

平成23年度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

【研究課題名】糖尿病性腎症の病期分類ならびに病態の解析に関する研究

【研究分担者・研究協力者】

研究分担者 羽田 勝計 旭川医科大学内科学講座病態代謝内科学分野
檜野 博史 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科腎・免疫・内分泌代謝内科学
草野 英二 自治医科大学附属病院腎臓内科学講座
鈴木 芳樹 新潟大学保健管理センター
佐藤 博亮 福島県立医科大学腎臓高血圧・糖尿病内分泌代謝内科学講座

研究協力者 横山 宏樹 自由が丘横山内科クリニック
馬場園哲也 東京女子医科大学糖尿病センター
原 茂子 虎ノ門病院腎センター
守屋 達美 北里大学病院内分泌代謝内科
荒木 信一 滋賀医科大学医学部附属病院腎臓内科
井関 邦敏 琉球大学医学部附属病院血液浄化療法部
中村 裕之 金沢大学医薬保健研究域医学系環境生態医学・公衆衛生学
二宮 利治 九州大学病院 腎・高血圧・脳血管内科

【背景・目的】本分科会の目的は、糖尿病性腎症病期分類への改訂にむけた、臨床の病態を反映する具体的な提言案を提示することである。糖尿病性腎症の病態は未だ十分に解明されていない。CKDステージ分類と糖尿病性腎症病期分類の点から、臨床的に頻度が高く、病態・予後が十分理解されていない下記の症例を中心に検討を行った。

- ① GFR60 未満（CKD ステージ分類 3 以上）で蛋白尿陰性及び微量アルブミン尿陰性症例
- ② GFR60 以上（CKD ステージ分類 1、2）で顕性蛋白尿例

【方法】以下の 3 つの方法で検討を行った。

1. 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）
2. 文献的解析（メタ解析）
3. 腎生検標本を含めた解析

主なアウトカムは腎予後、総死亡、心血管イベントとした。

【結果】

これまでの背景と本研究から、以下の提言が得られた。

- ① 糖尿病性腎症病期分類は、すべての糖尿性腎症症例が分類されるように配慮すべきである。
- ② CKDステージ分類と整合性をとることが求められる。
- ③ アルブミン・蛋白尿ならびに腎機能は、予後を規定する因子であり、病期分類の基本として用いるべきである。

④ 腎予後、心血管病変、総死亡を反映する必要がある。

上記の提言と各解析結果から、糖尿病性腎症病期分類の改訂に向けた提言案（案1、案2）を示す。

本研究の結果を踏まえ、今後解決すべき課題として以下に示すものが挙げられる。

- ① 早期腎症の診断には、アルブミン尿に加えて、病態を的確に示すバイオマーカーが必要である。
- ② この新規バイオマーカーの検討に際して、本研究班で収集された尿検体を用いて validation を行うことが将来的に可能である。
- ③ 病理学的検討により、本邦の腎症の病態評価を行う必要がある。
- ④ 腎機能低下例では、血尿を認めることを記載する。ただし、他の腎臓病、悪性疾患の鑑別を充分に行う必要がある。
- ⑤ 予後は現在進行中の前向きコホート研究（JDCEP、JDN-CSなど）の結果も反映させる。
- ⑥ 各病期における介入試験、食事療法などエビデンスに基付いた治療法の記載が必要である。
- ⑦ 国際的な比較・報告・検証も含めて、本邦の病期分類の妥当性を検証する必要がある。
- ⑧ 予後予測のためのスコアリングを導入することも考慮する。

案1

		GFR もしくは CCr (ml/min/1.73m ²)					
		>90	60-89	45-59	30-44	15-29	<15
尿アルブミン定量 尿アルブミン/Cr比 (mg/gCr)	正常 <30						
	微量アルブミン尿 30-299						
	顕性蛋白尿 (顕性アルブミン尿) >300						

