

201121003B

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 (H21-腎疾患-一般-002)

平成21-23年度 総合研究報告書

研究代表者 和田 隆 志

平成24 (2012) 年 3 月

目次

I. 総合研究報告

- 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 1
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

II. 全体研究報告

【全体研究：糖尿病性腎症症例のレジストリーの運用】

1. 糖尿病性腎症症例のレジストリーの運用に関する研究 45
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
2. 腎臓病総合レジストリー（糖尿病性腎症）の構築とその解析 54
横山 仁 金沢医科大学医学部腎臓内科学

III. 分担研究報告

【分科会：糖尿病性腎症の病期分類ならびに病態の解析】

1. 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 61
羽田 勝計 旭川医科大学内科学講座病態代謝内科学分野
2. 糖尿病性心筋症に関する研究 67
草野 英二 自治医科大学内科学講座腎臓内科学部門
増田 貴博 自治医科大学内科学講座腎臓内科学部門
武藤 重明 自治医科大学内科学講座腎臓内科学部門
3. 「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 70
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
加藤 哲夫 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
渡辺 毅 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
4. 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 77
鈴木 芳樹 新潟大学保健管理センター
5. — 糖尿病性腎症例を対象とした予後、合併症、治療に関する観察研究 — 79
槇野 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
6. 糖尿病性腎症の地域格差に関する研究 82
井関 邦敏 琉球大学医学部附属病院血液浄化療法部

7. 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……………	87
二宮 利治 九州大学病院腎高血圧脳血管内科	
8. 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……………	90
守屋 達美 北里大学医学部内分泌代謝内科学	
【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. 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……………	93
湯澤 由紀夫 藤田保健衛生大学医学部腎内科学	
2. 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……………	112
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腎臓内科学	
3. 糖尿病性腎症のバイオマーカーに関する研究……………	115
篁 俊成 金沢大学医薬保健研究域医学系恒常性制御学	
4. 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……………	120
森 潔 京都大学大学院医学研究科内分泌代謝内科	
向山 政志 京都大学大学院医学研究科内分泌代謝内科	
栗原 孝成 京都大学大学院医学研究科内分泌代謝内科	
【分科会：糖尿病性腎症の新規治療法の開発】	
1. “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……………	125
奥田 誠也 久留米大学医学部内科学講座腎臓内科部門	
深水 圭 久留米大学医学部内科学講座腎臓内科部門	
2. 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……………	130
古家 大祐 金沢医科大学糖尿病・内分泌内科	
3. 糖尿病性腎症に対する GLP-1 受容体作動薬の効果の検討……………	133
四方 賢一 岡山大学病院新医療研究開発センター	
4. 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……………	141
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	
原 章規 金沢大学附属病院腎臓内科・救急部	
IV.研究成果の刊行に関する一覧……………	147
V.研究成果の刊行物・別刷……………	151
VI.プログラム・抄録集……………	355

総合研究報告書

厚生労働省科学研究費補助金（腎疾患対策事業）

総合研究報告書

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

研究代表者

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

研究分担者

安部 秀斉 徳島大学大学院ヘルパバイオサイエンス研究部病態情報医学講座腎臓内科学

奥田 誠也 久留米大学医学部内科学講座腎臓内科部門

草野 英二 自治医科大学内科学講座腎臓内科学部門

古家 大祐 金沢医科大学糖尿病・内分泌内科学

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

鈴木 芳樹 新潟大学保健管理センター

篁 俊成 金沢大学医薬保健研究域医学系恒常性制御学

羽田 勝計 旭川医科大学内科学講座病態代謝内科学分野

槇野 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

湯澤 由紀夫 藤田保健衛生大学医学部腎内科学

研究協力者

荒木 信一 滋賀医科大学糖尿病・腎臓・神経内科

井関 邦敏 琉球大学医学部附属病院血液浄化療法部

岩野 正之 奈良県立医科大学第一内科学

四方 賢一 岡山大学病院新医療研究開発センター

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

馬場園 哲也 東京女子医科大学糖尿病センター

原 章規 金沢大学附属病院救急部

原 茂子 虎の門病院腎センター

深水 圭 久留米大学医学部内科学講座腎臓内科部門

古市 賢吾 金沢大学附属病院血液浄化療法部

森 潔 京都大学大学院医学研究科内分泌代謝内科

守屋 達美 北里大学内分泌代謝内科学

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

横山 仁 金沢医科大学医学部腎臓内科学

横山 宏樹 自由が丘横山内科クリニック

研究要旨

糖尿病と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り、その克服は国民の強い願いである。そこで本研究において、糖尿病性腎症の予後改善にむけて、1) 糖尿病性腎症レジストリーによるデータベース構築と拡充、2) 病期分類改訂にむけた提言案策定、3) バイオマーカー、新規治療法開発の基盤研究を行った。本研究の全体研究として、尿検体収集を伴った糖尿病性腎症レジストリーを構築し、拡充している。本レジストリー (JDN-CS) は日本腎臓学会が推進している腎臓病総合レジストリーシステムと関連し、平成 23 年 12 月末現在、420 例 (男性 269 例、女性 151 例、平均年齢 65.4 ± 10.7 歳) が登録された。また、尿検体収集例は 228 例であった。さらに 214 例の経時データが登録された。今後も症例登録、データの集積を継続し、本邦の糖尿病性腎症の病態解析、予後評価を行う予定である。すでにレジストリー登録例の尿検体を用いたバイオマーカーの validation が進行している。

