

**Fig. 6** The direct effects of exendin-4 on hGECs. **a** *GLP1R* gene expression in hGECs. h-P, human positive control (human pancreas). **b** GLP-1R protein production in hGECs by western blotting. **c** Quantification of *ICAM1* expression in hGECs by real-time RT-PCR. hGECs stimulated with TNF-α (100 pg/ml) for 6 h showed significantly enhanced *ICAM1* expression. Exendin-4 (EX) significantly and dose-dependently suppressed *ICAM1* gene expression. GLP-1R antagonist (1,000 nmol/l; anti-EX) significantly inhibited the suppressive effect of 100 nmol/l exendin-4 (EX100) on *ICAM1* expression. Values (means ± SEM) are presented as fold relative to *ACTB* and expressed as 1 in control (no TNF-α stimulation); *n*=5 per group. The experiment was repeated three times. \*\**p*<0.01 vs

control; †*p*<0.05 vs TNF-α stimulation; ‡*p*<0.05 vs TNF-α + 100 nmol/l EX (EX100). **d** ICAM-1 production in hGECs by western blotting analysis, with **e** quantification. hGECs stimulated with TNF-α (100 pg/ml) for 6 h significantly promoted ICAM-1 production. Exendin-4 significantly suppressed ICAM-1 production. Anti-EX significantly inhibited the suppressive effect of EX100 on ICAM-1 production. Values (means ± SEM) are presented as fold relative to β-actin and expressed as 1 in control (no TNF-α stimulation); *n*=5 per group. The experiment was repeated twice. \*\*\**p*<0.01 vs control; †*p*<0.05 vs TNF-α stimulation; ‡*p*<0.05 vs TNF-α + EX100. EX2.5, 2.5 nmol/l exendin-4; EX10, 10 nmol/l exendin-4

mation. In HUVECs, treatment with liraglutide, a long-acting GLP-1 analogue, has also been shown to inhibit TNF-α or hyperglycaemia-mediated induction of ICAM-1 gene and protein [30]. These reports support our present findings. In our study, high glucose (15 mmol/l) stimulation for a period of 24 to 72 h did not significantly enhance *ICAM1* gene expression in hGECs (data not shown).

Macrophages play a critical role in the development of diabetic nephropathy. In vitro, the culture supernatant fraction of macrophages has been shown to stimulate mesangial cells to produce fibronectin [31], while macrophages directly secrete TGF-β [32]. Both of these processes play a central role in the enhancement of glomerular extracellular matrix production in diabetic nephropathy

[33, 34]. Based on these previous and our present findings, we conclude that the inhibition of macrophage infiltration by exendin-4 has a beneficial effect on suppressing progression of diabetic nephropathy.

In the diabetic state, many factors contribute to elevated NF-κB activation [35]. NF-κB is also the most important transcription factor regulating ICAM-1 production [36]. Arakawa et al. [37] reported that exendin-4 suppressed NF-κB activation of lipopolysaccharide-induced macrophages, suggesting that exendin-4 reduced direct NF-κB activation in macrophages. The reduction of NF-κB activity by exendin-4 may lead to inhibition of ICAM-1 levels and suppression of pro-inflammatory cytokines derived from macrophages.

Oxidative stress and inflammation are closely related to each other and create a vicious cycle in the diabetic state. Gorin et al. [38] showed that NADPH oxidase, and especially the NOX4 component of NADPH in the kidney, is important as the major source of oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic nephropathy. Although many stimuli activate NOX4 production, cytokines and shear stress are important factors in the diabetic state [39]. NOX4 has been reported to be produced on epithelial cells [40] and mesangial cells [27], and was confirmed to be produced on endothelial cells in this study. In our study, exendin-4 suppressed NOX4 levels in the kidney. We speculate that reducing the release of pro-inflammatory cytokines from macrophages and normalising hyperfiltration by exendin-4 treatment may have contributed to the suppression of NOX4 production. Etoh et al. [27] reported that localisation and levels of NOX4 were in parallel with those of 8-OHdG. Therefore, the reduction of NOX4 level by exendin-4 treatment would contribute to a decrease in 8-OHdG production in glomeruli. Park et al. [25] also reported similar results in regard to 8-OHdG reduction by exendin-4 in a mouse model of type 2 diabetes. We speculate that exendin-4 contributes to an attenuation of oxidative stress and that this helps ameliorate diabetic vascular complications.

