

病者の糖尿病関連検査所見の経年的臨床プロファイルは、その予後に関連する因子の解析とともに、「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」分担研究機関と共同にて日本人でのエビデンスの構築に有用であるとする。

なし

E. 結論

807症例の経年的糖尿病関連臨床プロファイルを作成した。

F. 健康危険情報

分担研究のため、該当せず

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

糖尿病性腎症の地域格差に関する研究

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

研究要旨

沖縄県の透析患者数は人口 100 万人対で約 3,000 人であり、全国平均の 2,280 人を大きく上回っている。透析患者数が全国平均並みである茨城県に比し、肥満者、高血圧者が多く特に $GFR < 45 \text{ml/min/1.73m}^2$ で両県の差異が顕著であった。CKD の発見の遅れおよび不十分な治療が透析患者数多発の要因と考えられる。沖縄県内の糖尿病専門クリニックである田仲医院（田仲秀明院長）の協力をえて 867 名の糖尿病患者を登録した。全員、血清クレアチニン（eGFR）、微量アルブミン尿および検尿を測定している。2005 年度に登録を開始し、現在、予後（生死、透析導入）を追跡している。

A. 研究目的

日本透析医学会の統計調査委員会の現況報告で明らかな慢性透析患者の多発地域である。沖縄県においてその発症要因について沖縄県内の糖尿病患者コホートの調査分析および他地域と比較を通じて検討する。

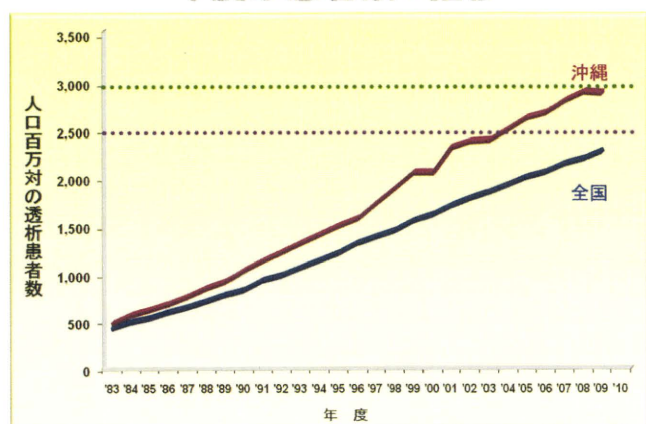
B. 研究方法

2005 年の開業以来の田仲クリニック（田仲秀明院長）の糖尿病患者 867 名の基礎データを収集し、eGFR および微量アルブミン尿、蛋白尿別に生命予後および透析導入の有無を追跡する。

（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、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。また各大学倫理委員会、および当該医療機関による審査、承認の後、実施する。連結可能匿名化データのみ使用する。結果は各協力機関にも報告する。

年度末患者数の推移



C. 研究結果

2005～2007 年度に田仲医院の糖尿病患者

867 例の平均年齢は 59.1 才、男性 58.4%、BMI26.6kg/m²、血 圧 (128.8/74.3mmHg) ,eGFR 76.2ml/min/1.73/m²、尿酸 5.3mg/dl、HbA1c 7.5%、アルブミン尿 32.8mg/g クレアチニンであった。

D. 考察

2009年度のKDIGOでCKDの分類についてわれわれのデータも参考にeGFRに加えて蛋白尿の有無を加えることが提案され、今後使用されることになった。今後は、CKDの構成要素である蛋白尿有無とeGFRレベル別に生活習慣病、CVDの発症率、死亡率に対する寄与度とその寄与度に影響を与える諸因子を検討する必要がある。さらに腎機能低下と尿蛋白の変化に対する諸因子の寄与度とそれに対する影響因子、蛋白尿とeGFR測定の意義と限界、経済性、および特定保健指導のCKD、CVDと生活習慣病の発症・経過への効果の解明が期待される。住民健診によるコホートと専門医療機関のコホートでは予後が異なることが考えられる。

E. 結論

沖縄県はDMによる透析導入が多い。糖尿病専門クリニックの協力を得て基礎資料の収集を行った。

F. 健康危険情報

該当せず

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yamagata K, Makino H, Akizawa T, Iseki K, Itoh S, Kimura K, Koya D, Narita I, Mitarai T, Miyazaki M, Tsubakihara Y, Watanabe T, Wada T,

