

糖尿病性腎症ならびに腎硬化症の診療水準向上と重症化防止にむけた調査・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、糸球体上皮細胞（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。不可逆的なポドサイトの脱落は不可逆的な腎障害への重症化が進行するため、ポドサイト障害を早期に検出することで、糖尿病性腎症の重症化を防止するための早期介入が可能となる。バイオマーカーとしてのpodocyte-derived exosomal transcriptional factors (PDEFs)を見出し、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が重症化し、やがて腎不全へ至る。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尿中バイオマーカー測定法を樹立する。

B. 研究方法

さまざまな腎疾患において重症化とともに、尿中にポドサイトが脱落すること

が知られている。本研究では、腎生検で確定診断のついた糖尿病性腎症患者において尿中エクソゾームタンパクを抽出し、podocyte-derived exosomal transcriptional factors (PDEFs)を同定するとともに、同分子の腎における発現の局在と硬化の重症度による発現量の変化を解析し、ポドサイト障害の分子機構を明らかにし、糖尿病性腎症の重症化を反映する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で承認されている。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、複数の候補分子としてPDETFsを得ている。このうち、経時的に尿中にPDETFsの排泄量が増加する患者では、腎予後が不良であることが確認された。組織における免疫組織学的な解析と照合し、糸球体内の発現の変化が重症度と相関がみられた。

D. 考察

糖尿病によるポドサイトの障害に関して、その分子機序は不明な点が多かった。また、ポドサイトの脱落は不可逆的な変化であるため、それよりも早い段階での細胞障害をとらえる方法もなかった。今回、得られた尿中分子マーカーであるPDETFsの分子動態を解析することで、こうした不明なメカニズムが徐々に明らかになると考えられる。また、ヒトでは、血糖だけでなく、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ため、ヒト尿によるPDETFsの定量化を可能とし、経時的な変化を解析することで、慢性的な糖尿病によるポドサイト障害の評価が可能になるものと考えられる。

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、PDETFsは反映しており、その検出・解析は糖尿病性腎症の重症化の評価に有用である。

F. 健康危険情報

無し

G. 研究発表

1. 論文発表

無し

2. 学会発表

・第35回 日本分子生物学会年会

Predictive biomarkers for kidney function declines: podocyte-derived exosomal transcriptional factors.

安部尚子、林早苗、土井俊夫、安部秀斉

H. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

無し

2. 実用新案登録

無し

3. その他

無し

分担研究報告書

研究分担者

丸山 彰一 名古屋大学大学院医学系研究科病態内科講座野腎臓内科学

研究要旨

メタボローム解析を用いて糖尿病性腎症診断のための新規血清バイオマーカーの探索を行った。289 の代謝物から 19 の新規バイオマーカー候補代謝物を同定した。このうち 12 個の代謝物はそれぞれ単独で $AUC > 0.7$ の精度で糖尿病性腎症を診断することが可能であった。メタボローム解析は糖尿病性腎症の診断アプローチとして有用である。

A. 研究目的

糖尿病性腎症の診断には微量アルブミン尿が用いられるが、その精度は必ずしも十分ではない。本研究は、糖尿病性腎症の血清を用いて感度と特異度に優れた糖尿病性腎症診断のための新規血清バイオマーカーを探索することを目的とした。

B. 研究方法

78 例の糖尿病性腎症患者 (第 1 期 20 例、第 2 期 32 例、第 3 期以上 26 例) から血清を採取し、慶応義塾大学先端生命科学研究所のキャピラリー電気泳動時間飛行型質量分析 (CE-TOFMS) 装置を用いてメタボローム解析を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は名古屋大学倫理委員会の承認を得ている (承認番号: 1135)。十分なインフォームドコンセントを行った後に文書

で同意を得て血清を採取し保存した。試料や臨床情報に関する個人識別情報は、連結可能匿名化を行い、個人識別情報管理者が厳重に管理した。

C. 研究結果

289 の代謝物を用いて PLS 判別分析 (orthogonal partial least-squares discriminant analysis) を行い、新規バイオマーカー候補となる 19 の代謝物を同定した。この中には、creatinine, aspartic acid, γ -butyrobetaine, citrulline, symmetric dimethylarginine, kynurenine, azelaic acid, galactaric acid が含まれていた。19 代謝物のうち 12 個はそれぞれ単独で $AUC > 0.7$ と比較的高い精度で糖尿病性腎症を診断することが可能であった。

D. 考察

メタボローム解析により、新規バイオマーカー候補となる 19 代謝物を同定した。今後はこのうち複数の代謝物を組み合わせてより診断精度の高いバイオマーカーセットを模索していく予定である。

E. 結論

メタボローム解析は糖尿病性腎症の診断アプローチとして有用である。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Metabolic profiling reveals new serum biomarkers for differentiating diabetic nephropathy. Anal Bioanal Chem. 2012 ;404(10):3101-9. Hirayama A, Nakashima E, Sugimoto M, Akiyama S, Sato W, Maruyama S, Matsuo S, Tomita M, Yuzawa Y, Soga T.

2. 学会発表

1) Metabolomic profiling differentiate diabetic nephropathy using capillary electrophoresis-mass spectrometry (CE-MS), Hirayama Akiyoshi, Nakashima Eitaro, Sugimoto Masahiro, Akiyama Shin-ichi, Maruyama Shoichi, Nakamura Jiro, Tomita Masaru, Yuzawa Yukio and Soga Tomoyoshi, Metabolomics 2012: The 8th Annual International Conference of the

Metabolomics Society, 2012年6月25-28日, Washington, DC.

- 2) 「CE-MSを用いた糖尿病性腎症のバイオマーカー探索」、平山明由、杉本昌弘、中島英太郎、秋山真一、丸山彰一、中村二郎、富田勝、湯澤由紀夫、曾我朋義、平成23年12月7-10日、神戸、平成23年度分子生物学会
- 3) 「メタボローム解析による新規糖尿病性腎症バイオマーカーの探索」丸山彰一、秋山真一、松尾清一ほか。平成24年12月2日、東京、第24回糖尿病性腎症研究会

H. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

「糖尿病性腎症鑑別用マーカー及びその用途」、発明者：丸山彰一、ほか7名、特願 2012-171406.

厚生労働科学研究費補助金 (難治性疾患等克服研究事業 (腎疾患対策研究事業))

分担研究報告書

ヒト糖尿病性腎症の腎組織におけるTLR4内因性リガンドMRP8の発現意義

(早期診断ならびに重症化防止のためのバイオマーカー開発分科会)

研究協力者

森 潔 京都大学・内分泌代謝内科

共同研究者

(京都大学・内分泌代謝内科)

栗原孝成、向山政志、笠原正登、横井秀基、今牧博貴、川西智子、石井 輝、
古賀健一、森 慶太、加藤有希子、戸田尚宏、大野祥子、細田公則、菅原 照、
中尾一和

(大阪市立総合医療センター・腎臓高血圧内科)

今西政仁、森川 貴、小西啓夫

(香川大学・薬理学)

