

dysfunction due to hyposialylation may cause a compensatory increase in the related sialomucins CD34 and endoglycan. Takeda *et al.* [19] reported that PC hyposialylation or desialylation in rats, generated by treatment with reagents such as puromycin aminonucleoside, disrupts PC complexes containing PC, NHERF2 and ezrin, and their interactions with the actin cytoskeleton, resulting in a loss of foot processes similar to that seen in human nephrotic syndrome. Therefore, hyposialylated PC could be a cause of the nephrotic-like syndrome in mt-mice.

To clarify whether hyposialylation is the cause of the nephrotic-like syndrome in mt-mice, we conducted a therapeutic study by administering sialic acid metabolites to mt-mice from embryonic stages through two months of age. Since ManNAc phosphorylation is affected by the GNE V572L point mutation in the sialic acid biosynthesis pathway [35], Neu5Ac, a final product in the pathway, rather than ManNAc, was administered in the therapeutic study. Neu5Ac treatment markedly suppressed the albuminuria and renal disorders, including fused podocyte foot processes, dilatation of Bowman's space and glomerulosclerosis, in the mt-mice. The proportion of PNA-positive glomeruli was reduced, indicating that PC sialylation was recovered. Therefore, starting Neu5Ac treatment prenatally prevented mt-mice from developing the nephrotic-like syndrome. These results suggest that the hyposialylation of renal proteins, including PC, causes the nephrotic-like syndrome in the mt-mice. Similar therapeutic studies using sialic acid metabolites have been demonstrated in GNE D176V and GNE M712T-mice, with the amelioration of myopathies and renal hematuria, respectively [18,21].

In conclusion, the GNE V572L mutation caused the hyposialylation of renal glycoproteins such as PC, resulting in glomerular filtration barrier failure and nephrotic syndrome-like phenotypes. Our mt-mice are suitable for long-term therapeutic trials and the pathological analysis of nephrotic-like syndromes. We consider the negatively charged monosaccharide Neu5Ac to be a promising therapeutic tool for some nephrotic syndromes; candidate disorders include focal and segmental glomerulonephritis [42,47], membranous glomerulopathy [42], and other unexplained nephrotic syndromes, congenital or otherwise. However, no renal diseases caused by hyposialylation have been identified to date, and renal abnormality has not been reported in DMRV patients. Several issues still need to be addressed, such as the pathomechanisms of the massive proteinuria caused by the hyposialylated glomerular glycoproteins and glycolipids, and the therapeutic effect of other sialic acid metabolites, in our mt-mice.

## Supporting Information

**Figure S1 PCR genotyping, skeletal muscle histology, and rota-rod tests.** (A) Mice were genotyped by PCR using allele-specific locked nucleic acid (LNA<sup>TM</sup>)-containing primers. A wild-type band (153 bp) of the *GNE* gene was detected by wild-type allele-specific primers (**left panel**), and a mutant band (153 bp) was detected by mutant allele-specific primers (**right panel**). (B) Modified Gomori's trichrome-stained sections of quadriceps femoris muscles of 6-month-old ht (**left panel**) and mt (**right panel**) mice. (C) Motor coordination and learning was assessed by an accelerating (5–40 rpm) rota-rod paradigm (wt, green circles; ht, blue triangles; mt, red squares). (TIF)

## References

1. Effertz K, Hinderlich S, Reutter W (1999) Selective loss of either the epimerase or kinase activity of UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosa-

**Figure S2 Scheme of the therapeutic Neu5Ac experiment.** Pregnant ht mice were not treated or were treated with 1 g/kg/day of Neu5Ac in the drinking water, from mating through the nursing period. After weaning, pups were not treated or were treated with Neu5Ac (0.2 g/kg/day) in the drinking water until they were 2 months old. The mice were sacrificed at 2 months of age and were analyzed by histological and biochemical methods. Urine was collected at 1 and 2 months of age. (TIF)

**Figure S3 Kidney fibrosis.** (A) Van-Gieson-stained kidney sections of ht (**upper panels**) and mt (**lower panels**) mice at 3 months (**left panels**) and 12 months (**right panels**) of age. (B) Quantitative RT-PCR analysis of the expression levels of several genes implicated in renal fibrosis in 3-month-old ht (n = 6) and mt (n = 5) mice. The expression level of each gene was normalized to that of the *GAPDH* gene. Results are shown as means  $\pm$  SD. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  (student's *t*-test). (TIF)

