

表 2：糖尿病診断例において糖尿病性腎症の組織診断に関連する臨床所見

	HR	(95% CI)	P
降圧薬服用 (+)	2.166	(1.53 - 3.07)	<0.01
尿蛋白定性高度 ((2+)以上)	2.054	(1.45 - 2.90)	<0.01
尿潜血 (-)	1.861	(1.43 - 2.43)	<0.01
血清総蛋白 (-1g/dl)	1.263	(1.11 - 1.44)	<0.01
HbA1c (NGSP) (+1%)	1.235	(1.12 - 1.37)	<0.01
年齢 (-1 歳)	1.027	(1.02 - 1.04)	<0.01
平均血圧 (+1mmHg)	1.012	(1.00 - 1.02)	<0.01
推算 GFR (-1ml/分/1.73m ²)	1.009	(1.00 - 1.01)	<0.01
血清総コレステロール (-1 mg/dl)	1.004	(1.00 - 1.01)	<0.01

図 1：成人ネフローゼ症候群（4,506 例）における糖尿病性腎症（非高齢成人 2,604 例と高齢成人 1,902 例）

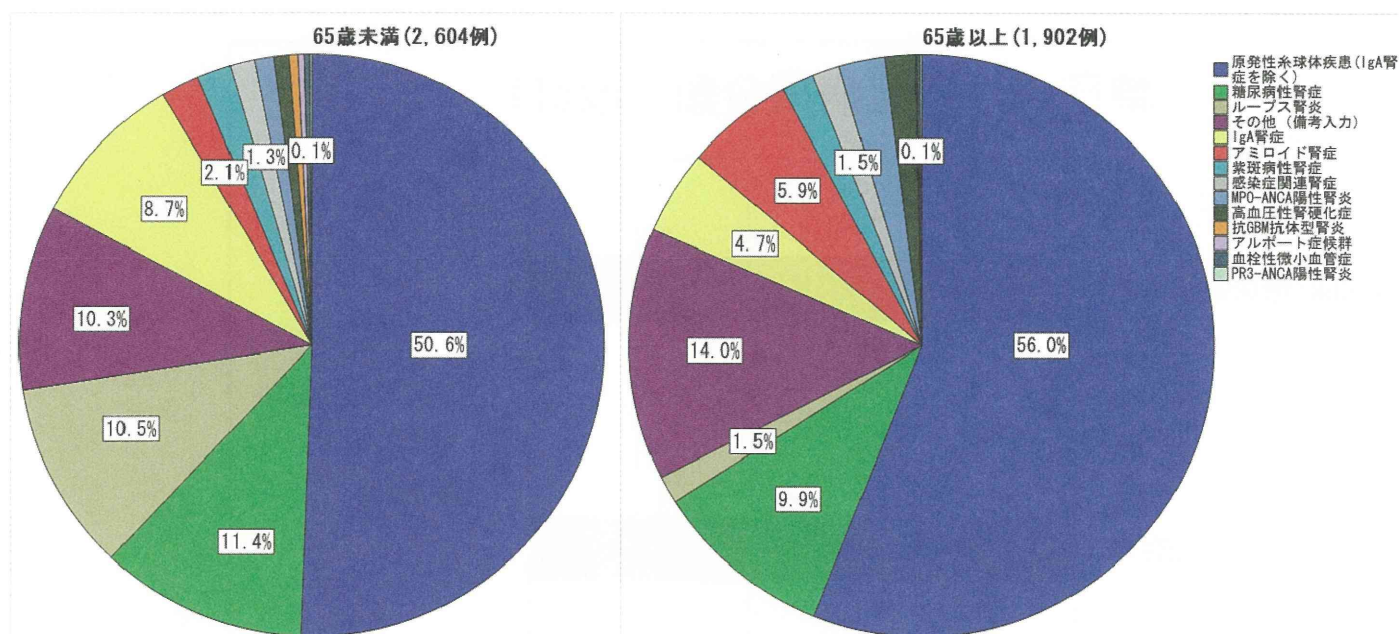
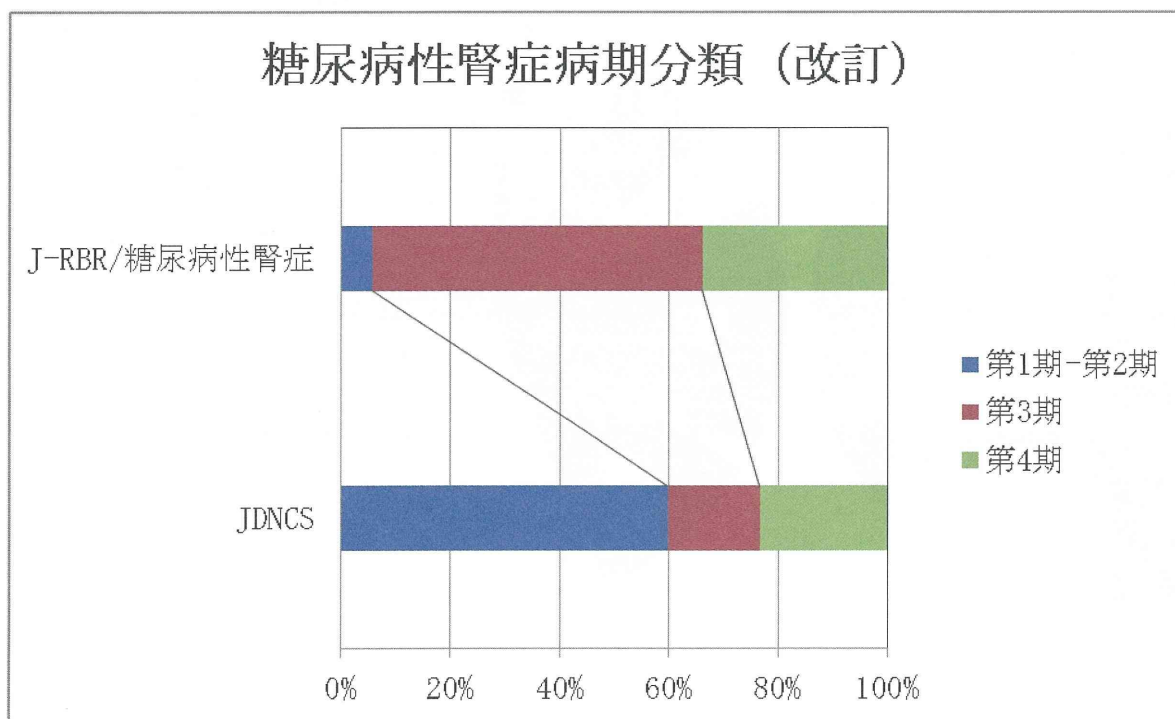


