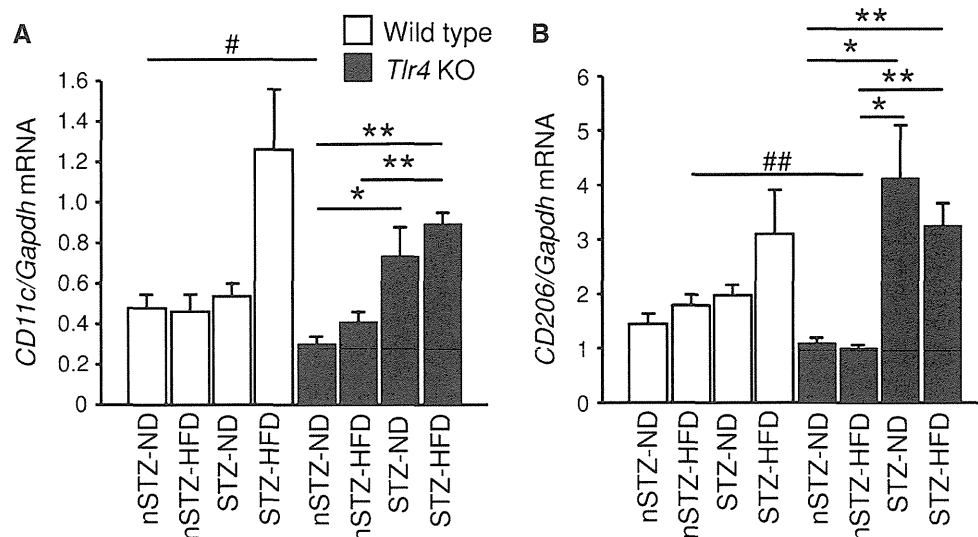


Fig. 6 Glomerular gene expression of M1 (a) and M2 (b) macrophage markers in STZ-HFD mice determined by TaqMan real-time PCR. Data are mean \pm SEM. $n = 4-11$. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ for similarly treated *Tlr4* KO versus wild-type



The role of M1 and M2 macrophages in DN with glucolipototoxicity

There are several subtypes of macrophages including M1 and M2 in tissue injury and repair [72–74]. During the course of renal ischemia/reperfusion injury [75] and unilateral ureteral obstruction [76], switch from proinflammatory M1 to anti-inflammatory or profibrotic M2 subtype occurs in macrophages infiltrating the tubulointerstitium. Here, we have carried out preliminary analysis of M1 and M2 macrophages in glomeruli of STZ + HFD mice by studying gene expression levels of *CD11c* (or *Itgax*) and *CD206* (or *Mrc1*) as markers of M1 and M2 subtypes, respectively [77, 78] (Fig. 6). In wild-type mice, treatment with STZ alone does not affect glomerular expression of *CD11c* and *CD206* genes, and addition of HFD to STZ causes a 100 % increase in *CD11c* and a 30 % increase in *CD206*, suggesting relative predominance of M1 subtype in diabetic-hyperlipidemic conditions. Furthermore, in *Tlr4* KO mice, the stimulatory effects of HFD upon STZ treatment are canceled both for *CD11c* and *CD206* genes, and simple STZ treatment increases *CD11c* expression by two-fold and increases *CD206* expression by three-fold, suggesting the presence of M2 predominant status. These results imply that TLR4-mediated signal is partially suppressing M2 subtype in STZ-normal diet mice and enhancing M1 subtype in STZ-HFD mice. These findings are in good agreement with previous reports indicating that treatment of macrophages with MRP8 induces M1 subtype (through TLR4 as lipopolysaccharide does) [61, 72, 76] and MRP8-expressing macrophages exhibits M1 characteristics by secretion of TNF- α and interleukin-6 [74, 79]. Formally, M1/M2 subtype analysis had to be carried out by analyzing isolated macrophages extracted from tissues.

Furthermore, in STZ + HFD animals, the levels of macrophage infiltration and extracellular matrix accumulation are proportional and progressive, suggesting that M1–M2 switching does not occur spontaneously in this model of DN. In glomeruli of STZ + HFD mice, >80 % of MRP8 signals co-localize with macrophage marker Mac2 (or Lgals3) [5], whereas collecting duct epithelial cells are the main source of MRP8 expression in unilateral ureteral obstruction [76].