**Figure S4 Lectin staining analysis of glomerular endothelial cells.** Confocal laser scanning microscopic analysis of double-staining for LEL, a marker for endothelial cells, and PNA in the kidneys of 3-month-old ht (**upper panels**) and mt (**lower panels**) mice. Sections were stained with LEL (**left panels; green**), PNA (**middle panels; red**), and both (**right panels; merge**). Scale bars: 25  $\mu$ m. (TIF)

**Figure S5 Western blot analysis of podocalyxin-related proteins expressed in podocytes.** Protein bands were detected at the expected molecular sizes and similar intensities in the ht and mt mice: NHERF2 (40 kDa), ezrin (80 kDa), nephrin (100 kDa), podocin (42 kDa), podoplanin (38 kDa), and NEPH1 (65 kDa). (TIF)

**Figure S6 Expression levels of CD34 family genes in the kidneys.** Expression levels of CD34 family genes were analyzed in the kidneys of 6-month-old ht (open bars, n = 5–6) and mt (closed bars, n = 5–6) mice by quantitative RT-PCR. Expression levels of each gene were normalized to those of the *GAPDH* gene. Results are shown as means  $\pm$  SD. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  (student's *t*-test). (TIF)

**Table S1 List of primers used for QRT-PCR.** (TIF)

## Acknowledgments

We are grateful to Dr. Takeshi Yagi (Osaka University, Osaka, Japan) for the DT-A cassette; Drs. Yumi Kanegae and Izumu Saito (Tokyo University, Tokyo, Japan) for the Cre-expressing adenoviral vector and the loxP cassette, and Dr. Tomoya Asano (Kanazawa University) for valuable comments on the biochemical analysis. We are also grateful to all the members of the Division of Transgenic Animal Science for their excellent animal care.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MI TW MA. Performed the experiments: MI KS TA TT TY. Analyzed the data: MI TA KF TW MA. Wrote the paper: MI MA.

mine kinase due to site-directed mutagenesis based on sequence alignments. *J Biol Chem* 274: 28771–28778.