さらに、糖尿病性腎症の病態・予後を反映する病期分類を目指し、糖尿病性腎症の病期分類の改訂にむけた提言案を示した。これは、1. 多施設共同による事前登録前向き研究、2. メタ解析、3. 長期観察を行った本邦の腎生検施行症例の予後解析を根拠として作成した。アルブミン・蛋白尿ならびに腎機能を病期分類の基本とすえ、腎予後、心血管病変、総死亡を反映する提言案となった。加えて、特異的な早期診断マーカーの開発、病理診断等今後解決すべき課題を提言した。

本研究では、糖尿病性腎症の評価のためのバイオマーカー開発の基盤研究を行った。CCN2, Collagen IV, Angiotensinogen (AGT), MCP-1, L-FABP を最終候補として選定し、レジストリーの収集尿検体も用いてパネルモデルを検討した。さらに、末梢血トランスクリプトーム解析、尿中エクソゾーム解析、尿のメタボローム解析が進行し有力なシーズが開発されている。さらに、糖尿病性腎症の新規治療法の開発も重要な課題である。カロリー制限模倣薬、ケモカイン受容体阻害薬、AGEs-DNA アプタマーおよび GLP-1 受容体アゴニストの解析が進行している。一部はすでに介入試験が臨床的に開始されている。

A. 研究目的

本邦において糖尿病性腎症による透析導入が増加している。この糖尿病とその合併症である糖尿病性腎症の克服は国民の強い願いであり、医学的、社会的、医療経済に加えて厚生労働行政の喫緊の課題である。本研究の目的は、1) 糖尿病性腎症レジストリーによるデータベース構築、2) 糖尿病性腎症病期分類改訂にむけた提言、3) バイオマーカー、新規治療法開発の基盤研究を行うことである。そして、最終的に糖尿病性腎症の予後改善を目指す。平成 21

年度より、研究分担者 10 名、研究協力者 16 名とともに、日本腎臓学会、厚生労働省関連研究班と協調し、データベースを推進し、糖尿病性腎症病期分類の改定にむけた提言案を示す。

全体研究：糖尿病性腎症症例のレジストリーの運用

糖尿病性腎症の克服にむけて、疫学、治療および予後を把握する必要がある。しかしながら、本邦では、糖尿病性腎症例の実態把握のための症例登録システム (レジストリー) が整備されておらず、病態の

解析や予後調査は未だ不十分である。この課題を解決するために、本研究班では、腎症前期から顕性腎症にいたる幅広い病期の糖尿病性腎症例を対象とし、尿検体の保存を含めて、長期経過観察可能なレジストリーシステムを構築する。そして、病態解明、予後改善や有効な治療法開発につながる本邦のコホートを作成することを目的とした。

分科会：糖尿病性腎症の病期分類ならびに病態の解析

本分科会の目的は、より臨床の病態を反映する糖尿病性腎症病期分類への改訂にむけた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解明されていない。特に臨床的に頻度が高く、CKD ステージ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を中心に腎予後、総死亡、心血管イベントの解析を行う。

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

本分科会の研究目的を達するために、1. 既存のコホートをを用いた多施設共同による事前登録前向き研究、2. 既報論文によるメタ解析、3. 長期観察を行った本邦の腎生検施行症例の予後とその規定因子を検討し、具体的な提言案をまとめる。

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) 分科会全体研究

「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」を最終目標とする。

2) 個別研究：

①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。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。

②エクソゾーム解析；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血液を用いた糖尿病病態診断の試み；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、PBMC のおよび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行う。

分科会：糖尿病性腎症の新規治療法の開発 糖尿病患者の増加に伴い糖尿病性腎症に

よる透析導入に至る患者が急増しているものの、その発症や進行を完全に抑制することは出来ていない。したがって、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が望まれる。そこで、本分科会では、4つの異なる新規糖尿病性腎症治療薬の効果ならびに今後の臨床応用の可能性について検討した。①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。②臓器線維化と密接に関連する骨髄由来細胞、CD45/typeI collagen (COLI) 二重陽性細胞がケモカイン・ケモカイン受容体を介して腎線維化に関与することから、CCR2 阻害薬を使用し、CD45/COLI 二重陽性細胞の制御による腎症の治療の可能性を検討した。③GLP-1 受容体作動薬は、膵β細胞に対するインスリン分泌増強作用のみならず、様々な膵外作用を示すことが示唆されている。しかし、腎臓に対する作用は解明されていないため、糖尿病性腎症に対する新規治療薬を開発する目的で、1型糖尿病モデルラットにGLP-1 受容体アゴニスト exendin-4 を投与して、その腎保護効果を検討した。さらに、PPAR-γ agonist の腎症への効果を検討した。また、糖尿病性腎症におけるメタロチオネイン発現の検討も行った。④advanced glycation end products (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していることが報告されている。AGE と特異的に、かつ強力に結合するAGEs-DNA aptamer を糖尿病モデル動物に投与して、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した。