Sakai O, and Advisory Committee for FROM-J. Design and methods of a strategic outcome study for chronic kidney disease - Frontier of Renal Outcome Modifications in Japan (FROM-J) –Clin Exp Nephrol 14: 144-151, 2010

- 2) Iseki K. Renal outcomes in chronic kidney disease. *Nephrology* 15: S273-S276, 2010
- 3) Iseki K, Chiho Iseki, and Kozen Kinjo.C-reactive protein is a predictor for developing proteinuria in a screened cohort. *Nephron Clin Pract* 117: C51-C56, 2011

2. 学会発表

- 1) 4th AFCKDI. Iseki K. Pan Asian CKD registry: Background and Japanese CKD registry. 2010,6/4 Seoul
- 2) APCN2010. Iseki K. Chronic kidney disease: from early prediction to current facts. 2010,6/5 Seoul
- 3) KDIGO Controversies Conference: CKD and CVD. 2010,10/29 London

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）
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

研究協力者

二宮 利治 九州大学病院腎高血圧脳血管内科

研究要旨

1993年に福岡県久山町循環器病健診を受診した40歳以上の住民2155名に、75g糖負荷試験を行い糖尿病の診断を行い、210名を糖尿病と診断した。この糖尿病患者210例における5年間の追跡データを構築した。追跡期間中に21名が死亡した。さらに、透析導入1名、脳出血2名、脳梗塞6名、心筋梗塞7名の発症を認めた。これらの患者個別のデータは研究事務局に提出され、統合研究に使用される予定である。

A. 研究目的

日本透析医学会統計調査委員会の成績によると、わが国における透析導入患者の主要原疾患は、1998年以降糖尿病性腎症が第1位となっている。そのため、わが国の慢性腎臓病対策において糖尿病性腎症の発症予防や合併症予防は重要な課題の一つである。

本研究では、日本各地で行われている糖尿病患者の追跡研究の統合データを用いて、糖尿病患者における糸球体濾過量値とアルブミン尿のそれぞれが糖尿病腎症発症や進行、また心血管病発症に及ぼす影響を評価することが目的である。そこで我々は、福岡県久山町住民における糖尿病患者の追跡データの収集を行った。

B. 研究方法

1993年に福岡県久山町循環器病健診を受診した40歳以上の住民2155名に、75g糖負荷試験を行い糖尿病の診断を行った。1)空腹時血糖 ≥ 126 mg/dl, 2)食後2時間以後の血糖 ≥ 200 mg/dl, 3)血糖降下薬使用の有

無のいずれかに該当する場合を糖尿病と診断した。エンドポイントは、総死亡、透析導入、脳卒中、心筋梗塞とした。さらに、追跡開始時及び追跡期間中の血清クレアチニン値、尿中アルブミン：クレアチニン値の測定を行い、腎機能低下及びアルブミン尿の発症及び進行の評価を行った。

（倫理面の配慮）

本研究は、「疫学研究に関する倫理指針」に基づき研究計画書を作成し、九州大学医学部倫理委員会の承認を得て行われた。本研究は、すべての対象者からインフォームドコンセントを取得したうえで実施した。研究者は、対象者の個人情報への漏洩を防ぐうえで細心の注意を払い、その管理に責任を負っている。

C. 研究結果

1993年の健診受診者2155名のうち、210名を糖尿病と診断した。この糖尿病患者210例における5年間の追跡データを構築した。追跡期間中に21名が死亡した。さらに、透

析導入1名、脳出血2名、脳梗塞6名、心筋梗塞7名の発症を認めた。これらの患者個別のデータは研究事務局に提出され、今後統合研究に使用される予定である。

D. 考察

わが国では、糖尿病の増加に伴い末期腎不全患者が増え続けている。末期腎不全患者は、長期の治療継続と経済的負担を要する上に、心血管病などの合併症を発症するリスクが高いことから、医療問題に与える影響は多大である。本研究によって、糖尿病腎症の早期評価法や治療方法が確立されると考えられる。その成果は、糖尿病性腎症の病態解明と治療法の飛躍的進歩とともに、末期腎不全や心血管病発症の予防手段の確立につながる事が期待される。

E. 結論

統合解析用に糖尿病患者210名の5年間の追跡データを作成した。今後は更に追跡年数を延長して、データ収集を行う予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Jardine MJ, Ninomiya T, Perkovic V, Cass A, Turnbull F, Gallagher MP, Zoungas S, Heerspink HJL, Chalmers J, Zanchetti A. Aspirin is beneficial in hypertensive patients with chronic kidney disease a post-hoc subgroup analysis of a randomized controlled trial. *J Am Coll Cardiol* 56: 956-65, 2010
- 2) Heerspink HJL, Ninomiya T, Perkovic V, Woodward M, Zoungas S, Cass A,