表 3：糖尿病性腎症登録 904 例における臨床診断

臨床診断	例数	%
代謝性疾患に伴う腎障害	239	26.4
ネフローゼ症候群	222	24.6
ネフローゼ症候群+代謝性疾患に伴う腎障害	143	15.8
慢性腎炎症候群	122	13.5
慢性腎炎症候群+代謝性疾患に伴う腎障害	98	10.8
慢性腎炎症候群+高血圧に伴う腎障害, その他	11	1.3
高血圧に伴う腎障害	8	0.9
急性腎障害 (*1)	26	2.9
その他	35	3.9

*1：急速進行性腎炎症候群，急性腎炎症候群，急性腎不全

図 2：糖尿病性腎症の病期分類（改訂）におけるレジストリー別比較



分担研究報告書

「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」分科会全体研究 ～多施設共同研究～

研究分担者

木村 健二郎 聖マリアンナ医科大学腎臓・高血圧内科

研究協力者

池森 敦子 聖マリアンナ医科大学解剖学

菅谷 健 聖マリアンナ医科大学腎臓・高血圧内科

松井 勝臣 聖マリアンナ医科大学腎臓・高血圧内科

安田 隆 聖マリアンナ医科大学腎臓・高血圧内科

柴垣 有吾 聖マリアンナ医科大学腎臓・高血圧内科

研究要旨

本研究の目的は、体外診断薬として公式に承認を受けている尿中 L-FABP、アルブミンおよび NAG を用いて、CKD の早期診断および重症化防止に有用なバイオマーカーおよびその最適な組み合わせを見出すことである。平成 24 年度は聖マリアンナ医科大学と金沢大学の患者情報および検体を用いて後ろ向きに検討した結果、観察開始時の尿中 L-FABP は、複合エンドポイント（脳卒中、心筋梗塞、手術が必要な ASO、透析導入、死亡）発症の ROC 曲線下面積(AUC)が、他のマーカーと比べ、最も大きく、予後予測の感度(82%)・特異度(72%)共に高かった。その結果をうけ、本年度は、バイオマーカーの推移と複合エンドポイント発症との関係を検討した。その結果、尿中 L-FABP の変化は、エンドポイント発症を他のマーカーに比べ、より正確に反映していた。来年度は、今年度解析に使用されたデータを使用し、これらバイオマーカーの値の変化とイベント発生時期との関係、治療との関係、疾患別の解析、さらにはバイオマーカーの適切な組み合わせを解析していく必要がある。

A. 研究目的

慢性腎臓病 (CKD) には、根治療法がないため、CKD の早期診断および疾患進行・予後予測に有用なバイオマーカーの開発は、CKD 進行の抑制のため、大変重要である。

昨年度 (平成 24 年度) において、すでに体外診断薬として公式に承認を受けているバ

イオマーカーである尿中 L-FABP、アルブミンおよび NAG を用い、後ろ向きではあるが、縦断解析を行ったところ、観察開始時の尿中 L-FABP は、複合エンドポイント (脳卒中、心筋梗塞、手術が必要な ASO、透析導入、死亡) 発症の ROC 曲線下面積 (AUC) が、最も大きく (0.825)、予後予測の感度 (82%)・特異度 (72%) 共に高かった。そこで、本年度は、

バイオマーカーの推移と複合エンドポイントとの関係を検討した。

B. 研究方法

対象患者：糖尿病性腎症および腎硬化症を含む CKD で聖マリアンナ医科大学または金沢大学付属病院に通院し、観察開始時および観察終了時の検体が保存されている外来患者である。これらの患者は、検体を他の研究に用いることについて文書で同意を得ている。

試験方法：後ろ向き研究

評価項目：1. 患者背景および過去に測定された臨床データ：年齢、性別、身長、体重、血圧、合併症、既往歴、現病歴、投薬歴、血液生化学検査：血清クレアチニン 2. 新たに測定する尿パラメーター：L-FABP、アルブミン（定量）、N-アセチルグルコサミニダーゼ (NAG)、尿クレアチニン 3. 複合エンドポイント：透析導入、心血管イベント（脳卒中、心筋梗塞、手術の必要な ASO）、死亡

検体測定施設：株式会社エスアールエル・八王子ラボ*で集中測定（*ISO15189, CAP システムの精度管理・品質保証体制の整っている施設）

（倫理面への配慮）

聖マリアンナ医科大学および金沢大学が提供する患者の尿および臨床情報は、生命倫理委員会で承認された臨床研究に参加された被験者のものである。被験者は臨床情報や検体が他の研究に用いられることに文書で同意している（聖マリアンナ医科大学における臨床研究「慢性腎臓病における動脈硬化進行度の経時的観察研究」（承認番号：1156））。患者に新たな介入は行わない。

C. 研究結果

対象患者は、210 人で、原疾患は、高血圧および腎硬化症 137（65%）、糸球体腎炎 36（17%）、糖尿病性腎症 23（11%）、その他 14（7%）であった。平均観察期間は、4.1 年で、観察開始から観察終了時までの総尿検体は、621 検体であった。エンドポイントの発症は、29 人であった。患者背景を下図に示す。

症例数, 人	210
尿検体数	621
性別 (男/女)	128/82
開始時年齢 mean ± SD median, 25–75% interquartile range	65.4 ± 11.6 67.0, 40 - 76
開始時 eGFR, ml/min/1.73m ²	51.7 ± 24.1 55.0, 42 - 78
期間, 年	4.1 ± 1.3 4.5, 3.2 - 5.2
尿蛋白量, g/gCr	0.7 ± 1.9 0.21, 0.11-0.62
エンドポイント	透析導入、 心血管イベント、死亡

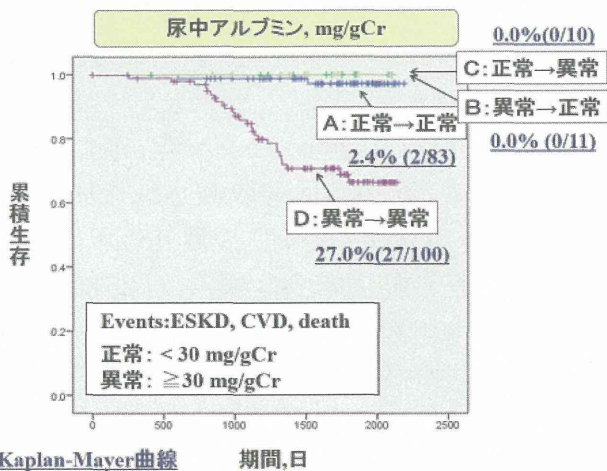
観察開始時と観察終了時のバイオマーカーの値の推移に応じて、患者を下記の A～D の 4 群にわけた。エンドポイント発症頻度は、A 群、B 群、C 群、D 群の順に上昇することが予想される。