西山 成

研究要旨

我々は、マウス糖尿病性腎症において、高脂血症の合併による腎障害の重症化では、myeloid-related protein 8 (MRP8)を発現するマクロファージが糸球体内に浸潤し、toll-like receptor 4を活性化し、細胞外基質蓄積やアルブミン尿の増悪をもたらすことを報告してきた。今回、ヒト腎生検組織を用いて、糖尿病および肥満症に随伴する腎症において腎臓でのMRP8発現が強い症例ほど、蛋白尿・腎機能悪化の程度が高度であることを明らかにした。以上の成績より、糖尿病性腎症を含む生活習慣病関連腎疾患において、腎内MRP8が腎症重症化の新規バイオマーカーとして有用である可能性が示された。今後、腎内MRP8発現が尿中MRP8濃度に反映されるかを検討する予定である。

A. 研究目的

我々は糖尿病性腎症の新規バイオマーカーを探索するために、1型および2型糖尿病を発症したマウスから腎糸球体を単離し、マイクロアレイにより遺伝子発現を網羅的に解析し、共通して発現誘導される分子として toll-like receptor 4 (TLR4)とその

内因性リガンドの一つである myeloid-related protein 8 (MRP8 or S100a8)を同定した(2011年日本腎臓学会学術総会)。

次に、糖尿病性腎症の重症化の病態を解明するために、高脂肪食負荷により1型糖尿病合併腎障害を悪化させるモデルを開発し、MRP8及びTLR4の関与を検討した。そ

の結果、糖尿病性腎症と高脂血症を合併させたマウスでは MRP8 を高発現するマクロファージが糸球体内に選択的に浸潤し TLR4 を介して炎症を増幅し、アルブミン尿や糸球体内細胞外マトリックス蓄積を亢進させると考えられることを報告した (Kuwabara, Mori et al. Diabetologia 2012)。

本研究では、ヒト糖尿病性腎症の病態におけるバイオマーカー MRP8 の発現意義を明らかにするために、糖尿病性腎症、肥満関連腎症、コントロール症例の腎生検組織における MRP8 発現を遺伝子レベル・蛋白レベルで検討し、臨床指標との横断的解析を行った。

B. 研究方法

MRP8 蛋白発現の検討には京都大学医学部附属病院にて腎生検を受けた 65 症例の腎組織を免疫組織化学により検討した。内訳は微小糸球体病変 (n=19)、微小変化型ネフローゼ (17)、肥満関連腎症 (10)、糖尿病性腎症 IIIa-IV 期 (19)。

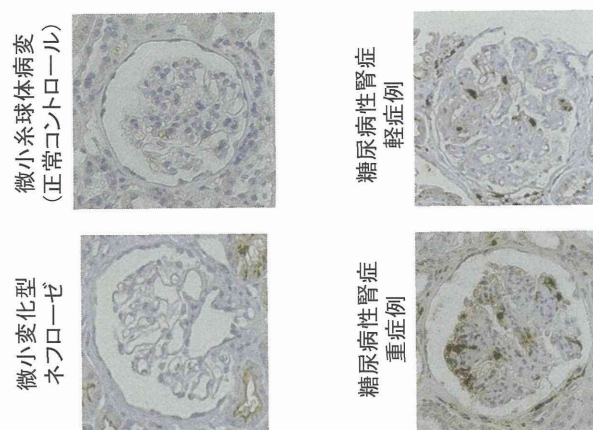
MRP8 遺伝子発現の検討には大阪市立総合医療センターにて腎生検を受けた 35 症例の腎凍結切片を laser capture micro-dissection により糸球体・尿細管間質領域に分離し、TaqMan real-time RT-PCR により検討した。内訳は微小糸球体病変 (6)、糖尿病性腎症 IIIa-IV 期 (22)。

(倫理面への配慮)

本臨床研究は 1975 年採択 (1983 年改訂) のヘルシンキ宣言の趣旨に則り、京都大学大学院医学研究科、大阪市立総合医療センター、香川大学医学部の医の倫理委員会の審査を経て施行した。個人のプライバシーを最大限に尊重すると共に、目的、方法、予想される利益・不利益、可能性のある危険について被験者に十分説明し、被験者の

自由な意思による同意 (インフォームド・コンセント) を文書の形でとりつけた。

C. 研究結果



【図】 ヒト糖尿病性腎症糸球体における MRP8 発現 (茶色シグナル)

ヒト糖尿病性腎症の腎糸球体において MRP8 mRNA の発現はコントロールの微小糸球体病変と比して有意に増加していた。尿細管間質における mRNA 発現は糸球体よりも有意に少量であった。

蛋白レベルでは MRP8 蛋白は糖尿病性腎症において、糸球体内の斑状シグナル、近位尿細管の内腔側、萎縮尿細管の細胞質に認められた。

MRP8 陽性細胞の数は、糸球体及び尿細管間質の両者において、糖尿病性腎症 > 肥満関連腎症 > 微小変化型ネフローゼ > 微小糸球体病変の順に多かった (図参照)。蛋白尿が極端に多い微小変化型ネフローゼを除外した 3 群の単変量解析では、糸球体及び尿細管間質の MRP8 発現は血圧、尿蛋白、血清クレアチニン・LDL コレステロール・中性脂肪値と正の相関を示した。多変量解析では尿蛋白及び血清クレアチニン値が MRP8 陽性細胞数の強力な規定因子であった。

D. 考察

本研究により糖尿病性腎症の腎生検組織において、肥満関連腎症・微小糸球体病変と比べて、MRP8 の遺伝子発現及び蛋白発現が亢進していることが明らかとなった。MRP8 の発現増強はとくに尿細管間質よりも糸球体において顕著であった。また腎内 MRP8 発現は蛋白尿及び腎機能悪化と強い正相関を示し、MRP8 は糖尿病性腎症などの生活習慣病関連腎疾患の重症度を反映することが分かった。

MRP8 の発現は、マクロファージ浸潤、萎縮尿細管での産生、血液由来 MRP8 を再吸収している近位尿細管、の3つのパターンから構成されていた。

TLR4 は病原微生物に対して自然免疫を駆動させるための重要なセンサーであるほか、近年では糖尿病、肥満症、動脈硬化症などの生活習慣病において内因性リガンドにより慢性的な活性化を受けて、病態悪化に大きな役割を果たすと考えられている。我々は TLR4 knockout mice では高脂血症合併に伴う糖尿病性腎症の重症化が見られないことを報告した (Kuwabara, Mori et al. Diabetologia 2012)。

MRP8 は (MRP14 と共に)、多数同定されている TLR4 の内因性リガンドの一つであるが、1型及び2型糖尿病に合併するマウス腎症の糸球体において共通に発現誘導される特異的な分子であった。糖尿病において血中 MRP8 濃度が上昇することは報告されているが、糖尿病性腎症の腎組織局所における MRP8 の発現意義を解析した研究はこれまでなかった。

E. 結論

糖尿病および肥満症に伴う腎疾

患において、糸球体内 MRP8 蛋白は特に糖尿病性腎症で発現亢進しており、蛋白尿増加・腎機能悪化と相関していた。糖尿病性腎症を主体とする生活習慣病関連腎疾患において MRP8 発現は腎病変の重症度と相関する新しいバイオマーカーとして有用であると考えられた。現在さらに、縦断的解析により MRP8 による腎予後予測、および尿中 MRP8 の測定と臨床的意義の解明を進めている。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Kuwabara T, Mori K, Mukoyama M, Kasahara M, Yokoi H, Saito Y, Ogawa Y, Imamaki H, Kawanishi T, Ishii A, Koga K, Mori KP, Kato Y, Sugawara A, Nakao K. Exacerbation of diabetic nephropathy by hyperlipidaemia is mediated by Toll-like receptor 4 in mice. *Diabetologia*. 2012 Aug;55(8):2256-66.