Cooper M, Grobbee DE, Mancia G, Mogensen CE, Neal B, Chalmers J; for the ADVANCE Collaborative Group. Effects of a fixed combination of perindopril and indapamide in patients with type 2 diabetes and chronic kidney disease. *Eur Heart J* 31: 2888-96, 2010

- 3) Ninomiya T, Zoungas S, Neal B, Woodward M, Patel A, Perkovic V, Cass A, Cooper M, Grobbee D, Hamet P, Harrap S, Liu L, Mancia G, Mogensen CE, Poulter N, Rodgers A, Williams B, MacMahon S, Chalmers J; ADVANCE Collaborative Group. Efficacy and safety of routine blood pressure lowering in older patients with diabetes: results from the ADVANCE trial. *J Hypertens* 28: 1141-9, 2010
 - 4) Nagata M, Ninomiya T, Doi Y, Yonemoto K, Kubo M, Hata J, Tsuruya K, Iida M, Kiyohara Y. Trends in the prevalence of chronic kidney disease and its risk factors in a general Japanese population: the Hisayama Study. *Nephrol Dial Transplant* 25: 2557-64, 2010
- ##### 2. 学会発表
- 1) Ninomiya T, Kiyohara Y, Tokuda Y, Doi Y, Arima H, Harada A, Ohashi Y, Ueshima H. Impact of kidney disease and blood pressure on the development of cardiovascular disease: Results from the Japan Arteriosclerosis Longitudinal Study. The 15th World Congress of Heart Disease, Vancouver, Canada. July 26, 2010
 - 2) Ninomiya T, Heerspink HJL, Perkovic V, Zoungas S, Patel A, Grobbee D, Harrap

S, Heller S, Cooper M, MacMahon S, Mancia G, Marre M, Neal B, Woodward M, Chalmers J. The fixed combination of perindopril and indapamide has a greater effect on cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes and albuminuria. ISN Nexus Symposium Kyoto 2010, Kyoto, Japan, April 16, 2010

H. 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

糖尿病患者における慢性腎臓病と無症候性脳梗塞との関連に関する研究

研究協力者

馬場園 哲也 東京女子医科大学糖尿病センター

坊内 良太郎 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

研究要旨

日本人 2 型糖尿病患者において、アルブミン尿と無症候性脳梗塞が密接かつ相互に関連することが明らかとなった。

A. 研究目的

慢性腎臓病（CKD）は、一般住民および糖尿病患者における心・脳血管障害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。近年、一般住民における無症候性脳梗塞（SCI）は、症候性脳卒中の発症を予測することや、横断面調査において、CKD と SCI が関連することが報告されている。

本研究は、2 型糖尿病患者における CKD と無症候性脳梗塞（SCI）との関連を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

1) 横断面研究

2003 年 7 月から 2008 年 4 月に当科で頭部 MRI 撮影を行った成人 2 型糖尿病患者のうち、推算糸球体濾過量（eGFR） $15 \text{ mL/min/1.73 m}^2$ 以上であった 786 名（平均年齢 65 ± 11 歳、男性 449 名、女性 337 名）を対象とした。SCI は、頭部 MRI の T1 強調画像で低信号、T2 強調画像で高信号を呈する長径 3 mm 以上の病変と定義し、尿中アルブミンおよび eGFR との関連を多変量 logistic 回帰分析で

検討した。

1) 縦断面研究

横断面研究に登録された 786 名のうち、顕性腎症患者を除外し、アルブミン尿を追跡調査した 366 名（平均年齢 64 ± 10 歳、男性 217 名、女性 149 名、正常アルブミン尿 246 名、微量アルブミン尿 120 名）を対象とした。SCI の合併と、観察期間中の腎症発症および進展との関連を、多変量 Cox 比例ハザードモデルを用いて検討した。

C. 研究結果

1) 横断面研究

786 名中 415 名（52.8%）に SCI を認めた。SCI 合併を従属変数とした多変量 logistic 回帰分析では、アルブミン尿は SCI 合併と有意に関連したが、eGFR 低下の影響は有意でなかった。