	観察開始時	観察終了時
A 群	正常値	正常値
B 群	異常値	正常値
C 群	正常値	異常値
D 群	異常値	異常値

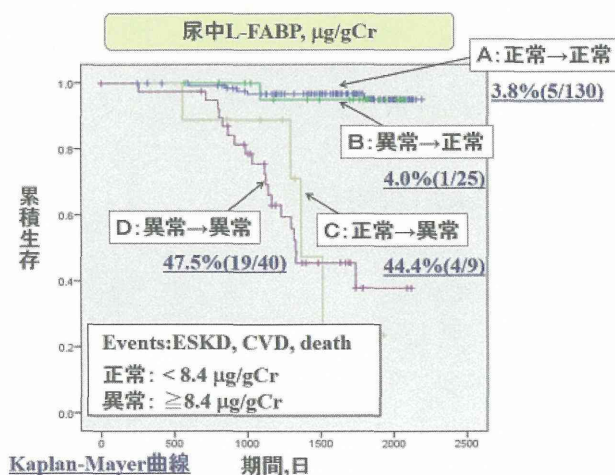
尿中アルブミンは、30mg/g. cr をカットオフ値として使用した。A 群：10 人中 2 人（2.4%）、B 群：11 人中 0 人（0%）、C 群：10 人中 0 人（0%）、D 群：100 人中 27 人（27%）にエンドポイント発症が見られた。尿アルブミンでは、正常値から異常値になっても、

エンドポイント発症は見られず、エンドポイント発症頻度は、B群=C群、A群、D群の順に上昇した。

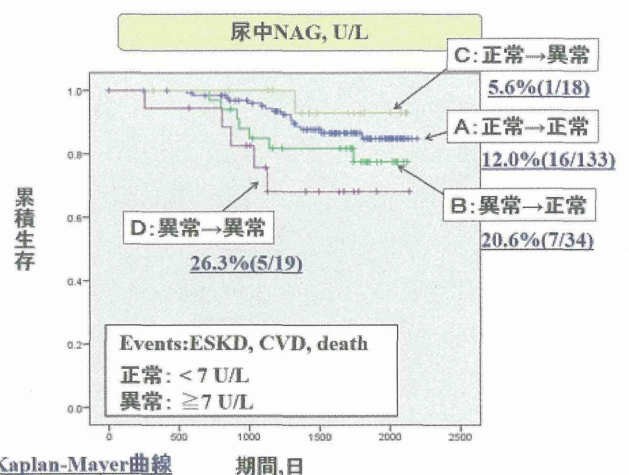
下に Kaplan-Meier 生存曲線を示す。



尿中 L-FABP は、 $8.4 \mu\text{g/g.cr}$ をカットオフ値として使用した。A群：130 人中 5 人 (3.8%)、B群：25 人中 1 人 (4%)、C群：9 人中 4 人 (44.4%)、D群：40 人中 19 人 (47.5%) にエンドポイント発症が見られた。エンドポイント発症頻度は、A群、B群、C群、D群の順に上昇した。尿中 L-FABP の変化は、腎予後、心血管イベント、死亡といった予後を正確に反映していた。下に Kaplan-Meier 生存曲線を示す。



尿中 NAG は、7U/L をカットオフ値として使用した。A群：133 人中 16 人 (12%)、B群：34 人中 7 人 (20.6%)、C群：18 人中 1 人 (5.6%)、D群：19 人中 5 人 (26.3%) にエンドポイント発症が見られた。尿中 NAG では、A群よりもC群のほうが、エンドポイント発症が低く、B群でもエンドポイント発症が高く観察された。エンドポイント発症頻度は、C群、A群、B群、D群の順に上昇した。次ページに Kaplan-Meier 生存曲線を示す。



D. 考察

本研究では、尿中 L-FABP、アルブミン、NAG とともに、正常値が持続した例は、もっとも予後が良く、異常値が持続した例は、もっとも予後が悪いことが示された。しかし、正常値→異常値、異常値→正常値と変化した群で、予後を正確に反映したマーカーは、尿中 L-FABP のみであった。今後、疾患別の解析や治療との関連についても、さらなる解析を行っていく。

E. 結論

1. 尿中 L-FABP の変化は、予後を正確に反映する事が示された。
2. 今後は、これらバイオマーカーの値の変化とイベント発生時期との関係、治療との関係、疾患別の解析、さらには

バイオマーカーの適切な組み合わせを解析していく必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kamijo-Ikemori A, Sugaya T, Ichikawa D, Hoshino S, Matsui K, Yokoyama T, Yasuda T, Hirata K, Kimura K Renal Urinary liver type fatty acid binding protein in diabetic nephropathy. Clin Chim Acta 2013; 23:104-108.
- 2) Hiraki K, Kamijo-Ikemori A, Yasuda T, Hotta C, Izawa KP, Watanabe S, Sugaya T, Kimura K. Moderate-intensity single exercise session does not induce renal damage. J Clin Lab Anal. 2013;27:177-180.
- 3) 池森敦子、市川大介、松井勝臣、横山健、菅谷健、木村健二郎：保険収載された新規バイオマーカー尿中 L-FABP の臨床的有用性。臨床病理。2013; 61:635-640.
- 4) Ichikawa D, Kamijo-Ikemori A, Sugaya T, Shibagaki Y, Yasuda T, Katayama K, Hoshino S, Igarashi-Migitaka J, Hirata K, Kimura K Renoprotective Effect of Renal Liver-Type Fatty Acid Binding Protein (L-FABP) and Angiotensin II Type 1a Receptor Loss in Renal Injury Caused by RAS Activation. Am J Physiol Renal Physiol, 2014, in press.

2. 学会発表

- 1) 市川大介、池森（上條）敦子、菅谷健、星野誠子、右高（五十嵐）潤子、安田隆、平田和明、木村健二郎：RAS 活性化腎障害における腎 L 型脂肪酸結合蛋白 (L-FABP) の腎保護作用の検討。第 56 回日本腎臓学会学術総会，東京，2013/5/11
- 2) 池森（上條）敦子、菅谷健、木村健二郎：新規に保険収載された尿中 L-FABP の臨床的有用性。第 45 回日本臨床検査自動化学会，横浜，2013/10/11
- 3) 市川大介，上條（池森）敦子，菅谷健，星野誠子，右高（五十嵐）潤子，安田隆，平田和明，木村健二郎：RAS 活性化腎障害における腎 L 型脂肪酸結合蛋白 (L-FABP) の腎保護作用の検討。第 36 回日本高血圧学会総会，大阪，2013/10/24
- 4) Ichikawa D, Kamijo-Ikemori A, Sugaya T, Yasuda T, Kimura K Additive Renoprotective Effect of Renal Liver Type Fatty Acid Binding Protein on Angiotensin II Type 1a Receptor Loss in Renal Injury due to RAS Activation. アメリカ腎臓学会 2013, USA, 2013/11/7