注1) 微量アルブミン尿は検尿試験紙法で(-)(±)を示す例も含まれるため、糖尿病例では尿アルブミン測定を推奨する。
 注2) GFRとして日本腎臓学会の推算GFR(eGFR)を用いても良い。
 注3) CCrは体表面積にて補正したものをを用いる。

案2

		GFR もしくは CCr (ml/min/1.73m ²)			
		>60	30-59	<30	5期 (透析療法期)
尿アルブミン定量 尿アルブミン/Cr比 (mg/gCr)	正常 <30	1期		4期	
	微量アルブミン尿 30-299	2期			
	顕性蛋白尿 (顕性アルブミン尿) >300	3A期	3B期		

注1) 微量アルブミン尿は検尿試験紙法で(-)(±)を示す例も含まれるため、糖尿病例では尿アルブミン測定を推奨する。
 注2) GFRとして日本腎臓学会の推算GFR(eGFR)を用いても良い。
 注3) CCrは体表面積にて補正したものをを用いる。

【考察】糖尿病性腎症の病態・予後を反映する病期分類を目指し、本邦を代表するコホートが参加した解析を進めることができた。事前登録前向き研究については、4814例の登録がえられ、これまでにない規模かつ質の高い本邦のコホート研究が行われたと考えられる。さらに、メタ解析ならびに長期経過観察を行った本邦の腎生検施行例の予後とその規定因子の解析も当初の計画通り遂行でき、今回の改訂にむけた提言案ならびに今後の課題につき記載することが可能であった。糖尿病性腎症病期分類との整合性について、今後も議論が求められる。

平成23年度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」
糖尿病性腎症の評価のためのバイオマーカー開発に関する研究の分科会

【研究分担者・研究協力者】

研究分担者 湯澤由紀夫 藤田保健衛生大学医学部腎内科
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分野
篁 俊成 金沢大学医薬保健研究域医学系恒常性制御学
研究協力者 山本 格 新潟大学大学院医歯学総合研究科附属腎研究施設構造病理学分野
森 潔 京都大学大学院医学研究科内科学講座内分泌代謝内科

全体研究

【背景・目的】 糖尿病性腎症に関する「より早期の診断」・「予後推定」・「治療効果判定」・「新たな病期分類を可能」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行う事を目的とする。

【方法】 名古屋大学糖尿病尿サンプル252症例及びJDNCSレジストリーの尿サンプル16症例を用いた既報の尿バイオマーカー (CCN2, Collagen IV, AGT, MCP-1, L-FABP) を測定し、各種臨床パラメーターとの相関を検討した。また、微小化学分析システム (μ TAS) を応用した次世代型の臨床用バイオマーカー測定装置の開発については、多数ある μ TASの中から本研究目的に最適な分析プラットフォームの選定と、選定した μ TASを用いた患者尿サンプルの測定についてモデルバイオマーカーを用いたフィジビリティスタディに着手した。

【結果】

既報の尿バイオマーカーの検討では、

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。

また、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。さらに、すでに本レジストリーで収集された尿検体を用いて、既知、新規バイオマーカー候補の validation を行っている。

各個研究

尿メタボローム解析

藤田保大 湯沢

【背景・目的】メタボローム解析；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。

【方法】キャピラリー電気泳動装置＋質量分析機（CE＋MS）による細胞内の全イオン性代謝物（～1k Da）を網羅的かつ高速に直接定量する手法を用い、糖尿病性腎症の病態を反映するバイオマーカーの網羅的解析を行う。

【結果】

名古屋大学のコホートの患者血液及び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。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。

第2段階として患者尿サンプルのメタボローム解析した結果、患者尿中の1kDa以下の代謝産物を再現性良く網羅的に一斉測定できた。（特許の関連で詳細は省略）

尿中エクソゾームタンパク群の解析

徳島大学 阿部

【背景・目的】糸球体上皮細胞（ポドサイト）は高度に機能が分化しており、増殖能を有さないため、種々の障害を受けると糸球体機能に影響を与え、不可逆的な腎機能低下へ至る。糖尿病性腎症のポドサイトにおける障害を、尿中エクソゾームタンパク群の解析から検討する。

