

厚生労働省科学研究費補助金（腎疾患対策事業）

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

湯澤 由紀夫 藤田保健衛生大学医学部腎内科学

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 23 年度は、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の作成を目指す。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。「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、既存の ELISA による測定結果と比較し、その精度・臨床応用の可能性を検討する。

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）

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。

本年度は肝臓に発現する遺伝子発現プロファイルから糖尿病に関連する遺伝子の検討を主に行う。

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、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。

3) メタボローム解析 (藤田保健衛生大学 : 湯澤由紀夫 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、尿サンプルを用いて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

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の測定を開始した。測定には、名古屋大学糖尿病尿サンプル 252 症例及び和田班 JDNCs レジストリーの尿サンプル 16 症例 (境界型・1期~4期) を用いた。市販の ELISA キットを用いて、5 種類のマーカーの尿中濃度の測定を行う。

さらに、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を用いた尿バイオマーカー測定系の確立を

目指す。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、 μTAS 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 μTAS 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。

平成 22 年度までに、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。

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。

個別研究 :

トランスクリプトーム解析

血 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。

エクソゾーム解析

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。

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開始した。

(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ールを作成し、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ーに一括して保存し、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。

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ールを作成し、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。測定したバイオマーカーと各種臨床パラメーターとの相関は、；

L-FABP：血清 Cr (R2:0.7694), 尿中アルブミン (R2:0.6640), Δ Cr (R2:0.8139)

MCP-1：尿中アルブミン (R2:0.7259) AGT, ColIV： Δ Cr (R2:AGT 0.6254, ColIV 0.5037)

腎機能低下 (Δ Cr) に関する各マーカーのROC 解析: (Δ Cr/M>0.0003)

背景因子：男性 (AUC:0.710), CKD stage (AUC:0.670), 血清 Cr (AUC:0.786) アルブミン尿 (AUC:0.689)

尿中マーカー：

L-FABP (AUC:0.664), MCP-1 (AUC:0.618), AGT (AUC:0.618), CTGF (AUC:0.521), CollagenIV (AUC:0.664)

であった。

ロジスティック多変量解析の結果、5種類のバイオマーカーのうち、腎機能低下に関する独立した危険因子は、Angiotensinogen (odd ratio: 4.69,

95%CI: 1.15-19.2, p value: 0.031) 及び Collagen IV (odd ratio: 1.60, 95%CI: 1.07-2.38, p value: 0.023) の 2 つであった。さらに、年齢・性・クレアチニン・アルブミン尿で補正すると、Collagen IV (odd ratio: 1.72, 95%CI: 1.09-2.72, p value: 0.019) のみが、独立した危険因子として残った。

流路型免疫分析チップ(名古屋大学工学部渡慶次学准教授)を用いた、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 (CCN2, Collagen IV, AGT, MCP-1, L-FABP) の確立に関しては、尿サンプルに最適化した測定条件の検証を続けている。

個別研究：

トランスクリプトーム解析

- 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) 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 分の血糖低下率は約 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、AMPK および ACC のリン酸化は有意に低下していた。

- 13) Dominant negative alpha AMPK をコードするアデノウイルスを感染させた H4 細胞では、SeP 投与によるインスリン抵抗性誘導作用はほぼ消失した。

- 14) SeP 投与でも細胞内 AMP, ATP 濃度には変化はなかった。

SeP 投与細胞では、AMPK リン酸化を負に制御するプロテインフォスファターゼ 2C (PP2C) のタンパク発現が亢進していた。一方、AMPKK である LKB1、CaMKK beta の総タンパク発現量に差はなかった。

エクソゾーム解析

糖尿病性腎症のネフローゼ症候群と糖尿病に合併した他の腎疾患によるネフローゼ症候群を明確に区別するマーカーを同定した。ヒト腎生検組織中での尿中マーカー候補分子の発現部位・変化が腎機能低

下の進行や、タンパク尿の程度などと相関があるかどうかの検証がさらに必要であり、現在、その解析が進行中である。また、糖尿病モデル動物を元に、病態を反映する尿中マーカー候補分子の同定も行っている。

メタボローム解析

名古屋大学のコホートの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1段階として患者血液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) を用いて患者血液中の代謝産物の測定を行った。糖尿病性腎症に特異的な 11 個の代謝物を発見した。さらにこの中の 8 代謝物が eGFR とよく相関し、1 代謝物は腎機能の低下とともに減少する新しいタイプのマーカーである。