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

「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 各個研究

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

糖尿病性腎症の重症化は、蛋白尿の出現・増加と腎機能低下という糸球体上皮細胞（ポドサイト）の障害がキープロセスとなる。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、細胞機能低下をきたし、脱落や細胞死を起こすと、腎機能の不可逆的な低下を招く。そのため、ポドサイト障害を脱落および細胞死よりも早い段階でとらえるバイオマーカーが必要である。このバイオマーカーの樹立のために、尿中エクソソームの解析により候補分子を抽出し、podocyte-derived signal transduction factors (PDSTFs)を見出し、その簡便な測定法を構築している。

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、糸球体高血圧、酸化・糖化ストレス、加齢など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、重症化をより早期に診断、あるいは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ソームタンパクを抽出し、エ

クソソームに含まれるシグナル伝達分子のプロファイルの解析を行い、podocyte-derived signal transduction factors (PDSTFs)を同定する。これらの尿中バイオマーカーとしての annotation を、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の解析を元に行い、ポドサイト障害の分子機構を明らかにすると同時に、糖尿病性腎症の重症化を反映する非侵襲的診断法を樹立する。また、同時に糖尿病モデルマウスを用いて、同マーカーの経時的な変化と治療効果に対する反応を解析する。

(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、尿中エクソソームを採取し、臨床情報を元に、2-3年後の腎機能低下を予測しうる尿中バイオマーカーの探索を行い、複数の候補分子を得た。これらの尿中への発現は、後の腎機能低下をよく反映していた。組織における免疫組織学的な解析によっても、ポドサイトにおける発現低下が確認され、組織上の重症化と正の相関がみられた。

また、糖尿病モデルマウスを用いた経時的な解析では、PDSTFs の程度とアルブミン尿の程度は一致しなかった。PDSTFs の尿中排泄量が増加する個体では、生命予後が悪化していた。

D. 考察

糖尿病によるポドサイトの障害は、腎生検を施行すると、腎症のかなり早期より認めるとの報告があるが、その分子機序はいまだ不明な点が多い。現在の腎機能検査では、これら早期のポドサイト障害をとらえることができない。また、ポドサイトの脱落は不可逆的な変化であり、それよりも早い段階での細胞障害を非侵襲的にとらえる方法もなかった。エクソソームは細胞が受けたストレスの違いによって、異なるプロファイルのタンパク質を内含し、細胞より放出されることが確認された。今回、得

られた尿中分子マーカーである PDSTFs 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明らかになると考えられる。また、糖尿病性腎症を発症している患者では、糖尿病だけでなく、高血圧・脂質異常症・肥満・加齢・多くの薬剤使用など、さまざまな要因が複合的にポドサイト障害に寄与していると考えられるため、ヒト尿による PDSTFs の定量化を可能とし、多くの患者における測定と臨床情報の経時的な解析によって、各リスクファクターのポドサイト障害の分子機構も明らかになるものと考えられる。

E. 結論

糖尿病性腎症において、尿中 PDSTFs はポドサイト障害を反映する非侵襲的バイオマーカーであり、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

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1) 第53回 日本臨床化学会年次学術集会
腎機能低下予測バイオマーカーとしてのポドサイト由来エクソソーム内転写因子 安部尚子、安部秀斉、土井俊夫

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

「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 各個研究

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。このうち未知の物質を含む 5 個の代謝物を採用した際、糖尿病性腎症診断における ROC 曲線の AUC は 0.927 であった。また 4 種類の既知の代謝物 (aspartic acid, SDMA, azelaic acid, galactaric acid) のみを採用した場合も 0.844 という高い AUC が得られた。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

糖尿病性腎症の早期診断のゴールドスタンダードは微量アルブミン尿の出現である。しかし、その検出は時間帯あるいは日により変動があり再現性が高いことが問題であり、その精度は必ずしも十分ではない。さらに最近、高血圧症患者においても高率にアルブミン尿が陽性となることが報告され、その特異性に疑問が呈されている。本研究は、糖尿病性腎症の尿検体ではなく血清検体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

正常アルブミン尿 (UACR<30mg/g) の非糖

尿病性腎症患者 20 名、微量アルブミン尿 (30<UACR<300 mg/g) を有する微量アルブミン尿を有する糖尿病患者 32 名、顕性蛋白尿 (UACR>300 mg/g) を有する糖尿病患者 26 名を含む糖尿病患者合計 78 名から血清を採取した。血清の網羅的メタボローム解析はキャピラリー電気泳動時間飛行型質量分析 (CE-TOFMS) を用いて、慶応大学の平山、曾我らが行った。4400 のピークから解析を開始し、ノイズを除去した後に 289 の代謝物が残った。この 289 代謝物を用いて PLS 判別分析を行った。続いて、non-DN 患者と DN-macro を鑑別するための PLS 判別分析を行い、新規バイオマーカー候補代謝物を抽出した。抽出された候補代謝物を用いて重回帰分析を行い、高い精度で糖尿病性腎症を診断できる複数のバイオマーカーの組み合わせを探索した。

(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。この 19 代謝産物のうち未知の物質 3 つを含む 5 個の代謝物 (γ -ブチロベタイン、symmetric dimethylarginine、ID114、ID127 アゼライン酸) を採用した重回帰分析では、糖尿病性腎症診断における ROC 曲線の AUC は 0.927 と高値であった(図 A)。次に既知の物質のみを用いて重回帰分析を行った。その結果、4 個の代謝物 (aspartic acid, SDMA, azelaic acid, galactaric acid) のみを採用し、0.844 という高い AUC が得られた(図 B)。

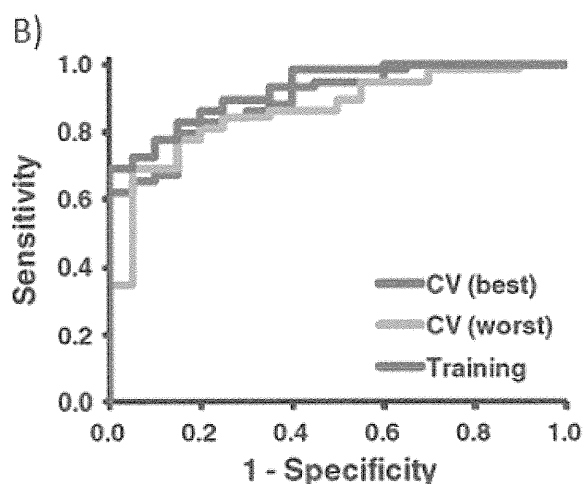
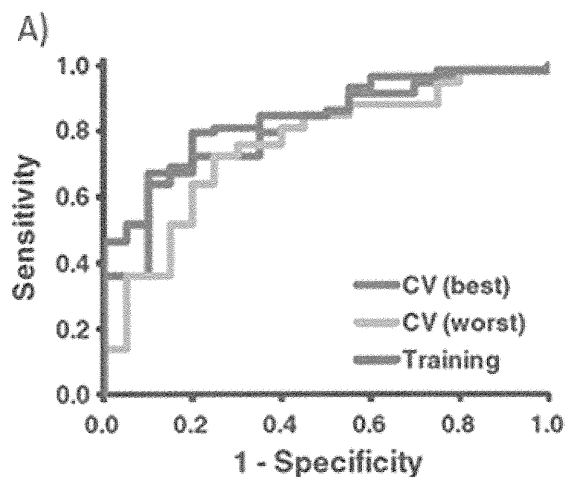


