

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

“AGEs-DNA aptamerによる糖尿病性腎症進展抑制の可能性”に関する研究

研究分担者

奥田 誠也 久留米大学医学部内科学講座腎臓内科部門

研究協力者

深水 圭 久留米大学医学部内科学講座腎臓内科部門

研究要旨

Advanced glycation end products (AGEs) は糖尿病性腎症発症進展に重要な役割を担っている。今回我々は AGEs と特異的に、かつ強力的に結合する AGEs-DNA aptamer を作製し、KKAy/Ta マウスに投与した。AGEs-DNA aptamer は、主に肝臓・腎臓集積していた。AGEs-DNA aptamer の腹腔内投与により腎機能改善とともに、糖尿病由来尿中アルブミン排泄、糸球体肥大・硬化、酸化ストレス亢進は有意に抑制された。今後は将来の臨床応用への可能性について検討する予定である。

A. 研究目的

Advanced glycation end products (AGEs) は、糖尿病における長期間の高血糖状態において、糖と蛋白が非酵素的に反応し生成される糖化最終産物である。近年、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担っていることが報告されている。近年、我々は AGEs と特異的に、かつ強力的に結合する AGEs-DNA aptamer を作製した (Microvas Res 2007, 74, 65-69)。本研究の目的は、AGEs-DNA aptamer 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である。

B. 研究方法

AGEs-aptamer と AGE との結合を QCM 法にて確認する。さらに aptamer に KK-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、尿中 albumin が出現すると思われる 16 週令まで観察する。AGEs-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 した。

(倫理面への配慮)

動物の飼育や sacrifice の方法に関しては、当大学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

g-32p 結合 AGE-aptamer を浸透圧ポンプにて投与したところ、約1時間で有意に血液、腎臓、肝臓、尿にて上昇した。KK-Ay/Taマウスにおける糸球体の AGEs 沈着は、AGEs-aptamer 投与により完全に抑制された。さらに AGEs-aptamer 投与は糖尿病由来腎機能の悪化、尿中アルブミン排泄、糸球体肥大、硬化を有意に抑制し(図1)、腎症の発症・進展を抑制した。酸化ストレスの指標である尿中 8-OHdG は糖尿病マウスにて有意に上昇し、それらは AGEs-aptamer にて抑制された。今後は創薬へむけた、臨床試験へ向けた準備を行う予定である。

D. 考察

今回、新たな AGE 抑制薬としての AGEs-aptamer が2型糖尿病性腎症の発症、進展を抑制しうることが明らかとなった。代謝、排泄経路は腎臓、肝臓が主な臓器であった。今後は AGEs-aptamer による糖尿病性腎症発症進展抑制メカニズムを明らかにし、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

AGEs-aptamer は糖尿病性腎症治療薬として有用である可能性がある。明らかな副作用等は見られていない。今後は具体的に臨床応用を考えていく。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) A new vasculitis activity score for predicting death in myeloperoxidase-antineutrophil cytoplasmic antibody associated

vasculitis patients. Koike K, Fukami K, Yonemoto K, Iwatani R, Obara N, Ueda K, Toyonaga M, Ueda S, Ohara A, Takeda K, Yamagishi S, Okuda S. Am J Nephrol. 35(1):1-6 2011.

2) Role of advanced glycation end products (AGEs) and oxidative stress in vascular complications in diabetes. Yamagishi SI, Maeda S, Matsui T, Ueda S, Fukami K, Okuda S. Biochim Biophys Acta. 2011 Apr 1.

3) Beneficial cardiometabolic actions of telmisartan plus amlodipine therapy in elderly patients with poorly controlled hypertension. Bekki H, Yamamoto K, Sone M, Homma T, Nakata M, Nohara M, Fukami K, Okuda S, Yamagishi S. Clin Cardiol. 2011 Apr;34(4):261-5

4) Fujimi-Hayashida A, Ueda S, Yamagishi S, Kaida Y, Ando R, Nakayama Y, Fukami K, Okuda S. Association of asymmetric dimethylarginine with severity of kidney injury and decline in kidney function in IgA nephropathy. Am J Nephrol. 33(1):1-6, 2011.

2. 学会発表

現在はデータ収集の段階であり、2011年 ISN、日本腎臓学会で学会発表を行った。現在、論文作成に着手しており、JASN への論文発表を目指している。

G. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

現在、国内、国外へ特許出願中である。

特願 2010-262341

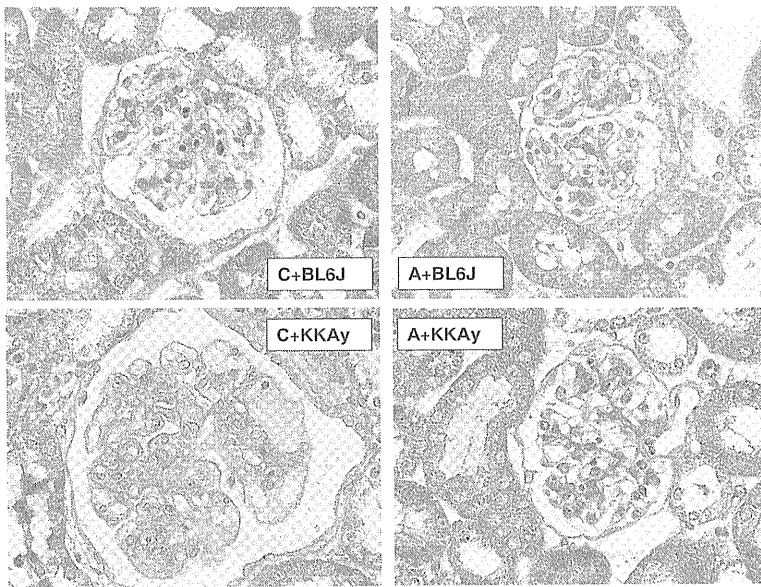
海外特許出願中

2. 実用新案登録

なし
3. その他
なし

図 1

Masson-Trichrome staining (×600)