In conclusion, a number of epidemiological and experimental studies have revealed that glucotoxicity and lipotoxicity cause synergistic effects upon the development and progression of DN. Macrophages have emerged as a potential contributor for mediating glucolipototoxicity through activation of MRP8/TLR4 signaling in diabetic glomeruli in our experiments. Although further studies are needed to understand regulation and potential role of MRP8/TLR4 signaling, targeting key molecules involved in this pathway may lead to novel therapeutic strategy to combat DN.

Acknowledgments This work was supported in part by Grant-in-Aid for Diabetic Nephropathy and Nephrosclerosis Research from the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan (KM), research grants from the Japanese Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology (TK, KM and MM), from the Japan Foundation for Applied Enzymology (TK), from the Smoking Research Foundation (MM) and from the ONO Medical Research Foundation (TK).

Conflict of interest The authors have declared no competing interest.

Open Access This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License which permits any use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author(s) and the source are credited.

References

- Tolonen N, Forsblom C, Thorn L, Waden J, Rosengard-Barlund M, Saraheimo M, Feodoroff M, Makinen VP, Gordin D, Taskinen MR, Groop PH. Lipid abnormalities predict progression of renal disease in patients with type 1 diabetes. *Diabetologia*. 2009;52:2522–30.
- 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.
- Ravid M, Brosh D, Ravid-Safran D, Levy Z, Rachmani R. Main risk factors for nephropathy in type 2 diabetes mellitus are plasma cholesterol levels, mean blood pressure, and hyperglycemia. *Arch Intern Med*. 1998;158:998–1004.
- Retnakaran R, Cull CA, Thorne KI, Adler AI, Holman RR. Risk factors for renal dysfunction in type 2 diabetes: UK prospective diabetes study 74. *Diabetes*. 2006;55:1832–9.
- 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;55:2256–66.
- Maeda S, Kobayashi MA, Araki S, Babazono T, Freedman BI, Bostrom MA, Cooke JN, Toyoda M, Umezono T, Tarnow L, Hansen T, Gaede P, Jorsal A, Ng DP, Ikeda M, Yanagimoto T, Tsunoda T, Unoki H, Kawai K, Imanishi M, Suzuki D, Shin HD, Park KS, Kashiwagi A, Iwamoto Y, Kaku K, Kawamori R, Parving HH, Bowden DW, Pedersen O, Nakamura Y. A single nucleotide polymorphism within the acetyl-coenzyme A carboxylase beta gene is associated with proteinuria in patients with type 2 diabetes. *PLoS Genet*. 2010;6:e1000842.
- Tang SC, Leung VT, Chan LY, Wong SS, Chu DW, Leung JC, Ho YW, Lai KN, Ma L, Elbein SC, Bowden DW, Hicks PJ, Comeau ME, Langefeld CD, Freedman BI. The acetyl-coenzyme A carboxylase beta (ACACB) gene is associated with nephropathy in Chinese patients with type 2 diabetes. *Nephrol Dial Transplant*. 2010;25:3931–4.
- Murea M, Freedman BI, Parks JS, Antinozzi PA, Elbein SC, Ma L. Lipotoxicity in diabetic nephropathy: the potential role of fatty acid oxidation. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2010;5:2373–9.
- Fazio S, Linton MF. Mouse models of hyperlipidemia and atherosclerosis. *Front Biosci*. 2001;6:D515–25.
- Park L, Raman KG, Lee KJ, Lu Y, Ferran LJ Jr, Chow WS, Stern D, Schmidt AM. Suppression of accelerated diabetic atherosclerosis by the soluble receptor for advanced glycation endproducts. *Nat Med*. 1998;4:1025–31.
- Hou CJ, Tsai CH, Su CH, Wu YJ, Chen SJ, Chiu JJ, Shiao MS, Yeh HI. Diabetes reduces aortic endothelial gap junctions in ApoE-deficient mice: simvastatin exacerbates the reduction. *J Histochem Cytochem*. 2008;56:745–52.
- Fledderus JO, van Oostrom O, de Kleijn DP, den Ouden K, Penders AF, Gremmels H, de Bree P, Verhaar MC. Increased amount of bone marrow-derived smooth muscle-like cells and accelerated atherosclerosis in diabetic apoE-deficient mice. *Atherosclerosis*. 2013;226:341–7.