図 複数の代謝産物を用いた糖尿病性腎症の診断

(A) 5 個の代謝物 (γ -ブチロベタイン、symmetric dimethylarginine、ID114、ID127 アゼライン酸) を採用した重回帰分析では、糖尿病性腎症診断における ROC 曲線の AUC は 0.927 と高値であった。

(B) 4 個の既知の代謝物 (aspartic acid, SDMA, azelaic acid, galactaric acid) のみを採用した重回帰分析でも 0.844 という高い AUC が得られた。

D. 考察

血清メタボローム解析と多変量解析により糖尿病性腎症患者を高い精度で選別する新規バイオマーカー候補分子群を選定することが可能であった。今後、さらに

高い診断能を有する代謝物バイオマーカーセットを探索していく必要がある。

E. 結論

網羅的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

ありません。

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) 「血液浄化メタボロミクス 血中イオン性低分子代謝物の経時的一斉解析」秋山真一，平山 明由，丸山 彰一，曾我 朋義，松尾 清一
第 57 回（社）日本透析医学会学術集会・総会 2012 年 6 月 22 日（札幌）

H. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許出願

「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.

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
Hara A, Sakai N, Furuichi K, Sakai Y, Takeya M, Bucala R, Mukaida N, Takuwa Y, Matsushima K, Kaneko S, Wada T.	CCL2/CCR2 augments the production of transforming growth factor-beta1, type 1 collagen and CCL2 by human CD45-/collagen 1-positive cells under high glucose concentrations.	Clin Exp Nephrol	17(6)	793-804	2013
Furuichi K, Shimizu M, Toyama T, Koya D, Koshino Y, Abe H, Mori K, Satoh H, Imanishi M, Iwano M, Yamauchi H, Kusano E, Fujimoto S, Suzuki Y, Okuda S, Kitagawa K, Iwata Y, Kaneko S, Nishi S, Yokoyama H, Ueda Y, Haneda M, Makino H, Wada T; Research Group of Diabetic Nephropathy, Ministry of Health, Labour, and Welfare of Japan.	Japan Diabetic Nephropathy Cohort Study: study design, methods, and implementation.	Clin Exp Nephrol	17(6)	819-826	2013
Shimizu M, Furuichi K, Toyama T, Kitajima S, Hara A, Kitagawa K, Iwata Y, Sakai N, Takamura T, Yoshimura M, Yokoyama H, Kaneko S, Wada T and Kanazawa Study Group for Renal Diseases and Hypertension.	Long-term outcomes of Japanese type 2 diabetic patients with biopsy-proven diabetic nephropathy.	Diabetes Care	36(11)	3655-3662	2013
Toyama T, Furuichi K, Ninomiya T, Shimizu M, Hara A, Iwata Y, Kaneko S, Wada T.	The impacts of albuminuria and low eGFR on the risk of cardiovascular death, all-cause mortality, and renal events in diabetic patients: meta-analysis.	PLoS ONE	8(8)	e71810	2013
Wada T, Shimizu M, Yokoyama H, Iwata Y, Sakai Y, Kaneko S, Furuichi K.	Nodular lesions and mesangiolysis in diabetic nephropathy.	Clin Exp Nephrol	17(1)	3-9	2013
Wada T, Haneda M, Furuichi K, Babazono T, Yokoyama H, Iseki K, Araki S, Ninomiya T, Hara S, Suzuki Y, Iwano M, Kusano E, Moriya T, Satoh H, Nakamura H, Shimizu M, Toyama T, Hara A, Makino H; The Research Group of Diabetic Nephropathy, Ministry of Health, Labour, and Welfare of Japan.	Clinical impact of albuminuria and glomerular filtration rate on renal and cardiovascular events, and all-cause mortality in Japanese patients with type 2 diabetes.	Clin Exp Nephrol	in press		
Shimizu M, Furuichi K, Yokoyama H, Toyama T, Iwata Y, Sakai N, Kaneko S, Wada T.	Kidney lesions in diabetic patients with normoalbuminuric renal insufficiency.	Clin Exp Nephrol	in press		
Toyama T, Shimizu M, Furuichi K, Kaneko S, Wada T.	Treatment and impact of dyslipidemia in diabetic nephropathy.	Clin Exp Nephrol	in press		
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	36(5)	1248-1253	2013

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Nakamura A, Shikata K, Nakatou T, Kitamura T, Kajitani N, Ogawa D, Makino H	Combination therapy with an angiotensin converting enzyme inhibitor and an angiotensin II receptor antagonist ameliorates microinflammation and oxidative stress in patients with diabetic nephropathy	J Diabetes Invest	4	195-201	2013
Inoue K, Wada J, Eguchi J, Nakatsuka A, Teshigawara S, Murakami K, Ogawa D, Terami T, Katayama A, Tone A, Iseda I, Hida K, Yamada M, Ogawa T, Makino H	Urinary fetuin-A is a novel marker for diabetic nephropathy in type 2 diabetes identified by lectin microarray	PLoS One	8	e77118	2013
Sato H, Takahashi N, Sato E, Kisu K, Ito S, Saito T.	Pathology of glomerular lipodosis.	Clin Exp Nephrol	in press		
Usui C, Hatta K, Aratani S, Yagishita N, Nishioka K, Kanazawa T, Itoh K, Yamano Y, Nakamura H, Nakajima T, Nishioka K	The Japanese version of the modified ACR preliminary diagnostic criteria for fibromyalgia and the fibromyalgia symptom scale: reliability and validity.	Mod Rheumatol	23(5)	846-850	2013
Hatta K, Takebayashi H, Sudo Y, Katayama S, Kasuya M, Shirai Y, Morikawa F, Nakase R, Nakamura M, Ito S, Kuga H, Nakamura M, Ohnuma T, Usui C, Nakamura H, Hirata T, Sawa Y; for the JAST study group	The possibility that requiring high-dose olanzapine cannot be explained by pharmacokinetics in the treatment of acute-phase schizophrenia.	Psychiatry Res	210(2)	396-401	2013
Iwasa K, Yoshikawa H, Samuraki M, Shinohara M, Hamaguchi T, Ono K, Nakamura H, Yamada M	Myasthenia gravis: Predictive factors associated with the synchronized elevation of anti-acetylcholine receptor antibody titer in Kanazawa, Japan.	J Neuroimmunol	in press		
Nagai K, Miyoshi M, Kake T, Fukushima N, Matsuura M, Shibata E, Yamada S, Yoshikawa K, Kanayama HO, Fukawa T, Yamaguchi K, Izaki H, Mima A, Abe N, Araoka T, Murakami T, Kishi F, Kishi S, Tominaga T, Moriya T, Abe H, Doi T.	Dual involvement of growth arrest-specific gene 6 in the early phase of human IgA nephropathy.	PLoS One	24(6)	e66759	2013
Yoshikawa K, Abe H*, Tominaga T, Nakamura M, Kishi S, Matsuura M, Nagai K, Tsuchida K, Minakuchi J, Doi T	Polymorphism in the human matrix Gla protein gene is associated with the progression of vascular calcification in maintenance hemodialysis patients.	Clin Exp Nephrol	17(6)	882-889	2013
Kuwabara T, Mori K, Mukoyama M, Kasahara M, Yokoi H, Nakao K.	Macrophage-mediated glucolipotoxicity via MRP8/TLR4 signaling in diabetic nephropathy.	Clin Exp Nephrol	in press		