B. 研究方法

本研究は班全体で行う全体研究と、研究班の目標にそった分担研究により構成さ

れる。

全体研究

糖尿病性腎症症例のレジストリーの運用

平成 21 年度から尿検体収集を伴う糖尿病性腎症レジストリー (Japan Diabetic Nephropathy Cohort Study (JDN-CS)) を構築・運用し拡充を図っている。登録例のデータを長期に利用可能なデータベースとして整備する。本レジストリーは日本腎臓学会腎臓病総合レジストリーと密接に連携する。本レジストリーの特色として、尿検体の収集ならびに腎生検例が含まれる事である。この臨床、病理所見、尿検体を用いて、平成 21 年度以降、データベースを拡充し、以下に示す事前登録前向き研究、バイオマーカー解析と関連し本邦の糖尿病性腎症の病態、予後を臨床病理学的に検討する。なお、対象は、20 歳以上で腎症発症前の糖尿病症例ならびに糖尿病性腎症第 1 期から第 5 期の症例とした。

検討項目を以下に記す。

1) 登録時および定期的観察点 (半年から 1 年毎) において収集するデータ
患者年齢 (生年)、性別、糖尿病歴 (登録時)、腎生検日、身長、体重、BMI、血圧、網膜症、血圧、ヘモグロビン値、血清クレアチニン値、血清総蛋白値、血清アルブミン値、血糖値、ヘモグロビン A1c 値、総コレステロール値、LDL コレステロール値、HDL コレステロール値、中性脂肪値、尿クレアチニン値、尿蛋白値、尿アルブミン値、尿蛋白/尿クレアチニン比、尿アルブミン/尿クレアチニン比とした。なお、定期観察点のデータは、前後 2 週間以内のデータを登録可能とした。

2) 治療に関して収集するデータ

糖尿病治療薬、降圧薬、脂質異常症治療薬の投与の有無および種類

3) 生活習慣に関して収集するデータ

喫煙状況

4) 予後に関して収集するデータ

最終観察日、最終観察時の血清クレアチニン値、観察終了の理由、死因、透析導入(日)、心血管イベント(日、内容)

5) 尿サンプルの収集に関するデータ

各施設において、観察時に尿サンプルを収集した際には、採取方法と保存条件を記載する。

収集された尿サンプルは、各施設で保管することとした。

分科会：糖尿病性腎症の病期分類ならびに病態の解析

本分科会では、より臨床の病態を反映する糖尿病性腎症病期分類への改訂にむけた具体的な提言案を提示する。そのために、特に臨床的に頻度が高く、CKD ステージ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の腎予後、総死亡、心血管イベントの解析を中心に行った。

①GFR60 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例

②GFR60 以上(CKD ステージ分類1、2)で顕性蛋白尿例

本分科会の研究目的を達するために、1. 既存のコホートを用いた多施設共同による事前登録前向き研究、2. 既報論文によるメタ解析、3. 長期観察を行った本邦の腎生検施行症例の予後とその規定因子を検討した。

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) 分科会全体研究

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 JDN-CS 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。

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。すなわち、本研究で求められる μ 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 μ 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た。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)が可能で、 μ TASに尿サンプルや分析試薬を送り込むための機器装置が不要で、使い捨てのスライドグラス型 μ TAS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、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。

現在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。さらに、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。

2) 個別研究

①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、メタボローム解析を行った。さらに、次のステップとして、同時に採取した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ルの確立を開始した。

②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いる。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。

③血液を用いた糖尿病病態診断の試み;PBMC の遺伝子発現プロファイルから、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。また、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 値と相関する遺伝子 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。

分科会:糖尿病性腎症の新規治療法の開発

①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。

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

ヒト末梢血より CD45/COLI 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、自然発症 2 型糖尿病モデルマウスである db/db マウスを用いて組織、尿中アルブミン排泄等にて検討した。

③糖尿病性腎症におけるメタロチオネインの発現の検討ならびに糖尿病性腎症に対する GLP-1 受容体アゴニストの有効性の検討

5 週齢の雄性 SD ラットを 1) 非糖尿群、2) 非糖尿病 + exendin-4 投与群、3) 糖尿病群、4) 糖尿病 + exendin-4 投与群に分け、糖尿病群には streptozotocin を投与して糖尿病を発症させて 8 週間観察し、腎保護効果と機序を検討した。また、THP-1 細胞、ヒト系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。

④AGEs-DNA aptamer による糖尿病性腎症進展抑制の可能性

2型糖尿病モデル KK-Ay/Ta マウスを腎障害（結節性病変）、尿中アルブミンが出現すると思われる16週令まで観察した。Control-aptamer、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週まで観察し屠殺した。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。

（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。動物実験に関しても、各施設で必要な審査を経て実施される。

C. 研究結果

全体研究：糖尿病性腎症症例のレジストリーの運用

本研究を通じて、尿検体収集を伴う本レジストリーは、日本腎臓学会腎臓病総合レジストリーの二次研究として構築された。

本研究計画は、平成21年7月に金沢大学倫理委員会にて承認された。研究計画書等は、日本腎臓学会のホームページに掲載し、本研究班の分担研究者および協力研究者の施設を中心に各施設の倫理委員会の

承認を得て、登録を開始した。また、平成22年6月には、日本腎臓学会の倫理委員会においても承認され、独自に倫理委員会の組織を持たない、日本腎臓学会会員の施設においても、本レジストリーの登録に参加できる状況となった。

一次研究としての腎臓病総合レジストリーにおける糖尿病性腎症関連の組織診断確定例（Japan Renal Biopsy Registry（J-RBR）登録例）は、平成23年11月末現在、614例が登録、抽出された。一方、本レジストリー（JDN-CS）には、平成23年12月末現在、14施設から420例（男性269例、女性151例、平均年齢65.4±10.7歳）の登録が行われた。腎生検施行例は15例であった。また、尿検体収集例は228例であった（図1）。