【方法】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、その解析を行った。

【結果】糖尿病性腎症の糸球体病変に伴って、いくつかの病態形成分子を同定した。また、ヒトの糖尿病性腎症の腎症前期～顕性腎症後期のそれぞれにおいて病態を正確にとらえる尿中エクソゾームタンパク質群が明らかになりつつある。すでに、糖尿病性腎症と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。

血液を用いた糖尿病病態診断の試み

金沢大学 篁

【背景・目的】PBMCの遺伝子発現プロファイルをから、糖尿病と心筋梗塞、ストレス、加齢、概日リズムの乱れ等の病態診断への応用を目指した解析を行った。

【方法】PBMCの遺伝子パスウェイ発現異常と病態との関連の解析から、糖尿病の重症度マーカーおよび糖尿病の発症予知マーカーを検索した。

【結果】 糖尿病の重症度マーカーとしてJNK 経路を、糖尿病の発症予知マーカーとしてOXPHOS経路を同定した。OXPHOS経路は糖尿病患者で健常者に比し協調的に発現低下しており、血糖コントロールによっても改善しない、という仮説を追跡コホート研究で検証中である。また、糖尿病状態の肝臓から産生される病態形成ヘパトカインを探索する過程で、インスリン抵抗性を形成するセレノプロテインPを同定した。血清セレノプロテインP値は2型糖尿病患者さんで高血糖依存性に上昇していた。さらに、ヘパトカインが、VEGF抵抗性を形成することで糖尿病血管合併症の成因に寄与する可能性を検討中である。

【考察】 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。

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の技術開発も合わせて行う必要がある。今後も、糖尿病性腎症のより早期かつ特異的に診断し予後予測が可能なバイオマーカー開発の基盤研究を順次進めていく必要がある。

平成23年度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」
糖尿病性腎症に対する新規治療法の開発の分科会

【研究分担者・研究協力者】

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
古家 大祐 金沢医科大学糖尿病・内分泌内科学
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
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
深水 圭 久留米大学医学部内科学講座腎臓内科部門
原 章規 金沢大学附属病院救急部

糖尿病性腎症の発症・進展機構に基づいた抜本的な新規治療法の開発に向けて 4 種類の異なる新規糖尿病性腎症治療法を検討した。

AGEs-DNA aptamer による糖尿病性腎症進展抑制の可能性

久留米大学医学部内科学講座腎臓内科部門 奥田 誠也

【背景・目的】 Advanced glycation end products (AGEs) と特異的、かつ強力に結合する AGEs-DNA aptamer の糖尿病性腎症に対する検討を行った。

【方法】 2 型糖尿病モデル KK-Ay/Ta マウスに Control-aptamer、または AGEs-aptamer を浸透圧ポンプにて持続的に投与し、尿中アルブミン排泄、糸球体障害に対する AGEs-aptamer の効果を検討した。

【結果】 AGEs-aptamer の投与により、2 型糖尿病モデルである KK-Ay/Ta マウスにおける AGE の糸球体への蓄積、尿中アルブミン排泄、腎機能障害は有意に改善した。さらに、PAS 染色、マッソントリクローム染色における評価では、糖尿病由来メサンギウム基質の増加、糸球体肥大は AGEs-aptamer により完全に抑制された。酸化ストレスの指標である尿中 8-OHdG は糖尿病群にて増加していたが、AGEs-aptamer 投与により有意に改善した。

【考察】 AGEs-aptamer の投与が、明らかな副作用もなく糖尿病性腎症発症進展を抑制しうる可能性が示唆された。今後は代謝や容量調節を行うことで、より臨床応用にむけた検討が必要である。

カロリー制限模倣薬、レスベラトロールによる糖尿病腎症の改善効果

金沢医科大学糖尿病・内分泌内科 古家 大祐

【背景・目的】 抗老化分子である 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の検討を行った。

【方法】 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、腎障害が改善するかを検討した。

【結果】 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p62Sqsstm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。

