

リティの確認に着手した。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。

個別研究

[トランスクリプトーム解析]

1) 糖尿病の有無で $P < 0.0005$ と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。

2) 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。

3) MAPK と OXPHOS 両経路を構成する、各々99、77 遺伝子の発現レベルを標準化し、症例ごとに平均化した mean centroid を求めた。MAPK mean centroid は糖尿病群で健常群に比し有意に高値で、血糖コントロールにより改善した。

4) OXPHOS mean centroid は糖尿病群で健常群に比し有意に低値で、血糖コントロールにより変化せず、血糖コントロール後も健常者に比し低値であった。

5) 各々の経路の協調的遺伝子発現と関連する糖尿病の病態を解析した。MAPK mean centroid は、血糖コント

ロールの指標である空腹時血糖値および HbA1c 値と有意な正相関を示した。

6) OXPHOS mean centroid は肥満、血糖コントロール、いずれの病態とも関連は低かった。

7) 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。

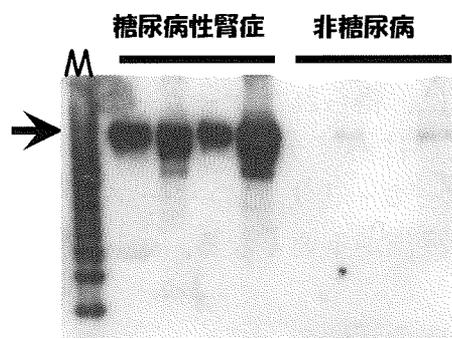
8) 糖尿病状態では、アポトーシス経路を構成する遺伝子群が協調的に発現亢進し、血糖コントロールにより、健常人のパターンに近づいた。

9) 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わかった。

10) 糖尿病患者の単球機能障害の背景に、ER ストレスと TLR シグナル異常の存在が示唆された。

[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) (図：矢印)を同定した。(M:マーカー)



[メタボローム解析]

-30℃で冷凍保存していた患者尿サンプルを解凍して、500 μ 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 μ 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た。(特許の関連で詳細は省略)

D. 考察

全体研究

多因子疾患・多臓器疾患の代表的な疾患である糖尿病性腎症の早期診断・予後推測を可能とするためには、多因子性病態形成メカニズムの解明と多因子性病態形成メカニズムの解明が不可欠であり、現在临床上広く利用されている「尿アルブミン」単一マーカーのみでは限界があり、この二つの特徴(多因子・多臓器)を踏まえたマルチバイオマーカー診断技術の開発が必要となる。

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。

個別研究

[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。

[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。

[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。

E. 結論

全体研究

本分科会最終目標に合致するバイオマーカーの最終候補を選出し、臨床研究プロトコルを作成の上、臨床研究倫理委員会の承認を受けた。平成23年度はレジストリーを中心に得られた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。併せて、病期分類改定にむけた検証と具体的な提言を行う予定である。

個別研究

[トランスクリプトーム解析]

得られた知見は、血液を用いた糖尿病の新規病態診断法開発の可能性を示唆する。今後、糖尿病腎症の病態を反映する PBMC 発現遺伝子パスウェイを検討する予定であり、現在コホートを構築中である。

[尿中エクソゾームを用いた podocyte 関連タンパク解析]

糖尿病性腎症における蛋白尿と腎機能低下の分子病態の解明に、尿中エクソゾーム蛋白を用いたポドサイトの解析は重要である。

[メタボローム解析]

今後は、得られたマーカーの同定・選別並びにバリデーションによりバイオマーカーとしてのパフォーマンスの評価が重要となる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

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 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

糖尿病性腎症における蛋白尿の出現と腎機能低下という病態解明にはポドサイトの変化を分子レベルで精確に把握することが必須である。これらの情報を非侵襲的かつ繰り返し得るために、尿中エクソゾーム蛋白の解析という手法を導入した。早期発見、予後予測などに用いられる尿中エクソゾームタンパク群の同定が進みつつある。