図1 登録時患者背景

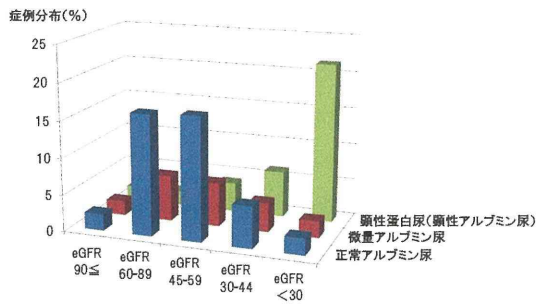
▶ 性別	(420例)	男性 269 例, 女性 151 例
▶ 腎生検施行		15 例
▶ 尿検体収集		228 例
▶ 年齢	(420例)	65.4±10.7 歳 (23-93)
▶ 糖尿病罹病期間	(326例)	14.6±10.2 年 (1-50)
▶ BMI	(383例)	24.9±4.2 (15.0-39.9)
▶ 収縮期血圧	(391例)	130.8±17.6 mmHg (80-185)
▶ 拡張期血圧	(408例)	73.1±11.3 mmHg (46-110)

登録症例の内訳は、腎症前期から顕性腎症まで幅広い病期の症例が登録されていることが確認された（図2、3）。

図2 登録時血液検査所見

▶ 血清クレアチニン値	(404例)	1.4±1.3 mg/dl (0.4-11.5)
▶ 血清総蛋白値	(397例)	6.9±0.8 g/dl (4.3-8.9)
▶ 血清アルブミン値	(387例)	3.9±0.6 g/dl (1.4-5.0)
▶ 総コレステロール値	(340例)	184.2±44.4 mg/dl (65-370)
▶ LDLコレステロール値	(359例)	100.8±33.1 mg/dl (23-263)
▶ HDLコレステロール値	(389例)	52.1±17.6 mg/dl (21-160)
▶ 中性脂肪値	(407例)	141.2±90.6 mg/dl (36-799)
▶ 血糖値	(409例)	149.4±59.7 mg/dl (55-431)
▶ ヘモグロビンA1c値	(403例)	6.8±1.4 % (4.2-13.5)
▶ ヘモグロビン値	(410例)	12.7±2.1 g/dl (6.2-19.1)

図3 登録時のアルブミン(蛋白)尿とeGFRによる症例分布



本レジストリーでは、定期的な経過観察を行う計画となっており、214例の経時データが登録された。登録時データと1年後データの比較では、収縮期血圧の上昇とヘモグロビンA1c値の低下を認めた。1年後の時点では、尿アルブミン(尿蛋白)や腎機能には変化を認めなかった(図4、5)。

図4 1年後の追跡データ:収縮期血圧の上昇を認めた

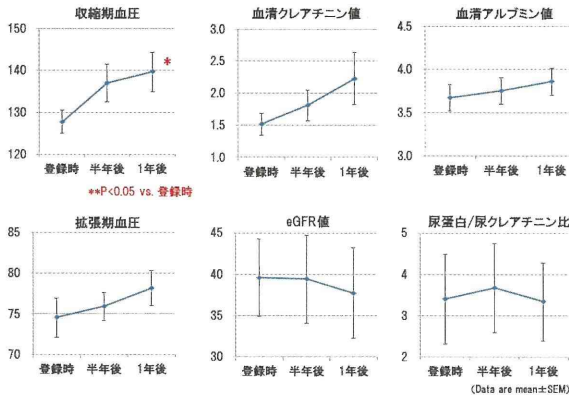
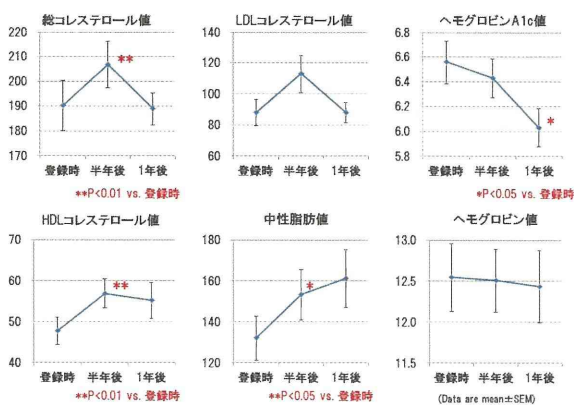


図5 1年後の追跡データ:ヘモグロビンA1c値の低下を認めた



現在も、腎臓学会のホームページや毎月発行するニュースレターにより、登録促進を進めている。今後も症例登録、データの

集積を継続し、本邦の糖尿病性腎症の病態解析、予後評価を行う予定である。このレジストリーは臨床的、疫学的ならびに病理学的な研究と密接に連関させ推進するものとする。特に、腎生検施行例を含めてレジストリー登録例の尿検体を用いたバイオマーカーの validation を行う。

分科会:糖尿病性腎症の病期分類ならびに病態の解析

はじめに、糖尿病性腎症の病期分類の改訂にむけた提言案を示し、ついでその根拠となった、1. 既存のコホートを用いた多施設共同による事前登録前向き研究、2. 既報論文によるメタ解析、3. 長期観察を行った本邦の腎生検施行症例の予後解析の結果を示す。