2. 学会発表

1) 栗原孝成、森 潔、向山政志、笠原正登、横井秀基、今牧博貴、川西智子、石井 輝、古賀健一、森 慶太、加藤有希子、戸田尚宏、大野祥子、菅原 照、中尾一和

「糖尿病及び高脂血症の合併による腎 TLR4 シグナル亢進と腎症進展は olmesartan により抑制される」

第55回日本腎臓学会学術総会、2012年6月1-3日、横浜

2) 栗原孝成、森 潔、森川 貴、小西啓夫、笠原正登、横井秀基、菅原 照、

- 向山政志、今西政仁、西山成、中尾一和
「ヒト糖尿病性腎症の腎組織における
TLR4内因性リガンドMRP8発現の検討」
第55回日本腎臓学会学術総会、2012年6
月1-3日、横浜（優秀演題賞受賞）
- 3) 栗原孝成、森 潔、向山政志、笠原正
登、横井秀基、中尾一和
「自然免疫受容体TLR4が糖尿病性腎症
進展に果たす役割-脂質による悪化-」
第55回日本腎臓学会学術総会、2012年6
月1-3日、横浜（ワークショップ）
- 4) 栗原孝成、森 潔、向山政志、笠原正
登、横井秀基、森慶太、今牧博貴、川西
智子、菅原 照、中尾一和
「脂質によるmacrophageのMRP8/TLR4シ
グナル活性化は肥満・高インスリン血症
非依存性に糖尿病腎症を悪化させる」
第49回日本臨床分子医学会学術集会
2012年4月13-14日、京都
- 5) 栗原孝成、森 潔、向山政志、笠原正
登、横井秀基、森 慶太、齋藤陽子、今
牧博貴、菅原 照、中尾一和
「糖尿病腎症におけるMRP8/TLR4シグナ
ル活性化の意義」
第109回日本内科学会講演会、2012年4
月13-15日、京都
- 6) 向山政志、森 潔、栗原孝成、今牧博
貴、細田公則、中尾一和
「肥満と炎症、レニン・アンジオテンシ
ン系」
第35回日本高血圧学会総会 2012年9
月20-22日、名古屋（肥満学会合同シ
ンポジウム）
- 7) 栗原孝成、森 潔、向山政志、笠原正
登、横井秀基、今牧博貴、菅原 照、今
西政仁、西山 成、中尾一和
「炎症メディエーターMRP8/TLR4シグナ
ルの糖尿病性腎症における発現と意義
の解析」

第16回日本心血管内分泌代謝学会学術
総会 2012年11月23-24日 東京

- 8) Kuwabara T, Mori K, Mukoyama M,
Kasahara M, Yokoi H, Imamaki H, Ishii
A, Koga K, Mori KP, Kato Y, Toda N, Ohno
S, Sugawara A, Nakao K.
Macrophage-mediated glucolipototoxicity
contributes to progression of diabetic
nephropathy through MRP8/TLR4 signaling.
The 45th Annual Meeting and Scientific
Exposition of the American Society of
Nephrology (ASN Renal Week 2012),
2012/11/1-11/4, San Diego, USA.

H. 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

分担研究報告書

尿バイオマーカー探索のための尿中タンパク質の由来に関する研究

研究協力者

山本 格 新潟大学大学院医歯学総合研究科分野

研究要旨

糖尿病腎症の腎臓の障害部位特異的な新規尿バイオマーカーを発見するために、尿とネフロン各部のタンパク質の網羅的解析（プロテオーム解析）を質量分析計と免疫組織化学法で行っている。腎臓組織の部位特異的に由来する尿タンパク質のリストを作成し、データベース化した。

A. 研究目的

糖尿病腎症を微量アルブミン尿より早期（超早期）診断、病態把握、予後予測などを可能にする新規の尿バイオマーカーの確立は重要である。健常者の尿、血漿、腎臓（ネフロン各部）及び尿路系組織のプロテオームを質量分析計と抗体で解析し、腎臓のネフロン各部に特異的に由来するタンパク質を探索する。このタンパク質は糖尿病性腎症で腎臓の部位別の障害程度などを示す新規バイオマーカー候補と考えることができる。

B. 研究方法

健常者から得られた尿からタンパク質を抽出し、SDS ゲル電気泳動法で分離後、ゲルをスライスし、ゲル内トリプシン消化し、ペプチドを分離した。液体クロマトグラフィー質量分析計でペプチドを解析し、網羅的にタンパク質（プロテオーム）を同定した。同様に、血漿、腎臓、尿管、膀胱などの組織のプロテオームを質量分析計で解析した。腎臓に関しては、組織切片をレーザーマイクロダイセクション法

で糸球体、近位尿細管、遠位尿細管、集合管などのネフロンに分けて採取し、タンパク質を質量分析計で同定した。血漿タンパク質に無い尿中タンパク質について、タンパク質の腎臓内局在を Human Protein Atlas (http://www.protein_atlas.org/) や抗体を用いた免疫組織化学法で探索し、データベース化した。

（倫理面への配慮）

尿、腎臓組織の採取、解析は新潟大学倫理委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

健常者の尿サンプルを質量分析計で解析し、約 1200 種類のタンパク質を同定した。そのうち約 450 種類のタンパク質は血漿タンパク質であった。残りのタンパク質の内、約 150 種類のタンパク質は腎臓組織のプロテオームと共通するものであった。また、血漿、腎臓のプロテオームに検出されていないタンパク質が約 300 種類あった。これらのタンパク質について腎臓の発現部位を免疫組織化学法で検討し、それら

をデータベース化した。それにより尿中に検出されるタンパク質のうち、腎臓の部位特異的に発現しているタンパク質のリストが作成された。

D. 考察

糖尿病性腎症の尿中バイオマーカーとして期待されるものとしては尿中微量アルブミンや蛋白尿（ほとんどが血漿タンパク質）より早期に糖尿病性腎症を発見できるもの、腎臓の部位特異的な障害程度が把握できるものである。本研究では、まず、健常者の尿をプロテオーム解析し、尿中タンパク質のなかで、腎臓の部位特異的に発現し、尿中に検出されるタンパク質を腎臓の部位特異的傷害バイオマーカー候補としてリストした。今後、それらのタンパク質の増減を糖尿病腎症発症前後の患者尿で検証することにより、糖尿病性腎症の新規尿バイオマーカーが確立できると考えられる。

E. 結論

糖尿病性腎症の腎臓障害部位や早期発見の尿バイオマーカー候補タンパク質のデータベースが構築された。今後、その拡充とバイオマーカーとして有用性の検証が必要である。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yutaka Yoshida, Masaaki Nameta, Masayoshi Kuwano, Ying Zhang, Xu Bo, Sameh Magdeldin, Zenyui Cui, Hidehiko Fujinaka, Eishin Yaoita, Takeshi Tomonaga, and Tadashi Yamamoto. Proteomic approach to human kidney

glomerulus prepared by laser microdissection from frozen biopsy specimens: exploration of proteome after removal of blood-derived proteins. *Proteomics-Clinical Applications* 2012, 6, 1-7.