A. 研究目的

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。

B. 研究方法

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。

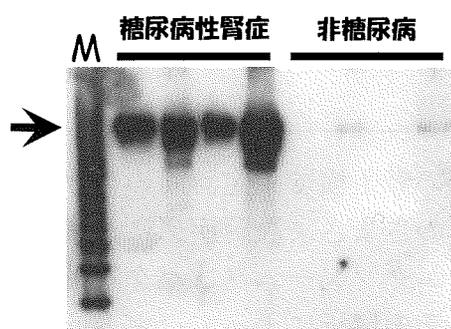
（倫理面への配慮）

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。

C. 結果

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) (図：矢印)を同定した。(M:マーカー)



D. 考察

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。

E. 結論

糖尿病性腎症における蛋白尿と腎機能低下の分子病態の解明に、尿中エクソゾーム蛋白を用いたポドサイトの解析は重要である。

F. 健康危険情報 無し

G. 研究発表

- 1. 論文発表 無し
- 2. 学会発表 無し

H. 知的財産権の出願・登録状況

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

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

糖尿病腎症のバイオマーカーに関する研究
（末梢血単核球発現遺伝子プロファイルを用いた糖尿病およびその合併症の病
態診断に関する研究）

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

研究要旨

A. 研究目的

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。

B. 研究方法

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。

非糖尿病患者 6 名、2 型糖尿病患者 8 名より末梢血を 9 時、15 時、21 時、27 時に採取し、直ちに白血球単離、RNA 安定化を行った。各時計遺伝子 mRNA 量を Real-time PCR 法により測定した。

（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、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した。

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した。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した。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った。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た。

C. 研究結果

1) 糖尿病の有無で $P < 0.0005$ と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。

2) 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。

3) MAPK と OXPHOS 両経路を構成する、各々 99、77 遺伝子の発現レベルを標準化し、症例ごとに平均化した mean centroid を求めた。MAPK mean centroid は糖尿病群で健常群に比し有意に高値で、血糖コントロールにより改善した。

4) OXPHOS mean centroid は糖尿病群で健常群に比し有意に低値で、血糖コントロールにより変化せず、血糖コントロール後も健常者に比し低値であった。

5) 各々の経路の協調的遺伝子発現と

関連する糖尿病の病態を解析した。MAPK mean centroid は、血糖コントロールの指標である空腹時血糖値および HbA1c 値と有意な正相関を示した。

6) OXPHOS mean centroid は肥満、血糖コントロール、いずれの病態とも関連は低かった。

7) 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。

8) 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。

9) 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わかった。

10) 糖尿病患者の単球機能障害の背景に、ER ストレスと TLR シグナル異常の存在が示唆された。

11) PBMC の PER1 発現は 9 時に頂値となり 21 時に底値となる有意な発現リズムを呈した一方、BMAL1 発現は 21 時に頂値となる傾向を示した。

12) 2 型糖尿病患者では、非糖尿病患者に比し、PER1 および BMAL1 の頂値がそれぞれ 31%、19% 有意に低く、時計遺伝子発現リズムは減弱していた。

D. 考察

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。

一方、末梢血白血球にも時計遺伝子機能を認めた。2型糖尿病患者の末梢血白血球においても時計遺伝子機能は減弱していた。

E. 結論

これらの知見は、血液を用いた糖尿病の新規病態診断法開発の可能性を示唆する。今後、糖尿病腎症の病態を反映する PBMC 発現遺伝子パスウェイを検討する予定であり、現在コホートを構築中である。

G. 研究発表

1. 論文発表

原著論文

1. 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
2. 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