2) 縦断面研究

中央値 3.9 年の観察期間中、47 名がエンドポイントに達した。SCI 合併例（171 名）は非合併例（195 名）に比べ、エンドポイントの到達率が有意に高かった。多変量 Cox 比例

ハザードモデルにおいても、SCI 合併患者の SCI 非合併患者に対する腎症進展のハザード比は有意であった。

D. 考察

本研究は、2 型糖尿病患者において、アルブミン尿および eGFR 低下と SCI との関連を検討した。横断面研究から、アルブミン尿は SCI 合併と有意に関連するが、eGFR 低下の影響は小さいこと、また縦断面研究から、SCI の合併が、腎症発症・進展の独立した予測因子であることが確認された。

アルブミン尿と SCI の関連を説明する機序については、大動脈 stiffness 増加がラクナ梗塞とアルブミン尿の介在因子である可能性、さらには脳および腎の血行動態上の解剖学的な類似点による結果と推察された。

E. 結論

日本人 2 型糖尿病患者において、アルブミン尿と SCI が密接かつ相互に関連す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

- 1) Bouchi R, et al. Relationship between chronic kidney disease and silent cerebral infarction in patients with type 2 diabetes. Diabet Med 27: 538-543, 2010
- 2) Bouchi R, et al. Silent cerebral infarction is associated with the development and progression of nephropathy in patients with type 2 diabetes. Hypertens Res 33:

1000-1003, 2010

2. 学会発表

- 1) 坊内良太郎, 他.
糖尿病性腎症と無症候性脳梗塞との関連に関する横断研究. 第 21 回日本糖尿病性腎症研究会
- 2) 坊内良太郎, 他.
糖尿病性腎症と無症候性脳梗塞との関連. 第 52 回日本糖尿病学会年次学術集会
- 3) 坊内良太郎
糖尿病患者における脳腎連関. 第 3 回臓器保護を考える会 ~脳からのアプローチ~.
- 4) 坊内良太郎, 他.
2 型糖尿病患者における無症候性脳梗塞が腎症の発症・進展におよぼす影響. 第 53 回日本糖尿病学会年次学術集会

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

糖尿病性腎症の組織・機能連関に関する研究

研究協力者

守屋 達美 北里大学医学部内分泌代謝内科学

研究要旨

糖尿病性腎症（腎症）は慢性腎臓病(CKD)の最大の原因疾患である。しかし、腎症病期分類と CKD stage 分類には整合性がみられない。本研究では、腎症 1～2 期でありながら、CKD stage 3 以降に分類される患者の腎組織が典型的な腎症と異なるか否かの検討を行う。多施設における腎生検組織を現在検討中である。

A. 研究目的

正常アルブミン尿期糖尿病患者の GFR60ml/min/1.73m²未満のCKDが糖尿病性腎症か否かを組織学的に検討する。

B. 研究方法

すでに経皮的腎生検を施行している正常および微量アルブミン尿の2型糖尿病患者の腎生検PAS標本を既報(Diabetologia 1996)の方法に従い、正常例、典型例、非典型例に分類する。

(倫理面への配慮)

すでに生検された組織を使用するため、侵襲はない。

C. 研究結果

現在、新潟大学、奈良県立医科大学、秋田大学および北里大学の腎生検例を組織、機能の両面から検討中である。

D. 考察

過去に、組織形態計測により正常アルブミン尿期と微量アルブミン尿期の糸球体所見には差がないことを報告したが、今回は組織

障害パターンに差異があるかどうかの検討である。

E. 結論

一定以上の結果がえられた段階で報告する。

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

【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）
研究報告書

糖尿病性腎症の病態解明と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 藤田保健衛生大学医学部腎内科

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
篁 俊成 医薬保健研究域医学系恒常性制御学

研究協力者

森 潔 京都大学大学院医学研究科内科学講座内分泌代謝内科
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構造病理学分野

研究要旨

本研究の全体研究では、「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 22 年度は、全体研究として、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着手した。平成 23 年度以降は、現在進行中の個別研究（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 種類以内を選定し、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。最終目標は、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の評価である。

A. 研究目的

分科会全体目標：

本研究は、「尿中アルブミン」をしのぐ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 22 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メタボローム解析による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：

メタボローム解析（藤田保健衛生大学：湯沢由紀夫）

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、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）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。

現在 1 種類のマーカーを用いた流路型分析チップが終了し、5 種類のマーカーを同時測定するシステムに移行中である。さらに、従来の ELISA 分析とデータの検証を行い、5 種類のマーカーを用いたパネルモデルを作成中である。