- 2) Sameh Magdeldin, Yutaka Yoshida, Huiping Li, Yoshitaka Maeda, Munesuke Yokoyama, Shymaa Enany, Ying Zhang, Bo Xu, Hidehiko Fujinaka, Eishin Yaoita, Sei Sasaki and Tadashi Yamamoto. Murine Colon Proteome and Characterization of the Protein Pathways. *Journal: BioData Mining* 2012, 5:11-25.
- 3) Paik YK, Omenn GS, Uhlen M, Hanash S, Marko-Varga G, Aebersold R, Bairoch A, Yamamoto T, Legrain P, Lee HJ, Na K, Jeong SK, He F, Binz PA, Nishimura T, Keown P, Baker MS, Yoo JS, Garin J, Archakov A, Bergeron J, Salekdeh GH, Hancock WS. Standard guidelines for the chromosome-centric human proteome project. *J Proteome Res.* 2012, 11, 2005-13.
- 4) Tadashi Yamamoto, Keiichi Nakayama, Hisashi Hirano, Takeshi Tomonaga, Yasushi Ishihama, Tetsushi Yamada, Tadashi Kondo, Yoshio Kodera, Yuichi Sato, Norie Araki, Hiroshi Mamitsuka, and Naoki Goshima. Integrated View of the Human Chromosome X-centric Proteome Project. *J Proteome Research* 2013, 12, 58-61.

H. 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

研究成果の刊行に関する一覧

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌（謝辞があるものを以下に記載する）

| 発表者氏名 | 論文タイトル名 | 発表誌名 | 巻号 | ページ | 出版年 |
|--|--|---------------------|---------|-----------|----------|
| Wada T, Shimizu M, Toyama T, Hara A, Kaneko S, Furuichi K | Clinical impact of albuminuria in diabetic nephropathy. | Clin Exp Nephrol | 16 | 96-101 | 2012 |
| Wada T, Shimizu M, Yokoyama H, Iwata Y, Sakai Y, Kaneko S, Furuichi K. | Nodular lesions and mesangiolysis in diabetic nephropathy. | Clin Exp Nephrol | | | in press |
| Makoto Sawaguchi, Shin-ichi Araki, Hiroyuki Kobori, Maki Urushihara, Masakazu Haneda, Daisuke Koya, Atsunori Kashiwagi, Takashi Uzu, Hiroshi Maegawa. | Association between urinary angiotensinogen levels and renal and cardiovascular prognoses in patients with type2 diabetes mellitus. | J Diabetes Investig | 3(3) | 318-324 | 2012 |
| Miyamoto S, Shikata K, Miyasaka K, Okada S, Sasaki M, Kodera R, Hirota D, Kajitani N, Takatsuka T, Kataoka H, Nishishita S, Sato C, Funakoshi A, Nishimori H, Uchida HA, Ogawa D, Makino H. | Cholecystokinin plays a novel protective role in diabetic kidney through anti-inflammatory actions on macrophage: anti-inflammatory effect of cholecystokinin. | Diabetes | 61 | 897-907 | 2012 |
| Nagase R, Kajitani N, Shikata K, Ogawa D, Kodera R, Okada S, Kido Y, Makino H. | Phenotypic change of macrophages in the progression of diabetic nephropathy; sialoadhesin-positive activated macrophages are increased in diabetic kidney. | Clin Exp Nephrol | 16 | 739-748 | 2012 |
| Tachibana H, Ogawa D, Matsushita Y, Bruemmer D, Wada J, Teshibawara S, Eguchi J, Uchida HA, Shikata K, Makino H. | Activation of Liver x receptor agonist suppresses osteopontin expression in diabetic nephropathy. | J Am Soc Nephrol | 23 | 1835-1846 | 2012 |
| Hirayama A, Nakashima E, Sugimoto M, Akiyama S, Sato W, Maruyama S, Matsuo S, Tomita M, Yuzawa Y, Soga T. | Metabolic profiling reveals new serum biomarkers for differentiating diabetic nephropathy. | Anal Bioanal Chem | 404(10) | 3101-3109 | 2012 |
| Araki S, Haneda M, Koya D, Sugaya T, Isshiki K, Kume S, Kashiwagi A, Uzu T, Maegawa H. | Predictive effects of urinary liver-type fatty acid-binding protein for deteriorating renal function and incidence of cardiovascular disease in type 2 diabetic patients without advanced nephropathy. | Diabetes Care | | | in press |
| Iseki K, Asahi K, Moriyama T, Yamagata K, Tsuruya K, Yoshida H, Fujimoto S, Konta T, Kurahashi I, Ohashi Y, 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 | 16 | 244-249 | 2012 |
| Kondo M, Yamagata K, Hoshi SL, Saito C, Asahi K, Moriyama T, Tsuruya K, Yoshida H, Iseki K, Watanabe T, 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 | 16 | 279-291 | 2012 |

| 発表者氏名 | 論文タイトル名 | 発表誌名 | 巻号 | ページ | 出版年 |
|---|--|---------------------------------------|-------|-------------|-----------------------|
| Iwano M, Yamaguchi Y, Iwamoto T, Nakatani K, Matsui M, Kubo A, Akai Y, Mori T, Saito Y. | Urinary FSP1 is a biomaker of crescentic GN. | J Am Soc Nephrol | 23 | 209-214 | 2012 |
| Kume S, Thomas MC, Koya D. | Nutrient sensing, autophagy, and diabetic nephropathy. | Diabetes | 61(1) | 23-29 | 2012 |
| 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 | | 2012:628978 | 2012 |
| Inagawa T, Hamagishi T, Takaso Y, Hitomi Y, Kambayashi Y, Hibino Y, Shibata A, Ngoc NT, Okochi J, Hatta K, Takamuku K, Konoshita T, Nakamura H. | Decreased activity of daily living produced by the combination of Alzheimer's disease and lower limb fracture in elderly requiring nursing care. | Environ Health Prev Med | 18 | 16-23 | 2013 |
| Kawano M, Mizushima I, Yamaguchi Y, Imai N, Nakashima H, Nishi S, Hisano S, et al. | Immunohistochemical characteristics of IgG4-related tubulointerstitial nephritis: detailed analysis of 20 Japanese cases. | International Journal of Rheumatology | | 1-9 | 2012 |
| Kuwabara T, Mori K, Mukoyama M, Kasahara M, Yokoi H, Saito Y, Ogawa Y, Imamaki H, Kawanishi T, Ishii A, Koga K, Mori KP, Kato Y, Sugawara A, Nakao K. | Exacerbation of diabetic nephropathy by hyperlipidaemia is mediated by Toll-like receptor 4 in mice. | Diabetologia | 55 | 2256-2266 | 2012 |
| 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 the Japanese general population. | Kidney Int | 81 | 293-299 | 2012 |
| Yano Y, Sato Y, Fujimoto S, Konta T, Iseki K, Moriyama T, Yamagata K, Tsuruya K, Yoshida H, Asahi K, Kurahashi I, Ohashi Y, Watanabe T. | Association of High Pulse Pressure With Proteinuria in Subjects With Diabetes, Prediabetes, or Normal Glucose Tolerance in a Large Japanese General Population Sample. | Diabetes Care | 35(6) | 1310-1315 | 2012 |
| Nagai K, Saito C, Watanabe F, Ohkubo R, Sato C, Kawamura T, Uchida K, Hiwatashi A, Kai H, Ishida K, Sairenchi T, Yamagata K. | Annual incidence of persistent proteinuria in the general population from Ibaraki annual urinalysis study. | Clin Exp Nephrol | | | [Epub ahead of print] |
| Yamamoto T, Nakayama K, Hirano H, Tomonaga T, Ishihama Y, Yamada T, Kondo T, Koderu Y, Sato Y, Araki N, Mamitsuka H, Goshima N. | Integrated View of the Human Chromosome X-centric Proteome Project. | J Proteome Research | 12 | 58-61 | 2013 |
| Yokoyama H, et al. | Renal disease in the elderly and the very elderly Japanese:analysis of the Japan Renal Biopsy Registry (J-RBR). | Clin Exp Nephrol | 16 | 903-920 | 2012 |