より病態を反映した本邦の糖尿病性腎症病期分類の改訂にむけて、これまでの背景ならびに本研究から得られた提言を示す。

- ① 糖尿病性腎症病期分類は、すべての糖尿病性腎症症例が分類されるように配慮する。
- 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。
- ④ 腎予後、心血管病変、総死亡を反映する必要がある。上記提言を鑑み、事前登録前向き試験、臨床病理学的検討、メタ解析の結果から、本研究班として糖尿病性腎症病期分類の改訂にむけた提言案2案を示す(表1)。

表1 糖尿病性腎症病期分類の改訂提言案

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

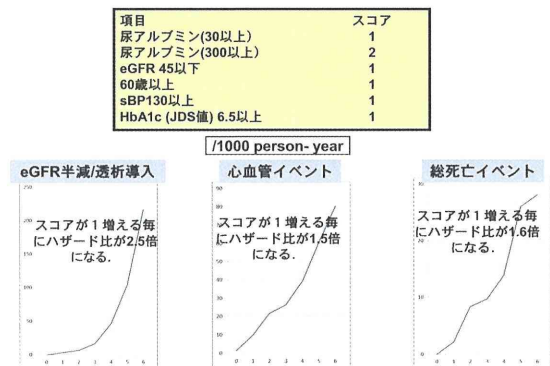
		GFRもしくは CCr (ml/min/1.73m ²)				
		>60	30-59		<30	5期 (透析療法期)
尿アルブミン定量 尿アルブミン/Cr比 (mg/gCr)	正常 <30	1期			4期	
	微量アルブミン尿 30-299	2期				
	顕性蛋白尿 (顕性アルブミン尿) >300	3A期	3B期			

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。

さらに、今後解決すべき課題として、以下に提言する。

- 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 (JDCP、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 下記に示すように、予後予測のためのスコアリングを導入することも考慮

図6 臨床的重み付けを加味した予後を反映するスコアリング化(案)



次いで、この提言案の根拠となった3つの研究成果を以下に示す。

1) 事前登録前向き研究

全国的な大規模コホートの協力を得て、10のコホートから4814例の症例登録を得た(表2)。主要評価項目は、1. 経時的なeGFRの低下あるいは透析導入、2. 個体死、3. 心血管イベントの3項目とした。

なお、各々のイベントの定義を以下に示す。虚血性心疾患は、典型的な症状、心電図異常、および血液検査により心筋逸脱酵素の上昇を示すものとする。また、PCI(経

皮的冠動脈インターベンション)、あるいは CABG (冠動脈バイパス術) のいずれかを施行した場合も含む。

脳梗塞は、急速に発症し、身体所見を伴った神経学的異常が、24 時間以上持続するものとする。(症状が無く、CT や MRI と書いた画像のみで指摘された異常は含めない)

脳出血は、身体所見を伴った神経学的異常を認め、画像所見にて脳出血を診断されたものとする。

腎イベントとしては、eGFR の半減もしくは透析の導入とする。

表2 事前登録前向き試験：登録施設と症例

施設名	症例数	アルブミン尿が測定された4355例
東京女子医大	1486	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px;"> 平均観察期間 6.5年 平均年齢 60.2歳 登録時 Cr0.8/eGFR75.6 腎イベント 420例 心血管イベント 610例 総死亡 237例 </div> <p style="font-size: small; margin-top: 5px;">年齢18歳以上、生存について最低1年間フォローされていて登録時Gとアルブミン尿が測定されている方を対象とした</p>
横山内科クリニック	1002	
琉球大学	867	
滋賀医大	598	
九州大学	230	
虎の門病院	225	
金沢大学	173	
金沢医療センター	139	
新潟大学	75	
奈良県立医大	19	
合計	4814	

このうち、18 歳以上かつ最低 1 年間経過観察されており、登録時に血清クレアチニン値ならびに尿アルブミンが測定されている 4355 例を対象にして詳細な解析を行った。なお、その際の腎イベント、心血管イベントならびに総死亡数を母集団となる症例数とともに示す (表 2-4)。

表3 患者背景

年齢 (年; 平均 [標準偏差])	60.2 (11.6)
男性 (人 [%])	2559 (58.8)
腎機能関連	
尿アルブミン (mg/g·Cr; 中央値 [四分位範囲])	18.2 (8.5 to 66.3)
<30 (人 [%])	2698 (62.0)
30 to 300 (人 [%])	1123 (25.8)
>300 (人 [%])	534 (12.3)
eGFR (ml/min/1.73m ² ; 中央値 [四分位範囲])	75.6 (60.1 to 92.1)
eGFR ≥90 (人 [%])	1204 (27.6)
eGFR 60 to 89 (人 [%])	2069 (47.5)
eGFR 45 to 59 (人 [%])	647 (14.9)
eGFR 30 to 44 (人 [%])	312 (7.2)
eGFR <30 (人 [%])	123 (2.8)
血圧 (mmHg)	
収縮期血圧 (平均 [標準偏差])	130.9 (18.6)
拡張期血圧 (平均 [標準偏差])	74.3 (18.0)
その他のリスク因子	
HbA1c (%) 平均 [標準偏差]	7.6 (1.7)
総コレステロール (mg/dL; 平均 [標準偏差])	205.1 (36.0)
BMI (kg/m ² ; 平均 [標準偏差])	25.2 (4.2)