2. Schwarzkopf M, Knobeloch KP, Rohde E, Hinderlich S, Wiechens N, et al. (2002) Sialylation is essential for early development in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 5267–5270.
3. Arai A, Tanaka K, Ikeuchi T, Igarashi S, Kobayashi H, et al. (2002) A novel mutation in the GNE gene and a linkage disequilibrium in Japanese pedigrees. *Ann Neurol* 52: 516–519.
4. Eisenberg I, Avidan N, Potikha T, Hochner H, Chen M, et al. (2001) The UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase gene is mutated in recessive hereditary inclusion body myopathy. *Nat Genet* 29: 83–87.
5. Griggs RC, Askanas V, DiMauro S, Engel A, Karpati G, et al. (1995) Inclusion body myositis and myopathies. *Ann Neurol* 38: 705–713.
6. Varki A (1997) Sialic acids as ligands in recognition phenomena. *FASEB J* 11: 248–255.
7. Keppler OT, Hinderlich S, Langner J, Schwartz-Albiez R, Reutter W, et al. (1999) UDP-GlcNAc 2-epimerase: a regulator of cell surface sialylation. *Science* 284: 1372–1376.
8. Rutishauser U, Acheson A, Hall AK, Mann DM, Sunshine J (1988) The neural cell adhesion molecule (NCAM) as a regulator of cell-cell interactions. *Science* 240: 53–57.
9. Bernard A, Lauwerys R, Ouled Amor A (1992) Loss of glomerular polyanion correlated with albuminuria in experimental cadmium nephropathy. *Arch Toxicol* 66: 272–278.
10. Charest PM, Roth J (1985) Localization of sialic acid in kidney glomeruli: regionalization in the podocyte plasma membrane and loss in experimental nephrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82: 8508–8512.
11. D'Souza Y B, Jones CJ, Short CD, Roberts IS, Bonshek RE (2009) Oligosaccharide composition is similar in drusen and dense deposits in membranoproliferative glomerulonephritis type II. *Kidney Int* 75: 824–827.
12. Harvey SJ, Jarad G, Cunningham J, Rops AL, van der Vlag J, et al. (2007) Disruption of glomerular basement membrane charge through podocyte-specific mutation of agrin does not alter glomerular permselectivity. *Am J Pathol* 171: 139–152.
13. Kerjaschki D, Vernillo AT, Farquhar MG (1985) Reduced sialylation of podocalyxin—the major sialoprotein of the rat kidney glomerulus—in aminonucleoside nephrosis. *Am J Pathol* 118: 343–349.
14. Nielsen JS, McNagny KM (2009) The role of podocalyxin in health and disease. *J Am Soc Nephrol* 20: 1669–1676.
15. Singh A, Satchell SC, Neal CR, McKenzie EA, Tooke JE, et al. (2007) Glomerular endothelial glycocalyx constitutes a barrier to protein permeability. *J Am Soc Nephrol* 18: 2885–2893.
16. Avasthi PS, Koshy V (1988) Glomerular endothelial glycocalyx. *Contrib Nephrol* 68: 104–113.
17. Tryggvason K, Patrakka J, Wartiovaara J (2006) Hereditary proteinuria syndromes and mechanisms of proteinuria. *N Engl J Med* 354: 1387–1401.
18. Galeano B, Klootwijk R, Manoli I, Sun M, Ciccone C, et al. (2007) Mutation in the key enzyme of sialic acid biosynthesis causes severe glomerular proteinuria and is rescued by N-acetylmannosamine. *J Clin Invest* 117: 1585–1594.
19. Takeda T, McQuistan T, Orlando RA, Farquhar MG (2001) Loss of glomerular foot processes is associated with uncoupling of podocalyxin from the actin cytoskeleton. *J Clin Invest* 108: 289–301.
20. Malicdan MC, Noguchi S, Nonaka I, Hayashi YK, Nishino I (2007) A Gne knockout mouse expressing human GNE D176V mutation develops features similar to distal myopathy with rimmed vacuoles or hereditary inclusion body myopathy. *Hum Mol Genet* 16: 2669–2682.
21. Malicdan MC, Noguchi S, Hayashi YK, Nonaka I, Nishino I (2009) Prophylactic treatment with sialic acid metabolites precludes the development of the myopathic phenotype in the DMRV-hIBM mouse model. *Nat Med* 15: 690–695.
22. Benoit G, Machuca E, Heidet L, Antignac C (2010) Hereditary kidney diseases: highlighting the importance of classical Mendelian phenotypes. *Ann N Y Acad Sci* 1214: 83–98.
23. Soriano P, Montgomery C, Geske R, Bradley A (1991) Targeted disruption of the c-src proto-oncogene leads to osteopetrosis in mice. *Cell* 64: 693–702.
24. Yagi T, Nada S, Watanabe N, Tamemoto H, Kohmura N, et al. (1993) A novel negative selection for homologous recombinants using diphtheria toxin A fragment gene. *Anal Biochem* 214: 77–86.
25. Kuhn R, Rajewsky K, Muller W (1991) Generation and analysis of interleukin-4 deficient mice. *Science* 254: 707–710.
26. Asano M, Furukawa K, Kido M, Matsumoto S, Umesaki Y, et al. (1997) Growth retardation and early death of beta-1,4-galactosyltransferase knockout mice with augmented proliferation and abnormal differentiation of epithelial cells. *EMBO J* 16: 1850–1857.
27. Kanegae Y, Lee G, Sato Y, Tanaka M, Nakai M, et al. (1995) Efficient gene activation in mammalian cells by using recombinant adenovirus expressing site-specific Cre recombinase. *Nucleic Acids Res* 23: 3816–3821.
28. Nagy A, Rossant J, Nagy R, Abramow-Newerly W, Roder JC (1993) Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 8424–8428.
29. Jepsen JS, Sorensen MD, Wengel J (2004) Locked nucleic acid: a potent nucleic acid analog in therapeutics and biotechnology. *Oligonucleotides* 14: 130–146.
30. Yoshihara T, Sugihara K, Kizuka Y, Oka S, Asano M (2009) Learning/memory impairment and reduced expression of the HNK-1 carbohydrate in beta-4-galactosyltransferase-II-deficient mice. *J Biol Chem* 284: 12550–12561.
31. Nishie T, Miyaishi O, Azuma H, Kameyama A, Naruse C, et al. (2007) Development of immunoglobulin A nephropathy-like disease in beta-1,4-galactosyltransferase-I-deficient mice. *Am J Pathol* 170: 447–456.
32. Wada T, Tomosugi N, Naito T, Yokoyama H, Kobayashi K, et al. (1994) Prevention of proteinuria by the administration of anti-interleukin 8 antibody in experimental acute immune complex-induced glomerulonephritis. *J Exp Med* 180: 1135–1140.
33. Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156–159.
34. Varki A (2001) Loss of N-glycolylneuraminic acid in humans: Mechanisms, consequences, and implications for hominid evolution. *Am J Phys Anthropol Suppl* 33: 54–69.
35. Tong Y, Tempel W, Nedyalkova L, Mackenzie F, Park HW (2009) Crystal structure of the N-acetylmannosamine kinase domain of GNE. *PLoS One* 4: e7165.
36. Kestila M, Lenkkeri U, Mannikko M, Lamerdin J, McCready P, et al. (1998) Positionally cloned gene for a novel glomerular protein—nephrin—is mutated in congenital nephrotic syndrome. *Mol Cell* 1: 575–582.
37. Rapola J (1987) Congenital nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol* 1: 441–446.
38. Kim JM, Wu H, Green G, Winkler CA, Kopp JB, et al. (2003) CD2-associated protein haploinsufficiency is linked to glomerular disease susceptibility. *Science* 300: 1298–1300.
39. Shih NY, Li J, Karpitskii V, Nguyen A, Dustin ML, et al. (1999) Congenital nephrotic syndrome in mice lacking CD2-associated protein. *Science* 286: 312–315.
40. Putaala H, Soininen R, Kilpelainen P, Wartiovaara J, Tryggvason K (2001) The murine nephrin gene is specifically expressed in kidney, brain and pancreas: inactivation of the gene leads to massive proteinuria and neonatal death. *Hum Mol Genet* 10: 1–8.
41. Holthofer H, Pettersson E, Tornroth T (1987) Diabetes mellitus associated changes in glomerular glycoproteins: a fluorescence microscopical study. *Histochem J* 19: 351–356.
42. Vogtlander NP, van der Vlag J, Bakker MA, Dijkman HB, Wevers RA, et al. (2010) Expression of sialidase and dystroglycan in human glomerular diseases. *Nephrol Dial Transplant* 25: 478–484.
43. Kerjaschki D, Sharkey DJ, Farquhar MG (1984) Identification and characterization of podocalyxin—the major sialoprotein of the renal glomerular epithelial cell. *J Cell Biol* 98: 1591–1596.
44. Nielsen JS, McNagny KM (2008) Novel functions of the CD34 family. *J Cell Sci* 121: 3683–3692.
45. Schnabel E, Dekan G, Miettinen A, Farquhar MG (1989) Biogenesis of podocalyxin—the major glomerular sialoglycoprotein—in the newborn rat kidney. *Eur J Cell Biol* 48: 313–326.
46. Doyonnas R, Kershaw DB, Duhme C, Merckens H, Chelliah S, et al. (2001) Anuria, omphalocele, and perinatal lethality in mice lacking the CD34-related protein podocalyxin. *J Exp Med* 194: 13–27.
47. Daskalakis N, Winn MP (2006) Focal and segmental glomerulosclerosis. *Cell Mol Life Sci* 63: 2506–2511.