研究成果の刊行物・別刷

Clinical impact of albuminuria in diabetic nephropathy

Takashi Wada · Miho Shimizu · Tadashi Toyama ·
Akinori Hara · Shuichi Kaneko · Kengo Furuichi

Received: 10 May 2011 / Accepted: 14 July 2011 / Published online: 10 August 2011
© Japanese Society of Nephrology 2011

Abstract Patients suffering from diabetic nephropathy, resulting in end-stage renal failure, are increasing in number. The pathophysiology of diabetic nephropathy remains to be fully investigated. In the clinical setting, the presence of albuminuria/overt proteinuria and a low glomerular filtration rate may predict poor renal prognosis, but the prognosis of the normoalbuminuric renally insufficient diabetic patient remains controversial. In addition to the measurement of urinary albumin excretion, biomarker studies to detect diabetic nephropathy more specifically at the early stage have been performed worldwide. There is a growing body of evidence for remission and/or regression

of diabetic nephropathy, which may be an indicator for cardiovascular and renal risk reduction. Deeper insights into the pathological characteristics as well as the clinical impact of albuminuria on renal and cardiovascular outcome are required.

Keywords Diabetic nephropathy · Albuminuria · Proteinuria · Glomerular filtration rate · Cardiovascular disease · Renal outcome

Introduction

Based on the annual report of the Japanese Society for Dialysis Therapy (JSDT), diabetic nephropathy is a leading cause of end-stage renal failure in Japan [1]. The number of dialysis patients had increased to 297,126 by the end of 2010. According to the annual report of the JSDT, diabetic nephropathy has been a leading primary disease of new patients who have been started on dialysis since 1998 [1]: the number of such patients with diabetic nephropathy has increased to 43.5%. In addition, cardiovascular diseases and deaths in patients with diabetes and underlying renal disease before and after dialysis has increased [2, 3]. Therefore, preventing and halting the progression of diabetic nephropathy is important if we are to prolong the survival of such patients.

Characteristic pathologic changes associated with diabetic nephropathy are accumulation of extracellular matrix (ECM) and the infiltration of inflammatory cells into glomeruli and tubulointerstitial regions [4, 5]. These pathologic abnormalities are induced by alterations in ECM production or degradation [6]. Generally speaking, the occurrence of albuminuria is a reflection of increased matrix deposition, leading to glomerular and tubulointerstitial lesions. Diabetic nephropathy is a clinical entity in

T. Wada (✉)

Division of Nephrology, Department of Laboratory Medicine,
Institute of Medical, Pharmaceutical and Health Sciences,
Faculty of Medicine, Kanazawa University, 13-1 Takara-machi,
Kanazawa 920-8641, Japan
e-mail: twada@m-kanazawa.jp

M. Shimizu · T. Toyama · A. Hara

Division of Nephrology, Department of Disease Control and
Homeostasis, Institute of Medical, Pharmaceutical and Health
Sciences, Faculty of Medicine, Kanazawa University,
13-1 Takara-machi, Kanazawa 920-8641, Japan

S. Kaneko

Department of Disease Control and Homeostasis,
Institute of Medical, Pharmaceutical and Health Sciences,
Faculty of Medicine, Kanazawa University, 13-1 Takara-machi,
Kanazawa 920-8641, Japan

K. Furuichi

Division of Blood purification, Kanazawa University Hospital,
13-1 Takara-machi, Kanazawa 920-8641, Japan

K. Furuichi

Division of Nephrology, Kanazawa University Hospital,
13-1 Takara-machi, Kanazawa 920-8641, Japan

which the presence of persistent albuminuria and declines in renal function and glomerular filtration rate (GFR) are the major characteristic findings, which are closely associated with end-stage renal diseases, enhanced cardiovascular morbidity and eventual mortality [7]. The incidence of albuminuria, which currently contributes to the diagnosis of diabetic nephropathy, is well correlated with a decrease in GFR and the incidence of cardiovascular diseases.

Here, we focus on the clinical impact of albuminuria along with GFR levels on the progression of diabetic nephropathy and the incidence of cardiovascular diseases, which is closely related to the mortality of patients with diabetic nephropathy in this manuscript.

Albuminuria in the diagnosis of diabetic nephropathy

The definitive diagnosis of diabetic nephropathy is based on pathological findings such as the presence of diffuse mesangial lesions and nodular lesions. However, renal biopsy is not performed for all patients with diabetic nephropathy. In the clinical setting, the presence of persistent proteinuria as well as other complications such as diabetic retinopathy and renal dysfunction is important in the diagnosis of diabetic nephropathy. However, early detection of the presence of diabetic nephropathy is clinically required for the best prognosis. The measurement of urinary albumin excretion is currently crucial to the detection of early diabetic nephropathy. The increased excretion of albumin (albuminuria) is an early diagnostic indicator of diabetic nephropathy. Thus, Mogensen et al. [8] proposed a classification of diabetic nephropathy in patients with type 1 diabetes based on increased urinary albumin excretion once diabetic nephropathy was diagnosed. Diabetic nephropathy is also staged in Japan [9, 10], and the staging was described by Yokoyama et al. [11] as follows: stage I: urinary albumin-to-creatinine ratio (ACR) <30 mg/g creatinine; stage II: ACR \geq 30 and <300 mg/g creatinine (i.e., albuminuria); stage III: ACR \geq 300 mg/g creatinine and/or persistent proteinuria with serum concentration of creatinine <2 mg/dl; stage IV: serum concentration of creatinine \geq 2 mg/dl with proteinuria; and stage V: being treated with dialysis. The Japan Diabetes Clinical Data Management Study Group (JDDM) reported that the prevalence of albuminuria (stage II) in Japanese type 2 diabetic patients was 32%, which is very similar to the 39% observed in the DEMAND study [12]. These results suggest that albuminuria is common, and that 76% of patients with diabetic nephropathy are categorized as stage II, as evidenced by the presence of albuminuria. Further, 58% of the patients enrolled were at stage I, 7% were at stage III, 2.6% were at stage IV, and 0.4% were at stage V [11]. A very recent study from the Japan Diabetes Complications Study (JDACS) revealed that the annual transition rate to proteinuria (ACR \geq 300 mg/g

creatinine) was 0.67%, and that this was substantially higher for the low-albuminuric group (defined as a urinary ACR of 30–150 mg/g creatinine) than for the normoalbuminuric group (defined as a urinary ACR of <30 mg/g creatinine) [13]. In this sense, UKPDS 64 reported that the progression to albuminuria occurred at 2.0% per year, and from albuminuria to macroalbuminuria at 2.8% per year [14]. However, about 40% of the diabetic patients had no urinary albumin excretion measurements, regardless of the recommendation for the JDDM cohort [11]. Therefore, the measurement of urinary albumin excretion is required for the early detection of diabetic nephropathy in Japan.