It is well known that GLP-1 signalling through GLP-1R enhances cyclic AMP as a second messenger [41]. Previous reports have revealed that an increase in activity of the cyclic AMP/protein kinase A pathway suppresses NF- $\kappa$ B activity in THP-1 cells and HUVECs [42], and inhibits NADPH oxidase [43]. These findings support our finding that exendin-4 modulated the inflammatory vicious cycle in the kidney.

In our model, exendin-4 did not affect blood glucose levels, blood pressure, food intake or body weight as it has been shown to do in models of type 2 diabetes. To determine that the effects of exendin-4 occurred without lowering of blood glucose, we started exendin-4 treatment at 1 week after the streptozotocin injections and confirmed that exendin-4 did not restore insulin secretion in our model. A much higher dose than that used in our study would have been necessary to reduce blood pressure in diabetic rats [26]. GLP-1 inhibits food intake and results in weight loss [18, 20, 21]. In the present study, the non-diabetic group treated with exendin-4 had decreased food intake and weight loss compared with the control group, but there were no significant differences. It is difficult to differentiate the effect of exendin-4 from the significant weight reduction that is generally seen in the model of type 1 diabetes.

In this study, the ratio of kidney weight to body weight in the diabetic groups was significantly increased in diabetic rats compared with the non-diabetic groups. However, exendin-4 treatment did not affect them. As

periodic acid–Schiff's reagent staining revealed, exendin-4 did not ameliorate tubular hypertrophy. Tubular hypertrophy may be the main factor contributing to kidney weight, and we need to investigate a longer period to appreciate the effect of exendin-4 on tubular hypertrophy and interstitial fibrosis. Additionally, exendin-4 prevented diabetes-induced hyperfiltration. Previous reports have revealed that hyperfiltration was improved by exendin-4 treatment in obese diabetic patients [44] and the *db/db* mouse model [25]. There has been no report that exendin-4 affects creatinine clearance in a later stage of diabetic nephropathy.

The inflammatory process is involved in the mechanism of obesity-related insulin resistance [45] and in the pathogenesis of atherosclerosis [46]. Moreover, there is also a close relationship between chronic renal insufficiency and the cardiorenal syndrome, through several pathways including inflammation [47, 48]. GLP-1R agonists might be beneficial for these diseases through their anti-inflammatory effects. Recently, Arakawa et al. [37] reported an anti-inflammatory effect of exendin-4 in an animal model of atherosclerosis. Their report also pointed out the importance of exendin-4 as a potential therapeutic agent for cardiovascular disease in diabetes.

In conclusion, we have shown that exendin-4 exerts renoprotective effects through anti-inflammatory actions without lowering blood glucose in a streptozotocin-induced rat model of type 1 diabetes. Furthermore, exendin-4 directly acted on GLP-1R and suppressed production of pro-inflammatory cytokines and ICAM-1. This study may provide the first evidence that GLP-1R agonists directly contribute to the prevention of diabetic nephropathy via an anti-inflammatory effect.

**Acknowledgements** This study was supported in part by a Grant-in-Aid for Scientific Research from the Ministry of Education, Science, Culture, Sports and Technology (C21591031 to K. Shikata), and the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan.

**Duality of interest** The authors declare that there is no duality of interest associated with this manuscript.

## References

1. de Zeeuw D, Parving HH, Henning RH (2006) Microalbuminuria as an early marker for cardiovascular disease. *J Am Soc Nephrol* 17:2100–2105
2. Go AS, Chertow GM, Fan D, McCulloch CE, Hsu CY (2004) Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. *N Engl J Med* 351:1296–1305
3. Magee GM, Bilous RW, Cardwell CR, Hunter SJ, Kee F, Fogarty DG (2009) Is hyperfiltration associated with the future risk of developing diabetic nephropathy? A meta-analysis. *Diabetologia* 52:691–697