3. 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
4. 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
5. 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
6. 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
 7. 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]
 8. 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
 9. 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
 10. 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
 11. Uno M, Kurita S, Misu H, Ando H, Ota T, Matsuzawa-Nagata N, Kita Y, Nabemoto S, Akahori H, Zen Y, Nakanuma Y, Kaneko S, Takamura T: Tranilast, an antifibrogenic agent, ameliorates a dietary rat model of nonalcoholic steatohepatitis. **Hepatology** 48:109-118, 2008
 12. Takeshita Y, Takamura T, Minato H, Misu H, Ando H, Yamashita T, Ikeda H, Nakanuma Y, Kaneko S: Transformation of p53-positive papillary thyroid carcinoma to anaplastic carcinoma of the liver following postoperative radioactive iodine-131 therapy. **Intern Med** 47:1709-1712, 2008
 13. Takeshita Y, Takamura T, Ando H, Hamaguchi E, Takazakura

- A, Matsuzawa-Nagata N, Kaneko S: Cross talk of tumor necrosis factor-alpha and the renin-angiotensin system in tumor necrosis factor-alpha-induced plasminogen activator inhibitor-1 production from hepatocytes. **Eur J Pharmacol** 579:426-432, 2008
14. Takamura T, Misu H, Matsuzawa-Nagata N, Sakurai M, Ota T, Shimizu A, Kurita S, Takeshita Y, Ando H, Honda M, Kaneko S: Obesity Upregulates Genes Involved in Oxidative Phosphorylation in Livers of Diabetic Patients. **Obesity** (Silver Spring), 2008
15. Sakurai M, Takamura T, Miura K, Kaneko S, Nakagawa H: BMI may be better than waist circumference for defining metabolic syndrome in Japanese women. **Diabetes Care** 31:e12, 2008
16. Matsuzawa-Nagata N, Takamura T, Ando H, Nakamura S, Kurita S, Misu H, Ota T, Yokoyama M, Honda M, Miyamoto K, Kaneko S: Increased oxidative stress precedes the onset of high-fat diet-induced insulin resistance and obesity. **Metabolism** 57:1071-1077, 2008
17. Kurita S, Takamura T, Ota T, Matsuzawa-Nagata N, Kita Y, Uno M, Nabemoto S, Ishikura K, Misu H, Ando H, Zen Y, Nakanuma Y, Kaneko S: Olmesartan ameliorates a dietary rat model of non-alcoholic steatohepatitis through its pleiotropic effects. **Eur J Pharmacol** 588:316-324, 2008
18. Kurita S, Ando H, Kaneko S, Takamura T: Intra-thyroid blood flow in Plummer's disease. **Intern Med** 47:1065-1066, 2008
19. Kazama Y, Takamura T, Sakurai M, Shindo H, Ohkubo E, Aida K, Harii N, Taki K, Kaneshige M, Tanaka S, Shimura H, Endo T, Kobayashi T: New insulin sensitivity index from the oral glucose tolerance test. **Diabetes Res Clin Pract** 79:24-30, 2008
20. Ando H, Sugimoto KI, Yanagihara H, Tsuruoka S, Saito T, Takamura T, Kaneko S, Fujimura A: Effects of Atorvastatin and Pravastatin on Glucose Tolerance, Adipokine Levels and Inflammatory Markers in Hypercholesterolaemic Patients. **Clin Exp Pharmacol Physiol** 35:1012-1017, 2008