表4 イベントをおこした症例数

		eGFR					
		~30	30~60	60~90	90~120	120~150	150~
腎イベント	アルブミン尿 <30	59	4	3	1		
	アルブミン尿 30~300	31	42	15	10	1	
	アルブミン尿 300+	20	62	56	54	63	
		eGFR					
		~30	30~60	60~90	90~120	120~150	150~
解析対象となった症例の内訳	アルブミン尿 <30	2226	348	109	15		
	アルブミン尿 30~300	297	535	176	101	14	
	アルブミン尿 300+	65	150	123	102	94	
		eGFR					
		~30	30~60	60~90	90~120	120~150	150~
総死亡	アルブミン尿 <30	70	26	4	4		
	アルブミン尿 30~300	11	33	13	5	6	
	アルブミン尿 300+	6	13	19	13	14	
		eGFR					
		~30	30~60	60~90	90~120	120~150	150~
心血管イベント	アルブミン尿 <30	232	40	14	1		
	アルブミン尿 30~300	31	97	33	28	2	
	アルブミン尿 300+	7	41	30	30	24	

死因
 アルブミン尿 30未満で、GFR30未満の症例：2例が感染症、2例が不明
 アルブミン尿 30~300で、GFR30未満の症例心血管イベント2名、癌2名、感染症1名、不明1名

事前登録前向き研究において予後を中心に解析し、その規定因子を同定した。その結果、

- ① 3つの予後、すなわち腎イベント、心血管イベントならびに総死亡のいずれも、正常アルブミン尿に比べて微量アルブミン尿、顕性蛋白尿に進展するにつれてその予後が不良となった(表5)。
- ② 乖離例のうち、正常アルブミン尿かつ腎機能低下例は腎イベント、心血管イベントとも有意な増悪はみられなかった。ただし、総死亡数の増加が観察された(表6)。
- ③ さらに、顕性蛋白尿を示しながら腎機能が保持されている乖離例はいずれもイベント数の増加がみられた(表6-7)。
- ④ 腎機能低下かつ顕性蛋白尿を示す症例では腎イベントのリスクが増大した(表6-7)。

表5 アルブミン尿・蛋白尿は腎イベント・心血管イベント・総死亡の危険因子である

腎イベント		心血管イベント	
	eGFR 規定無し		eGFR 規定無し
正常アルブミン尿	Ref	正常アルブミン尿	Ref
微量アルブミン尿	3.6 *	微量アルブミン尿	1.4 *
顕性蛋白尿	23.4 *	顕性蛋白尿	2.1 *

総死亡

	eGFR 規定無し
正常アルブミン尿	Ref
微量アルブミン尿	1.3
顕性蛋白尿	3.4 *

*: p<0.05

表6 顕性蛋白尿群において腎機能低下により腎イベントが増加する

腎イベント						心血管イベント					
	eGFR ≥90	eGFR ≥60	eGFR ≥45	eGFR ≥30	eGFR <30		eGFR ≥90	eGFR ≥60	eGFR ≥45	eGFR ≥30	eGFR <30
正常アルブミン尿	Ref		0.7	1.7	6.0	正常アルブミン尿	Ref		1.0	1.4	0.4
微量アルブミン尿	4.0 *	3.2 *	3.9 *	3.8 *	5.8 *	微量アルブミン尿	1.1	1.5 *	1.4	2.0 *	0.6
顕性蛋白尿	16.4 *	17.1 *	33.3 *	12.7 *	81.7 *	顕性蛋白尿	1.5	2.3 *	1.9 *	2.4 *	2.0 *

総死亡

	eGFR ≥90	eGFR ≥60	eGFR ≥45	eGFR ≥30	eGFR <30
正常アルブミン尿	Ref		1.6 *	1.2	7.6 *
微量アルブミン尿	1.6	1.5 *	1.3	0.9	9.3 *
顕性蛋白尿	5.2 *	2.2 *	4.9 *	4.0 *	5.9 *

*: p<0.05

表7 顕性蛋白尿群において腎機能低下により腎イベントが増加する

腎イベント				心血管イベント			
	eGFR ≥60	eGFR ≥30	eGFR <30		eGFR ≥60	eGFR ≥30	eGFR <30
正常アルブミン尿	Ref *		62.1 *	正常アルブミン尿	Ref		1.4
微量アルブミン尿	3.7 *			微量アルブミン尿	1.5 *		
顕性蛋白尿	16.1 *	33.9 *		顕性蛋白尿	2.0 *	2.0 *	

総死亡

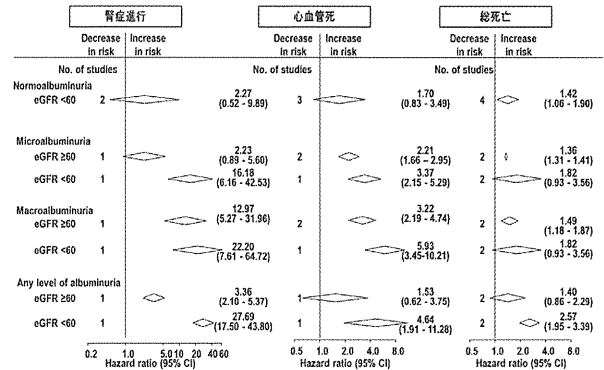
	eGFR ≥60	eGFR ≥30	eGFR <30
正常アルブミン尿	Ref		5.9 *
微量アルブミン尿	1.3		
顕性蛋白尿	2.5 *	4.2 *	