4. Baynes JW (1991) Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes* 40:405–412
5. Brownlee M, Cerami A, Vlassara H (1988) Advanced glycosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications. *N Engl J Med* 318:1315–1321
6. Koya D, Jirousek MR, Lin YW, Ishii H, Kuboki K, King GL (1997) Characterization of protein kinase C beta isoform activation on the gene expression of transforming growth factor-beta, extracellular matrix components, and prostanoids in the glomeruli of diabetic rats. *J Clin Invest* 100:115–126
7. Ziyadeh FN, Sharma K, Ericksen M, Wolf G (1994) Stimulation of collagen gene expression and protein synthesis in murine mesangial cells by high glucose is mediated by autocrine activation of transforming growth factor-beta. *J Clin Invest* 93:536–542
8. Nelson CL, Karschimkus CS, Dragicevic G et al (2005) Systemic and vascular inflammation is elevated in early IgA and type 1 diabetic nephropathies and relates to vascular disease risk factors and renal function. *Nephrol Dial Transplant* 20:2420–2426
9. Saraheimo M, Teppo AM, Forsblom C, Fagerudd J, Groop PH (2003) Diabetic nephropathy is associated with low-grade inflammation in type 1 diabetic patients. *Diabetologia* 46:1402–1407
10. Furuta T, Saito T, Ootaka T et al (1993) The role of macrophages in diabetic glomerulosclerosis. *Am J Kidney Dis* 21:480–485
11. Hirata K, Shikata K, Matsuda M et al (1998) Increased expression of selectins in kidneys of patients with diabetic nephropathy. *Diabetologia* 41:185–192
12. Sugimoto H, Shikata K, Hirata K et al (1997) Increased expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in diabetic rat glomeruli: glomerular hyperfiltration is a potential mechanism of ICAM-1 upregulation. *Diabetes* 46:2075–2081
13. Okada S, Shikata K, Matsuda M et al (2003) Intercellular adhesion molecule-1-deficient mice are resistant against renal injury after induction of diabetes. *Diabetes* 52:2586–2593
14. Yozai K, Shikata K, Sasaki M et al (2005) Methotrexate prevents renal injury in experimental diabetic rats via anti-inflammatory actions. *J Am Soc Nephrol* 16:3326–3338
15. Tone A, Shikata K, Sasaki M et al (2005) Erythromycin ameliorates renal injury via anti-inflammatory effects in experimental diabetic rats. *Diabetologia* 48:2402–2411
16. Ohga S, Shikata K, Yozai K et al (2007) Thiazolidinedione ameliorates renal injury in experimental diabetic rats through anti-inflammatory effects mediated by inhibition of NF-kappaB activation. *Am J Physiol Renal Physiol* 292:F1141–F1150
17. Usui H, Shikata K, Matsuda M et al (2003) HMG-CoA reductase inhibitor ameliorates diabetic nephropathy by its pleiotropic effects in rats. *Nephrol Dial Transplant* 18:265–272
18. Baggio LL, Drucker DJ (2007) Biology of incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology* 132:2131–2157
19. Farilla L, Hui H, Bertolotto C et al (2002) Glucagon-like peptide-1 promotes islet cell growth and inhibits apoptosis in Zucker diabetic rats. *Endocrinology* 143:4397–4408
20. Nauck MA, Niedereichholz U, Ettl R et al (1997) Glucagon-like peptide 1 inhibition of gastric emptying outweighs its insulinotropic effects in healthy humans. *Am J Physiol* 273:E981–E988
21. Turton MD, O'Shea D, Gunn I et al (1996) A role for glucagon-like peptide-1 in the central regulation of feeding. *Nature* 379:69–72
22. Orskov C, Wettergren A, Holst JJ (1993) Biological effects and metabolic rates of glucagon like peptide-1 7-36 amide and glucagon like peptide-1 7-37 in healthy subjects are indistinguishable. *Diabetes* 42:658–661
23. Bullock BP, Heller RS, Habener JF (1996) Tissue distribution of messenger ribonucleic acid encoding the rat glucagon-like peptide-1 receptor. *Endocrinology* 137:2968–2978