C; control DNA-aptamer, A; AGEs DNA-aptamer, BL; C57BL/6J mouse, KKAY; KKAY/Ta mouse

分担研究報告書

カロリー制限模倣薬、レスベラトロールによる糖尿病性腎症の改善効果

研究分担者

古家 大祐 金沢医科大学糖尿病・内分泌内科

研究要旨

本研究では、抗老化分子として注目されている SIRT1 に着目し、2 型糖尿病モデルマウスである db/db マウスに SIRT1 を調節しうるレスベラトロールを投与し、腎障害進展抑制作用を検討した。さらに、カロリー制限による、ミトコンドリア形態異常、腎障害の改善を検討した。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(尿中 8-OHdG)、組織所見の改善がみられた。さらに、2 型糖尿病ラットにカロリー制限を行うと、ミトコンドリア機能および腎障害の改善がみられた。以上より抗老化薬としてのレスベラトロールが糖尿病性腎症モデルに対する有効性をもつことが見出された。今後、カロリー制限模倣薬の臨床応用が待たれる。

A. 研究目的

カロリー制限模倣薬、レスベラトロールによる糖尿病性腎症の改善効果を目的に、抗老化分子として注目されている SIRT1 に着目し、SIRT1 を調節しうるレスベラトロールによる腎障害進展抑制作用を検討した。

B. 研究方法

カロリー制限模倣薬、レスベラトロールによる糖尿病性腎症の改善効果

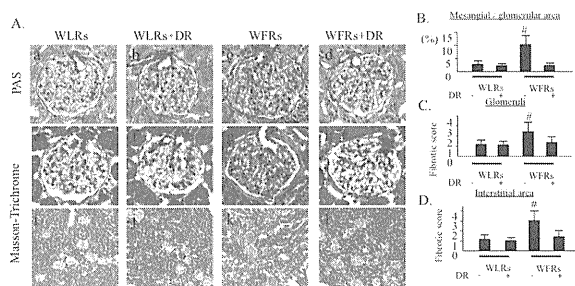
2 型糖尿病モデルマウスである db/db マウスに、摂餌中にレスベラトロールを 0.3% を添加して 8 週間飼育した。その後、代謝マーカー、尿アルブミン量、腎組織検査、酸化ストレス、Mn-SOD 活性と発現量を検討した。さらに 2 型糖尿病ラットにカロリー制限を行い、ミトコンドリア形態異

常、腎障害の改善を検討した。

C. 研究結果

2 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(尿中 8-OHdG)、組織所見の改善がみられた。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、2 型糖尿病ラットにカロリー制限を行うと、腎臓における p62Sqstm 過剰発現の改善とともに、ミトコンドリア機能、腎障害の改善がみられた (図)。

図 40%カロリー制限による2型糖尿病ラットの腎障害の改善効果



Kitada M et al. *Exp Diabetes Res.* 2011;2011:908185.

D. 考察

抗老化薬としてのレスベラトロールが少なくとも実験糖尿病性腎症モデルに対する有効性をもつことが見出された。レスベラトロールの分子機構は、SIRT1 活性化ではなく、抗酸化作用であることを見出した。さらに、カロリー制限がミトコンドリアの代謝を制御している p62Sqsam 発現低下を介して機能改善、腎保護に働くことが判明し、今後、カロリー制限模倣薬の臨床応用が待たれる。

E. 結論

本研究において、新規治療開発の基盤研究が進行した。当初の計画に沿って、独創性、公共性の高い研究を展開しえ、目的を達したものとする。今後、この成果を通じて、本邦における糖尿病性腎症の病態解明、予後改善、有効な治療法開発に向けた総合的なシステム構築につながることを期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Tanaka Y, Kume S, Kitada M, Kanasaki K, Uzu T, Maegawa H, Koya D. Autophagy as a therapeutic target in

diabetic nephropathy. *Exp Diabetes Res* 2012;2012, 628978. Epub 2011 Oct

2. Kitada M, Takeda A, Nagai T, Ito H, Kanasaki K, Koya D. Dietary restriction ameliorates diabetic nephropathy through anti-inflammatory effects and regulation of the autophagy via restoration of

Sirt1 in diabetic Wistar fatty (fa/fa) rats, a model of type 2 diabetes. *Exp Diabetes Res* 2011;2011, 908185. Epub 2011 Sep 22.

