎症は 1998 年以降、慢性血液透析導入の原因疾患の第 1 位となっている。糖尿病ならびに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る。現在、糖尿病性腎症には「尿中アルブミン」を指標とする早期診断基準と病期分類がある。しかし、「尿中アルブミン」については、日内変動・腎機能低下との相関性など問題点も多い。さらに、糖尿病性腎症は患者特有の環境因子や遺伝的素因などの影響を受けて病態が形成され、炎症、凝固、線維化形成などの複合要因の相互関与が報告されているため、単一のマーカーの限界も指摘されている。本研究では、「より早期の診断」・「予後推定」・「治療効果判定」・「新たな病気分類を可能」とするバイオマーカーの探索、及びパネル化モデルの提言を目的としている。今回、和田班全体の研究目標として、「糖尿病性腎症の疾患登録及び尿検体の収集」が掲げられ、本分科会としては、バイオマーカーのソースを尿検体に限定して「尿中アルブミン」をしのぐバイオマーカー群の検索とパネル化モデルの提言を最終目標とする。

平成 21 年度は、全体研究として、「既報の尿バイオマーカー候補群の選定と複数のマーカーを微量な尿サンプルで同時に測定可能なシステム開発」としての臨床研究プロトコルを作成し、臨床研究倫理委員会の承認を得た。既報の尿バイオマーカーは、CCN2, Collagen IV, AGT, MCP-1, L-FABP を最終候補として選定した。平成 22 年度以降は、個別研究（ゲノム・トランスクリプトーム解析、尿中エクソゾーム解析、尿メタボローム解析）により網羅的に検索されたバイオマーカー群及び研究協力者の山本格教授のプロテオーム解析（日本腎臓学会尿バイオマーカー委員会：委員長）から有望なマーカーを 100 種類以内に選定し、最終的には 10 種類以下のマーカー群に絞り込む。

同時に現在開発中の多因子を同時に検索可能な新たなアッセイ系プラットフォームにこれらの候補マーカー群を導入し、既報のマーカーに網羅的に検索されたバイオマーカー群を加えた、新たなパネル化モデルを作成する。平成23年度以降は、はレジストリーを中心に得られたゴールデン尿サンプルを利用して、これらの最終候補の新規臨床検査診断法としての有用性を評価する予定である。

A. 研究目的

分科会全体目標：

本研究は、「尿中アルブミン」をしのご尿中バイオマーカー群の検索とパネル化モデルの提言を最終目標とする。平成21年度は、「既報の尿バイオマーカー候補群の選定と複数のマーカーを微量な尿サンプルで同時に測定可能なシステム開発」を全体研究の目標とし、個別研究で糖尿病性腎症の候補マーカーの網羅的検索をさらに進める。

個別研究 目的：

1) トランスクリプトーム解析（金沢大学： 篁 俊成 准教授）
2型糖尿病は、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が複雑なネットワークを形成して発症する。末梢血単核球(PBMC)は、こうした多彩な因子にさらされて、遺伝子発現をダイナミックに変化させることで病態を反映している可能性がある。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した。

2) 尿中エクソゾームを用いた

podocyte関連タンパク解析（徳島大学： 安部 秀斉 准教授）

糸球体上皮細胞（ポドサイト）は高度に機能が分化しており、増殖能を有さないため、種々の障害を受けると糸球体機能に影響を与え、不可逆的な腎機能低下へ至る。この、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。

3) メタボローム解析（名古屋大学： 湯沢由紀夫 准教授）

オミクス解析法のひとつであるメタボローム解析は、生体試料中の全代謝物（メタボローム）の変化をバイアスをかけずに一斉測定する網羅的解析手法である。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。

B. 研究方法

分科会全体研究

まず、既報の糖尿病性腎症の尿バイオマーカーとして、CCN2, Collagen IV, Angiotensinogen (AGT), 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名古屋大学工学部の渡慶次学准教授との共同研究にて開始した。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及び腎臓研究室で採取したサンプルを用いた。

微小化学分析システム (μ TAS, micro total analysis system) を応用した次世代型の臨床用バイオマーカー測定装置の開発については、多数ある μ TAS の中から本研究目的に最適な分析プラットフォームの選定と、選定した μ TAS を用いた患者尿サンプルの測定についてモデルバイオマーカーを用いたフィジビリティスタディに着手した。すなわち、本研究で求められる μ TAS のスペックとして、複数のバイオマーカーを測定可能であること、微量な尿サンプルで測定可能であること、尿中の微量なバイオマーカーを検出可能な感度を有すること、臨床への応用展開を踏まえて簡便かつ安価な装置であること、などが挙げられる。このような観点から複数の μ TAS を比較検討した結果、名古屋大学工学部の渡慶次学准教授が開発した流路型免疫分析チップが最適であると判断し