24. Schlatter P, Beglinger C, Drewe J, Gutmann H (2007) Glucagon-like peptide 1 receptor expression in primary porcine proximal tubular cells. *Regul Pept* 141:120–128
25. Park CW, Kim HW, Ko SH et al (2007) Long-term treatment of glucagon-like peptide-1 analog exendin-4 ameliorates diabetic nephropathy through improving metabolic anomalies in db/db mice. *J Am Soc Nephrol* 18:1227–1238
26. Hirata K, Kume S, Araki S et al (2009) Exendin-4 has an anti-hypertensive effect in salt-sensitive mice model. *Biochem Biophys Res Commun* 380:44–49
27. Etoh T, Inoguchi T, Kakimoto M et al (2003) Increased expression of NAD(P)H oxidase subunits, NOX4 and p22phox, in the kidney of streptozotocin-induced diabetic rats and its reversibility by interventional insulin treatment. *Diabetologia* 46:1428–1437
28. Fong JS, Drummond KN (1968) Method for preparation of glomeruli for metabolic studies. *J Lab Clin Med* 71:1034–1039
29. Shigenaga MK, Gimeno CJ, Ames BN (1989) Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine as a biological marker of in vivo oxidative DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:9697–9701
30. Liu H, Dear AE, Knudsen LB, Simpson RW (2009) A long-acting glucagon-like peptide-1 analogue attenuates induction of plasminogen activator inhibitor type-1 and vascular adhesion molecules. *J Endocrinol* 201:59–66
31. Pawluczyk IZ, Harris KP (1997) Macrophages promote proclerotic responses in cultured rat mesangial cells: a mechanism for the initiation of glomerulosclerosis. *J Am Soc Nephrol* 8:1525–1536
32. Leonarduzzi G, Scavazza A, Biasi F et al (1997) The lipid peroxidation end product 4-hydroxy-2,3-nonenal up-regulates transforming growth factor beta1 expression in the macrophage lineage: a link between oxidative injury and fibrosclerosis. *Faseb J* 11:851–857
33. Ziyadeh FN, Hoffman BB, Han DC et al (2000) Long-term prevention of renal insufficiency, excess matrix gene expression, and glomerular mesangial matrix expansion by treatment with monoclonal antitransforming growth factor-beta antibody in *db/db* diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:8015–8020
34. Sharma K, Ziyadeh FN (1995) Hyperglycemia and diabetic kidney disease. The case for transforming growth factor-beta as a key mediator. *Diabetes* 44:1139–1146
35. Guijarro C, Egidio J (2001) Transcription factor-kappa B (NF-kappa B) and renal disease. *Kidney Int* 59:415–424
36. Roebuck KA, Finnegan A (1999) Regulation of intercellular adhesion molecule-1 (CD54) gene expression. *J Leukoc Biol* 66:876–888
37. Arakawa M, Mita T, Azuma K et al (2010) Inhibition of monocyte adhesion to endothelial cells and attenuation of atherosclerotic lesion by a glucagon-like peptide-1 receptor agonist, exendin-4. *Diabetes* 59:1030–1037
38. Gorin Y, Block K, Hernandez J et al (2005) Nox4 NAD(P)H oxidase mediates hypertrophy and fibronectin expression in the diabetic kidney. *J Biol Chem* 280:39616–39626
39. Frey RS, Ushio-Fukai M, Malik AB (2009) NADPH oxidase-dependent signaling in endothelial cells: role in physiology and pathophysiology. *Antioxid Redox Signal* 11:791–810
40. Sharma K, Ramachandrarao S, Qiu G et al (2008) Adiponectin regulates albuminuria and podocyte function in mice. *J Clin Invest* 118:1645–1656
41. Doyle ME, Egan JM (2007) Mechanisms of action of glucagon-like peptide 1 in the pancreas. *Pharmacol Ther* 113:546–593
42. Ollivier V, Parry GC, Cobb RR, de Prost D, Mackman N (1996) Elevated cyclic AMP inhibits NF-kappaB-mediated transcription in human monocyte cells and endothelial cells. *J Biol Chem* 271:20828–20835
43. Kim JS, Diebold BA, Babior BM, Knaus UG, Bokoch GM (2007) Regulation of Nox1 activity via protein kinase A-mediated