尿サンプルを用いたメタボローム解析の結果、同定可能な代謝物は、cation: 91 物質、anion: 79 物質、計 170 物質であった。

尿中アルブミンと負の相関を示す 3 代謝物 (cation: 2、anion: 1)、正の相関を示す 1 代謝物 (anion) を同定した。eGFR と負の相関を示す 2 代謝物 (cation)、正の相関を示す 6 代謝物 (cation: 3、anion: 3) を同定した。複数を組み合わせた腎予後推定パネル作成を目指している (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

トランスクリプトーム解析

血液を用いた糖尿病病態診断の試み; 2 型糖尿病患者の肝臓では分泌タンパク SeP の産生が亢進しており、この過剰産生が全身のインスリン抵抗性と高血糖を生じさせている可能性がある。最近になって、サプリメントを通じてセレンを過剰に摂取すると糖尿病発症リスクが高まるとする疫学研究が報告され、セレンと糖尿病の関係についても注目されている。

本研究は、肝臓由来ホルモン「ヘパトカイン」が 2 型糖尿病の病態形成に寄与していること、ヘパトカインが 2 型糖尿病を代表とするインスリン抵抗性関連疾患の治療標的になりうることを示唆する。

SeP は autocrine, paracrine として肝細胞に作用し、AMPK のリン酸化を減弱させることで肝インスリン抵抗性を誘導する。SeP の AMPK リン酸化減弱作用は主に AMP 非依存性メカニズムを介すると思われるが、その詳細の解明にはさらなる検討を要する。現在、糖尿病腎症モデルをセレノプ

ロテイン P ノックアウトマウスに導入し、表現型を解析中である。

エクソゾーム解析

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

尿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。

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、臨床研究プロトコールを作成の上、臨床研究倫理委員会の承認を受けた。レジストリーを中心に得られた尿サンプルも利用して、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している。併せて、病期分類改定にむけた検証を行う予定である。

個別研究

トランスクリプトーム解析

血液を用いた糖尿病病態診断の試み; 2 型糖尿病患者肝臓の包括的発現遺伝子解析から同定した新規ヘパトカイン、セレノプ

ロテイン P は、抗酸化作用を有するにもかかわらず、一部に AMP キナーゼ活性の抑制を介して、全身のインスリン抵抗性を増大する。このことは、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。

今後は、SeP 受容体の同定と機能解析、SeP 遺伝子のプロモーター解析から発現制御機構の解明、SeP 産生を制御する薬剤のスクリーニング、迅速血中濃度アッセイ系の確立と臨床的意義の解明等が課題となる。

エクソゾーム解析

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。

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. 研究発表

1. 論文発表

Yuzawa Y., Role of hydrogen sulfide in chronic kidney disease and diabetic nephropathy. , Nihon Yakurigaku Zasshi, 139(1): 17-21, 2012

Nakamura S, Kawai K, Takeshita Y, Honda M, Takamura T, Kaneko S, Matoba R, Matsubara K., Identification of blood biomarkers of aging by transcript profiling of whole blood., Biochem Biophys Res Commun., : [Epub ahead of print], 2012