（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」を遵守している。

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た。

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

メタボローム解析

名古屋大学で収集した糖尿病性腎症各ステージの患者尿サンプルを用いて、メタボローム解析を行った。

さらに、次のステップとして、同時に採取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開始した。

(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。同意を得た

対象者より、血液・尿サンプルを採取し、採取されたサンプルを、連結可能匿名化後、名古屋大学病態内科学講座糖尿病研究室及び腎臓研究室にて保存する。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一括して保存し、部外者のアクセスを禁じる。

C. 研究結果

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, Collagen IV, AGT, MCP-1, L-FABP 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行性の確認に着手した。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

[メタボローム解析]

-30℃で冷凍保存していた患者血液サンプルを解凍して、500 μl 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。

血液サンプルの解析から、糖尿病性腎症の正常・1型糖尿病・境界型・2型糖尿病4ステージを分類可能な7種類の代謝物を同定した。

微量アルブミン期に特異的な16代謝物(陽イオン)7代謝物(陰イオン)を同定し、さらにeGFRと相関する8代謝物を確認した。(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、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

[メタボローム解析]

血液サンプルの解析から糖尿病性腎症の

各病期に特異的な複数のマーカー群を確認し、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。

尿サンプルにて同様の検討をしており、尿バイオマーカーの候補物質の同定に移行している。

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

[メタボローム解析]

今後は、尿サンプルにて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

- 1) Mizutani M, Ito Y, Mizuno M, Nishimura H, Suzuki Y, Hattori R, Matsukawa Y, Imai M, Oliver N, Goldschmeding R, Aten J, Krediet RT, Yuzawa Y, Matsuo S. Connective tissue growth factor(CTGF/CCN2) is increased in peritoneal dialysis

- patients with high peritoneal solute transport rate. *Am J Physiol Renal Physiol.* 298 (3): F721-33. 2010
- 2) Ito Y, Goldschmeding R, Kasuga H, Claessen N, Nakayama M, Yuzawa Y, Sawai A, Matsuo S, Weening JJ, Aten J. Expression patterns of connective tissue growth factor and of TGF β isoforms during glomerular injury recapitulate glomerulogenesis. *Am J Physiol Renal Physiol.* 299(3): F545–F558, 2010
- 3) Sawai A, Ito Y, Mizuno M, Suzuki Y, Toda S, Ito I, Hattori R, Matsukawa Y, Gotoh M, Takei Y, Yuzawa Y, Matsuo S., Peritoneal macrophage infiltration is correlated with baseline peritoneal solute transport rate in peritoneal dialysis patients. *Nephrol Dial Transplant.* 2010 Nov 22. , Epub ahead of print
2. 学会発表
- 1) Noritoshi Kato, Tomoki Kosugi, Waichi Sato, Takuji Ishimoto, Shoichi Maruyama, Yukio Yuzawa, Kenji Kadomatsu, Seiichi Matsuo. Basigin/CD147 Promotes Renal Fibrosis after Unilateral Ureteral Obstruction. 43rd Annual Meeting & Scientific Exposition (Renal Week). Denver (USA). November 18, 2010
- 2) Kazuo Takahashi, Hitoshi Suzuki, Archer D. Smith, Knud Poulsen, Mogens Kilian, Yukio Yuzawa, Yoshiyuki Hiki, Bruce A. Julian, Jiri F. Mestecky, Matthew B. Renfrow, Jan Novak. Identification of Structural Isomers of IgA1 Hinge-Region O-Glycopeptides: Implications for Pathogenesis of IgA Nephropathy (IgAN). 43rd Annual Meeting & Scientific Exposition (Renal Week). Denver (USA). November 18, 2010
- 3) Akiho Sawai, Yasuhiko Ito, Masashi Mizuno, Yasuhiro Suzuki, Susumu, Toda, Isao Ito, Waichi Sato, Naotake Tsuboi, Shoichi Maruyama, Enyu Imai, Yoshifumi Takei, Yukio Yuzawa, Seiichi Matsuo. Peritoneal Macrophage Infiltration Is Correlated with Baseline Peritoneal Solute Transport Rate in Peritoneal Dialysis Patients. 43rd Annual Meeting & Scientific Exposition (Renal Week). Denver (USA). November 18, 2010
- 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