21. 清水暁子, 篁 俊成, 櫻井勝, 竹下有美枝, 栗田征一郎, 御簾博文, 安藤仁, 金子周一: 2型糖尿病患者に対する超速効型インスリン製剤を用いた bolus 単独療法 12ヶ月後のアウトカム. *糖尿病* 50:385-391, 2007
22. 乙田敏城, 櫻井勝, 太田嗣人, 栗田征一郎, 御簾博文, 清水暁子, 安藤仁, 金子周一, 篁 俊成: 1型糖尿病とバセドウ病を同時期に診断しえた多腺性自己免疫症候群の2例. *糖尿病* 51:323-327, 2008
23. Tsuchiyama N, Takamura T, Ando H, Sakurai M, Shimizu A, Kato K, Kurita S, Kaneko S: Possible role of alpha-cell insulin resistance in exaggerated glucagon responses to arginine in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 30:2583-2587, 2007
24. Takamura T, Shimizu A, Komura T, Ando H, Zen Y, Minato H, Matsushita E, Kaneko S: Selective estrogen receptor modulator raloxifene-associated aggravation of nonalcoholic steatohepatitis. *Intern Med* 46:579-581, 2007
25. Takamura T, Sakurai M, Nakamura M, Shimizu A, Ota T, Misu H, Takeshita Y, Tsuchiyama N, Kurita S, Ando H, Kaneko S: Factors associated with improvement of fasting plasma glucose level by mealtime dosing of a rapid-acting insulin analog in type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 75:278-284, 2007
26. Takamura T, Honda M, Sakai Y, Ando H, Shimizu A, Ota T, Sakurai M, Misu H, Kurita S, Matsuzawa-Nagata N, Uchikata M, Nakamura S, Matoba R, Tanino M, Matsubara K, Kaneko S: Gene expression profiles in peripheral blood mononuclear cells reflect the pathophysiology of type 2 diabetes. *Biochem Biophys Res Commun* 361:379-384, 2007
27. Shimizu A, Takamura T, Matsuzawa N, Nakamura S, Nabemoto S, Takeshita Y, Misu H, Kurita S, Sakurai M, Yokoyama M, Zen Y, Sasaki M, Nakanuma Y, Kaneko S: Regulation of adiponectin receptor expression in human liver and a hepatocyte cell line. *Metabolism* 56:1478-1485, 2007
28. Sakurai M, Takamura T, Ota T, Ando H, Akahori H, Kaji K, Sasaki M, Nakanuma Y, Miura

- K, Kaneko S: Liver steatosis, but not fibrosis, is associated with insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. **J Gastroenterol** 42:312-317, 2007
29. Ota T, Takamura T, Kurita S, Matsuzawa N, Kita Y, Uno M, Akahori H, Misu H, Sakurai M, Zen Y, Nakanuma Y, Kaneko S: Insulin resistance accelerates a dietary rat model of nonalcoholic steatohepatitis. **Gastroenterology** 132:282-293, 2007
30. Ota T, Takamura T, Kaneko S: Pioglitazone in nonalcoholic steatohepatitis. **N Engl J Med** 356:1068; author reply 1068-1069, 2007
31. Misu H, Takamura T, Matsuzawa N, Shimizu A, Ota T, Sakurai M, Ando H, Arai K, Yamashita T, Honda M, Yamashita T, Kaneko S: Genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately upregulated with fasting hyperglycaemia in livers of patients with type 2 diabetes. **Diabetologia** 50:268-277, 2007
32. Matsuzawa N, Takamura T, Kurita S, Misu H, Ota T, Ando H, Yokoyama M, Honda M, Zen Y, Nakanuma Y, Miyamoto K, Kaneko S: Lipid-induced oxidative stress causes steatohepatitis in mice fed an atherogenic diet. **Hepatology** 46:1392-1403, 2007
33. Komura T, Mizukoshi E, Kita Y, Sakurai M, Takata Y, Arai K, Yamashita T, Ohta T, Shimizu K, Nakamoto Y, Honda M, Takamura T, Kaneko S: Impact of diabetes on recurrence of hepatocellular carcinoma after surgical treatment in patients with viral hepatitis. **Am J Gastroenterol** 102:1939-1946, 2007
34. Koike N, Takamura T, Kaneko S: Induction of reactive oxygen species from isolated rat glomeruli by protein kinase C activation and TNF-alpha stimulation, and effects of a phosphodiesterase inhibitor. **Life Sci** 80:1721-1728, 2007
35. Kita Y, Mizukoshi E, Takamura T, Sakurai M, Takata Y, Arai K, Yamashita T, Nakamoto Y, Kaneko S: Impact of diabetes mellitus on prognosis of patients infected with hepatitis C virus. **Metabolism** 56:1682-1688, 2007
36. Hayakawa T, Takamura T, Abe T, Kaneko S: Association of

the C825T polymorphism of the G-protein beta3 subunit gene with hypertension, obesity, hyperlipidemia, insulin resistance, diabetes, diabetic complications, and diabetic therapies among Japanese. **Metabolism** 56:44-48, 2007