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 23 年度 第 1 回班会議

プログラム

日時：平成 23 年 5 月 8 日（日）14：00～16：00  
場所：八重洲富士屋ホテル 3 階 赤松の間

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 23 年度 第 1 回班会議 プログラム  
平成 23 年 5 月 8 日 (日)

1. 挨拶  
14 : 00～14 : 05  
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の現状報告と今後 14 : 05～14 : 15  
清水 美保
  
  - II. 「糖尿病性腎症の病期分類ならびに病態の解析」分科会 活動予定と報告  
14 : 15～15 : 35  
羽田 勝計  
古市 賢吾
  
  - 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  
15 : 35～15 : 45  
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  
15 : 45～15 : 55  
奥田 誠也
  
3. 事務連絡  
今後の予定 15 : 55～16 : 00

## 尿検体収集を伴った糖尿病性腎症レジストリーの運用

全体研究として、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の二次研究という形で糖尿病性腎症レジストリーを平成21年度より運営している。非腎生検例も含め、早期腎症から進行した腎症までを対象とし、本邦の糖尿病性腎症の全体像を表すデータ基盤を作成する事を目標としている。プロトコルを日本腎臓学会のホームページに掲載し、登録促進のために、定期的にニュースレターを作成し、現状報告とさらなる登録のお願いを行っている。

平成23年4月末現在で、295例が登録された。登録時の年齢は平均66.1歳（36-93歳）、糖尿病歴は平均14.5年（0-50年）であった。血清クレアチニン値は平均1.35 mg/dl（0.38-7.46）、血清総蛋白値は平均6.9g/dl（4.3-8.9）、血清アルブミン値は平均3.9g/dl（1.4-6.1）、血清総コレステロール値は平均173.2mg/dl（65-370）、HbA1c値は平均6.8%（4.2-12.6）であった。蛋白尿に関しては、正常アルブミン尿が35.5%、微量アルブミン尿が24.9%、顕性蛋白尿が39.6%であり、ネフローゼ症候群は14.3%であった。このうち13例が腎生検されており、162例で尿検体の収集が行われている。

経時的なデータの登録も順次進んでおり、6ヶ月目として62例、12ヶ月目として11例の登録を得ている。事務局から毎月登録の進捗状況をNews letterで発信していることに加え、“追跡データの登録お願い”のメールも運用されている。