糖尿病性腎症の病態解明と評価のためのバイオマーカー開発に関する研究

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障害の機序とそ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。さまざまなストレスに対して、ポドサイトは構成分子・機能分子の発現パターンが変化を繰り返す。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解析という手法を導入して、ポドサイト障害に起因して、同細胞より放出されるエクソゾームの測定・意義を解析することにより、糖尿病性腎症の早期発見、予後予測をめざす。これまでに、複数の候補分子が同定され、その機能解析が進行中である。

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、ポドサイト障害の分子病態の解析とともに、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. 研究結果

腎生検で確定診断のついた糖尿病性腎症患者の尿より、尿中 **exosome** を採取し、腎機能低下に強くリンクした候補マーカ-の探索を行った。現在、7つの分子がポドサイト由来の **exosome** 中候補タンパク質として選定されてきた。このうち、全尿を用いての検出が可能なものは、3分子である。これら候補分子は、腎生検で得られた組織における免疫組織学的な解析と照合することで、糸球体内の発現の変化を反映することが明らかとなっている。

D. 考察

糖尿病によるポドサイトの障害に関して、どのような障害を受けて脱落に至るかは、ヒトでの検討はあまりなされていなかったが、障害を反映して発現の変化するタンパク質群が徐々に明らかになりつつある。ポドサイト障害の分子機序およびそれをとらえる尿中エクソゾーム蛋白のプロファイルの変化が糖尿病性腎症の病期にあわせ、病変の進行を検出するマ-カ-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病変の進展、腎機能低下の分子病態の解明に、ポドサイト由来尿中エクソゾームタンパク質を用いた解析は重要である。

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

- 1) 第 21 回 日本老年医学会四国地方会総会 加齢による影響を受けない腎症新規バイオマ-カ-の探索 芦名茂人、安部秀斉、土井俊夫
- 2) 第 21 回 日本老年医学会四国地方会総会 65歳以上の腎機能低下関連因子--横断的研究による検討 高松典通、安部秀斉、富永辰也、奥本陽子、伊藤結美、金智雲、北風政史、土井俊夫
- 3) 第 55 回 日本透析医学会学術集会・総会 **CKD** 患者の血中 **MGP** および関連分子と、病態に関する検討 吉川和寛、安部秀斉、富永辰也、岸誠司、岸史、荒岡利和、村上太一、近藤直樹、松浦元一、長井幸二郎、土井俊夫、中村雅将、土田健司、水口潤、川島周
- 4) 第 55 回 日本透析医学会学術集会・総会 新規バイオマ-カ-としての尿中エクソゾーム中の **CD2AP** による **CKD** 患者の予後解析 近藤直樹、安部秀斉、芦名茂人、吉川和寛、岸史、荒岡利和、岸誠司、松浦元一、富永辰也、村上太一、中村雅将、長井幸二郎、土井俊夫
- 5) 第 53 回 日本腎臓学会学術総会 地域住民健診におけるアルブミン尿検出の有用性 高松典通、安部秀斉、富永辰也、長井幸二郎、土井俊夫
- 6) 第 33 回 日本分子生物学会年会、第 83 回日本生化学会大会 新規バイオマ-カ-としての **podocyte** 由来尿中エクソゾームによる慢性腎臓病患者の病態解析 安部尚子、安部秀斉、近藤直樹、吉川和寛、土井俊夫

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

2型糖尿病・肥満症の病態を形成する新規肝臓由来ホルモンの同定と機能解析

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

代謝の司令塔であり分泌タンパクの主要な産生源である肝臓には臓器間ネットワークを制御する未知のホルモン、すなわちヘパトカインが存在することが推定されてきたが、それらの同定と解析は未だ不十分である。本研究では、2型糖尿病および健常人の肝臓に発現する遺伝子のSAGE、DNA chip解析から、シグナルペプチドの構造を有すると推測される遺伝子に絞り、発現量と臨床マーカーの関連を照合し、インスリン抵抗性、肥満、あるいは血糖コントロールと関連する肝臓由来分泌蛋白コード遺伝子を絞り込んだ。これらの中で、ヒト肝臓での発現がインスリン抵抗性および高血糖と関連する機能性ヘパトカインとしてセレノプロテイン P (selenoprotein P; SeP) を同定した。in vitro および in vivo の検討から、SeP は、少なくとも一部に AMP キナーゼの活性抑制を介して全身のインスリン抵抗性を引き起こし、糖代謝を障害することがわかった。この結果は、過栄養状態で脂肪化した肝臓が、糖尿病の病態に成因として関与する可能性を示唆する。