- Lassila M, Seah KK, Allen TJ, Thallas V, Thomas MC, Candido R, Burns WC, Forbes JM, Calkin AC, Cooper ME, Jandeleit-Dahm KA. Accelerated nephropathy in diabetic apolipoprotein e-knockout mouse: role of advanced glycation end products. *J Am Soc Nephrol*. 2004;15:2125–38.
- Watson AM, Gray SP, Jiaze L, Soro-Paavonen A, Wong B, Cooper ME, Bierhaus A, Pickering R, Tikellis C, Tzorotes D, Thomas MC, Jandeleit-Dahm KA. Alagebrium reduces glomerular fibrogenesis and inflammation beyond preventing RAGE activation in diabetic apolipoprotein E knockout mice. *Diabetes*. 2012;61:2105–13.
- Lopez-Parra V, Mallavia B, Lopez-Franco O, Ortiz-Munoz G, Oguiza A, Recio C, Blanco J, Nimmerjahn F, Egido J, Gomez-Guerrero C. Fcγ receptor deficiency attenuates diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2012;23:1518–27.
- Berault DR, Sharma S, Shi Y, Khan MI, Werstuck GH. Glucosamine-supplementation promotes endoplasmic reticulum stress, hepatic steatosis and accelerated atherogenesis in apoE^{-/-} mice. *Atherosclerosis*. 2011;219:134–40.
- McAlpine CS, Bowes AJ, Khan MI, Shi Y, Werstuck GH. Endoplasmic reticulum stress and glycogen synthase kinase-3β activation in apolipoprotein E-deficient mouse models of accelerated atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012;32:82–91.
- Goldberg IJ, Hu Y, Noh HL, Wei J, Huggins LA, Rackmill MG, Hamai H, Reid BN, Blaner WS, Huang LS. Decreased lipoprotein clearance is responsible for increased cholesterol in LDL receptor knockout mice with streptozotocin-induced diabetes. *Diabetes*. 2008;57:1674–82.
- Spencer MW, Muhlfeld AS, Segerer S, Hudkins KL, Kirk E, LeBoeuf RC, Alpers CE. Hyperglycemia and hyperlipidemia act synergistically to induce renal disease in LDL receptor-deficient BALB mice. *Am J Nephrol*. 2004;24:20–31.
- Sassy-Prigent C, Heudes D, Mandet C, Bélaïr MF, Michel O, Perdureau B, Bariéty J, Bruneval P. Early glomerular macrophage recruitment in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes*. 2000;49:466–75.
- Sauve M, Ban K, Momen MA, Zhou YQ, Henkelman RM, Husain M, Drucker DJ. Genetic deletion or pharmacological inhibition of dipeptidyl peptidase-4 improves cardiovascular outcomes after myocardial infarction in mice. *Diabetes*. 2010;59:1063–73.
- Hazra S, Rasheed A, Bhatwadekar A, Wang X, Shaw LC, Patel M, Caballero S, Magomedova L, Solis N, Yan Y, Wang W, Thinschmidt JS, Verma A, Li Q, Levi M, Cummins CL, Grant MB. Liver x receptor modulates diabetic retinopathy outcome in a mouse model of streptozotocin-induced diabetes. *Diabetes*. 2012;61:3270–9.
- Guilford BL, Ryals JM, Wright DE. Phenotypic changes in diabetic neuropathy induced by a high-fat diet in diabetic C57BL/6 mice. *Exp Diabetes Res*. 2011;2011:848307.
- Zeng XY, Wang YP, Cantley J, Iseli TJ, Molero JC, Hegarty BD, Kraegen EW, Ye Y, Ye JM. Oleonic acid reduces hyperglycemia beyond treatment period with Akt/FoxO1-induced suppression of hepatic gluconeogenesis in type-2 diabetic mice. *PLoS One*. 2012;7:e42115.
- Moitra J, Mason MM, Olive M, Krylov D, Gavrilova O, Marcus-Samuels B, Feigenbaum L, Lee E, Aoyama T, Eckhaus M, Reitman ML, Vinson C. Life without white fat: a transgenic mouse. *Genes Dev*. 1998;12:3168–81.
- Kim JK, Gavrilova O, Chen Y, Reitman ML, Shulman GI. Mechanism of insulin resistance in A-ZIP/F-1 fatless mice. *J Biol Chem*. 2000;275:8456–60.
- Suganami T, Mukoyama M, Mori K, Yokoi H, Koshikawa M, Sawai K, Hidaka S, Ebihara K, Tanaka T, Sugawara A, Kawachi H, Vinson C, Ogawa Y, Nakao K. Prevention and reversal of renal injury by leptin in a new mouse model of diabetic nephropathy. *FASEB J*. 2005;19:127–9.
- Keren P, George J, Keren G, Harats D. Non-obese diabetic (NOD) mice exhibit an increased cellular immune response to glycated-LDL but are resistant to high fat diet induced atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2001;157:285–92.
- Fox TE, Bewley MC, Unrath KA, Pedersen MM, Anderson RE, Jung DY, Jefferson LS, Kim JK, Bronson SK, Flanagan JM,