研究成果の刊行物・別刷

CCL2/CCR2 augments the production of transforming growth factor-beta1, type 1 collagen and CCL2 by human CD45-/collagen 1-positive cells under high glucose concentrations

Akinori Hara · Norihiko Sakai · Kengo Furuichi · Yoshio Sakai ·
Motohiro Takeya · Richard Bucala · Naofumi Mukaida · Yoh Takuwa ·
Kouji Matsushima · Shuichi Kaneko · Takashi Wada

Received: 13 February 2012 / Accepted: 11 March 2013 / Published online: 6 April 2013
© Japanese Society of Nephrology 2013

Abstract

Background The migration and activation of circulating profibrotic cells including fibrocytes by the action of the chemokine/chemokine receptor system has been implicated in pathological fibrogenesis. In the present study, the involvement of collagen 1 (Col1)-producing cells, CD45-positive/collagen-1-positive (CD45⁺/Col1⁺) cells originally named as fibrocytes via CC chemokine receptor 2 (CCR2), a cognate receptor of CCL2/monocyte chemoattractant protein, was examined in diabetic conditions.

Methods Human CD45⁺/Col1⁺ cells originating from the peripheral blood of healthy volunteers were incubated with high concentrations of D-glucose or D-mannitol as an osmotic control for 12, 24 or 48 h. In addition, these cells were preincubated with CCL2 under high glucose concentrations. We also examined the effects of the inhibitors

of glucose transporters (GLUTs), reactive oxygen species or CCR2 on the expression of transforming growth factor beta1 (TGF- β_1), pro- α 1 chain of Col1 (COL1A1), and CCL2.

Results Stimulation of CD45⁺/Col1⁺ cells with high glucose concentrations increased the mRNA and protein levels of TGF- β_1 and CCL2 and those of pro-COL1A1, and this effect was mediated in part by increased osmolality. Preincubation of the cells with cytochalasin B (a GLUT inhibitor) or N-acetylcysteine (an antioxidant) blocked the stimulatory effect of high glucose concentrations on these profibrotic molecules. In addition, preincubation of the cells with CCL2 enhanced the high glucose-induced upregulation of TGF- β_1 , pro-COL1A1 and CCL2 and migration of the cells, and this effect was partly inhibited by treatment with CCR2 inhibitors.

A. Hara · N. Sakai · K. Furuichi · S. Kaneko
Department of Disease Control and Homeostasis,
Kanazawa University, Kanazawa, Japan

Y. Sakai
Department of Laboratory Medicine, Faculty of Medicine,
Institute of Medical, Pharmaceutical and Health Sciences,
Kanazawa University, 13-1 Takara-machi,
Kanazawa 920-8641, Japan

M. Takeya
Department of Cell Pathology, Graduate School of Medical
Sciences, Kumamoto University, Kumamoto, Japan

R. Bucala
Department of Medicine, Yale University School of Medicine,
New Haven, CT, USA

N. Mukaida
Division of Molecular Bioregulation, Cancer Research Institute,
Kanazawa University, Kanazawa, Japan

Y. Takuwa
Department of Physiology, Faculty of Medicine, Institute
of Medical, Pharmaceutical and Health Sciences,
Kanazawa University, Kanazawa, Japan

K. Matsushima
Department of Molecular Preventive Medicine, Graduate School
of Medicine, The University of Tokyo, Tokyo, Japan

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

Conclusion These results suggest that CD45⁺/Col1⁺ cells may be directly involved, in part through CCL2/CCR2 signaling, in the fibrotic process under diabetic conditions.

Keywords Diabetes mellitus · CCR2 · Fibrosis · Bone marrow-derived cells · Fibrocyte · CD45

Introduction

Diabetic nephropathy is one of the major microvascular complications of diabetes. It is by far the most common cause of end-stage kidney failure and is epidemic worldwide [1, 2]. In the course of the disease progression, the accumulation of matrix proteins resulting in glomerulosclerosis and interstitial fibrosis is a prominent feature of the disease [2]. In this histopathological picture, the infiltration of bone marrow-derived inflammatory cells such as monocytes/macrophages into the diseased kidneys is a hallmark of the progression of diabetic nephropathy [3, 4]. Infiltrated monocytes/macrophages release lysosomal enzymes, nitric oxide, and transforming growth factor beta (TGF- β), which have an essential role in kidney damage [2, 5]. Recent studies have uncovered that CCL2, also termed monocyte chemoattractant protein-1, plays an important role through its cognate receptor, CCR2 and its downstream signal transduction system in the pathogenesis of diabetic nephropathy as well as glomerulonephritis [6–9].

In recent years, fibrocytes, a precursor to several mature cell lineages in monocyte fraction of peripheral blood, have been shown to be involved in the pathogenesis of organ fibrosis through distinct chemokine/chemokine receptor systems [10–13]. These cells are associated with fibrotic conditions such as lung and kidney fibrosis, bronchial asthma, and skin wounds [12–15]. Fibrocytes are identified by the coexpression of the stem cell marker CD34, the leukocyte common antigen CD45, and extracellular matrix proteins such as type 1 collagen (Col1) [10]. Although a recent study revealed that markers of CD45RO, 25F9 and S100A8/A9 distinguish monocyte-derived fibrocytes from monocytes, macrophages, and fibroblasts [16], until now fibrocytes have been identified by dual positivity of CD34 or CD45 and Col1 or pro-collagen 1 (pro-Col1) [17]. Furthermore, fibrocytes express chemokine receptors such as CCR2, CCR7 and CXCR4, and the function and differentiation of fibrocytes are influenced by various mediators such as TGF- β [13, 17]. While CD45 and pro-Col1 dual-positive (CD45⁺/pro-Col1⁺) cells may be found in human diabetic nephropathy and may have a role in the progression of the disease [15], the specific cellular and molecular mechanisms involved in the development and/or progression of diabetic complications, especially in the kidney, remains to be investigated.