- Takeshita Y, Takamura T, Inoue O, Okumura M, Kato K, Sunagozaka H, Arai K, Misu H, Nakamura M, Nakanuma Y, Kaneko S., Slowly progressive insulin-dependent diabetes in a patient with primary biliary cirrhosis with portal hypertension-type progression., *Intern Med.*, 51(1): 79-82, 2012
- Sakurai M, Nakamura K, Miura K, Takamura T, Yoshita K, Morikawa Y, Ishizaki M, Kido T, Naruse Y, Suwazono Y, Kaneko S, Sasaki S, Nakagawa H. Dietary glycemic index and risk of type 2 diabetes mellitus in middle-aged Japanese men., *Metabolism.*, ;61(1): 47-55, 2012
- Watanabe T, Maruyama S, Yamamoto T, Kamo I, Yasuda K, Saka Y, Ozaki T, Yuzawa Y, Matsuo S, Gotoh M., Increased urethral resistance by periurethral injection of low serum cultured adipose-derived mesenchymal stromal cells in rats., *Int J Urol.*, 18(9): 659-66, 2011"
- Doi T, Suzuki D, Uzu T, Yuzawa Y, Kondo M, Kishi S., Peritonitis is still an important factor for withdrawal from peritoneal dialysis therapy in the Tokai area of Japan., *Clin Exp Nephrol.*, 15(5): 727-37, 2011
- Sugiyama H, Yokoyama H, Sato H, Saito T, Kohda Y, Nishi S, Tsuruya K, Kiyomoto H, Iida H, Sasaki T, Higuchi M, Hattori M, Oka K, Kagami S, Nagata M, Kawamura T, Honda M, Fukasawa Y, Fukatsu A, Morozumi K, Yoshikawa N, Yuzawa Y, Matsuo S, Kiyohara Y, Joh K, Taguchi T, Makino H; Committee for Standardization of Renal., Pathological Diagnosis and Working Group for Renal Biopsy Database, Japanese Society of Nephrology, Tokyo, Japan. Japan Renal Biopsy Registry: the first nationwide, web-based, and prospective registry system of renal biopsies in Japan., *Clin Exp Nephrol.*, 15(4): 493-503, 2011"
- Mizuno T, Mizuno M, Morgan BP, Noda Y, Yamada K, Okada N, Yuzawa Y, Matsuo S, Ito Y., Specific collaboration between rat membrane complement regulators Crry and CD59 protects peritoneum from damage by autologous complement activation., *Nephrol Dial Transplant.*, 26(6): 821-30, 2011
- Kato N, Kosugi T, Sato W, Ishimoto T, Kojima H, Sato Y, Sakamoto K, Maruyama S, Yuzawa Y, Matsuo S, Kadomatsu K., Basigin/CD147 promotes renal fibrosis after unilateral ureteral obstruction., *Am J Pathol.*, 178(2): 572-9, 2011
- Kato K, Kosugi T, Sato W, Arata-Kawai H, Ozaki T, Tsuboi N, Ito I, Tawada H, Yuzawa Y, Matsuo S, Kadomatsu K, Maruyama S., Growth factor Midkine is involved in the pathogenesis of renal injury induced by protein overload containing endotoxin., *Clin Exp Nephrol.*, 15(3): 346-54, 2011

Kanayama K, Ohashi A, Hasegawa M, Kondo F, Yamamoto Y, Sasaki M, Hayashi H, Kato M, Hattori R, Yamashita H, Arai J, Ishii J, Emi N, Yuzawa Y., Comparison of free light chain removal by four blood purification methods., *Ther Apher Dial.*, 15(4): 394-9, 2011

Kishi S, Abe H, Akiyama H, Tominaga T, Murakami T, Mima A, Nagai K, Kishi F, Matsuura M, Matsubara T, Iehara N, Ueda O, Fukushima N, Jishage KI, Doi T., Sox9 induces a chondrogenic phenotype of mesangial cells and contributes to advanced diabetic nephropathy., *J Biol Chem.*, 286(37): 32162-9, 2011

Abe H., Recent progress in understanding the molecular pathogenesis of diabetic nephropathy., *Rinsho Byori.*, 59(2): 179-86, 2011

Tominaga T, Abe H, Ueda O, Goto C, Nakahara K, Murakami T, Mima A, Nagai K, Araoka T, Kishi S, Fukushima N, Jishage KI, Doi T., Activation of bone morphogenetic protein 4 signaling leads to glomerulosclerosis that mimics diabetic nephropathy., *J Biol Chem.*, 286(22): 20109-16, 2011

Mima A, Abe H, Nagai K, Arai H, Matsubara T, Araki M, Torikoshi K, Tominaga T, Iehara N, Fukatsu A, Kita T, Doi T., Activation of Src Mediates PDGF-Induced Smad1 Phosphorylation and Contributes to the Progression of Glomerulosclerosis in

Glomerulonephritis., *PLoS One.*, 22;6(3): e17929, 2011

Abe H, Matsubara T, Arai H, Doi T., Role of Smad1 in diabetic nephropathy: Molecular mechanisms and implications as a diagnostic marker., *Histol Histopathol.*, 26(4): 531-541, 2011

Mima A, Shiota F, Matsubara T, Iehara N, Akagi T, Abe H, Nagai K, Matsuura M, Murakami T, Kishi S, Araoka T, Kishi F, Kondo N, Shigeta R, Yoshikawa K, Kita T, Doi T, Fukatsu A., An autopsy case of mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes (MELAS) with intestinal bleeding in chronic renal failure., *Ren Fail.*, 33(6): 622-5, 2011

Murakami T, Nagai K, Matsuura M, Kondo N, Kishi S, Araoka T, Kishi F, Sakiyama T, Mima A, Bando Y, Abe H, Doi T., MPO-ANCA-positive anti-glomerular basement membrane antibody disease successfully treated by plasma exchange and immunosuppressive therapy., *Ren Fail.*, 33(6): 626-31, 2011

Iwakami S, Misu H, Takeda T, Sugimori M, Matsugo S, Kaneko S, Takamura T., Concentration-dependent dual effects of hydrogen peroxide on insulin signal transduction in H4IIEC hepatocytes., *PLoS One.*, 6(11): e27401, 2011