【考察】 抗老化薬としてのレスベラトロールに糖尿病性腎症に対する有効性が見出された。その分子機構は、Sirt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p62Sqsstm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。

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

金沢大学医薬保健研究域医学系血液情報統御学 和田 隆志

【背景・目的】 骨髄由来細胞、CD45/typeI collagen (COL1) 二重陽性細胞のCCR2阻害薬による抗線維化作用の検討を行った。

【方法】 ヒト末梢血よりCD45/COL1二重陽性細胞を分離・培養し、高血糖刺激、高血糖下におけるMCP-1刺激によるI型コラーゲンおよびTGF- β 1のmRNA発現を検討した。さらに、CCR2阻害薬による抑制効果についても、組織、尿中アルブミン排泄等にて検討した。

【結果】 ヒト末梢血より分離・培養したCD45/COL1二重陽性細胞を高糖培養した結果、I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した。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。高糖下のMCP-1刺激により、I型コラーゲンおよびTGF- β 1のmRNA発現はさらに亢進した。CCR2阻害薬を添加した結果、db/dbマウスにおける尿中アルブミン排泄の増加・糸球体硬化・間質線維化・CD45+/Col1+細胞の増加はいずれも改善した。

【考察】 ヒト末梢血より分離・培養したCD45/COL1二重陽性細胞を用いた結果、骨髄由来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。現在、ヒト糖尿病性腎症に対するCCR2阻害薬であるプロパゲルマニウムの有効性についての臨床研究を開始している。

糖尿病性腎症に対するGLP-1受容体アゴニストの有効性およびメタロチオネインの発現の検討

岡山大学病院新医療研究開発センター 四方 賢一

【背景・目的】 GLP-1受容体アゴニストexendin-4およびPPAR- γ agonistの腎症への効果およびメタロチオネイン発現の検討をおこなった。

【方法】 SDラットにstreptozotocinを投与して糖尿病を発症させ、exendin-4投与による腎保護効果とそのメカニズムを検討した。また、THP-1細胞、ヒト糸球体血管内皮細胞を使用し、exendin-4の

抗炎症作用のメカニズムを検討した。さらに、PPAR- γ agonistであるGW0742を投与し、その効果について検討した。また、糖尿病性腎症におけるメタロチオネイン発現を、免疫染色にて確認した。

【結果】 Exendin-4は、HbA1c、摂餌量の増加、体重の低下には影響を与えなかったが、アルブミン尿の増加の抑制、糸球体肥大の抑制、メサンギウム領域の増大の抑制、糸球体内マクロファージの浸潤の抑制、ICAM-1、IV型コラーゲン発現の抑制効果があった。さらに、exendin-4は、Nox-4の糸球体内発現、8-OHdGの糸球体内発現と尿中排泄を減少させるとともに、NF- κ Bの活性を抑制した。in vitroの検討では、exendin-4はGLP-1受容体が発現する、培養マクロファージ（THP-1細胞）と、培養ヒト糸球体内皮細胞のTNF- α 、IL-1 β 産生を抑制し、TNF- α 刺激による培養ヒト糸球体内皮細胞のICAM-1の発現を抑制した。これらのexendin-4の効果は、GLP-1受容体拮抗剤の添加により消失した。さらに、PPAR-g agonistを1型糖尿病モデルに投与すると、尿中アルブミン排泄の改善に伴い、糸球体マクロファージ数の減少、Bcl-6・MCP-1・TGF- β mRNA発現が改善した。糖尿病性腎症における抗酸化作用を有するメタロチオネイン発現は、近位尿細管上皮細胞に発現が増強していた。

【考察】 Exendin-4は、糖尿病ラットにおいて、血糖降下作用とは独立して、抗炎症作用を介した腎保護効果を示した。これらの結果より、GLP-1受容体作動薬の糖尿病性腎症に対する有用性が強く示唆された。また、PPAR- γ agonistも今後は新たな治療戦略となりうることが証明された。

以上、糖尿病性腎症に対するこれら新規薬剤の臨床への応用を順次試みていく予定である。