総説

1. 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
2. 籾 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もいいでしょうか」. 日本糖尿病協会誌「さかえ」 49:22, 2009
3. 籾 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
4. 籾 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
5. 籾 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
6. 籾 俊成: 糖尿病からみた肝障害. **Medicament News**:11-13, 2009
7. 籾 俊成: α 細胞機能. **Islet Equality** 1:15-19, 2009
8. 竹下有美枝, 籾 俊成: NASH とインスリン抵抗性. **Vascular Medicine** 5:82-85, 2009
9. 竹下有美枝, 籾 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
10. 竹下有美枝, 籾 俊成: 1 型糖尿病におけるインスリン複数回注射療法 (グラルギン 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
11. Takamura T, Misu H, Yamashita T, Kaneko S: SAGE application in the study of diabetes. **Curr Pharm Biotechnol** 9:392-399, 2008
12. 籾 俊成: 基礎インスリン、追加インスリン、いずれの補充からはじめるのか. **プラクティス** 25:165-170, 2008
13. 長田直人, 籾 俊成: 脂肪肝と炎症 ~NASH 発症の分子機構~ **Diabetes**

- Frontier** 19:60-64, 2008
14. 太田嗣人, 篁 俊成: 脂肪肝とリポトキシシティ **The Lipid** 19:20-26, 2008
 15. 御簾博文, 篁 俊成: 肝臓由来分泌タンパク質"ヘパトカイン"を標的とした2型糖尿病に対する新規治療法の開発. **化学工業** 59:37-42, 2008
 16. 岩本安彦, 番度行弘, 小林正, 浦風雅春, 古家大祐, 篁俊成: ケースバイケースで適したインスリン導入法を考える. **Pharma Medica** 25:113-115, 2008
 17. 加藤健一郎, 安藤仁, 清水暁子, 篁 俊成: 肥満患者にインスリン療法を導入すべきか? **Progress in Medicine** 28:349-352, 2008
 18. Takamura T, Shimizu A, Ando H, Kaneko S: Comment on: Nathan DM, Buse JB, Davidson MB et al. (2006) Management of hyperglycaemia in type 2 diabetes: a consensus algorithm for the initiation and adjustment of therapy. A consensus statement from the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. **Diabetologia** 49: 1711-1721.
 19. 御簾博文, 篁 俊成: 特集 糖尿病の現況と治療・対策 (2) 糖尿病合併症治療 肝疾患 **医学と薬学** 57:793-799, 2007
 20. 篁 俊成, 金子周一: NASHの病態におけるインスリン抵抗性の意義. **BIO Clinica** 22:37-42, 2007
 21. 長田直人, 篁 俊成: 高脂血症がもたらす臓器障害—脂肪肝と高脂血症. **Medical Practice** 24:1211-1213, 2007
- 著書
1. 篁 俊成: 内分泌・代謝系糖尿病治療薬. In ナーシングブック 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
 2. 金沢大学附属病院 **Team DiET**. 金沢大学附属病院 **Team DiET** 式ランチオンマット法 満腹ダイエットレシピ. 第1版. 金沢: 北國新聞社, 2009: 1-84.
 3. 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