Takamura T, Misu H, Kaneko S., [The cutting-edge of medicine; clinical and molecular pathology of type 2 diabetic

liver], Nihon Naika Gakkai
Zasshi, 100(6): 1670-6, 2011

Yasui K, Hashimoto E, Komorizono Y,
Koike K, Arie S, Imai Y, Shima T, Kanbara
Y, Saibara T, Mori T, Kawata S, Uto H,
Takami S, Sumida Y, Takamura T, Kawanaka
M, Okanoue T; Japan NASH Study Group,
Ministry of Health, Labour, and Welfare
of Japan., Characteristics of patients
with nonalcoholic steatohepatitis who
develop hepatocellular carcinoma., Clin
Gastroenterol Hepatol., 9(5):
428-33, 2011

学会発表

Yukio Yuzawa. (Invited Lecture)
Cross-talk between kidney and lung in
critical care nephrology, 7th
International Congress on Uremia
Research and Toxicity(Nagoya). May
12-14, 2011

Yukio Yuzawa. (Invited Lecture) AKI and
Midkine, World Congress of Nephrology
(Canada), April 8-12, 2011

Kyoko Kanayama, Midori Hasegawa, Yukio
Yuzawa. Evaluation of Free Light Chain
Removal by Various Blood Purification
Methods. 44rd Annual Meeting &
Scientific Exposition (Renal Week).
Philadelphia (USA). November 8-13,
2011

Midori Hasegawa, Kyoko Kanayama, Yukio
Yuzawa. Cardiac Biomarkers in Patients
with Chronic Kidney Disease Not on
Dialysis. 44rd Annual Meeting &
Scientific Exposition (Renal Week).

Philadelphia (USA). November 8-13, 2011

Jun-ichiro Yamamoto, Waichi
Sato, Tomoki Kosugi, Shoichi Maruyama,
Seiichi Matsuo, Yukio Yuzawa.
Distribution of Hydrogen Sulfide
(H₂S)-Producing Enzymes and the Roles
of H₂S in Diabetic Nephropathy.
ASN(Philadelphia, PA) November 8-13,
2011

Hibiki Shinjo, Waichi Sato, Tomoki
Kosugi, Hiroki Hayashi, Shoichi
Maruyama, Enyu Imai, Yukio Yuzawa,
Seiichi Matsuo. A Comparison of the
Acute Kidney Injury Network and Kidney
Disease: Improving Global Outcomes
Criteria for Acute Kidney Injury in
Critically Ill Patients.
ASN(Philadelphia, PA) November 8-13,
2011

Sawako Kato, Yoshinari Yasuda, Bengt
Lindholm, Peter Stenvinkel, Karin
Luttrupp, Tomas J. Ekström, Yukio
Yuzawa, Yoshinari Tsuruta, Shoichi
Maruyama, Seiichi Matsuo. Impact of
Subclinical Bacterial Infection on
Epigenetic DNA Methylation in Japanese
CKD Stage 5 Patients ASN(Philadelphia,
PA) November 8-13, 2011

Sawako Kato, Bengt Lindholm, Peter
Stenvinkel, Karin Luttrupp, Tomas J
Ekström, Yukio Yuzawa, Yoshinari Yasuda,
Yoshinari Tsuruta, Shoichi Maruyama. Is
epigenetic DNA hyper-methylation
linked to chronic inflammation in
Japanese dialysis patients? Abstract
for ISBP(Beijing(北京)), September

9-11, 2011

Hiroshi Kojima, Waichi Sato, Tomoki Kosugi, Yuka Sato, Kayaho Maeda, Shoichi Maruyama, Yukio Yuzawa, Seiichi Matsuo. The Growth Factor Midkine Ameliorates Crescentic Glomerulonephritis through Inhibiting Thrombosis ASN(Philadelphia, PA), November 9-11, 2011

Midori Hasegawa, Kyoko Kanayama, Atsushi Ohashi, Yukio Yuzawa. Evaluation of free light chain removal by blood purification., The International Congress on Uremia Research and Toxicity (Nagoya, Japan), November 9-11, 2011

Akiyoshi Hirayama, Masahiro Sugimoto, Eitaro Nakashima, Shoichi Maruyama, Jiro Nakamura, Masaru Tomita, Yukio Yuzawa, Tomoyoshi Soga. Metabolomic profiling using capillary electrophoresis-mass spectrometry differentiates diabetic nephropathy. METABOLOMICS 2011(Australia). June 27-30, 2011