2. 学会発表

なし

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

研究協力者

四方 賢一 岡山大学病院 新医療研究開発センター

研究要旨

我々は、血管壁に起こる微小な慢性炎症（microinflammation）が糖尿病性腎症の進展過程に重要な役割を果たしていることを明らかにしてきた。酸化ストレスは microinflammation の原因の一つであり、腎症の成因に深く関与していると考えられる。本研究では、抗酸化作用を示すメタロチオネインが、糖尿病ラットでの近位尿細管上皮細胞に強く発現すること、さらに、マウス培養近位尿細管上皮細胞を高糖濃度条件下で培養すると、メタロチオネインの発現が増加することを明らかにした。これらの結果より、メタロチオネインは糖尿病性腎症の発症・進展に対して保護的に働いている可能性が示唆される。

A. 研究目的

我々は、血管壁に起こる微小な慢性炎症（microinflammation）が糖尿病性腎症の進展過程に重要な役割を果たしていることを明らかにしてきた。酸化ストレスは microinflammation の原因の一つであり、腎症の成因に深く関与していると考えられる。メタロチオネイン（MT）は、1957年に Margoshes と Vallee によってウマの腎臓からカドミウムを結合するタンパク質として発見された、金属結合性のタンパク質である。分子中に最大 7-12 個の重金属イオンを結合できることから、必須微量元素の恒常性維持あるいは重金属元素の解毒の役割を果たしていると考えられている。また、抗酸化性タンパク質としても注目されている。MT-I から -IV までの 4 種のアイソフォームが存在し、MT-I および MT -II はほとんどの臓器で発現しているが、特に肝臓、腎臓、

小腸および膵臓で多く発現している。現在までに、糖尿病性腎症における MT の発現パターンや詳細な局在は未だ報告がない。本研究では、抗酸化作用を示すメタロチオネイン（MT）が、腎症の進展過程に果たす役割を検討した。

B. 研究方法

SD ラットにストレプトゾトシンを投与し、1 週、2 週、8 週の時点で腎臓を摘出し、免疫組織化学にて MT の発現変化を検討した。また腎臓における局在を明らかにするため、内皮細胞、ポドサイトや尿細管上皮細胞などに対する抗体と二重染色を行った。

C. 研究結果

コントロールラットでは腎臓組織に MT の

発現をほとんど認めないが、糖尿病ラットでは近位尿細管上皮細胞に MT 発現が増強することを確認した。さらに、マウス培養近位尿細管上皮細胞(mProx24)を用いた検討では、高糖濃度条件下において約 1.5 倍の MT 発現を認めた。また、ビタミン E は高糖濃度条件下において用量依存的に MT 発現を抑制した。

D. 考察

(1) 今回の研究結果から、MT は糖尿病における酸化ストレスから腎臓を保護する可能性が示唆された。

E. 結論

メタロチオネインの発現が腎保護につながる可能性がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 小寺 亮、四方 賢一:特集 糖尿病性腎症の克服を目指して—Microinflammation—。メディカルレビューポイント, 2011
- 2) 小寺 亮、四方 賢一:糖尿病性腎症と CKD—新たな展開と治療法の選択—。糖尿病性腎症の治療 1 : 血糖コントロール。月刊糖尿病, 2011
- 3) 小寺 亮、四方 賢一:糖尿病性腎症—病態の解明と最新治療戦略—糖尿病性腎症の最新治療戦略。医学のあゆみ, 2011 年
- 4) 松下裕一、四方賢一:糖尿病性腎症: 晩期糖尿病の管理と注意点。腎疾患・透析 最新の治療 2011-2013
- 5) 四方賢一:生活習慣病治療のパラダイムシフト—慢性炎症を標的とした治

療戦略—。岡山医学会雑誌 第 123 巻 pp. 197-206, 20112.

- 6) Ogawa D, Asanuma M, Miyazaki I, Tachibana H, Wada J, Sogawa N, Sugaya T, Kitamura S, Maeshima Y, Shikata K, Makino H. High glucose increases metallothionein expression in renal proximal tubular epithelial cells. *Exp Diabetes Res.* 2011. 534872, 2011.
- 7) Watanabe N, Shikata K, Shikata Y, Sarai K, Omori K, Kodera R, Sato C, Wada J, Makino H. Involvement of MAPKs in ICAM-1 expression in glomerular endothelial cells in diabetic nephropathy. *Acta Med Okayama* 65:247-257, 2011.
- 8) Sasaki M, Shikata K, Okada S, Miyamoto S, Nishishita S, Kataoka HU, Sato C, Wada J, Ogawa D, Makino H. The macrophage is a key factor in renal injuries caused by glomerular hyperfiltration. *Acta Med Okayama.* 2011 Apr; 65:81-89, 2011.
- 9) Matsushita Y, Ogawa D, Wada J, Yamamoto N, Shikata K, Sato C, Tachibana H, Toyota N, Makino H. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor delta inhibits streptozotocin-induced diabetic nephropathy through anti-inflammatory mechanisms in mice. *Diabetes.* 60:960-968, 2011
- 10) Kodera R, Shikata K, Kataoka HU, Takatsuka T, Miyamoto S, Sasaki M, Kajitani N, Nishishita S, Sarai K, Hirota D, Sato C, Ogawa D, Makino H. Glucagon-like peptide-1 receptor agonist ameliorates renal injury