*: p<0.05

2) 既報論文のメタ解析では、MEDLINE、EMBASE、CINAHLを用いて、コホート研究論文を対象とした。主なキーワードは糖尿病性腎症・腎機能・心血管障害・総死亡とした。スクリーニングは2名の査読者が独立して行った。相対危険 (RR) の統合にはランダム効果モデルを用いた。乖離例である正常アルブミン尿かつ GFR60 未満例は腎症進行、心血管死は有意な危険因子とな

らなかった。いずれのアウトカムにおいても、微量アルブミン尿・顕性蛋白尿は正常アルブミン尿群と比較してリスクが上昇した。各アウトカムにおいて、腎機能低下はアルブミン尿に合併した場合にリスクの増悪要因となった (表8)。

表8 アルブミン尿・蛋白尿は腎症進行・心血管死に対する危険因子である



3) 長期観察可能な腎生検施行症例の検討では、腎生検により糖尿病性腎症と診断され長期観察された2型糖尿病260例を対象に、臨床・病理学的特徴と予後との関連を検討した。

顕性蛋白尿は、腎予後、心血管系疾患発症、生命予後に最も影響を及ぼす因子であった (図7、表9)。一方、eGFR低下の影響は、微量アルブミン尿例と顕性蛋白尿例の腎予後ならびに顕性蛋白尿例の心血管系疾患発症と生命予後において認められた。また、顕性蛋白尿例では、44.8%に血尿を認めることも確認された。さらにGFR60 未満の顕性蛋白尿例では49.1%に血尿を認めた。

正常アルブミン尿の腎機能低下 (eGFR 60mL/分/1.73m² 未満) 例は、腎機能保持例と比較して高齢であり、びまん性病変・間質病変・血管病変が高度であった。

顕性蛋白尿例は、腎機能が保持されていても糸球体病変、間質線維化、動脈硬化が

高度であり、腎機能低下例は間質病変がより高度であった。さらに病理学的予後規定因子として表9に示すものがあがった。

図7 透析導入/eGFR半減：蛋白尿が重要である

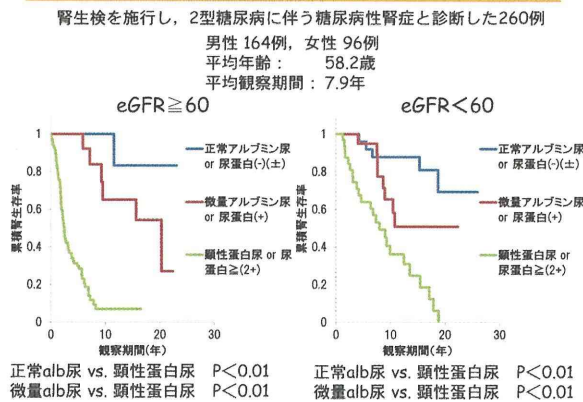


表9 顕性蛋白尿は、腎予後に最も影響する因子である

＜腎予後不良に関連する臨床因子＞		
顕性蛋白尿	HR 13.6	(95%CI 5.16-35.59)
アルブミン尿	HR 2.93	(95%CI 1.05-8.18)
糖尿病性網膜症	HR 2.67	(95%CI 1.18-6.04)
貧血	HR 1.44	(95%CI 1.28-1.63)
低年齢	HR 1.03	(95%CI 1.01-1.06)
eGFR低値	HR 1.02	(95%CI 1.00-1.03)
収縮期血圧高値	HR 1.01	(95%CI 1.00-1.02)
＜腎予後不良に関連する病理因子＞		
動脈硬化	HR 1.81	(95%CI 1.25-2.61)
結節性病変	HR 1.77	(95%CI 1.24-2.52)
滲出性病変	HR 1.71	(95%CI 1.15-2.55)
間質線維化・尿細管萎縮	HR 1.67	(95%CI 1.23-2.25)
メサングウム融解	HR 1.65	(95%CI 1.02-2.67)
びまん性病変	HR 1.46	(95%CI 1.08-1.98)

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) 分科会全体研究

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 (図 8)。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、Col1IV： Δ Cr (R2:AGT 0.6254、Col1IV 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)

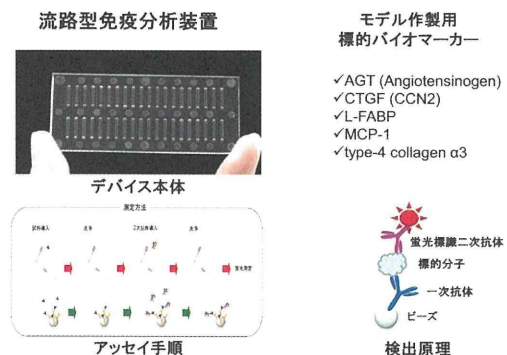
背景因子：男性 (AUC:0.710)、CKD stage (AUC:0.670)、血清 Cr (AUC:0.786) アルブミン尿 (AUC:0.689)

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。

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。

図8 次世代型糖尿病性腎症検査デバイスの開発



2) 個別研究

①メタボローム解析

-30°Cで冷凍保存していた患者血液サンプルを解凍して、500 μ l を分取し、そこ

へ内部標準品として L-Methionine sulfone および MES を各々55 μ M となるように添加した後、5 kDa 以上の分子群をフィルターで除去してから Agilent 社製 CE-MS システムにダイレクトインジェクションして分析した結果、患者尿中の 1 kDa 以下の代謝産物を再現性良く網羅的に一斉測定できた。

さらに、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ー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。くわえて、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する)。