Akiyoshi Hirayama, Eitaro Nakanishi, Masahiro Sugimoto, Shin-ichi Akiyama, Shoichi Maruyama, Jiro Nkamura, Masaru Tomita, Yukio Yuzawa, Tomoyoshi Soga. Metabolomic profiling using capillary electrophoresis-mass spectrometry differentiates diabetic nephropathy. BMB2011 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会(横浜). 12/13-16, 2011

Shin' ichi Akiyama, Akiyoshi Hirayama,

Isao Ito, Seiichi Matsuo, Masaru Tomita, Shoichi Maruyama, Tomoyoshi Soga. CE-MS based time-course metabolic profiling in plasma and dialysate with hemodialysis. The ISURT 2011 7th International Congress on Uremia Research and Toxicity(名古屋). May12-14, 2011

G. 知的所有権の出願・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

厚生労働省科学研究費補助金（腎疾患対策事業）

分担研究報告書

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

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・増加と腎機能低下という病態解明には、ポドサイトが血行動態の変化、酸化・糖化ストレス、薬剤、加齢などの複合的な原因により、細胞機能低下が進行するため、それら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。これらさまざまなストレスに対して、ポドサイト中の構成分子・機能分子の発現異常を、非侵襲的かつ簡便に検出するために、尿中エクソゾームの解析を介して、評価する。脱落以前のポドサイト障害を早期に検出し、糖尿病性腎症の病態把握を詳細なものにするとともに、治療効果の判定、早期発見、予後予測の具体的なバイオマーカー樹立を行う。複数の候補分子が同定され、その測定系が構築中である。

A. 研究目的

糸球体上皮細胞である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、種々のストレスを受けると細胞機能が低下し、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、糖尿病性腎症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ーの探索を行い、ポドサイト由来の exosome 中候補タンパク質を得ている。このうち、全尿から直接、またキット化による間接測定法を順次樹立し、外来で得られる少量の随時尿を用いての検出を可能とした。また、各種治療によって、その測定値が変化しており、効果判定に用いる可能性を確認した。

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。糖尿病性腎症では、高血糖・高血圧・高タンパク食・脂質異常症・薬剤など、さまざまなストレスにより複合的にポドサイト障害が進行すると考えられる。その分子機序を反映する尿中エクソゾーム蛋白の変化を評価することは、糖尿病性腎症の進展を正しく理解するうえで有用と考えられる。

E. 結論

糖尿病性腎症において、各種ストレスによるポドサイトの障害を、ポドサイト由来尿中エクソゾームタンパク質は反映しており、その検出・解析は重要である。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
 - 1) 第 58 回日本臨床検査医学会学術集会
新規バイオマーカーとしての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、土井俊夫
 - 2) 第 56 回 日本透析医学会学術集会・総会 Genomic biomarker を用いた CKD 患者の心血管リスク評価の試み
吉川和寛、安部秀斉、富永辰也、岸誠司、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
 - 3) 第 54 回 日本糖尿病学会年次学術集会 BMP4 における糖尿病性腎症の発症とアルブミン尿排泄に関する新たな機序 富永辰也、安部秀斉、村上太一、岸誠司、長井幸二郎、土井俊夫
 - 4) 第 10 回次世代医療システム産業化フォーラム 慢性腎臓病患者の診断・治療のための新規バイオマーカー
安部秀斉

G. 知的所有権の出願・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

厚生労働省科学研究費補助金（腎疾患対策事業）

分担研究報告書

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

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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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 と関連する遺伝子 14 種、BMI と関連する遺伝子 22 種、HOMA-IR と関連する遺伝子 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 と関連する遺伝子 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 $\mu\text{g/mL}$ 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、

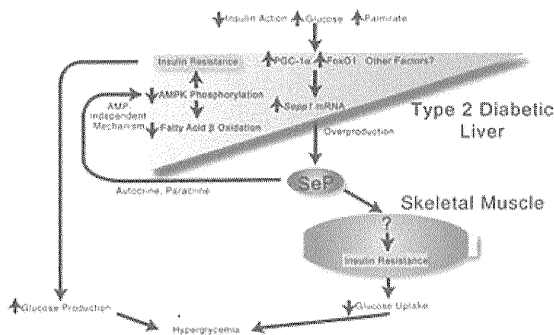
C-14-oleate の C-14-CO₂ へのベータ酸化も低下していた。

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、AMPK および ACC のリン酸化は有意に低下していた。
13. Dominant negative alpha AMPK をコードするアデノウイルスを感染させた H4 細胞では、SeP 投与によるインスリン抵抗性誘導作用はほぼ消失した。
14. SeP 投与でも細胞内 AMP, ATP 濃度には変化はなかった。
15. SeP 投与細胞では、AMPK リン酸化を負に制御するプロテインフォスファターゼ 2C (PP2C) のタンパク発現が亢進していた。一方、AMPKK である LKB1、CaMKK beta の総タンパク発現量に差はなかった。