本研究で収集されたデータ及び検体を用いて、病期分類の分科会およびバイオマーカーの分科会で得られた成果の検証を行う予定である。

糖尿病性腎症の病期分類ならびに病態の解析

旭川医科大学	羽田	勝計
岡山大学	榎野	博史
自治医科大学	草野	英二
新潟大学	鈴木	芳樹
福島県立医科大学	佐藤	博亮

本年度は、1) 最終目標である、病期分類の改訂にむけた基礎的データを検討すること、2) 簡便で病態・予後が分かる病期分類を目指して具体的な提言を行うことを目標とする。そのために、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、JDNCS）
  - ②長期観察されたコホート研究の解析（事前登録前向き研究）
  - ③文献的解析（メタ解析）
  - ④腎生検標本を含めた解析
- を進め、具体的成果を得る。

現在、①全国規模の糖尿病性腎症レジストリー（前向き研究）には、295例の登録が行われており、順次登録数が増加している。②長期観察されたコホート研究の解析（事前登録前向き研究）では、7施設より、2904例の解析可能な症例データを得た。③文献的解析（メタ解析）に関しては、6520本の論文より、解析可能な論文の選定を進め、メタ解析を進めている。また、④226例の腎生検標本と臨床データを収集し、臨床病理学的な検討を進めている。

提言にむけて、現在の病期分類の問題点を明らかにする必要がある。その問題点に対して、現在までに収集・解析したデータより検討を行い、提言を作成する。本年度中には、その提言とともに、本邦の病態をより反映し、国際的にも整合性のある病期分類案を提示する事を目標とする。

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

藤田保健衛生大学	湯沢由紀夫
徳島大学	安部秀斉
金沢大学	篁俊成

平成23年度全体研究

「既報の尿バイオマーカー群による複数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パネル化モデルの作成、新規尿バイオマーカー候補の絞り込み」

1：名古屋大学糖尿病尿サンプル200名（境界型・1期～4期）の既報の尿バイオマーカー（CCN2, Collagen IV, AGT, MCP-1, L-FABP）測定：96穴ELISAシステム

2：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、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）のデータと1のデータの比較検討

3：200症例のCCN2, Collagen IV, AGT, MCP-1, L-FABPのデータを用いたパネルモデルの作成

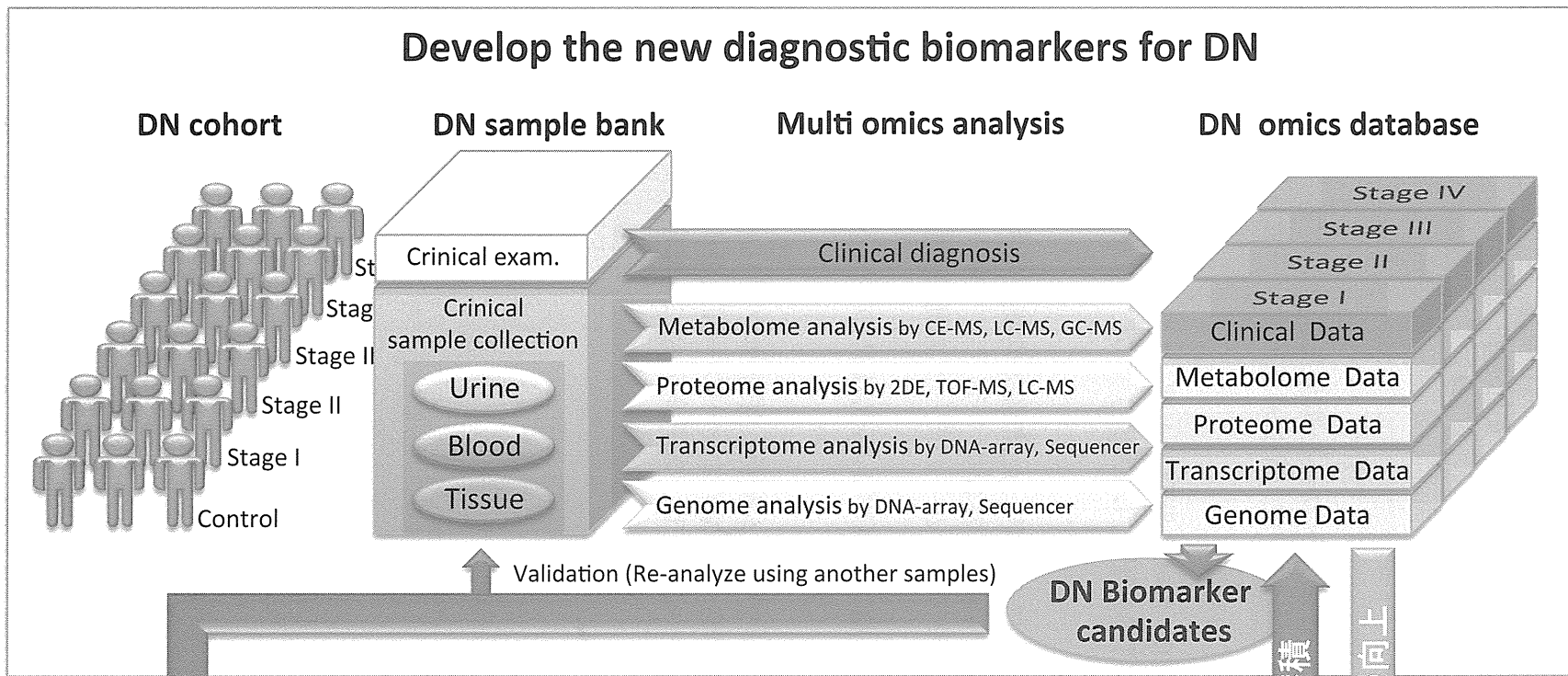
4：個別研究（ゲノム・トランスクリプトーム解析、尿中エクソゾーム解析、尿メタボローム解析）により網羅的に検索されたバイオマーカー群及び山本格教授のプロテオーム解析から有望な尿マーカーを選定し、最終的には10種類以下のマーカー候補に絞り込む。