- phosphorylation of NoxA1 and 14-3-3 binding. *J Biol Chem* 282:34787–34800
44. Gutzwiller JP, Tschopp S, Bock A et al (2004) Glucagon-like peptide 1 induces natriuresis in healthy subjects and in insulin-resistant obese men. *J Clin Endocrinol Metab* 89:3055–3061
45. Xu H, Barnes GT, Yang Q et al (2003) Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest* 112:1821–1830
46. Ross R (1999) Atherosclerosis—an inflammatory disease. *N Engl J Med* 340:115–126
47. Bongartz LG, Cramer MJ, Doevendans PA, Joles JA, Braam B (2005) The severe cardiorenal syndrome: ‘Guyton revisited’. *Eur Heart J* 26:11–17
48. Nakamura A, Shikata K, Hiramatsu M et al (2005) Serum interleukin-18 levels are associated with nephropathy and atherosclerosis in Japanese patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 28:2890–2895

プログラム・抄録集

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

平成 22 年度 第 1 回班会議

プログラム

日時：平成 22 年 4 月 9 日（金）13：30～14：30  
場所：東京国際フォーラム 604 号室

研究代表者 和田 隆志

事務局 〒920-8640 金沢市宝町 13 番 1 号  
金沢大学医薬保健研究域医学系  
血液情報統御学

TEL：076-265-2499 FAX：076-234-4273

E-mail：lab-med@med.kanazawa-u.ac.jp

厚生労働省  
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

平成 22 年度 第 1 回班会議 プログラム  
平成 22 年 4 月 9 日 (金)

1. 挨拶 13 : 30～13 : 35  
研究代表者 和田 隆志
  
2. 活動計画
  - I. 全体研究：糖尿病性腎症レジストリー構築 13 : 35～13 : 50  
古市 賢吾
  
  - II. 「糖尿病性腎症の病期分類ならびに病態の解析」分科会 活動予定 13 : 50～14 : 05  
羽田 勝計
  
  - III. 「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 活動予定 14 : 05～14 : 15  
湯澤 由紀夫
  
  - IV. 「糖尿病性腎症の新規治療法の開発」分科会 活動予定 14 : 15～14 : 25  
奥田 誠也
  
3. 事務連絡  
分担研究者・協力研究者リスト  
研究費  
今後の予定

## 糖尿病性腎症の評価のためのバイオマーカー開発

湯澤 由紀夫<sup>1</sup>, 安部 秀斉<sup>2</sup>, 篁 俊成<sup>3</sup>

<sup>1</sup>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, <sup>2</sup>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分野, <sup>3</sup>金沢大学医薬保健研究域医学系恒常性制御学

### 1. 研究の目的、必要性及び特色・独創的な点

次年度では、初年度に引き続きトランスクリプトーム解析（金沢大学）、尿中エクソソームを用いた podocyte 関連タンパク解析（徳島大学）、メタボローム解析（名古屋大学）などの解析作業を推進して、本分科会の最終目標に合致するバイオマーカー候補を選出する。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・血清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する。

### 2. 期待される成果

これまで有効な診断法が無かった糖尿病性腎症に対して、最新の一斉分析技術を体系的に採用したことで、従来法よりも低コスト・短時間でバイオマーカー等の数値を具体的に入れた新たな病期分類を作製することに寄与する基礎データを提供することができる。その結果、日本人患者に最適化した診断法の開発および診断基準改訂に向けた提言が期待できる。その結果、早期診断・早期治療介入が現実的になり、国民の健康向上や医療費抑制に貢献できる。

### 3. 当初の研究計画に照らした本研究事業の進捗状況

トランスクリプトーム解析では、2型糖尿病患者の末梢血単核球(PBMC)に発現する遺伝子発現プロファイルが糖尿病に伴う病態を反映すること(BBRC 2007、Diabetes *in press*)を示した。この系を用いて、糖尿病腎症の病態と関連したPBMC発現遺伝子プロファイルと代謝パスウェイを探索予定である。尿中エクソソーム解析では正常および腎機能低下を伴わない蛋白尿では検出されず、糖尿病性腎症において検出される候補タンパクを同定した。メタボローム解析では、尿中代謝産物の一斉解析に着手し、病態別および病期別代謝産物プロファイルの作製が進行中である。



## 糖尿病性腎症に対する新規治療法の開発

奥田 誠也

久留米大学医学部内科学講座 腎臓内科部門

糖尿病性新規治療薬として、カロリー制限模倣薬（スベラトロール）、ケモカイン受容体(CCR2)阻害薬、AGE-DNA aptamer について、研究の目的、期待される成果、進捗状況についてそれぞれについて記載する。

### 1) 糖尿病性腎症におけるカロリー制限およびその模倣薬の検討（金沢医科大学、古屋大祐）

#### 1. 研究の目的

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していること、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、我々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した。

#### 2. 期待される成果

本研究成果は、新規治療薬の開発につながりわが国の医療に多大な貢献をするものと信じている。

#### 3. 進捗状況

既に、軽度のカロリーあるいはその模倣薬であるレスベラトロールによって、糖尿病腎症モデルラットの腎障害が改善されることを見出しており、今後はその分子機構の解明と新たな標的分子の同定を目指している。