D. 考察

2 型糖尿病患者の肝臓では分泌タンパク SeP の産生が亢進しており、この過剰産生が全身のインスリン抵抗性と高血糖を生じさせている可能性がある。最近になって、サプリメントを通じてセレンを過剰に摂取すると糖尿病発症リスクが高まるとする疫学研究が報告され、セレンと糖尿病の関係についても注目されている。本研究は、肝臓由来ホルモン「ヘパトカイン」が 2 型糖尿病の病態形成に寄与していること、ヘパトカインが 2 型糖尿病を代表とするインスリン抵抗性関連疾患の治療標的になりうることを示唆する。SeP は autocrine, paracrine として肝細胞に作用し、AMPK のリン酸化を減弱させることで肝インスリン抵抗性を誘導する。SeP の AMPK リン酸化減弱作用は主に AMP 非依存性メカニズムを介すると思われる

が、その詳細の解明にはさらなる検討を要する。



E. 結論

2型糖尿病患者肝臓の包括的発現遺伝子解析から同定した新規ヘパトカイン、セレノプロテインPは、抗酸化作用を有するにもかかわらず、一部にAMPキナーゼ活性の抑制を介して、全身のインスリン抵抗性を増大する。このことは、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。

今後は、SeP受容体の同定と機能解析、SeP遺伝子のプロモーター解析から発現制御機構の解明、SeP産生を制御する薬剤のスクリーニング、迅速血中濃度アッセイ系の確立と臨床的意義の解明等が課題となる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Iwakami S, Misu H, Takeda T, Sugimori M, Matsugo S, Kaneko S, Takamura T. Concentration-dependent Dual Effects of Hydrogen Peroxide on Insulin Signal Transduction in H4IIEC Hepatocytes. PLoS One

6:e27401, 2011. Epub 2011 Nov 15.

- Yusuke Nakade, Toshinari Takamura, Masaru Sakurai, Hirofumi Misu, Mitsuko Nagata, Yuko Nanbu, Hiroyasu Oe, Toshiji Takamura, Yoshio Sakai, Shuichi Kaneko, Takashi Wada. Association between coefficients of variation of the R-R intervals on electrocardiograms and post-challenge hyperglycemia in patients with newly diagnosed type 2 diabetes. J Diabetes Invest 2:324-327, 2011

2. 学会発表（講演・シンポジウム、筆頭のみ）

- Toshinari Takamura, Toshiki Ota, Hirofumi Misu, Tsuguhito Ota, and Shuichi Kaneko: Proteasome dysfunction in obesity contributes to ER stress, enhanced autophagy and insulin resistance in type 2 diabetic liver. Keystone Symposia - Type 2 Diabetes, Insulin Resistance and Metabolic Dysfunction, Keystone, Colorado, 2011年1月15日
- Hirofumi Misu, Kazuhide Ishikura, Hiroaki Takayama, Hiroto Hayashi, Tsuguhito Ota, Shuichi Kaneko, and Toshinari Takamura（発表者）: Keystone Symposia - Obesity, Keystone, Colorado, 2011年1月16日
- 篁 俊成: 過栄養状態の肝臓が形成する2型糖尿病の病態. 第45回糖尿病学の進歩, 福岡, 2011年2月18日
- 篁 俊成: スローエイジングを目指す2型糖尿病の全人的ケア. 第52回北陸支部生涯教育講演会, 金沢, 2011年3月13日

5. 篁 俊成：スローエイジングを見据えた糖尿病の総合的治療戦略. 第 50 回日本臨床検査医学会東海・北陸支部総会、第 322 回日本臨床化学会、東海・北陸支部例会 連合大会 シンポジウム、金沢、2011 年 3 月 13 日

G. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

- ① 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)