- Kester M. Circulating sphingolipid biomarkers in models of type 1 diabetes. *J Lipid Res.* 2011;52:509–17.
30. Colombo C, Haluzik M, Cutson JJ, Dietz KR, Marcus-Samuels B, Vinson C, Gavrilova O, Reitman ML. Opposite effects of background genotype on muscle and liver insulin sensitivity of lipotrophic mice. Role of triglyceride clearance. *J Biol Chem.* 2005;278:3992–9.
 31. Breyer MD, Bottinger E, Brosius FC 3rd, Coffman TM, Harris RC, Heilig CW, Sharma K. Mouse models of diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2005;16:27–45.
 32. Brosius FC 3rd, Alpers CE, Bottinger EP, Breyer MD, Coffman TM, Gurley SB, Harris RC, Kakoki M, Kretzler M, Leiter EH, Levi M, McIndoe RA, Sharma K, Smithies O, Susztak K, Takahashi N, Takahashi T. Mouse models of diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2009;20:2503–12.
 33. Qi Z, Fujita H, Jin J, Davis LS, Wang Y, Fogo AB, Breyer MD. Characterization of susceptibility of inbred mouse strains to diabetic nephropathy. *Diabetes.* 2005;54:2628–37.
 34. Agellon LB, Walsh A, Hayek T, Moulin P, Jiang XC, Shelanski SA, Breslow JL, Tall AR. Reduced high density lipoprotein cholesterol in human cholesteryl ester transfer protein transgenic mice. *J Biol Chem.* 1991;266:10796–801.
 35. Nakamuta M, Oka K, Krushkal J, Kobayashi K, Yamamoto M, Li WH, Chan L. Alternative mRNA splicing and differential promoter utilization determine tissue-specific expression of the apolipoprotein B mRNA-editing protein (Apobec1) gene in mice. Structure and evolution of Apobec1 and related nucleoside/nucleotide deaminases. *J Biol Chem.* 1995;270:13042–56.
 36. Prentki M, Corkey BE. Are the beta-cell signaling molecules malonyl-CoA and cystolic long-chain acyl-CoA implicated in multiple tissue defects of obesity and NIDDM? *Diabetes.* 1996;45:273–83.
 37. Brun T, Roche E, Assimacopoulos-Jeannet F, Corkey BE, Kim KH, Prentki M. Evidence for an anaplerotic/malonyl-CoA pathway in pancreatic beta-cell nutrient signaling. *Diabetes.* 1996;45:190–8.
 38. Poitout V, Robertson RP. Minireview. Secondary beta-cell failure in type 2 diabetes—a convergence of glucotoxicity and lipotoxicity. *Endocrinology.* 2002;143:339–42.
 39. Maedler K, Oberholzer J, Bucher P, Spinas GA, Donath MY. Monounsaturated fatty acids prevent the deleterious effects of palmitate and high glucose on human pancreatic beta-cell turnover and function. *Diabetes.* 2003;52:726–33.
 40. El-Asaad W, Buteau J, Peyot ML, Nolan C, Roduit R, Hardy S, Joly E, Dbaibo G, Rosenberg L, Prentki M. Saturated fatty acids synergize with elevated glucose to cause pancreatic beta-cell death. *Endocrinology.* 2003;144:4154–63.
 41. Martinez-Garcia C, Izquierdo A, Velagapudi V, Vivas Y, Velasco I, Campbell M, Burling K, Cava F, Ros M, Oresic M, Vidal-Puig A, Medina-Gomez G. Accelerated renal disease is associated with the development of metabolic syndrome in a glucolipotoxic mouse model. *Dis Model Mech.* 2012;5:636–48.
 42. Yamabe N, Noh JS, Park CH, Kang KS, Shibahara N, Tanaka T, Yokozawa T. Evaluation of loganin, iridoid glycoside from Corni Fructus, on hepatic and renal glucolipotoxicity and inflammation in type 2 diabetic db/db mice. *Eur J Pharmacol.* 2010;648:179–87.
 43. Urano F, Wang X, Bertolotti A, Zhang Y, Chung P, Harding HP, Ron D. Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science.* 2000;287:664–6.
 44. Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, Gorgun CZ, Uysal KT, Maeda K, Karin M, Hotamisligil GS. A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature.* 2002;420:333–6.