- スー癌、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
4. 14. 篁 俊成: 糖質代謝異常. 新時代の糖尿病学 (2) -病因・診断・治療研究の進歩- 大阪, 日本臨床, 2008 p. 33-37
 5. 篁 俊成, 大村健二. 肥満患者に対する栄養療法 日本静脈経腸栄養学会 編. コメディカルのための静脈経腸栄養ハンドブック. 東京: 南江堂, 2008: 339-43.
 6. 19. 御簾博文, 篁 俊成: スルホニル尿素薬と α グルコシダーゼ阻害薬. 新時代の糖尿病学 (3) -病因・診断・治療研究の進歩- 大阪, 日本臨床, 2008, p. 305-310
 7. 26. 櫻井勝, 篁 俊成: メタボリックシンドロームの病態は?. In 現場の疑問に答える糖尿病診療 Q&A 寺内康夫, Ed. 東京, 中外医学者, 2007, p. 19-21
 8. 篁 俊成: 糖尿病. 大村健二 編. 身につく水・電解質と酸塩基平衡. 東京: 南江堂, 2007: 143—8
 9. 篁 俊成: 糖尿病性ケトアシドーシスに合併した低ナトリウム血症. 大村健二 編. 身につく水・電解質と酸塩基平衡. 東京: 南江堂, 2007: 196-9
2. 学会発表 (講演・シンポジウム、筆頭のみ)
 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)
 4. Toshinari Takamura: Molecular mechanisms underlying fat-induced insulin resistance in the liver **The 17th Korean Diabetes Association Summer Workshop & 2008 Symposium** 招待講演. Seoul. 2008年8月 (Korean Diabetes Journal 2008; 32 (Suppl. 5): 22-23 に掲載)

5. 篁 俊成, 安藤 仁, 御簾博文, 金子周一: 肝臓のトランスクリプトームからみた糖尿病. 第22回日本糖尿病合併症学会 シンポジウム. つくば. 2007年10月 (糖尿病合併症 2007; 21 (Suppl. 1): 51 に掲載) (糖尿病合併症 2008; 22: 136-140 に Proceeding)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

- ① 篁 俊成、金子周一、御簾博文、山下太郎:「糖尿病の病態と関連して発現変動する遺伝子群」、特願 2005-125689
- ② 篁 俊成、金子周一、本多政夫、酒井佳夫, 松原謙一:「糖尿病の有無等を判定する方法」、特願 2006-284625
- ③ 篁 俊成、金子周一、御簾博文、高倉伸幸:「インスリン抵抗性誘導・血管新生抑制作用を有する糖尿病関連肝臓由来分泌蛋白」、特願 2006-206747、PCT (国際特許) 出願(WO/2008/013324)
- ④ 篁 俊成、金子周一、安藤仁、太田嗣人、御簾博文、栗田征一郎:「非アルコール性脂肪肝炎予防または治療薬」、特願 2007-277750
- ⑤ 篁 俊成、金子周一、安藤仁、太田嗣人、御簾博文、栗田征一郎, 宇野将文:「新規な肝疾患の予防または治療ならびにインスリン抵抗性改善剤」、特願 2008-274758

【分科会：糖尿病性腎症の新規治療法の開発】

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

糖尿病性腎症に対する新規治療法の開発

分科会長 奥田誠也
研究分担者 古家大祐・和田隆志
研究協力者 深水 圭・原 章規

研究要旨；今回、糖尿病性腎症新規治療薬としてカロリー制限模倣薬（レスベラトロール）、ケモカイン受容体(CCR2)阻害薬、AGE-DNA aptamer の3種類の治療薬について研究を行った。2型糖尿病性腎症モデルマウスへのレスベラトロール投与により、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。さらにケモカイン受容体 CCR2 を介した骨髄由来細胞 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についての検討では、CCR2 阻害薬により腎内 fibrocyte およびマクロファージ数が減少し、アルブミン尿が低下傾向を示した。Advanced glycation end products (AGEs) と特異的に、かつ強力に結合する AGEs-DNA aptamer を作製し、現在、2型糖尿病モデルマウスに対し AGE-aptamer を浸透圧ポンプにて投与しており、血中でのアプタマーの存在を確認出来ている。今後は糖尿病性腎症への有効性を検討する予定である。以上、3種類の薬剤を新規治療薬として今後は臨床応用に期待したい。

A. 研究目的

糖尿病性腎症は、いまや慢性腎臓病の主たる疾患であるが、血糖、血圧に対する治療薬の進歩にも拘らず、進行を抑制することは出来ていない。したがって、糖尿病性腎症の発症・進展機構に基づいた抜本的な新規治療法が望まれる。そこで、我々は、3種類の異なる新規糖尿病性腎症治療薬の効果、臨床応用の可能性について検討した。まず、抗老化分子として注目されてい