In the present study, we examined the direct involvement of CD45⁺/Col1⁺ cells in the development and/or progression of the profibrotic process under high glucose with or without the costimulation of CCL2. We report here that high glucose concentrations stimulate the production of TGF- β ₁, pro-Col1 and CCL2, and cell migration, which are augmented partly by CCL2/CCR2 signaling, in human CD45⁺/Col1⁺ cells *in vitro*.

Materials and methods

Differentiation and isolation of human CD45⁺/Col1⁺ cells originating from peripheral blood

CD45⁺/Col1⁺ cells were harvested and cultured as previously reported [18, 19]. Briefly, total peripheral blood mononuclear cells were isolated from venous blood drawn from healthy donors by centrifugation on a Ficoll-Metrizoate density gradient ($d = 1.077$ g/ml; Lymphoprep; Nycomed, Oslo, Norway) following the manufacturer's protocol. After 2 days of culture in a tissue culture flask using Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) containing 4500 mg/L D-glucose (Gibco BRL) supplemented with 20 % heat-inactivated fetal calf serum (FCS) (Gibco BRL), 100 U/ml penicillin (Gibco BRL), and 100 μ g/ml streptomycin (Gibco BRL), non-adherent cells were removed by gentle aspiration, and media were replaced. After 10–12 days, adherent cells were lifted by incubation in ice-cold 0.05 % ethylenediaminetetraacetic acid in phosphate-buffered saline (PBS). The crude cell preparations were then depleted by immunomagnetic selection of contaminating T cells, B cells, and CD14⁺ monocytes using pan-T, anti-CD2; pan-B, anti-CD19; and anti-CD14 monoclonal antibody coated with microbeads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) [19]. Cell purity was examined by flow cytometry using both fluorescein isothiocyanate-conjugated mouse anti-human CD45 monoclonal antibody (Becton Dickinson/Pharmin-gen, San Diego, CA, USA) and R-phycoerythrin-labeled rabbit antihuman type 1 collagen polyclonal antibodies (Millipore, Temecula, CA, USA) and confirmed as >92 % pure population of cells coexpressing CD45 and type 1 collagen, as described previously [19]. With regard to ethical considerations, the medical ethics committee of Kanazawa University approved the experiments which were conducted with the understanding and the consent of each participant.

Culture conditions

To examine the effect of glucose and CCL2 on function of CD45⁺/Col1⁺ cells, CD45⁺/Col1⁺ cells were incubated

with D-glucose (Wako Chemicals Inc., Tokyo, Japan) and/or CCL2 in a dose- and time-dependent manner. Briefly, CD45⁺/Col1⁺ cells (1×10^6 /ml) were cultured in plastic tissue culture plates in DMEM supplemented with 0.5 % heat-inactivated FCS (Gibco BRL) at 37 °C in a humidified atmosphere with 5 % CO₂ for 24 h after isolation in the presence of increasing concentrations (5–30 mmol/l) of D-glucose using D-mannitol (Wako Chemicals Inc.) as osmotic controls. In addition, CD45⁺/Col1⁺ cells were cultured for an increasing period of time (0–48 h) in DMEM supplemented with 0.5 % heat-inactivated FCS in the presence of 30 mmol/l D-glucose or 5 mmol/l D-glucose with 25 mmol/l D-mannitol. In additional experiments to explore the role of glucose-specific signaling pathways in the production of TGF- β_1 , pro-Col1 and CCL2, CD45⁺/Col1⁺ cells were treated with D-glucose or D-mannitol in the presence of cytochalasin B (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, USA), a well-known glucose transporter (GLUT) inhibitor [20], at 5 μ mol/l for 24 h. According to earlier dosing studies in our laboratory, this concentration of cytochalasin B did not influence the viability of cultured CD45⁺/Col1⁺ cells as assessed by Trypan blue dye exclusion (data not shown). In addition, to investigate the role of reactive oxygen species (ROS) in this pathological process, N-acetylcysteine (NAC) (Sigma-Aldrich, Inc.) was used as an antioxidant at 2 mmol/l for 24 h. Furthermore, to examine whether CCL2/CCR2 is responsible for the production of TGF- β_1 , pro-Col1 and CCL2, propagermanium (kindly provided by Sanwa Kagaku) and RS-504393 (Tocris Bioscience, Bristol, UK) [21] inhibitors of CCR2 signaling were used [21, 22]. CD45⁺ Col1⁺ cells (1×10^6 /ml) were preincubated in DMEM supplemented with 0.5 % heat-inactivated FCS by adding propagermanium (3 μ g/ml) or RS-504393 (1 μ M) into each culture medium for 30 min. Subsequently, CD45⁺/Col1⁺ cells were incubated in the presence of recombinant human CCL2 (50 ng/ml) (R&D Systems Inc., MN, USA) for 48 h.

Analysis of GLUT isoforms and CCR2 by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

Transcripts of GLUT isoforms were detected using RT-PCR. In brief, total RNA was extracted from cultured human CD45⁺/Col1⁺ cells under normal or high concentrations of glucose, and complementary DNA (cDNA) was reverse-transcribed from 1 μ g total RNA using a RT-PCR kit (Takara Shuzo, Tokyo, Japan) as previously described [14, 23]. The cDNA product was amplified by PCR as follows—incubation for 3 min at 94 °C, followed by 30 cycles of 45 s at 94 °C, 1 min at 56 °C, and 1 min at 72 °C and a final extension for 7 min at 72 °C [24]. Primers for human GLUT1, GLUT2, GLUT3, and GLUT4 were used to examine expression of GLUT1, GLUT2, GLUT3, and

Table 1 Oligonucleotide primer pairs used for RT-PCR

Gene		Oligonucleotide primers 5'-3'	Product size
GLUT1	S	TCCACGAGCATCTTCGAGA	393
	AS	ATACTGGAAGCACATGCC	
GLUT2	S	CACTGATGCTGCATGTGGC	522
	AS	ATGTGAACAGGGTAAAGGCC	
GLUT3	S	TTCAAGAGCCCATCTATGCC	458
	AS	GGTCTCAGGGACTTTGAAGA	
GLUT4	S	GGCATGTGTGGCTGTGCCATC	414
	AS	GGGTTTCACCTCCTGCTCTAA	
CCR2	S	GGATTGAACAAGGACGCATT	766
	AS	TCTCACTGCCCTATGCCTCT	
GAPDH	S	CCCATCACCATCTTCCAGGAGC	473
	AS	CCAGTGAGCTTCCCCTTCAGC	