抗体作成候補物質の絞り込み

全体の流れは、別図参照



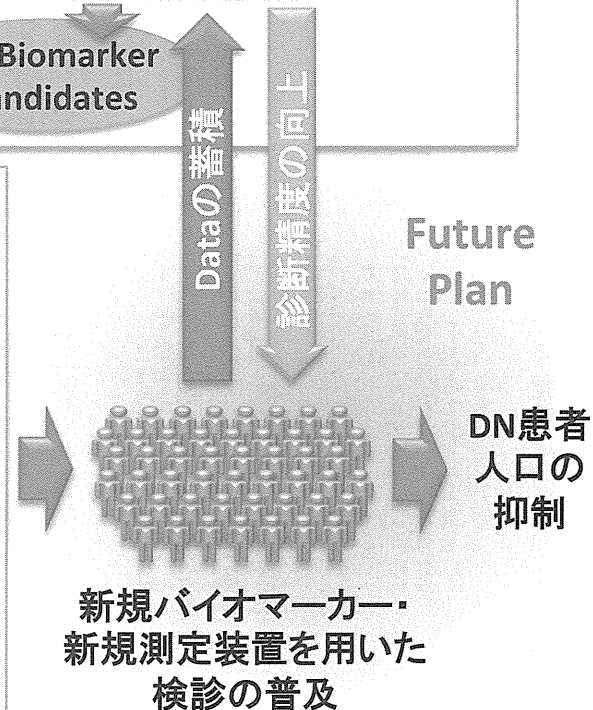
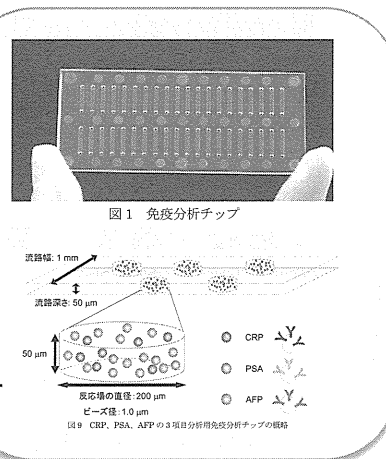
# Develop the new diagnostic biomarkers for DN



# Develop the new diagnosis tools for DN

## New Diagnostic Biomarkers for DN

[Targets]	[Methods]
Metabolites	High-performance CE-MS
Peptides, Proteins	ELISA based $\mu$ TAS chip
mRNA, miRNA	DNA microarray
Genome DNA	



## 糖尿病性腎症に対する新規治療法の開発

久留米大学 奥田 誠也  
金沢医科大学 古家 大祐  
金沢大学 和田 隆志

糖尿病性腎症新規治療薬の開発研究として、ミトコンドリア機能改善薬、ケモカイン受容体 (CCR2) 阻害薬、メタロチオネイン制御薬、AGEs-DNA aptamer の 4 研究が進行中であり、それぞれ有用性を検討している。今年度の研究の目的、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。