- through its anti-inflammatory action without lowering blood glucose level in a rat model of type 1 diabetes. *Diabetologia*. 54:965-978, 2011.
- 11) Sato C, Shikata K, Hirota D, Sasaki M, Nishishita S, Miyamoto S, Kodera R, Ogawa D, Tone A, Kataoka HU, Wada J, Kajitani N, Makino H. P-selectin glycoprotein ligand-1 deficiency is protective against obesity-related insulin resistance. *Diabetes*. 60:189-199, 2011.
- 12) Kido Y, Ogawa D, Shikata K, Sasaki M, Nagase R, Okada S, Usui Kataoka HU, Wada J, Makino H. Intercellular adhesion molecule-1 plays a critical role in glomerulosclerosis after subtotal nephrectomy. *Clin Exp Nephrol*. 15:212-219, 2011.
- 13) Miyatake N, Shikata K, Makino H, Numata T. Decreasing Abdominal Circumference Is Associated with Improving Estimated Glomerular Filtration Rate (eGFR) with Lifestyle Modification in Japanese Men: A Pilot Study. I. *Acta Med Okayama*. 65:363-367, 2011.
- 14) Tone A, Shikata K, Nakagawa K, Hashimoto M, Makino H. Renoprotective effects of clarithromycin via reduction of urinary MCP-1 levels in type 2 diabetic patients. *Clin Exp Nephrol*. 15:79-85, 2011.
- 15) Miyatake N, Shikata K, Makino H, Numata T. The Relation between estimated glomerular filtration rate (eGFR) and proteinuria in Okayama prefecture, Japan. *Environ Health Prev Med* 16: 191-195, 2011.
- 16) Miyatake N, Shikata K, Makino H, Numata T. Comparison of ventilatory threshold between subjects with and without proteinuria in Japanese. *Health* 3:6 394-399, 2011.
- 17) Miyatake N, Shikata K, Makino H, Numata T. Decreasing serum uric acid levels might be associated with improving estimated glomerular filtration rate (eGFR) in Japanese men. *Health* 3:8 498-503, 2011.
- 18) Miyatake N, Nishii K, Numata T. Relationship between work style and cigarette smoking in Japanese workers. *Health* 3:9 537-541, 2011.
- 19) Miyatake N, Shikata K, Makino H, Numata T. The relation between estimated glomerular filtration rate (eGFR) and coffee consumption in the Japanese. *Health* 3:9 549-552, 2011.
- 20) Miyatake N, Shikata K, Makino H, Numata T. Comparison of muscle strength between subjects with and without proteinuria. *Health* 3:11 698-702, 2011.
2. 学会発表
- 1) 松下裕一、小川大輔、橘洋美、豊田智子、佐藤千景、和田淳、四方賢一、槇野博史: PPAR δ アゴニストは抗炎症効果により糖尿病性腎症の進展を抑制する. 第54回日本糖尿病学会年次学術集会. さっぽろ芸術文化の館 (札幌市), 2011
- 2) 梶谷展生、四方賢一、小寺亮、宮本聡、廣田大昌、佐藤千景、小川大輔、和田淳、槇野博史: Telmisartan は PPAR \cdot 活性化を介した抗炎症効果により糖

尿病性腎症の進展を抑制する. 第 54 回日本糖尿病学会年次学術集会. さっぽろ芸術文化の館 (札幌市), 2011

- 3) 高塚哲全、四方賢一、小寺亮、片岡仁美、宮本聡、廣田大昌、梶谷展生、佐藤千景、小川大輔、和田淳、槇野博史: 糖尿病性腎症の病態進展に関連する microRNA の網羅的解析. 第 54 回日本糖尿病学会年次学術集会. さっぽろ芸術文化の館 (札幌市), 2011
- 4) 小川大輔、松下裕一、四方賢一、和田淳、佐藤千景、橘洋美、豊田智子、槇野博史: 糖尿病性腎症における PPAR δ アゴニストの腎保護効果. 第 54 回日本腎臓病学会学術集会. パシフィコ横浜 (横浜市), 2011
- 5) Kajitani N, Shikata K, Koder R, Miyamoto S, Hirota D, Sato C, Wada J, Ogawa D, and Makino H. Helmsartan attenuates diabetic nephropathy through anti-oxidative and anti-inflammatory actions via activation of peroxisome proliferator-activated receptor- γ . 47th Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes Lisbon Portugal, 12-16 September 2011.
- 6) Ogawa D, Wada J, Matsushita Y, Nakatsuka A, Murakami K, Kanzaki M, Shikata K, Makino H. Activation of Peroxisome Proliferator-activated Receptor δ Inhibits Streptozotocin-induced Diabetic Nephropathy Through Anti-inflammatory Mechanisms in Mice. Keystone Symposia (Keystone, Colorado, USA) 2011. 1. 12-1. 17
- 7) Tachibana H, Ogawa D, Matsushita Y, Yamamoto N, Toyota N, Sato C, Wada

J, Shikata K, Makino H. Activation of Peroxisome Proliferator-activated Receptor δ Inhibits Streptozotocin-induced Diabetic Nephropathy Through Anti-inflammatory Mechanisms in Mice. American Diabetes Association 71st Scientific Sessions (San Diego, California, USA) 2011. 6. 24-6. 28