厚生労働省科学研究費補助金（腎疾患対策事業）

分担研究報告書

高脂血症による腎障害進展に着目した糖尿病性腎症の新規バイオマーカーの探索

研究分担者

森 潔 京都大学大学院医学研究科内分泌代謝内科

研究協力者

向山政志 京都大学大学院医学研究科内分泌代謝内科・臨床検体の収集及びデータ解析

栗原孝成 京都大学大学院医学研究科内分泌代謝内科・実験の遂行と統計処理

研究要旨

昨年度までにマウス糖尿病性腎症の糸球体で強く発現誘導されるリガンド/受容体のペアとして S100A8/TLR4 を同定し、高脂血症合併による糖尿病性腎症の増悪にこれらの発現増加が関わることを明らかにした。今回、ヒト糖尿病性腎症の腎組織においても、糸球体に浸潤するマクロファージで S100A8/TLR4 の発現亢進が認められること、高糖濃度刺激及び遊離脂肪酸刺激は相乗的に培養マクロファージにおいて S100A8 の発現を誘導することが示された。高脂血症による糖尿病性腎症の悪化にはマクロファージ内の炎症シグナル増幅が重要な役割を果たすと考えられた。

A. 研究目的

1 型及び 2 型糖尿病患者の疫学的観察研究より、高 LDL 血症あるいは高 TG 血症などの脂質代謝異常症が糖尿病性腎症悪化の独立した危険因子であることが明らかとなっているが、その分子機構は明らかではない。昨年度までに、マウス糖尿病性腎症の糸球体で強く発現誘導されるリガンド(分泌蛋白)/受容体のペアとして S100A8 (myeloid-related protein 8)/toll-like receptor 4 (TLR4) を同定した。さらに S100A8 が主に糸球体内浸潤マクロファージに発現し、高脂肪食負荷による高脂血症にて悪化させたマウス糖尿病性腎症において、S100A8 の発現がさらに強く誘導されることを見出した。さらに TLR4 knockout

(KO)マウスにおいては高脂肪食による腎症悪化がほとんど見られないことを示し、S100A8/TLR4 システムが糖尿病性腎症の病態において重要な役割を果たすことを明らかにした。平成 23 年度は糖尿病性腎症患者の腎生検組織における S100A8 発現を検討した。また糖尿病と高脂血症の合併が相乗的に腎病変を悪化させる分子機構を明らかにするために、培養マクロファージに対する高糖濃度刺激、遊離脂肪酸刺激の影響を検討した。

B. 研究方法

4%パラホルムアルデヒドにて固定した腎生検薄切標本に対して、クエン酸バッファーにて抗原賦活化を行い、抗ヒト S100A8

モノクローナル抗体 (BMA Biomedicals, Rheinstrasse, Switzerland) を用いた免疫組織化学を行った。マウス長管骨より骨髓液を採取、低浸透圧にて赤血球を破碎し、リコンビナント M-CSF (50 ng/ml) 存在下で6日間培養し、骨髓由来マクロファージを樹立した。低および高濃度のブドウ糖 (100 または 450 mg/dL) で24時間培養後、(モル比で 1/10 量の牛血清アルブミンを含む) パルミチン酸 (10-200 μ M) でさらに24時間刺激を行い、total RNA を抽出、TaqMan real-time RT-PCR により遺伝子発現を検討した。

C. 研究結果

糖尿病性腎症とくに顕性蛋白尿を呈し、病理学的には糖尿病性腎症に特徴的な結節性病変を示すサンプルの糸球体において数個の S100A8 陽性細胞を認めた。一方、微小変化型群あるいは minor glomerular abnormality (MGA) のサンプルでは、全く S100A8 の糸球体内発現を認めなかった。野生型マウス由来の骨髓マクロファージにおいては、高糖濃度培養条件下においてのみ、パルミチン酸添加により S100A8 遺伝子発現の亢進を認めた。TLR4 KO マウス由来のマクロファージはパルミチン酸に反応しなかった。

D. 考察

ヒト及びマウスの糖尿病性腎症糸球体において、分泌蛋白 S100A8 を豊富に発現するマクロファージが糸球体内に浸潤することが明らかとなった。マウス糖尿病性腎症に対する高脂血症の合併は、マクロファージ浸潤、S100A8 発現、アルブミン尿、糸球体細胞外マトリックス発現などをすべて増悪させた。高脂血症の病態は TLR4