 45. Ozcan U, Cao Q, Yilmaz E, Lee AH, Iwakoshi NN, Ozdelen E, Tuncman G, Gorgun C, Glimcher LH, Hotamisligil GS. Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science.* 2004;306:457–61.
 46. Bachar E, Ariav Y, Ketzinel-Gilad M, Cerasi E, Kaiser N, Leibowitz G. Glucose amplifies fatty acid-induced endoplasmic reticulum stress in pancreatic beta-cells via activation of mTORC1. *PLoS One.* 2009;4:e4954.
 47. Lee SJ, Choi SE, Hwang YC, Jung IR, Yi SA, Jung JG, Ku JM, Jeoung K, Han SJ, Kim HJ, Kim DJ, Lee KW, Kang Y. A compound (DW1182v) protecting high glucose/palmitate-induced glucolipotoxicity to INS-1 beta cells preserves islet integrity and improves hyperglycemia in obese db/db mouse. *Eur J Pharmacol.* 2012;696:187–93.
 48. Lu M, Seufert J, Habener JF. Pancreatic beta-cell-specific repression of insulin gene transcription by CCAAT/enhancer-binding protein beta. Inhibitory interactions with basic helix-loop-helix transcription factor E47. *J Biol Chem.* 1997;272:28349–59.
 49. Fontes G, Semache M, Hagman DK, Tremblay C, Shah R, Rhodes CJ, Rutter J, Poitout V. Involvement of Per-Arnt-Sim kinase and extracellular-regulated kinases-1/2 in palmitate inhibition of insulin gene expression in pancreatic beta-cells. *Diabetes.* 2009;58:2048–58.
 50. Zador IZ, Hsieh CC, Papaconstantinou J. Renal CCAAT/enhancer-binding proteins in experimental diabetes mellitus. *Nephron.* 1998;79:312–6.
 51. Zenz R, Eferl R, Kenner L, Florin L, Hummerich L, Mehic D, Scheuch H, Angel P, Tschachler E, Wagner EF. Psoriasis-like skin disease and arthritis caused by inducible epidermal deletion of Jun proteins. *Nature.* 2005;437:369–75.
 52. Yao D, Brownlee M. Hyperglycemia-induced reactive oxygen species increase expression of the receptor for advanced glycation end products (RAGE) and RAGE ligands. *Diabetes.* 2010;59:249–55.
 53. Endoh Y, Chung YM, Clark IA, Geczy CL, Hsu K. IL-10-dependent S100A8 gene induction in monocytes/macrophages by double-stranded RNA. *J Immunol.* 2009;182:2258–68.
 54. Kuruto-Niwa R, Nakamura M, Takeishi K, Nozawa R. Transcriptional regulation by C/EBP alpha and -beta in the expression of the gene for the MRP14 myeloid calcium binding protein. *Cell Struct Funct.* 1998;23:109–18.
 55. Shi H, Kokoeva MV, Inouye K, Tzamelis I, Yin H, Flier JS. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. *J Clin Invest.* 2006;116:3015–25.
 56. Suganami T, Mieda T, Itoh M, Shimoda Y, Kamei Y, Ogawa Y. Attenuation of obesity-induced adipose tissue inflammation in C3H/HeJ mice carrying a Toll-like receptor 4 mutation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;354:45–9.
 57. Kim JK. Fat uses a TOLL-road to connect inflammation and diabetes. *Cell Metab.* 2006;4:417–9.
 58. Pal D, Dasgupta S, Kundu R, Maitra S, Das G, Mukhopadhyay S, Ray S, Majumdar SS, Bhattacharya S. Fetuin-A acts as an endogenous ligand of TLR4 to promote lipid-induced insulin resistance. *Nat Med.* 2012;18:1279–85.
 59. Ix JH, Biggs ML, Mukamal KJ, Kizer JR, Zieman SJ, Siscovick DS, Mozaffarian D, Jensen MK, Nelson L, Ruderman N, Djousse L. Association of fetuin-a with incident diabetes mellitus in community-living older adults: the cardiovascular health study. *Circulation.* 2012;125:2316–22.
 60. Ou HY, Wu HT, Hung HC, Yang YC, Wu JS, Chang CJ. Endoplasmic reticulum stress induces the expression of fetuin-A to develop insulin resistance. *Endocrinology.* 2012;153:2974–84.
 61. Odink K, Cerletti N, Bruggen J, Clerc RG, Tarcsay L, Zwadlo G, Gerhards G, Schlegel R, Sorg C. Two calcium-binding proteins in infiltrate macrophages of rheumatoid arthritis. *Nature.* 1987;330:80–2.
 62. Vogl T, Tenbrock K, Ludwig S, Leukert N, Ehrhardt C, van Zoelen MA, Nacken W, Foell D, van der Poll T, Sorg C, Roth J.