### 2) 骨髄由来細胞に作用するケモカイン受容体阻害薬の検討（金沢大学、和田隆志）

#### 1. 研究の目的

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。

#### 2. 期待される成果

腎局所における炎症・免疫担当細胞制御の側面から新規治療法の可能性が示される。それにより, 糖尿病性腎症による腎不全への進行抑制につながる。

#### 3. 進捗状況

マウス糖尿病性腎症モデルにおいて CCR2 阻害薬を投与した結果, 腎内 fibrocyte およびマクロファージ数が減少した。臨床的には腎機能およびアルブミン尿に改善傾向を認めた。

現在は同薬剤の前臨床試験への応用を検討している。

### 3) AGEs-DNA aptamer による糖尿病性腎症進展抑制の可能性 (久留米大学、奥田誠也)

#### 1. 研究の目的

AGEs-aptamer 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。Aptamer 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る。

#### 2. 期待される成果

AGE-aptamer 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。

#### 3. 進捗状況

AGE-aptamer を作成した。直接腹腔内に aptamer 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。

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  
「糖尿病性腎症の病期分類ならびに病態の解析」分科会

平成 22 年度 第 1 回分科会会議

プログラム

日時：平成 22 年 4 月 9 日（金）18：00～19：30  
場所：ベルサール八重洲

研究代表者 和田 隆志

事務局 〒920-8640 金沢市宝町 13 番 1 号  
金沢大学医薬保健研究域医学系  
血液情報統御学

TEL：076-265-2499 FAX：076-234-4273

E-mail：lab-med@med.kanazawa-u.ac.jp

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  
「糖尿病性腎症の病期分類ならびに病態の解析」分科会

平成 22 年度 第 1 回分科会会議 プログラム  
平成 22 年 5 月 6 日 (木)

1. 挨拶  
18 : 00～18 : 05  
研究代表者 和田 隆志

18 : 05～18 : 15  
分科会長 羽田 勝計

2. 討議

I. コホートをを用いたメタ解析の概要  
18 : 15～18 : 25  
古市 賢吾

II. 登録の実際  
18 : 25～18 : 35  
二宮 利治

III. 討議  
18 : 35～

3. 事務連絡

今後の予定

次回班会議;日時: 6月16日(水) 13時30分～17時

場所; 日本腎臓学会総会、会場内

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

平成 22 年度 第 2 回班会議

プログラム

日時：平成 22 年 6 月 16 日（水）15：00～17：00  
場所：神戸国際会議場 会議室 403

研究代表者 和田 隆志

事務局 〒920-8640 金沢市宝町 13 番 1 号  
金沢大学医薬保健研究域医学系  
血液情報統御学

TEL：076-265-2499 FAX：076-234-4273

E-mail：lab-med@med.kanazawa-u.ac.jp

厚生労働省  
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

平成 22 年度 第 2 回班会議 プログラム  
平成 22 年 6 月 16 日 (水)

1. 挨拶 15 : 00～15 : 10  
研究代表者 和田 隆志
  
2. 活動計画
  - I. 全体研究：糖尿病性腎症レジストリー構築 15 : 10～15 : 30  
古市 賢吾
  
  - II. 「糖尿病性腎症の病期分類ならびに病態の解析」分科会 活動予定 15 : 30～16 : 00  
羽田 勝計
  
  - III. 「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 活動予定 16 : 00～16 : 30  
湯沢 由紀夫
  
  - IV. 「糖尿病性腎症の新規治療法の開発」分科会 活動予定 16 : 30～17 : 00  
古家 大祐
  
3. 事務連絡  
今後の予定

## 尿検体収集を伴った糖尿病性腎症レジストリーの運用

増加の一途をたどる透析患者の増加に対して、透析導入患者の4割以上を占め、透析導入の原疾患の第1位を占める糖尿病性腎症の透析導入患者を減らすことは喫緊の課題である。本事業の全体研究では、糖尿病性腎症レジストリーの構築と運用により、診断および治療に対す総合的なシステムの構築を目指して取り組んでいる。

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、本邦のデータ基盤を作成する事としている。その際、尿検体の保存システムをも構築し、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、二次研究という形で運営している。

3回の全体会議を経て、プロトコールを作成し、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、各施設での倫理委員会での倫理審査を進めている。同時に、平成21年12月開催の日本腎臓学会の倫理委員会でも審議され、条件付き承認となった。登録は始まったばかりではあるが、平成22年5月末までに糖尿病性腎症症例登録システム（JDN-CS）に67例登録されておりシステムが順調に稼働する事が確認された。平成22年度には登録を一層推進し、本レジストリーにて得られたデータを本邦の実態把握のためのデータベースシステムとして確立することを目指す。