の活性化を介して、高血糖に曝されているマクロファージを効率よく刺激することにより、糖尿病性腎症を悪化させると考えられた。

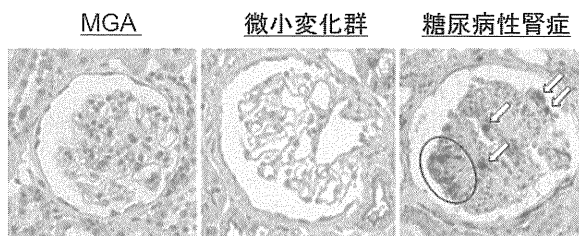


図1. ヒト腎生検組織におけるS100A8蛋白発現陽性シグナルを白矢印あるいは丸内で示す。

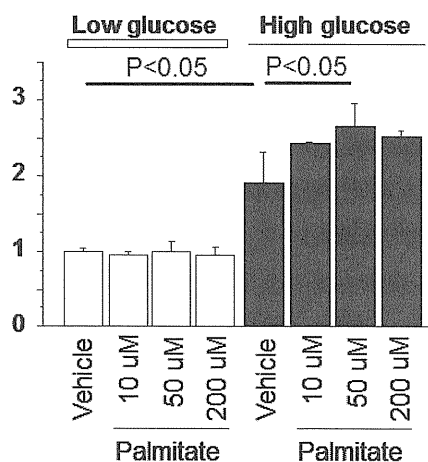


図2. マウス骨髓由来マクロファージにおけるS100A8/GAPDH 遺伝子発現

E. 結論

高脂血症の病態は TLR4 の活性化を介して、高血糖に曝されているマクロファージを効率よく刺激することにより、糖尿病性腎症を悪化させると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) T. Kuwabara, K. Mori, M. Mukoyama, M. Kasahara, H. Yokoi, Y. Saito, Y. Ogawa, H. Imamaki, T. Kawanishi, A. Ishii, K. Koga, K. P. Mori, Y. Kato, A. Sugawara,

K. Nakao. Hyperlipidemia exacerbates diabetic nephropathy through activation of toll-like receptor 4 in mice. (投稿中)

2) 栗原孝成、向山政志、森 潔、笠原正登、中尾一和. 糖尿病性腎症における脂質代謝異常とその役割. *Current Therapy* 29:59-63, 2011.

2. 学会発表

1) Annual meeting for World Congress of Nephrology 2011. April 8-12, 2011. Vancouver, Canada. 「Hyperlipidemia promotes diabetic renal injury via TLR4 signaling」 T. Kuwabara, K. Mori, M. Mukoyama, M. Kasahara, H. Yokoi, Y. Saito, Y. Ogawa, H. Imamaki, T. Kawanishi, A. Ishii, K. Koga, K. P. Mori, Y. Kato, A. Sugawara, K. Nakao.

2) 第 84 回日本内分泌学会学術総会 2011 年 4 月 21-23 日、神戸

「MRP8/TLR4 シグナルを介した高脂血症による糖尿病腎症の新規悪化機序」栗原孝成、森 潔、向山政志、笠原正登、横井秀基、斎藤陽子、小川喜久、今牧博貴、川西智子、石井輝、古賀健一、森慶太、加藤有希子、菅原照、中尾一和。

3) 第 54 回日本糖尿病学会年次学術集会 2011 年 5 月 19-21 日、札幌

「高脂血症による糖尿病腎症進展の分子機構」栗原孝成、森 潔、向山政志、笠原正登、横井秀基、斎藤陽子、小川喜久、今牧博貴、川西智子、石井輝、古賀健一、森慶太、加藤有希子、菅原照、中尾一和。

4) 第 54 回日本腎臓学会学術総会 2011 年 6 月 15-17 日、横浜

「脂質による TLR4 シグナル活性化は糖尿病腎症を進展させる」栗原孝成、森 潔、向山政志、笠原正登、横井秀基、斎藤陽子、今牧博貴、川西智子、石井輝、古賀健一、

森慶太、加藤有希子、菅原照、中尾一和。
5) American Diabetes Association, 71st Scientific Sessions; June 24-28, 2011, San Diego, California. 「Toll-like receptor 4-mediated,

hyperinsulinemia-independent progression of diabetic Nephropathy by hyperlipidemia」 Takashige Kuwabara, Kiyoshi Mori, Masashi Mukoyama, Masato Kasahara, Hideki Yokoi, Yoko Saito, Hiroataka Imamaki, Tomoko Kawanishi, Akira Ishii, Kenichi Koga, Keita Pierre Mori, Yukiko Kato, Akira Sugawara, Kazuwa Nakao

6) Annual meeting for American Society of Nephrology. Nov. 10-13, 2011. Philadelphia, PA

「Aggravation of diabetic nephropathy by hyperlipidemia is mediated by MRP8/TLR4 signaling in macrophages」 Takashige Kuwabara, Kiyoshi Mori, Masashi Mukoyama, Masato Kasahara, Hideki Yokoi, Yoko Saito, Hiroataka Imamaki, Tomoko Kawanishi, Akira Ishii, Kenichi Koga, Keita Pierre Mori, Yukiko Kato, Akira Sugawara, Kazuwa Nakao.

G. 知的所有権の出願・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

【分科会：糖尿病性腎症の新規治療法の開発】