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

糖尿病性腎症の進展に対するケモカイン受容体阻害薬の検討

研究分担者

和田隆志 金沢大学医薬保健研究域医学系血液情報統御学 教授

研究協力者

原 章規 金沢大学附属病院腎臓内科・救急部

研究要旨

ケモカイン受容体 CCR2 を介した骨髄由来細胞 CD45/type 1 collagen (Col1) 二重陽性(CD45+/Col1+)細胞の制御による 2 型糖尿病性腎症の治療の可能性を検討した。2 型糖尿病モデルマウス(db/db)を用いて検討した結果、CCR2 阻害薬投与群では非投与群に比較して、腎糸球体硬化および間質線維化が改善した。また CD45+/Col1+細胞の数は CCR2 阻害薬投与群で減少した。さらに、CCR2 阻害薬投与群では非投与群に比較して、尿中アルブミン排泄量が減少した。以上の結果より、骨髄由来細胞の制御を介した 2 型糖尿病性腎症に対する CCR2 阻害薬の有効性が示唆された。現在、2 型糖尿病性腎症の患者に対する CCR2 阻害薬の有効性を検討する臨床試験 (UMIN000004779) を開始し、症例登録が進行中である。

A. 研究目的

糖尿病性腎症の成因に炎症が関与することが判明しつつある。病理学的には単球・マクロファージに代表される炎症・免疫担当細胞の浸潤を認める。一方、臓器線維化と密接に関連する新規細胞成分として骨髄由来細胞、CD45/type 1 collagen (Col1) 二重陽性(CD45+/Col1+)細胞が注目されている。CD45+/Col1+細胞はケモカイン・ケモカイン受容体を介して腎に浸潤し、マウス腎線維化に重要な役割を果たすことが報告されている。また、ヒト糖尿病性腎症の腎生検組織においても

CD45+/Col1+細胞を認め、その細胞数は腎機能および間質線維化と関連することから、同細胞の線維化への関与が示唆されている。ケモカインの代表である MCP-1 はその受容体 CCR2 を介して炎症・免疫担当細胞の浸潤に関与する重要な腎臓病の進展因子である。これまでの検討から、CD45+/Col1+細胞がマウス 1 型糖尿病性腎症モデルの腎間質に存在することが確認された。加えて、CCR2 阻害により CD45+/Col1+細胞数が減少するとともに、腎線維化およびアルブミン尿が改善することが判明している。

一方、ヒト末梢血より分離・培養した CD45+/Col1+細胞を高糖培養した結果、1型コラーゲンおよび TGF- β 1 の mRNA 発現が濃度および時間依存性に亢進することが判明した。また、高糖下の CD45/Col1 二重陽性細胞には CCR2 が発現することが確認された。さらに、高糖下の MCP-1 刺激により、1型コラーゲンおよび TGF- β 1 の mRNA 発現はさらに亢進した。

本年度は、CCR2 を介した CD45+/Col1+細胞の制御による2型糖尿病性腎症の治療の可能性を検討した。

B. 研究方法

本研究では、自然発症2型糖尿病モデルマウスである db/db マウスを用い、対照マウスとして db/+ マウスを用いた。CCR2 阻害薬としては、これまでに1型糖尿病モデルマウスおよび試験管内の検討の際に使用したプロパゲルマニウム(PG)を用いた。PG または対照薬投与 16 週後にと殺し腎組織を得た。

検討項目として、腎における CD45+/Col1+細胞ならびに F4/80 陽性マクロファージ数に加え、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。さらに、腎機能およびアルブミン尿を検討した。

(倫理面への配慮)

金沢大学動物実験規定ならびに動物実験等に関わる飼養保管施設及び実験室の設置と運用に関する細則を遵守した。また、本研究で使用した薬剤

である PG については、提供される三和化学研究所と覚書(MTA)を締結のうゑで使用した。

C. 研究結果

コンピュータ画像解析により算出した糸球体硬化率および間質線維化率は、PG 非投与群に比して PG 投与群で低下した(図)。CD45 および 1型コラーゲンの二重陽性細胞として同定した CD45+/Col1+細胞は主として腎間質に浸潤し、その数は PG 非投与群に比して PG 投与群で低下した(図)。腎内マクロファージ数も糸球体・間質ともに CD45+/Col1+細胞数と同様の結果であった。また、1型コラーゲン、TGF- β 1 ならに MCP-1 といった線維化に関連する分子発現も PG 非投与群に比して PG 投与群で低下した。両群間の腎機能に差はみられなかったが、PG 投与群では PG 非投与群に比して、アルブミン尿が改善した(図)。

D. 考察

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 CD45+/Col1+細胞ならびに単球・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、CD45+/Col1+細胞ならびに単球・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。前年度の試験管内の検討結果と合わせ、CCR2 阻害薬は CD45+/Col1+細胞を直接あるいは腎固有細胞や浸潤細胞との相互作用を間接的に制御することにより、2 型糖尿病性腎症の進展抑制に有効であることが示唆された。

そこで、当院では現在、糖尿病性腎症患者における CCR2 阻害薬の有効性と安全性を検討する目的で、臨床試験(UMIN000004779)を開始している。2 型糖尿病性腎症を対象とし、従来治療群と CCR2 阻害薬を追加した群において、腎機能および尿中アルブミン排泄量を比較検討する介入試験である。順次症例の登録が行われており、今後の解析結果が待たれる。

E. 結論

CCR2 阻害薬は骨髄由来細胞 CD45+/Col1+細胞の機能を制御することにより糖尿病性腎症の進展を抑制する新規治療薬として有用であることが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 糖尿病性腎症の進展におけるケモカイン-ケモカイン受容体の役割

原章規、和田隆志

日本腎臓学会誌 2011; 53(7): 1027-1033

2) Pathogenesis of diabetic complications through bone marrow-derived cells.