Biomarkers for diabetic nephropathy and disease progression

Further studies to detect diabetic nephropathy more specifically at the early stage in addition to urinary albumin excretion are needed. In this sense, biomarker studies to identify the presence and predict the progression of diabetic nephropathy have been performed worldwide [15]. Recently, Kamijio-Ikemori et al. [16] reported that urinary levels of liver-type fatty acid-binding protein (L-FABP) accurately reflected the severity of diabetic nephropathy in type 2 diabetes. Importantly, urinary L-FABP levels were high in patients with normoalbuminuria, suggesting its usefulness for detecting early nephropathy in these patients. Further, an increase in urinary Smad1—a key transcriptional factor for mesangial matrix expansion in diabetic nephropathy—at the early stage was correlated with subsequent development of glomerulosclerosis in experimental rodent models [17]. Regarding renal function, serum cystatin C was reported to be a good marker for nephropathy [18]. Notably, cases of early renal dysfunction, defined by a loss of cystatin C GFR exceeding $-3.3\%/year$, occurred in 9% of the normoalbuminuria group and 31% of the albuminuria group [19].

Prevalence of albuminuria and low GFR in type 2 diabetic patients in Japan

As previously described, diabetic nephropathy is diagnosed through the detection of albuminuria. Recently, Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) reported the definition, classification and prognosis of chronic kidney disease based on both estimated GFR and urinary levels of albumin excretion [20]. In this sense, there are diabetic patients with decreases in GFR and normoalbuminuria. Is diabetic nephropathy observed in such patients? In fact, the percentage of diabetic patients with normoalbuminuria and low estimated GFR is believed to be relatively high. Importantly, Yokoyama et al. [21] described

that the proportion of subjects with low estimated GFR (<60 ml/min/1.73 m²) and normoalbuminuria was 11.4% of the type 2 diabetic patients examined (262/2298). In this manuscript, 63.4% of the 262 patients studied had neither diabetic retinopathy nor neuropathy. On the other hand, these patients were older and included a higher proportion of women and patients with hypertension, hyperlipidemia and cardiovascular disease, as well as fewer smokers compared with those with normoalbuminuria and preserved GFR. In contrast, the proportion of type 2 diabetic patients with preserved GFR but albuminuria or overt proteinuria was 27% (755/2791). Most importantly, the lack of histologically proven diabetic nephropathy should be discussed. In type 1 diabetes patients with normoalbuminuria and low GFR, renal biopsy specimens revealed more advanced diabetic glomerular lesions. It is worth noting that a reduced GFR was found much more often among female patients, particularly if retinopathy and/or hypertension were also present [22]. Deep insight into the prevalence and prognoses of these patients with proven pathological characteristics and grading is required to understand the pathophysiology of diabetic nephropathy in greater depth, together with future perspectives.

Clinical impacts of albuminuria and GFR on the prognoses of diabetic patients

Obviously, diabetic patients who had both albuminuria/overt proteinuria and low GFR were at risk of adverse

outcomes, including cardiovascular events, cardiovascular death, and renal events, as reported by the Action in Diabetes and Vascular Disease: Preterax and DiamicroN MR Controlled Evaluation (ADVANCE) study [23] (Fig. 1). Do normoalbuminuric renally insufficient diabetic patients have a poor prognosis? Rigalleau et al. [24] reported that the risks of renal progression and death in these patients with type 1 or type 2 diabetes are lower. Concomitantly, in type 2 diabetic patients, the Casale Monferrato study revealed that macroalbuminuria was the main predictor of mortality, independently of both estimated GFR and cardiovascular risk factors, whereas the estimated GFR provided no further information on all-cause mortality and cardiovascular mortality in normoalbuminuric patients [25]. Supporting this notion, regarding renal end-points, there was also a progressive increase in risk associated with declined renal function, which was mainly observed in the albuminuric group in Chinese type 2 diabetic patients [26]. Interestingly, those with a reduced estimated GFR were at high risk of developing cardiovascular end-points (cardiovascular death, new admissions due to angina, myocardial infarction, stroke, revascularization or heart failure) and all-cause mortality, independent of albuminuria [26]. In contrast, as previously described, in the ADVANCE study, patients with normoalbuminuria and estimated GFR <60 ml/min per 1.73 m² had a 3.95-fold higher risk of renal events, a 1.33-fold higher risk of cardiovascular events, and a 1.85-fold higher risk of cardiovascular death [23] (Fig. 1). Moreover, Vlek et al. reported that an estimated GFR <60 ml/min/1.73 m² without albuminuria was

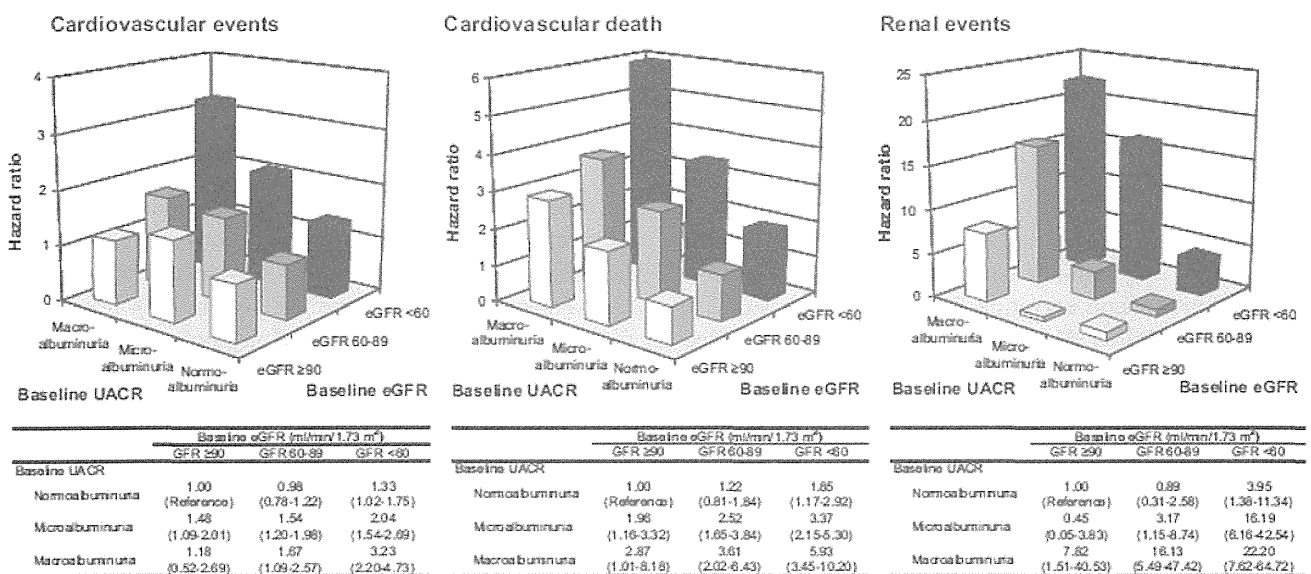


Fig. 1 Combined effects of albuminuria and eGFR levels at baseline on the risk of an adverse outcome. The estimates are adjusted for baseline covariates, including age, gender, duration of diabetes, SBP, history of currently treated hypertension, history of macrovascular

disease, HbA1c, LDL cholesterol, HDL cholesterol, log-transformed triglycerides, BMI, electrocardiogram abnormalities, current smoking, and current drinking. (From Ref. [23] reproduced with permission from the American Society of Nephrology)