## 糖尿病性腎症の病期分類ならびに病態の解析

平成 21 年度から引き続き、①全国規模の糖尿病性腎症レジストリー（前向き研究）ならびに全国にすでに存在する②長期観察されたコホート解析（メタ解析）をすすめる。平成 22 年度第 1 回分科会にて、解析のハードエンドポイント確認、データ入力しーとの整備がされた。②の試験デザインは、多施設共同による事前登録のコホート研究とし、既存のデータ、前向きデータ収集および新規登録も可能にすることとした。統計解析は 協力研究者である金沢大学公衆衛生学教室中村教授に助言頂く。現時点で本邦を代表するコホートが参加し、メタ解析と経時的予後分析を目指している。平成 22 年度には、各コホートからのデータ収集、メタ解析を進めていく予定である。 検討課題としては、特に臨床的に頻度が高く、CKD 分類と糖尿病性腎症病期分類から病態・予後が十分理解されていない下記の症例である。

- ① ステージ 3 で蛋白尿陰性及び微量アルブミン尿陽性症例の予後と合併症
- ② ステージ 1、2 で顕性腎症例の予後と合併症

最終目標として、病期分類の改訂にむけた基礎的データを検討・提供し、より臨床病態を反映する病期分類を目指して具体的な提言を行うこととする。



## 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

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、単一のマーカーによる評価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。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」が掲げられており、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」をのぞく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、市販のルートで抗体購入が可能な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。

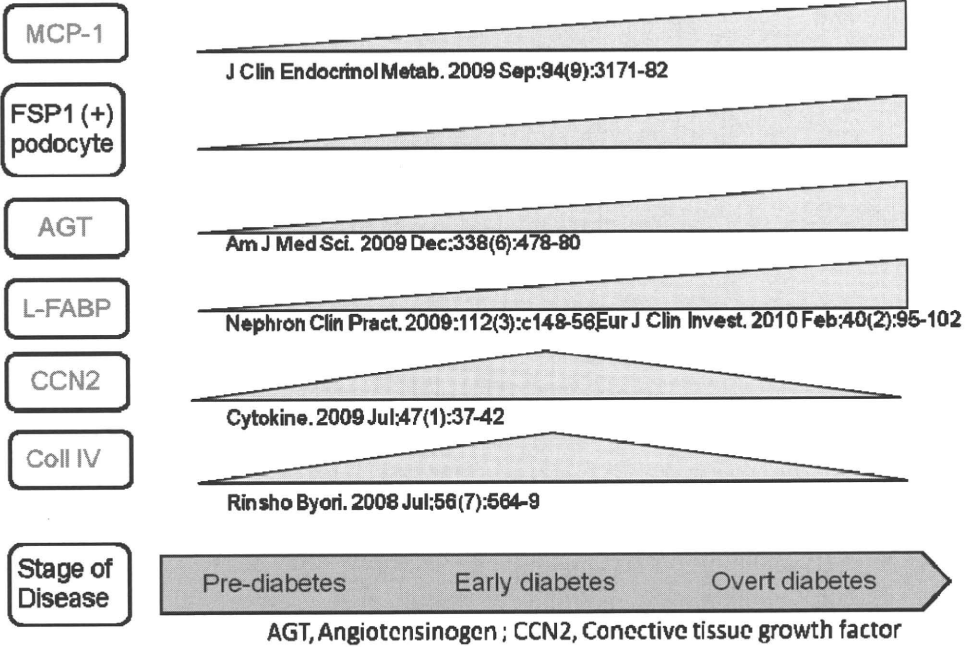
微小化学分析システム（ $\mu$ TAS, micro total analysis system）を応用した次世代型の臨床用バイオマーカー測定装置の開発については、多数ある $\mu$ TASの中から本研究目的に最適な分析プラットフォームの選定と、選定した $\mu$ TASを用いた患者尿サンプルの測定についてモデルバイオマーカーを用いたフィジビリティスタディに着手した。すなわち、本研究で求められる $\mu$ TASのスペックとして、複数のバイオマーカーを測定可能であること、微量な尿サンプルで測定可能であること、尿中の微量なバイオマーカーを検出可能な感度を有すること、臨床への応用展開を踏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 $\mu$ 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、共同研究により糖尿病性腎症尿中バイオマーカー開発用の分析プラットフォーム。