Hara A, Norihiko Sakai, Takashi

Wada.

Journal of Wound Technology, in press

2. 学会発表

1) 第54回日本糖尿病学会年次学術集会

一般演題 II-P-98. 糖尿病性腎症の進展における CD45/COL1 陽性細胞の関与
原章規、北川清樹、坂井宣彦、古市賢吾、和田隆志

平成 23 年 5 月 20 日 於札幌

2) 第2回西日本腎臓病研究会
骨髄由来細胞からみた糖尿病合併症の進展機序解明と治療への展開

原章規、坂井宣彦、北川清樹、古市賢吾、和田隆志

平成 23 年 6 月 4 日 於名古屋

3) 第54回日本腎臓学会学術総会

糖尿病性腎症(基礎)(1) P-393. マウス2型糖尿病性腎症モデルにおける CD45/COL1 二重陽性細胞の意義

原章規、北川清樹、坂井宣彦、清水美保、古市賢吾、和田隆志

平成 23 年 6 月 16 日 於横浜

4) ASN Renal Week 2011

FR-P01549 Impact of CD45+/Col1+ cells through CCR2 signaling on the pathogenesis of diabetic nephropathy

Akinori Hara, Norihiko Sakai, Kiyoki Kitagawa, Kengo Furuichi, Shuichi Kaneko,

Takashi Wada

平成 23 年 11 月 11 日 於フィラデルフィア

G. 知的所有権の出現登録状況

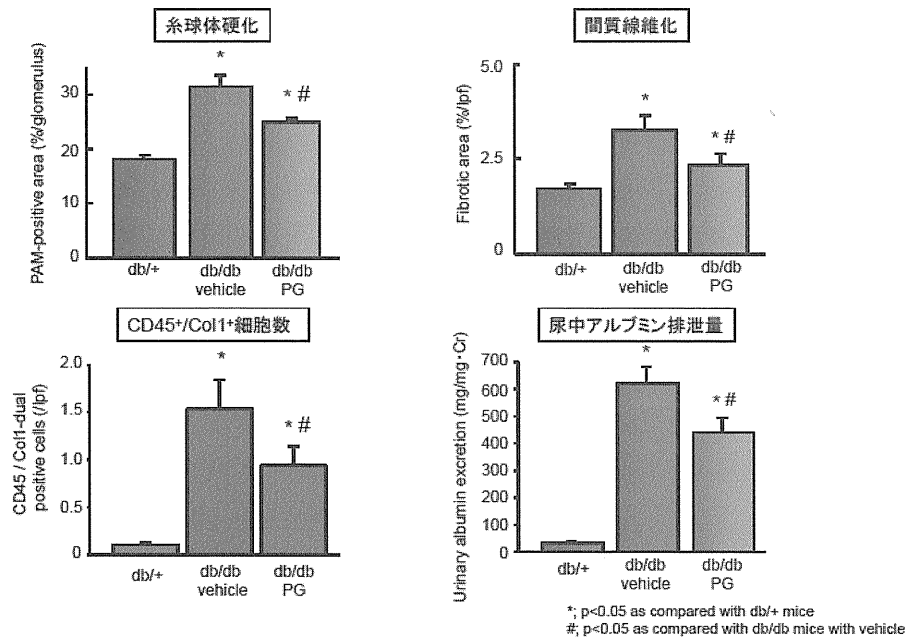
1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

図. CCR2 阻害により、糸球体硬化・間質線維化、骨髄由来細胞数およびアルブミン尿が改善した



研究成果の刊行に関する一覧

【全体研究：糖尿病性腎症症例のレジストリーの運用】

- 1) Asai O, Nakatani K, Tanaka T, Sakan H, Imura A, Yoshimoto S, Samejima KI, Yamaguchi Y, Matsui M, Akai Y, Konishi N, Iwano M, Nabeshima Y, Saito Y. Decreased renal α -Klotho expression in early diabetic nephropathy in humans and mice and its possible role in urinary calcium excretion. *Kidney Int Jan* 4. [Epub ahead of print], 2012
- 2) Iwano M, Yamaguchi Y, Iwamoto T, Nakatani K, Matsui M, Kubo A, Akai Y, Mori T, Saito Y. Urinary FSP1 Is a Biomarker of Crescentic GN. *Journal of American Society of Nephrology* Nov 17. [Epub ahead of print], 2011
- 3) 横山 仁：腎臓病総合レジストリーの登録及び二次研究の状況. *Annual Review 腎臓* 2012, 中外医学社 東京, 2012
- 4) Yokoyama H. Clinicopathological insights into lupus glomerulonephritis of Japanese and Asians. *Clinical Exp Nephrol* 15, 321-330, 2011
- 5) 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
- 6) 横山 仁. 膜性腎症の疫学：腎臓病総合レジストリーの解析から. *日腎会誌* 53, 677-683, 2011