### 糖尿病腎症に対するミトコンドリア制御をターゲットとした治療法の確立 (金沢医科大学 古家大祐)

#### 1. 研究の目的

代謝異常である糖尿病あるいは加齢による虚血応答の破綻が、ミトコンドリア機能不全に起因している可能性が示唆されてきた。そこで、本研究では、ミトコンドリア制御手段とし mTOR 依存性にオートファジーを誘発する小分子化合物を用い、糖尿病腎症においてミトコンドリア制御が可能か、また腎障害が改善されるかを検討する。さらに、腎抽出蛋白のプロテオーム解析を行い、オートファジーに関わる標的分子の同定を目指す。

#### 2. 期待される成果

本研究成果によって、既存の治療薬の新たな作用の解明と糖尿病腎症の克服に繋がる。さらに、オートファジーに関わる新たな標的分子は新規治療薬の開発に繋がる。

#### 3. 進捗状況

既に、加齢および高カロリー食によって 48 時間絶食後のオートファジー系が破綻していることを見出している。今後はその異常が糖尿病状態においても生じていることを確認する。

### 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、CD45/type 1 collagen (COL1) 二重陽性細胞はケモカイン・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 CD45/COL1 二重陽性細胞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展抑制につながる。

### 3. 進捗状況

これまでのマウス1型糖尿病性腎症モデルおよびヒトCD45/COL1二重陽性細胞を用いた検討の結果、CD45/COL1二重陽性細胞の制御を介した糖尿病性腎症に対するCCR2阻害薬の有効性が示唆された。本年度は、2型糖尿病モデルマウス(db/db)におけるCCR2阻害薬の腎機能、蛋白尿および腎組織所見に対する有効性を検討する。腎機能として糸球体濾過量を評価し、蛋白尿は尿中アルブミン排泄量で評価する。腎病理学的には糸球体硬化・間質線維化の半定量的評価に加えて、CD45/COL1二重陽性細胞およびマクロファージ数を検討する。

### 糖尿病性腎症におけるメタロチオネインの発現の検討

(岡山大学 四方賢一)

#### 1. 研究の目的

メタロチオネインは、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。メタロチオネイン-Iから-IVまでの4種のアイソフォームが存在し、メタロチオネイン-Iおよびメタロチオネイン-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メタロチオネインの発現パターンや詳細な局在は未だ報告がなく、これらを明らかにすることを目的とする。

#### 2. 期待される成果

糖尿病状態で腎臓は強い酸化ストレスにさらされるが、抗酸化作用をもつメタロチオネインの発現を明らかにすることにより、糖尿病性腎症における生体防御機構を解明し、酸化ストレスに対する新しい治療法を開発する。

#### 3. 進捗状況

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、免疫組織化学にてメタロチオネインの発現変化を検討している。また、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うことで、腎臓における局在を明らかにする。

### 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とその受容体であるRAGEの発現調節は糖尿病性腎症の発症進展に重要であるが、現在までいくつかAGE阻害剤の報告はあるものの、臨床応用されるまでには至っていない。今回我々はAGEs-DNA aptamerの投与が新規糖尿病性腎症治療薬になりうるかを目的として検討している。

#### 2. 期待される成果

AGEs-DNA aptamerを投与することにより、AGEs蓄積の減少とともに糖尿病性腎症由来尿中アルブミン排泄、糸球体硬化が改善すれば、新規糖尿病性腎症治療薬として臨床応用出来る可能性がある。

### 3. 進捗状況

2型糖尿病マウスに対する AGEs-DNA aptamer の投与は、糸球体における AGE 蓄積の軽減とともに、尿中アルブミン排泄、糸球体硬化を有意に改善させることが示された。本年度は、AGEs-DNA aptamer の AGE 形成抑制・除去に働く機序・詳細なメカニズムを、メサンギウム細胞を用いて *in vitro* にて解明していく。今後の目標としては、ヒトへの臨床応用となる。今回の結果から、AGEs-DNA aptamer の投与は、糖尿病性腎症の発症進展を改善しうる可能性が期待される。Aptamer は安価に大量に作製できるため、経済的にも有用である。Aptamer のヒトへの投与は、他の疾患にてすでに応用されているが、特に重篤な副作用もなく、AGEs-DNA aptamer も安全に使用できる可能性がある。

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 23 年度 第 1 回分科会会議

プログラム

日時：平成 23 年 5 月 9 日（月）14：00～16：00  
場所：品川イーストワンタワー 小会議室Ⅲ

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 23 年度 第 1 回分科会会議 プログラム  
平成 23 年 5 月 9 日 (月)

1. 挨拶  
14 : 00～14 : 05  
研究代表者 和田 隆志  
14 : 05～14 : 15  
分科会長 羽田 勝計
2. 討議
  - I. 本年度の活動予定  
14 : 15～15 : 15
  - II. 討議  
15 : 15～
3. 事務連絡