た。この流路型免疫分析チップの特徴には、微量サンプル (1 バイオマーカーあたり $0.7 \mu\text{l}$) で、高速分析 (1 アッセイあたり 10 分間以下) が可能なこと、 μ TAS に尿サンプルや分析試薬を送り込む為の機器装置が不要で、使い捨てのスライドグラス型 μ TAS とその検出装置のみで、従来の 96 穴プレートによる ELISA 分析と同等かそれ以上の検出感度でマルチバイオマーカーのアッセイが可能であることが挙げられる。しかも、該流路型分析チップのコストは一枚当たり千円程度で、使用する抗体や試薬も極微量で済むため、バイオマーカーの分析に係る総コストを低く抑えることが可能になる。

併せて、バイオマーカー診断法の実用化を踏まえて、採取が容易な尿中の複数バイオマーカーのパネル化による診断能の向上や微小化学分析システム等を応用した簡便・高精度・高再現性なバイオマーカー測定装置の開発可能性についても検討をおこなった。

(倫理面への配慮)

本研究にあたっては、ヘルシンキ宣言および文部科学省・厚生労働省・経済産業省の「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、厚生労働省の「臨床研究に関する倫理指針」および文部科学省の「疫学研究に関する倫理指針」を遵守する。

遺伝子発現検索に用いる末梢血液サンプルは、医学研究目的に用いられることについて同意を得た対象者より

採取し、連結可能匿名化後に保存する。また、観察研究および臨床研究においては各研究の分担研究者は、臨床研究のプロトコルを作成し、各施設の臨床研究倫理委員会の承認を受ける。個人遺伝子情報に関する保護と管理についても上記の倫理指針を遵守する。試料・データはすべて連結可能匿名化とし、個人識別に関するデータは個人識別情報管理分担者が管理する。データは専用コンピュータにて一括管理し、データアクセスは研究従事者がパスワードを用いて行う。また、各症例の遺伝子発現情報の管理、情報解析も専用コンピュータにて一括して保存し、部外者のアクセスを禁じる。本研究で得られた成果を公表する際は、参加者個人を特定できない形にする。

個別研究

1) 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、55±17才、BMI 26.0±5.4 kg/m²、FPG 291±277 mg/dl、HbA_{1c} 11.0±2.7%)、若年健常者 16名(男14名、26±2才、BMI 21.1±1.9 kg/m²、FPG 83±12 mg/dl)よりPBMCを単離した。2型糖尿病患者 18名からは血糖コントロール 328±235日後(BMI 27±5.1 kg/m²、FPG 131±38 mg/dl、HbA_{1c} 6.8±1.5%)にもPBMCを得た。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。

(倫理面への配慮)

本研究にあたっては、文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号の「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守することを明文化し、すでに施設における倫理委員会において了承を得た。遺伝子発現プロファイルを中心とした医学研究目的に用いられることについて同意を得た対象者より、末梢血液サンプルを採取し、採取されたサンプルを、連結可能匿名化後、金沢大学医薬保健研究域医学系恒常性制御学にて保存する。

個人遺伝子情報に関する保護と管理は、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に基づいて行うものとする。試料・データはすべて連結可能匿名化とし、個人識別に関するデータは個人識別情報管理分担者が管理する。データは研究室に設置した専用コンピュータにて一括管理し、データアクセスは研究従事者がパスワードを用いて行う。また、各症例の遺伝子発現情報の管理、情報解析も専用コンピュータにて一括して保存し、部外者のアクセスを禁じる。

2) 尿中エクソゾームを用いた podocyte関連タンパク解析

進行性の腎疾患においては、尿中にポドサイトが脱落することが知られており、この脱落ポドサイトのカウントによる評価はなされているが、元の腎疾患の診断に用いることはできない。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を開発する。

(倫理面への配慮)

本研究を含めた遺伝子研究計画書「進行性腎障害の遺伝子解析に関する臨床研究」は徳島大学医学部ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理委員会にて承認されている。また「腎疾患の診断のための研究」は徳島大学病院臨床研究倫理審査委員会にて承認されている。検体の提供者、その家族・血縁者その他関係者の人権及び利益の保護の取扱いについては十分配慮し、必要に応じて遺伝相談室にて遺伝カウンセリングを提供する。動物実験については、徳島大学動物実験指針および徳島大学動物実験委員会規則に従い、動物実験計画書は、徳島大学動物実験委員会より承認を受けている。

3) 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ルの確立を目指した。具体的には、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否かについてパイロットアッセイを行った。

(倫理面への配慮)

ヒト検体を用いた臨床研究に関して

は、名古屋大学での倫理委員会の承認を取得し（「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」名古屋大学承認番号：870）、本学術調査研究実施においては、ヒト検体など生体材料および個人情報を取り扱う。これらの使用法、連結可能匿名化には十分な配慮を行う。

C. 結果

全体研究

1. ヘルシンキ宣言および各省庁よりの倫理指針に基づいて末梢血液および尿サンプル採集のための臨床研究プロトコルを作成し、臨床研究倫理委員会の承認を受けた。

2. 尿中では CCN2 (connective tissue growth factor), Collagen IV, AGT (angiotensinogen), 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 β , 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。

該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