【分科会：糖尿病性腎症の病期分類ならびに病態の解析】

- 1) 羽田勝計. 糖尿病腎症－診断と治療に対する最近の考えかたとその実際. *Medical Practice* 28(1), 69-73, 2011
- 2) 羽田勝計. 糖尿病とCKD. *Medical Practice* 28(6), 1017-1020, 2011
- 3) 羽田勝計. 糖尿病性腎症病期分類とCKDステージ分類. *医学のあゆみ* 238(9), 825-828, 2011
- 4) Nakamaki S, Satoh H, Kudoh A, Hayashi Y, Hirai H, Watanabe T. Adiponectin reduces proteinuria in streptozotocin-induced diabetic Wistar rats. *Exp Biol Med (Maywood)* 236, 614-620, 2011
- 5) Kudoh A, Satoh H, Hirai H, Watanabe T. Pioglitazone upregulates adiponectin receptor 2 in 3T3-L1 adipocytes. *Life Sci* 88, 1055-1062, 2011
- 6) 小川大輔, 榎野博史：糖尿病における腎臓病・CKDの診断・検査法. *糖尿病診療ガイド*, 南山堂 東京, 2011
- 7) Matsushita Y, Ogawa D, Wada J, Yamamoto N, Shikata K, Sato C, Tachibana H, Toyota N, Makino H. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor delta inhibits streptozotocin-induced diabetic nephropathy through anti-inflammatory mechanisms in mice. *Diabetes* 60, 960-968, 2011
- 8) Kido Y, Ogawa D, Shikata K, Sasaki M, Nagase R, Okada S, Usui Kataoka HU, Wada J, Makino H. Intercellular adhesion molecule-1 plays a critical role in

- glomerulosclerosis after subtotal nephrectomy. *Clin Exp Nephrol* 15, 212-219, 2011
- 9) Sawaguchi M, Araki S, Kobori H, Urushihara M, Haneda M, Koya D, Kashiwagi A, Uzu T, Maegawa H. Association between urinary angiotensinogen levels and renal and cardiovascular prognoses in patients with type 2 diabetes mellitus. *Journal of Diabetes Investigation* , 掲載予定
 - 10) Gansvoort RT, Matsushita K, van der Verde M, Astor BC, et al. Lower estimated GFR and higher albuminuria are associated with adverse kidney outcomes in both general and high-risk population: A meta-analysis of general and high-risk population cohorts. *Kidney Int* 80, 93-104, 2011
 - 11) Iseki K. Editorials. Role of chronic kidney disease in cardiovascular disease: are we different from others? *Clin Exp Nephrol* 15, 450-455, 2011
 - 12) 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
 - 13) Ichikawa K, Konta T, Ikeda A, Fujimoto S, Iseki K, Moriyama T, Yamagata K, Tsuruya K, Yoshida H, Asahi K, Kurahashi I, Ohashi Y, Watanabe T. Significance of past history of kidney disease for the detection of individuals with high-risk chronic kidney disease: analysis of data from a nationwide cohort. *Clin Exp Nephrol* , 2011
 - 14) Yano Y, Fujimoto S, Sato Y, Konta T, Iseki K, Moriyama T, Yamagata K, Tsuruya K, Yoshida H, Asahi K, Kurahashi I, Ohashi Y, Watanabe T. Association between prehypertension and chronic kidney disease in Japanese general population. *Kidney Int* , 2012
 - 15) Iseki K, Moriyama T, Yamagata K, Tsuruya K, Yoshida H, Fujimoto S, Konta T, Asahi K, Ohashi Y, and Watanabe T. Risk factor profiles based on eGFR and dipstick proteinuria: Analysis of the participants of the Specific Health Check and Guidance System in Japan 2008. *Clin Exp Nephrol*, 2012
 - 16) Tsuneo Konta, Kazunobu Ichikawa, Ami Ikeda, Shouichi Fujimoto, Kunitoshi Iseki, Toshiki Moriyama, Kunihiro Yamagata, Kazuhiko Tsuruya, Hideaki Yoshida, Koichi Asahi, Issei Kurahashi, Yasuo Ohashi, Tsuyoshi Watanabe. Blood pressure control in a Japanese population with chronic kidney disease: A baseline survey of a nationwide cohort. *Am J Hypertens* (in press)
 - 17) Masahide Kondo, Kunihiro Yamagata, Shu-Ling Hoshi, Chie Saito, Koichi Asahi, , Toshiki Moriyama, Kazuhiko Tsuruya, Hideaki Yoshida, Kunitoshi Iseki, Tsuyoshi Watanabe, and on behalf of the Japanese Society of Nephrology Task Force for the Validation of Urine Examination as a Universal Screening. Cost-effectiveness of chronic kidney disease mass screening test in Japan. *Clin Exp Nephrol* (in press)
 - 18) Tanaka K, Hara S, Kushiyama A, Ubara Y, Yoshida Y, Mizuiri S, Aikawa A, Kawatzu S. Risk of macrovascular disease stratified by stage of chronic kidney disease in type 2 diabetic patients: critical level of the estimated glomerular filtration rate and the significance of hyperuricemia. *Clin Exp Nephrol* 15(3), 391-397, 2011

【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】

- 1) Yuzawa Y. Role of hydrogen sulfide in chronic kidney disease and diabetic nephropathy. *Nihon Yakurigaku Zasshi* 139(1), 17-21, 2012
- 2) 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
- 3) 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
- 4) 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
- 5) 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
- 6) 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
- 7) 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
- 8) 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
- 9) 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
- 10) 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
- 11) 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
- 12) Abe H. Recent progress in understanding the molecular pathogenesis of diabetic nephropathy. *Rinsho Byori* 59(2), 179-86, 2011