A. 研究目的

近年、2型糖尿病・肥満症は、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体内において複雑なネットワークを形成して発症することが認識されてきた。なかでも肝臓は、糖・蛋白・脂質代謝の司令塔として、これらの多因子を感じとり、遺伝子発現をダイナミックに変化させることで生体の恒常性を維持している。肥満症、糖尿病、およびそれらの合併症である動脈硬化、癌などの、過栄養が関与する症候群に肝臓の機能破綻とそれに伴うインスリン抵抗性が大きく関与している可能性がある。

本研究では、2型糖尿病および健常人の

肝臓に発現する遺伝子のSAGE、DNA chip解析から新規肝臓由来ホルモンとして、セレノプロテインP(selenoprotein P; SeP)を同定し、その機能を解析した。

SePは、主に肝臓からつくられる分泌タンパクであり、ヒトの血液中にはSePが4~5 $\mu\text{g/mL}$ と大量に存在している。SePは、必須微量元素であるセレン (Se)を多く含んでおり、セレンを肝臓から全身へと輸送するホルモンであることが報告されてきた。しかしながら、SePが血糖値やインスリン感受性に及ぼす影響は従来不明であった。本研究により、2型糖尿病患者で血液中のSePが増えていること、SePが血糖値を上昇させるホルモンであることが明らかになっ

た。

B. 研究方法

2型糖尿病患者5名と健常者5名の肝臓における発現遺伝子をSAGE法を用いて包括的に解析し、糖尿病患者で1.5倍以上発現亢進する分泌タンパクコード遺伝子63種、発現低下する遺伝子114種を同定した。DNA chip法を用いてこれらの遺伝子群の肝発現レベルと患者の臨床背景を照合した結果、肝遺伝子発現量がHbA1cと相関する遺伝子14種、BMIと相関する遺伝子22種、HOMA-IRと相関する遺伝子14種、グルコースクランプ法で評価したインスリン感受性指数MCRと相関する遺伝子15種を同定した。

(倫理面への配慮)

臨床試験開始にあたっては関連する倫理委員会の審査を受け、指針に従い臨床情報は匿名化し個人情報に十分配慮した。

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ーにて一括管理し、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ーに一括して保存し、部外者のアクセスを禁じた。

C. 研究結果

1. 肝遺伝子発現がMCRと負に相関し、かつ糖負荷後120分血糖値と正に相関したセレノプロテインP (SeP)を精製した。
2. 2型糖尿病モデル動物KKAyマウス、OLETFラットでは、肝SeP遺伝子、血中

SePタンパクが上昇していた。

3. 2型糖尿病患者31名で血中SeP濃度を測定した結果、血糖値、HbA1c値と有意な正相関を認めた。
4. C57BLマウスに1mg/kgの精製SePを前投与すると、糖負荷30分後の血糖値は約1.8倍に上昇し ($p=0.001$)、腹腔内インスリン負荷後30分の血糖降下率は約10%減弱した。
5. このマウスの肝と筋でインスリン刺激性Aktリン酸化は減弱していた。
6. SePノックアウトマウスは体重、摂食量、酸素消費量は正常であったが、糖およびインスリン負荷試験では耐糖能、インスリン感受性は良好であった。
7. SePノックアウトマウスの肝と筋ではインスリン刺激によるインスリンレセプターのチロシンリン酸化が亢進していた。
8. H4IIEC肝細胞をSePタンパク10 μ g/mLで12時間前処置すると、1ng/mlのインスリン15分刺激によるinsulin receptor、IRS-2、Aktのリン酸化はそれぞれ約40%に減少した。このとき培養液中への糖放出は約30%増加した。
9. インスリン抵抗性関連既知因子の発現を同細胞で網羅的に検討した結果、SeP投与細胞ではAMPKのリン酸化とその下流のACCのリン酸化が減弱していた。
10. AMPKの下流で制御される脂肪酸酸化関連遺伝子群 (PPAR- α 、Cpt-1、Acad1)の発現も減弱した。
11. SePタンパク投与H4肝細胞では、C-14-oleateのC-14-CO₂へのベータ酸化も低下していた。
12. 精製SePタンパク1 mg/kgBWをC57BLマウスに静脈投与し、6時間後に肝臓を摘出しタンパク発現を検討したところ、