Sense (S) and antisense (AS) primer pairs specific for facilitative glucose transporter isoforms (GLUT1–4), and glycerophosphate dehydrogenase (GAPDH). Nucleotide numbers refer to positions within the published sequence

GLUT4, respectively (Table 1) [24]. Similarly, to determine CCR2 transcripts, the cDNA products from total RNA were amplified by semiquantitative RT-PCR using that from a human monocyte cell line, THP-1 (DS Pharma Biomedical, Osaka, Japan), as a positive control. Primers for CCR2 were used to detect CCR2 transcripts (Table 1) [22]. The amplification profile for CCR2 was described previously [22]. The housekeeping gene glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was used for PCR controls (Table 1) [24]. Photographs of DNA-stained agarose gels were evaluated by band intensity comparison of GAPDH expression versus GLUT expression using computer image analysis [22].

Analysis of gene expression by real-time quantitative PCR

To determine transcripts of the pro- $\alpha 1$ chain of Col1 (pro-COL1A1), TGF- β_1 , and CCL2, total RNA was extracted from cultured human CD45⁺/Col1⁺ cells as described above. Quantitative real-time RT-PCR was performed on the ABI Prism 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) as previously described [19, 22]. Real-time PCR was performed in a total volume of 20 μ l, containing 1 μ l cDNA sample, TaqMan gene expression assays (Applied Biosystems), and TaqMan universal PCR master mix (Applied Biosystems), using the universal temperature cycles—10 min at 94 °C, followed by 40, two temperature cycles (15 s at 94 °C and 1 min at 60 °C). Assay IDs of TaqMan gene expression assays were Hs00234140 for CCL2, Hs00171257 for TGF- β_1 , Hs00164004 for COL1A1 and Hs99999905 for GAPDH.

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

To determine the protein levels of CCL2 and TGF- β_1 , supernatants of the samples which were prepared by centrifuging at 1,500 rpm for 10 min and then storing 1 ml at -80°C until use, were evaluated using the commercial Quantikine Human CCL2 and TGF- β_1 ELISA kit, respectively, in accordance with the protocol specified by the manufacturer (R&D Systems Inc.).

Cell migration assay

To examine the degree to which cultured human CD45⁺/Col1⁺ cells migrate in vitro in response to high glucose concentrations and CCL2/CCR2 signaling, cell migration assay was performed using the Cultrex 96 Well Cell Migration Assay Kit in accordance with the protocol specified by the manufacturer (Trevigen, Inc., Gaithersburg, MD, USA).

Statistical analysis

The mean and SEM were calculated on all of the parameters determined in this study. Statistical analyses were performed using Kruskal–Wallis test and analysis of variance. $P < 0.05$ was accepted as statistically significant.

Results

Effect of high glucose concentrations on expression of TGF- β_1 and pro-COL1A1 by isolated CD45⁺/Col1⁺ cells

The impact of high glucose concentrations on isolated human CD45⁺/Col1⁺ cells was examined in vitro. The exposure of human CD45⁺/Col1⁺ cells to D-glucose resulted in the induction of TGF- β_1 and pro-COL1A1 mRNA in a time- and dose-dependent manner (Fig. 1a, b, e, f). In addition to mRNA up-regulation of TGF- β_1 , the concentration of the TGF- β_1 protein in the supernatant was increased by stimulation with high glucose concentrations (Fig. 1c, d). When human CD45⁺/Col1⁺ cells were incubated with D-mannitol, there was a similar, albeit lower magnitude, dose- and time-dependent increase in mRNA and protein levels of TGF- β_1 and pro-COL1A1 mRNA was observed (Fig. 1a–f). After 24 h, mRNA and protein levels of TGF- β_1 and pro-COL1A1 mRNA were significantly higher in D-glucose-treated human CD45⁺/Col1⁺ cells compared with those treated with D-mannitol (Fig. 1b, d, f).

Effect of high glucose concentrations on expression of CCL2 by isolated CD45⁺/Col1⁺ cells

To examine the effect of high glucose concentrations on the expression of CCL2 in human CD45⁺/Col1⁺ cells, the cells were incubated for 24 h with high glucose concentrations. Stimulation with high glucose enhanced the levels of CCL2 mRNA as well as protein in a dose-dependent manner (Fig. 2a, c). In addition, human CD45⁺/Col1⁺ cells were cultured in 30 mmol/l D-glucose or 25 mmol/l D-mannitol with 5 mmol/l D-glucose for up to 48 h. Enhanced mRNA levels of CCL2 were observed in a time-dependent manner, which were followed by the up-regulation of CCL2 protein (Fig. 2b, d). As well as the expression of TGF- β_1 and pro-COL1A1, high osmolality also increased mRNA and protein levels of CCL2 (Fig. 2a–d). After 24 h, mRNA and protein levels of CCL2 were significantly higher in D-glucose-treated human CD45⁺/Col1⁺ cells compared with those treated with D-mannitol (Fig. 2b, d).

Expression of mRNAs for GLUTs

The expression of GLUT isoforms in human CD45⁺/Col1⁺ cells cultured with 5 or 30 mmol/l D-glucose was examined by RT-PCR. The expression of GLUT1 and GLUT3 mRNA was detectable under normal glucose concentrations, and their expression was downregulated at 24 h after incubation with high glucose concentrations (Fig. 3a). Transcripts for the mRNA for GLUT2 and GLUT4 were not detected by this qualitative analysis (Fig. 3a).

Effect of inhibition of glucose transport or ROS on the expression of TGF- β_1 and pro-COL1A1

Cytochalasin B, an antioxidant and an inhibitor of GLUT and NAC, was used to determine the contribution of glucose-specific mechanisms and their downstream pathways leading to the expression of TGF- β_1 and pro-COL1A1 in human CD45⁺/Col1⁺ cells. Human CD45⁺/Col1⁺ cells were incubated for 24 h with control medium (5 mmol/l D-glucose), 30 mmol/l D-glucose, or 25 mmol/l D-mannitol with 5 mmol/l D-glucose in the presence or absence of 5 $\mu\text{mol/l}$ of cytochalasin B or 2 mmol/l of NAC. D-glucose and mannitol significantly increased mRNA and protein levels of TGF- β_1 and pro-COL1A1 mRNA, when compared to the control condition (Fig. 3b, d, f). In the presence of cytochalasin B or NAC, the D-glucose-induced increase in the expression of TGF- β_1 and pro-COL1A1 mRNA was significantly reduced (Fig. 3b, f). Similarly, the concentration of the TGF- β_1