the strongest risk factor in the occurrence of vascular events (hazard ratio 1.50; 1.05–2.15) [27]. Recently, the Fenofibrate Intervention and Event Lowering in Diabetes (FIELD) study revealed that normoalbuminuric patients with eGFR 30–59 ml/min per 1.73 m² were at higher risk of a cardiovascular event, cardiovascular death, noncoronary heart disease death, and death from any cause than normoalbuminuric patients with eGFR \geq 60 ml/min per 1.73 m² [28]. Interestingly, high normal levels of albuminuria (\geq 5 μ g/min) predicted the development of micro- and macroalbuminuria and increased mortality in Brazilian type 2 diabetic patients [29]. Furthermore, in Japanese patients with type 1 and type 2 diabetes, even within the normal range (\leq 30 mg/g), ACR \geq 10 mg/g in women and \geq 5 mg/g in men was associated with a significantly greater rate of decline in eGFR relative to subjects with ACR \leq 5 mg/g [30]. It is of interest that the risk of cardiovascular events in individuals with diabetes increases with the ACR, starting well below the microalbumin cutoff [31]. Taken together, an evaluation of the clinical impact of albuminuria along with an evaluation of the effect of GFR on the prognoses of diabetic patients is required.

Remission/regression of albuminuria in patients with diabetic nephropathy

Fioretto et al. [32] reported that pancreas transplantation reversed the lesions of diabetic nephropathy in patients with type 1 diabetes mellitus, but that reversal required more than 5 years of normoglycemia. A growing body of evidence since then has pointed to the possibility of remission and/or regression of diabetic nephropathy, especially in patients treated with renin-angiotensin system blockade drugs. However, there is a lack of data on pathological findings in these patients. In the clinical setting, Perkins et al. [33] stated that regression of albuminuria was frequent in patients with type 1 diabetes mellitus, with a 6-year cumulative incidence of 58%. In this context, the definition of regression of microalbuminuria is a 50% reduction in albumin excretion from one 2-year period to the next. In addition, Hovind et al. [34] at the Steno Diabetes Center reported that the total number of patients who obtained remission was 92 (31%), with a duration of remission of 3.4 years, and regression occurred in 67 (22%) of 301 consecutive type 1 diabetic patients with diabetic nephropathy. Remission was defined as albuminuria $<$ 200 μ g/min sustained for at least 1 year and a decrease of at least 30% from pre-remission levels, and regression as a rate of decline in GFR equal to the natural aging process: \leq 1 ml/min/year during the investigation period in this report. Moreover, remission of nephrotic-range albuminuria in type 1 diabetic patients was also

reported at the Steno Diabetes Center [35]. In this report, remission was induced in 28 of 126 (22%) patients; 21 were predominantly treated with angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors, and 7 with non-ACE inhibitor medications. Remission lasted 3.6 years. In particular, more women (37%) than men (16%) obtained remission. In addition to type 1 diabetic patients, recent studies have revealed that remission is induced in type 2 diabetic patients. Araki et al. [36] reported that a reduction in urinary albumin excretion rate was frequent, with a 6-year cumulative incidence of 51% for remission, defined as a shift to normoalbuminuria, and 54% for regression, defined as a 50% reduction in the urinary albumin excretion rate. Interestingly, in this particular study, the frequency of progression to overt proteinuria was 28%, and albuminuria of short duration, the use of renin-angiotensin system-blocking drugs, and lower titers for HbA1c and systolic blood pressure were independently associated with remission or regression. More recently, JDCS revealed that a return from low microalbuminuria to normoalbuminuria was observed in 137 out of 452 patients (30.3%) [13].

Further, the clinical impact of remission/regression on renal outcome and cardiovascular events is still to be fully investigated. Importantly, Araki et al. [37] have reported that a reduction in albuminuria in patients with type 2 diabetes is an indicator of cardiovascular and renal risk reduction. In this study, the cumulative incidence of mortality from and hospitalization for renal and cardiovascular events was significantly lower in patients with a 50% reduction. Collectively, remission/regression in patients with diabetic nephropathy is relatively frequent, and insight into the pathological characteristics as well as the clinical impact on renal and cardiovascular outcomes when remission/regression is induced is needed.

Hematuria in diabetic nephropathy

Hematuria, the other major characteristic finding aside from albuminuria/overt proteinuria, was reported in 14 out of 34 Japanese patients with biopsy-proven diabetic nephropathy [38]. Patients with hematuria had significantly lower renal function, and the prevalences of nephrotic syndrome and retinopathy were significantly higher than in patients without hematuria. Interestingly, based on a logistic regression analysis, the presence of nephrotic syndrome and a known duration of diabetes were identified as significant predictors for hematuria with diabetic nephropathy.

Concluding remarks and future directions

Deep insights into the onset and progression of albuminuria along with GFR may elucidate the pathogenesis of

progressive kidney complications and associated cardiovascular diseases. Further studies of the clinical characteristics and the pathological findings of kidney involvement in patients with diabetes are required for a better understanding of diabetic nephropathy and the benefits of therapy for it.

Acknowledgments This study was supported in part by a Grant-in-Aid for Diabetic Nephropathy Research from the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan.