を完成させる。

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。

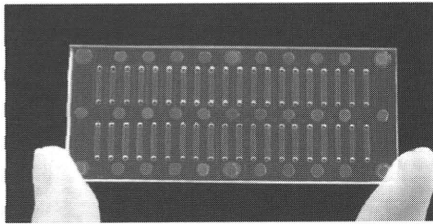
Urine sample

## 既報の尿中糖尿病性腎症バイオマーカー



## 次世代型糖尿病性腎症検査デバイスの開発

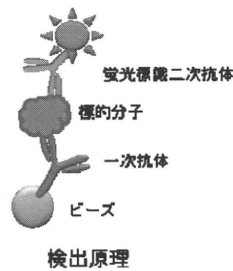
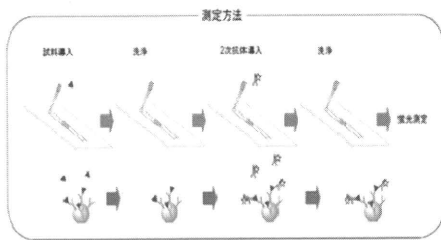
流路型免疫分析装置



デバイス本体

モデル作製用  
標的バイオマーカー

- ✓AGT (Angiotensinogen)
- ✓CTGF (CCN2)
- ✓L-FABP
- ✓MCP-1
- ✓type-4 collagen  $\alpha 3$



## 糖尿病性腎症に対する新規治療法の開発

糖尿病性新規治療薬として、カロリー制限模倣薬（スベラトロール）、ケモカイン受容体(CCR2)阻害薬、AGE-DNA aptamer について、研究の目的、期待される成果、進捗状況についてそれぞれについて記載する。

### 1) 糖尿病性腎症におけるカロリー制限およびその模倣薬の検討

(金沢医科大学 古家大祐)

#### 1. 研究の目的

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が知られている。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、我々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した。

#### 2. 期待される成果

本研究成果は、新規治療薬の開発につながりわが国の医療に多大な貢献をするものと信じている。

#### 3. 進捗状況

既に、軽度のカロリーあるいはその模倣薬であるレスベラトロールによって、糖尿病腎症モデルラットの腎障害が改善される。その分子機構として、ミトコンドリアに存在するMn-SOD活性の維持が重要であることの分子機構を見出した。その上流にSIRT1の活性が関与しているのか、またどのような分子が標的分子であるのかを解明したい。

### 2) 骨髄由来細胞に作用するケモカイン受容体阻害薬の検討

(金沢大学 和田隆志 原章規)

#### 1. 研究の目的

2型糖尿病性腎症モデルマウスを用いて、CCR2 阻害剤の作用機序とその有効性につき検討する。この際、CCR2 阻害剤の標的細胞として、単球・マクロファージならびに fibrocyte に着目している。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。

#### 2. 期待される成果

腎局所における炎症・免疫担当細胞制御の側面から新規治療法の可能性が示される。それにより、糖尿病性腎症による腎不全への進行抑制につながる

#### 3. 進捗状況

腎局所における炎症・免疫担当細胞制御の側面から 1 型および 2 型糖尿病性腎症に対する新規治療法の可能性を探り、将来の臨床応用・試験を視野に入れた基礎研究を行うことを目的としている。現在、マウス糖尿病性腎症モデルにおいて CCR2 阻害薬を投与した結果、腎内 fibrocyte およびマクロファージ数が減少した。臨床的

には腎機能およびアルブミン尿に改善傾向を認めた。

### 3) AGEs-DNA aptamer による糖尿病性腎症進展抑制の可能性

(久留米大学 奥田誠也 深水圭)

#### 1. 研究の目的

AGEs-aptamer 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。

Aptamer 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る。

#### 2. 期待される成果

AGEs-aptamer 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。

#### 3. 進捗状況

AGE-aptamer を作成し浸透圧ポンプにて投与を行った。その結果、Ctrl-aptamer 投与群と比較し、AGE-aptamer は糖尿病由来尿中アルブミン排泄を有意に改善し、それは組織変化(GSI)の改善を伴っていた。今後は蛋白、RNA 発現の解析と、ヒトへの投与を想定した DNA-aptamer の血中動態、代謝、副作用発現の検討を行う予定である。