- 13) 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
- 14) 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
- 15) 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
- 16) 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
- 17) 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
- 18) 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
- 19) 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
- 20) Yasui K, Hashimoto E, Komorizono Y, Koike K, Arii 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
- 21) 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

【分科会：糖尿病性腎症の新規治療法の開発】

- 1) Koike K, Fukami K, Yonemoto K, Iwatani R, Obara N, Ueda K, Toyonaga M, Ueda S, Ohara A, Takeda K, Yamagishi S, Okuda S. A new vasculitis activity score for predicting death in myeloperoxidase-antineutrophil cytoplasmic antibody associated vasculitis patients. *Am J Nephrol* , 1–6, 2011
- 2) Yamagishi SI, Maeda S, Matsui T, Ueda S, Fukami K, Okuda S. Role of advanced glycation end products (AGEs) and oxidative stress in vascular complications in diabetes. *Biochim Biophys Acta* , , 2011
- 3) Bekki H, Yamamoto K, Sone M, Homma T, Nakata M, Nohara M, Fukami K, Okuda S,

- Yamagishi S. Beneficial cardiometabolic actions of telmisartan plus amlodipine therapy in elderly patients with poorly controlled hypertension. *Clin Cardiol* , 261-5, 2011
- 4) Fujimi-Hayashida A, Ueda S, Yamagishi S, Kaida Y, Ando R, Nakayama Y, Fukami K, Okuda S. Association of asymmetric dimethylarginine with severity of kidney injury and decline in kidney function in IgA nephropathy. *Am J Nephrol* , 1-6, 2011
 - 5) Nagano M, Fukami K, Yamagishi S, Sakai K, Kaida Y, Matsumoto T, Hazama
 - 6) T, Tanaka M, Ueda S, and Okuda S. 7. Tissue level of advanced glycation end products (AGEs) is an independent determinant of high sensitive C-reactive protein levels in hemodialysis patients. *V. Nephrology* , 299-303, 2011
 - 7) Maeda S, Matsui T, Takeuchi M, Yoshida Y, Yamakawa R, Fukami K, Yamagishi SI. Pigment epithelium-derived factor (PEDF) inhibits proximal tubular cell injury in early diabetic nephropathy by suppressing advanced glycation end products (AGEs)-receptor (RAGE) axis. *Pharmacol Res* , 241-8, 2011
 - 8) 松下裕一、四方賢一：糖尿病性腎症：晩期糖尿病の管理と注意点. 腎疾患・透析 最新の治療 2011-2013, 南江堂 東京, 2011
 - 9) 小寺 亮、四方 賢一. 特集 糖尿病性腎症の克服を目指して—Microinflammation—. *メディカルビューポイント* 3, 2, 2011
 - 10) 小寺 亮、四方 賢一. 糖尿病性腎症とCKD—新たな展開と治療法の選択—. 糖尿病性腎症の治療1：血糖コントロール. *月刊糖尿病* 3 (7) , 69-77, 2011
 - 11) 小寺 亮、四方 賢一. 糖尿病性腎症—病態の解明と最新治療戦略—糖尿病性腎症の最新治療戦略. *医学のあゆみ* 238 (9) , 851-856, 2011
 - 12) 松下裕一、四方賢一. 糖尿病性腎症：晩期糖尿病の管理と注意点. 腎疾患・透析 最新の治療 2011-2013. , , 2011
 - 13) 四方賢一. 生活習慣病治療のパラダイムシフト—慢性炎症を標的とした治療戦略—. *岡山医学会雑誌* 123, 197-206, 2011
 - 14) Ogawa D, Asanuma M, Miyazaki I, Tachibana H, Wada J, Sogawa N, Sugaya T, Kitamura S, Maeshima Y, Shikata K, Makino H. High glucose increases metallothionein expression in renal proximal tubular epithelial cells. *Exp Diabetes Res* 2011, , 2011
 - 15) Watanabe N, Shikata K, Shikata Y, Sarai K, Omori K, Kodera R, Sato C, Wada J, Makino H. Involvement of MAPKs in ICAM-1 expression in glomerular endothelial cells in diabetic nephropathy. *Acta Med Okayama* 65, 247-25, 2011
 - 16) Sasaki M, Shikata K, Okada S, Miyamoto S, Nishishita S, Kataoka HU, Sato C, Wada J, Ogawa D, Makino H. The macrophage is a key factor in renal injuries caused by glomerular hyperfiltration. *Acta Med Okayama* 65, 81-89, 2011
 - 17) Matsushita Y, Ogawa D, Wada J, Yamamoto N, Shikata K, Sato C, Tachibana H, Toyota N, Makino H. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor delta inhibits streptozotocin-induced diabetic nephropathy through anti-inflammatory mechanisms in mice. *Diabetes* 60, 960-968, 2011
 - 18) Kodera R, Shikata K, Kataoka HU, Takatsuka T, Miyamoto S, Sasaki M, Kajitani N, Nishishita S, Sarai K, Hirota D, Sato C, Ogawa D, Makino H. Glucagon-like peptide-1 receptor agonist ameliorates renal injury through its