References

- Nakai S, Suzuki K, Masakane I, Wada A, Itami N, Ogata S, et al. Overview of regular dialysis treatment in Japan (as of 31 December 2008). *Ther Apher Dial*. 2010;14:505–40.
- Nakayama M, Sato T, Sato H, Yamaguchi Y, Obara K, Kurihara I, et al. Different clinical outcomes for cardiovascular events and mortality in chronic kidney disease according to underlying renal disease: the Gonryo study. *Clin Exp Nephrol*. 2010;14:333–9.
- Foley RN, Culleton BF, Parfrey PS, Harnett JD, Kent GM, Murray DC, et al. Cardiac diseases in diabetic end-stage renal disease. *Diabetologia*. 1997;40:1307–12.
- Saito Y, Kida H, Takeda S, Yoshimura M, Yokoyama H, Koshino Y, et al. Mesangiolysis in diabetic glomeruli: its role in the formation of nodular lesions. *Kidney Int*. 1988;34:389–96.
- Wada T, Furuichi K, Sakai N, Iwata Y, Yoshimoto K, Shimizu M, et al. Up-regulation of monocyte chemoattractant protein-1 in tubulointerstitial lesions in human diabetic nephropathy. *Kidney Int*. 2000;58:1492–9.
- Furuichi K, Hisada Y, Shimizu M, Okumura T, Kitagawa K, Yoshimoto K et al. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and membrane-type 1 MMP (MT1-MMP) affect the remodeling of glomerulosclerosis in diabetic OLETF rat. *Nephrol Dial Transplant* 2011 (Epub ahead of print).
- Parving HH. Diabetic nephropathy: prevention and treatment. *Kidney Int*. 2001;60:2041–55.
- Mogensen CE, Christensen CK, Vittinghus E. The stages in diabetic renal disease. With emphasis on the stage of incipient diabetic nephropathy. *Diabetes*. 1983;32(Suppl 2):64–78.
- Shigeta Y, Kikkawa R. Diabetic nephropathy in Japan. *Diabetes Res Clin Pract*. 1994;24(Suppl):S191–7.
- Guideline Committee of the Japan Diabetes Society. Japan Diabetes Society guideline for the management of diabetes based on scientific evidence. Tokyo: Japan Diabetes Society; 2004.
- Yokoyama H, Kawai K, Kobayashi M, Japan Diabetes Clinical Data Management Study Group. Microalbuminuria is common in Japanese type 2 diabetic patients: a nationwide survey from the Japan Diabetes Clinical Data Management Study Group (JDDM 10). *Diabetes Care*. 2007;30:989–92.
- Parving HH, Lewis JB, Ravid M, Remuzzi G, Hunsicker LG, DEMAND investigators. Prevalence and risk factors for microalbuminuria in a referred cohort of type II diabetic patients: a global perspective. *Kidney Int*. 2006;69:2057–63.
- Katayama S, Moriya T, Tanaka S, Tanaka Y, Yajima H, Sone S, et al. Low transition rate from normo- and low microalbuminuria to proteinuria in Japanese type 2 diabetic individuals: the Japan Diabetes Complications Study (JDCS). *Diabetologia*. 2011;54:1025–31.
- Adler AI, Stevens RJ, Manley SE, Bilous RW, Cull CA, Holman RR, UKPDS GROUP. Development and progression of nephropathy in type 2 diabetes: The United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS 64). *Kidney Int*. 2003;63:225–32.
- Valk EJ, Bruijn JA, Bajema IM. Diabetic nephropathy in humans: pathologic diversity. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2011;20:285–9.
- Kamijo-Ikemori A, Sugaya T, Yasuda T, Kawata T, Ota A, Tatsunami S, et al. Clinical significance of urinary liver-type fatty acid-binding protein in diabetic nephropathy of type 2 diabetic patients. *Diabetes Care*. 2011;34:691–6.
- Mima A, Arai H, Matsubara T, Abe H, Nagai K, Tamura Y, et al. Urinary Smad1 is a novel marker to predict later onset of mesangial matrix expansion in diabetic nephropathy. *Diabetes*. 2008;57:1712–22.
- Kimura T, Ikeda H, Fujikawa J, Nomura K, Aoyama T, Wada Y, et al. Usefulness of serum cystatin C in Japanese patients with type 2 diabetes mellitus and nephropathy. *Diabetes Res Clin Pract*. 2009;83:e58–61.
- Perkins BA, Ficociello LH, Ostrander BE, Silva KH, Weinberg J, Warram JH, et al. Microalbuminuria and the risk for early progressive renal function decline in type 1 diabetes. *J Am Soc Nephrol*. 2007;18:1353–61.
- Levey AS, de Jong PE, Coresh J, Nahas ME, Astor BC, Matsushita K, et al. The definition, classification and prognosis of chronic kidney disease: a KDIGO Controversies Conference report. *Kidney Int*. 2011;80:17–28.
- Yokoyama H, Sone H, Oishi M, Kawai K, Fukumoto Y, Kobayashi M, Japan Diabetes Clinical Data Management Study Group. Prevalence of albuminuria and renal insufficiency and associated clinical factors in type 2 diabetes: the Japan Diabetes Clinical Data Management study (JDDM15). *Nephrol Dial Transplant*. 2009;24:1212–9.
- Caramori ML, Floretto P, Mauer M. Low glomerular filtration rate in normoalbuminuric type 1 diabetic patients: an indicator of more advanced glomerular lesions. *Diabetes*. 2003;52:1036–40.
- Ninomiya T, Perkovic V, de Galan BE, Zoungas S, Pillai A, Jardine M, et al. Albuminuria and kidney function independently predict cardiovascular and renal outcomes in diabetes. *J Am Soc Nephrol*. 2009;20:1813–21.
- Rigalleau V, Lasseur C, Raffaitin C, Beauvieux MC, Barthe N, Chauveau P, et al. Normoalbuminuric renal-insufficient diabetic patients: a lower-risk group. *Diabetes Care*. 2007;30:2034–9.
- Bruno G, Merletti F, Bargero G, Novelli G, Melis D, Soddu A, et al. Estimated glomerular filtration rate, albuminuria and mortality in type 2 diabetes: the Casale Monferrato study. *Diabetologia*. 2007;50:941–8.
- So WY, Kong AP, Ma RC, Ozaki R, Szeto CC, Chan NN, et al. Glomerular filtration rate, cardiorenal end points, and all-cause mortality in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care*. 2006;29:2046–52.
- Vlek AL, van der Graaf Y, Spiering W, Algra A, Visseren FL, SMART study group. Cardiovascular events and all-cause mortality by albuminuria and decreased glomerular filtration rate in patients with vascular disease. *J Intern Med*. 2008;264:351–60.
- Drury PL, Zannino TD, Ehnholm C, Flack J, Whiting M, Fassett R, et al. Estimated glomerular filtration rate and albuminuria are independent predictors of cardiovascular events and death in type 2 diabetes mellitus: the Fenofibrate Intervention and Event Lowering in Diabetes (FIELD) study. *Diabetologia*. 2011;54:32–43.
- Murussi M, Campagnolo N, Beck MO, Gross JL, Silveiro SP. High-normal levels of albuminuria predict the development of micro- and macroalbuminuria and increased mortality in Brazilian type 2 diabetic patients: an 8-year follow-up study. *Diabetes Med*. 2007;24:1136–42.
- Babazono T, Nyumura I, Toya K, Hayashi T, Ohta M, Suzuki K, et al. Higher levels of urinary albumin excretion within the normal range predict faster decline in glomerular filtration rate in diabetic patients. *Diabetes Care*. 2009;32:1518–20.

31. Gerstein HC, Mann JF, Yi Q, Zinman B, Dinneen SF, Hoogwerf B, et al. Albuminuria and risk of cardiovascular events, death, and heart failure in diabetic and nondiabetic individuals. *JAMA*. 2001;286:421–6.
32. Fioretto P, Steffes MW, Sutherland DE, Goetz FC, Mauer M. Reversal of lesions diabetic nephropathy after pancreas transplantation. *N Engl J Med*. 1998;339:69–75.
33. Perkins BA, Ficociello LH, Silva KH, Finkelstein DM, Warram JH, Krolewski AS. Regression of microalbuminuria in type 1 diabetes. *N Engl J Med*. 2003;348:2285–93.
34. Hovind P, Rossing P, Tarnow L, Smidt UM, Parving HH. Remission and regression in the nephropathy of type 1 diabetes when blood pressure is controlled aggressively. *Kidney Int*. 2001;60:277–83.
35. Hovind P, Rossing P, Tarnow L, Toft H, Parving J, Parving HH. Remission of nephrotic-range albuminuria in type 1 diabetic patients. *Diabetes Care*. 2001;24:1972–7.
36. Araki S, Haneda M, Sugimoto T, Isono M, Isshiki K, Kashiwagi A, et al. Factors associated with frequent remission of microalbuminuria I patients with type 2 diabetes. *Diabetes*. 2005;54:2983–7.
37. Araki S, Haneda M, Koya D, Hidaka H, Sugimoto T, Isono M, et al. Reduction in microalbuminuria as an integrated indicator for renal and cardiovascular risk reduction in patients with type 2 diabetes. *Diabetes*. 2007;56:1727–30.
38. Akimoto T, Ito C, Saito O, Takahashi H, Takeda S, Ando Y, et al. Microscopic hematuria and diabetic glomerulosclerosis—clinical-pathological analysis of type 2 diabetic patients associated with overt proteinuria. *Nephron Clin Pract*. 2008;109:c119–26.