糖尿病性腎症の病期分類ならびに病態の解析

旭川医科大学	羽田 勝計
岡山大学	槇野 博史
自治医科大学	草野 英二
新潟大学	鈴木 芳樹
福島県立医科大学	佐藤 博亮

本年度は、1) 最終目標である、病期分類の改訂にむけた基礎的データを検討すること、2) 簡便で病態・予後が分かる病期分類を目指して具体的な提言を行うことを目標とする。そのために、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、JDNCS）
  - ②長期観察されたコホート研究の解析（事前登録前向き研究）
  - ③文献的解析（メタ解析）
  - ④腎生検標本を含めた解析
- を進め、具体的成果を得る。

現在、①全国規模の糖尿病性腎症レジストリー（前向き研究）には、295例の登録が行われており、順次登録数が増加している。②長期観察されたコホート研究の解析（事前登録前向き研究）では、7施設より、2904例の解析可能な症例データを得た。③文献的解析（メタ解析）に関しては、6520本の論文より、解析可能な論文の選定を進め、メタ解析を進めている。また、④226例の腎生検標本と臨床データを収集し、臨床病理学的な検討を進めている。

提言にむけて、現在の病期分類の問題点を明らかにする必要がある。その問題点に対して、現在までに収集・解析したデータより検討を行い、提言を作成する。本年度中には、その提言とともに、本邦の病態をより反映し、国際的にも整合性のある病期分類案を提示する事を目標とする。

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 23 年度 第 2 回分科会会議

プログラム

日時：平成 23 年 8 月 19 日（金）15:30～17:00  
場所：日内会館 4 階 C 会議室

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 23 年度 第 2 回分科会会議 プログラム  
平成 23 年 8 月 19 日 (金)

1. 挨拶  
15 : 30～15 : 35  
研究代表者 和田 隆志  
15 : 35～15 : 45  
分科会長 羽田 勝計
2. 討議
  - I. 本年度の活動予定  
15:45～16 : 30
  - II. 討議  
16 : 30～
3. 事務連絡

糖尿病性腎症の病期分類ならびに病態の解析

旭川医科大学	羽田	勝計
岡山大学	榎野	博史
自治医科大学	草野	英二
新潟大学	鈴木	芳樹
福島県立医科大学	佐藤	博亮

本年度は、1) 最終目標である、病期分類の改訂にむけた基礎的データを検討すること、2) 簡便で病態・予後が分かる病期分類を目指して具体的な提言を行うことを目標とする。そのために、

- ①全国規模の糖尿病性腎症レジストリー（前向き研究、JDNCs）
- ②長期観察されたコホート研究の解析（事前登録前向き研究）
- ③文献的解析（メタ解析）
- ④腎生検標本を含めた解析を進め、提言案をまとめる。

現在、①全国規模の糖尿病性腎症レジストリー（前向き研究）には、321例の登録が行われている。さらなる登録数増加を促進させる。②長期観察されたコホート研究の解析（事前登録前向き研究）では、9施設より、3299例の解析可能な症例データを得た。③文献的解析（メタ解析）に関しては、のべ6546の論文より、解析可能な32の論文の選定を進め、メタ解析を行った。また、④226例の腎生検標本と臨床データを収集し、臨床病理学的な検討を進めている。

現在の病期分類の問題点を明らかにし、その問題点に対して、現在までに収集・解析したデータより検討をおこなった。病態をより反映し、国際的にも整合性のある病期分類作成にむけて、提言案を作成する。

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

平成 23 年度 第 2 回全体会議

プログラム

日時：平成 23 年 8 月 27 日（土）10:30～12:00  
場所：砂防会館 別館 3 階 霧島

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

平成 23 年度 第 2 回全体会議 プログラム  
平成 23 年 8 月 27 日 (土)

1. 挨拶 10 : 30～10 : 35  
研究代表者 和田 隆志  
日本腎臓学会理事長 槇野 博史
  
2. 活動計画
- I. 全体研究：糖尿病性腎症レジストリーの現状報告と今後 10 : 35～10 : 45  
清水 美保
  
- II. 「糖尿病性腎症の病期分類ならびに病態の解析」分科会 活動予定と報告 10 : 45～11 : 30  
羽田 勝計  
古市 賢吾
  
- 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 11 : 30～11 : 40  
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 11 : 40～11 : 50  
奥田 誠也
  
3. 事務連絡 11 : 50～11 : 55  
今後の予定
  
4. 挨拶 11 : 55～12 : 00  
「進行性腎障害に関する調査研究」研究代表者 松尾 清一