②エクソゾーム解析

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った。おもに糸球体病変の変化に伴って、いくつかの病態形成分子が、その発現パターンを変えながら進行する

ことが判明してきた。長期にわたるヒトの糖尿病性腎症の病態を正確にとらえる尿中マーカーとして、現在の分類でいう腎症前期～顕性腎症後期のそれぞれにおいて、病態把握に有用な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。

③血液を用いた糖尿病病態診断の試み

BMC 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。この仮説を追跡コホート研究で検証中である。

また、肝臓における検討では、

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 α 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

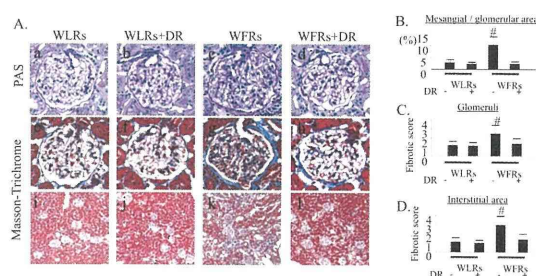
総タンパク発現量に差はなかった。

分科会：糖尿病性腎症の新規治療法の開発

①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

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 p62Sqtstn 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 9)。

図9 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.

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

ヒト末梢血より分離・培養した CD45/COLI 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/COLI 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。

さらに、本分科会の目標であった臨床試験に関連し、この CCR2 阻害薬は臨床試験をすでに開始した（臨床試験名：糖尿病性腎症に対するプロパゲルマニウムの有効性の検討、UMIN ID 000004779）。登録日は 2011 年 1 月 4 日で対象患者は 5 年以上の罹病期間を有する 2 型糖尿病患者で、微量アルブミン尿または蛋白尿定性で 1+以上、かつ eGFR30ml/min/1.73m² 以上の症例を対象としている。アウトカムとして、主要評価項目として、尿中アルブミン排泄量/尿中蛋白排泄量とし、副次評価項目として腎機能、血圧、血糖、脂質プロファイル等としている。現在、この臨床試験が進行している。

③糖尿病性腎症におけるメタロチオネインの発現の検討ならびに糖尿病性腎症に対する GLP-1 受容体アゴニストの有効性の検討

糖尿病群では正常群にくらべ、有意に HbA1c の増加、摂餌量の増加、体重の低下を認めたが、exendin-4 投与による影響は認めなかった。exendin-4 は糖尿病ラットにおけるアルブミン尿の増加を有意に抑制した。腎組織においては、exendin-4 投与によって、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を認めた。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有意に減少させるとともに、NF- κ B の活性を有意に抑制した。in vitro の検討では、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に GLP-1 受容体の発現を確認した。exendin-4 は、高血糖刺激による THP-1 細胞からの TNF- α 、IL-1 β の産生を有意に抑制した。また、exendin-4 は、TNF- α 刺激による培養ヒト糸球体内皮細胞の ICAM-1 の発現を有意に抑制した。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- γ 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 発現が有意に改善した。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。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 倍のメタロチオネイン発現を認めた。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。

④AGEs-DNA aptamer による糖尿病性腎症進展抑制の可能性

AGEs-aptamer の投与により、2 型糖尿病モデルである KKAY/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。

なお、上記の成果は当初の予定通り、アウトリーチとして情報の発信を積極的に行った。特に、日本腎臓学会公開セッション、日本糖尿病学会、2 回の市民公開講座

にて情報を発信し、積極的に論文作成を行っている。

D. 考察

全体研究

糖尿病性腎症症例のレジストリーの運用

本研究の取り組みにより、尿検体の保存を含み、長期経過観察が可能な、本邦の糖尿病性腎症レジストリーが構築された。

症例登録は、当初の予定通り、腎症前期から顕性腎症にいたる幅広い病期の糖尿病性腎症の実態を把握する形で進められた。また、尿検体の保存も各施設で着々と進められた。このレジストリーの取組みを通じて、病態解明、予後改善や有効な治療法開発に向けた総合的なシステムの構築につながる可能性がある。今後も症例登録、データの集積を継続し、日本腎臓学会、関連学会と密接に連携し、本邦の糖尿病性腎症の病態解析、予後評価を行う予定である。

さらに、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 をすでに行っている。このように、当初のレジストリー構築の目的である予後が判明した検体を用いた validation も順調に進行している。

分科会：糖尿病性腎症の病期分類ならびに病態の解析

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。すでに 4814 例の登録がえられ、登録時血清クレアチニン値ならびに尿アルブミンを測定し、18 歳以上かつ最低 1 年間経過観察された 4355 例の解析が進んでいる。これは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。これらにより当初の本研究班の研究目的は達成できたものと考えられる。

平成 24 年 6 月までに改訂される日本腎臓学会による CKD 診療ガイドに、改訂された本邦の CKD ステージ分類が掲載される予定である。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。これらもふまえて、今後も提言案に基づいて、糖尿病性腎症病期分類の改訂にむけた取り組みを推進する必要がある。

また、事前登録前向き試験、腎生検施行例での検討においても透析に導入された症例数に限りがあり、透析導入のみに関する予後を十分にエビデンスとして評価することができなかった。しかし、糖尿病性腎症の病期分類の改訂にむけた提言案には透析療法期（5 期）の記載も含めた。これは現行の病期分類でも記載されており、臨床における分類の汎用性や利便性等から考慮した。

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

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。本研究において、