るレスベラトロールに、糖尿病性腎症保護効果があるか、また、どのような分子機構によって作用を発揮しているのかを検討した。次に、ケモカインであるMCP-1の受容体CCR2を介した炎症・免疫担当細胞の浸潤が、腎症の進展に重要であり、fibrocyte上にCCR2が発現することを確認しており糖尿病性腎症モデルマウスを用いて、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した。さらに、

Advanced glycation end products (AGEs) の蓄積や生物化学的反応が糖尿病性腎症の発症、進展に重要な働きをしていることが報告されており、近年、我々はAGEと特異的に、かつ強力に結合するAGEs-DNA aptamerを作製した。そこでAGE-アプタマーを糖尿病モデル動物に投与して、アプタマーの糖尿病性腎症への有効性を検討し、将来の臨床応用への可能性を模索することとした。

B. 研究方法

- ①2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を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 CCR2 ノックアウトマウス (CCR2^{-/-}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+群) または対照薬 (PG-群) を投与した。投与 16 週後に sacrifice し腎組織を得た。検討項目として、腎における骨髄由来細胞、特に、fibrocyte ならびに単球・マクロファージ数を評価した。また、糸球体硬化・間質線維化およびそれに関連する分子群を評価した。臨床的指標として腎機能およびアルブミン尿を検討した。
- ③KK-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-aptamer 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 sacrifice する。血清;AGE-2、ADMA、sRAGE、尿;アルブミン、L-FABP、蛋白、RNA;PEDF、RAGE、VEGF、TGF-β、CTGF、TNF-α、免疫染色; AGE-2、8-OHdG にて AGE-aptamer の効果を検討する。
(倫理面への配慮)

動物の飼育や sacrifice の方法に関しては、各施設動物実験計画書に記載しており、審査の結果問題ないことを確認している。

C. 研究結果

- ①2 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(図 1)。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。
- ②コンピュータ画像解析により算出した糸球体硬化率は、PG-群に比して CCR2^{-/-}および PG+群で低下した(図 2)。間質線維化についても糸球体硬化率と同様の結果であった(図 3)。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 (図 4)。腎内マクロファージ数も糸球体・間質ともに fibrocyte 数と同様の結果であった。また、1 型コラーゲン、TGF- β 1、ならびに MCP-1 といった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 (図 5A, B, C)。

③AGE-aptamer を浸透圧ポンプにて投与した。現在 aptamer を投与して 3 週 (11 週令) であるが、下痢は出現していない。さらに、血中への aptamer の移行を確認するため、血液を採取し、PCR を行ったところ、0.03, 0.3, 3 μ M の aptamer 投与にて、血中 AGE-aptamer が濃度依存性に増加していることを確認出来た (図 6)。今後は 4 週ごとに尿中アルブミン、血糖等を測定し、16 週令に sacrifice1 報のみの報告であるが、動物モデルに対する効果を検討した報告はない。今後の実験結果により当細胞や固有細胞との相互関連による間接的関与が明らかになると考えられる。

D. 考察

①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本研究では、マウス糖尿病性腎症モデルにおいて、腎における MCP-1 の発現が亢進し fibrocyte ならびに単球・マクロファージ浸潤が増加した。同時に TGF- β 1 および 1 型コラーゲンの発現の亢進を伴い、腎線維化が進展した。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。また、MCP-1 に加え、TGF- β 1 および 1 型コラーゲンの発現が低下した。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ことにより、fibrocyte の病態への直接的、あるいは、周囲の炎症・免疫担当細胞や固有細胞との相互関連による間接的関与が明らかになると考えられる。

③Vitro の実験系では AGE-aptamer の効果は我々の 1 報のみの報告であるが、動物モデルに対する効果を検討した報告はない。今後の実験結果により AGE-aptamer 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. 結論

抗老化ポリフェノールに糖尿病性腎症に対する有効性が見出された。その分子機構は、Sirt1 活性化ではなく、抗酸化作用であることを見出した。