- Mrp8 and Mrp14 are endogenous activators of Toll-like receptor 4, promoting lethal, endotoxin-induced shock. *Nat Med*. 2007;13:1042–9.
63. Croce K, Gao H, Wang Y, Mooroka T, Sakuma M, Shi C, Sukhova GK, Packard RR, Hogg N, Libby P, Simon DI. Myeloid-related protein-8/14 is critical for the biological response to vascular injury. *Circulation*. 2009;120:427–36.
64. Loser K, Vogl T, Voskort M, Lueken A, Kupas V, Nacken W, Klenner L, Kuhn A, Foell D, Sorokin L, Luger TA, Roth J, Beissert S. The Toll-like receptor 4 ligands Mrp8 and Mrp14 are crucial in the development of autoreactive CD8+ T cells. *Nat Med*. 2010;16:713–7.
65. Nguyen MT, Favelyukis S, Nguyen AK, Reichart D, Scott PA, Jenn A, Liu-Bryan R, Glass CK, Neels JG, Olefsky JM. A subpopulation of macrophages infiltrates hypertrophic adipose tissue and is activated by free fatty acids via Toll-like receptors 2 and 4 and JNK-dependent pathways. *J Biol Chem*. 2007;282:35279–92.
66. Solinas G, Vilcu C, Neels JG, Bandyopadhyay GK, Luo JL, Naugler W, Grivennikov S, Wynshaw-Boris A, Scadeng M, Olefsky JM, Karin M. JNK1 in hematopoietically derived cells contributes to diet-induced inflammation and insulin resistance without affecting obesity. *Cell Metab*. 2007;6:386–97.
67. Brown HJ, Lock HR, Wolfs TG, Buurman WA, Sacks SH, Robson MG. Toll-like receptor 4 ligation on intrinsic renal cells contributes to the induction of antibody-mediated glomerulonephritis via CXCL1 and CXCL2. *J Am Soc Nephrol*. 2007;18:1732–9.
68. Allam R, Lichtnekert J, Moll AG, Taubitz A, Vielhauer V, Anders HJ. Viral RNA and DNA trigger common antiviral responses in mesangial cells. *J Am Soc Nephrol*. 2009;20:1986–96.
69. Hagele H, Allam R, Pawar RD, Reichel CA, Krombach F, Anders HJ. Double-stranded DNA activates glomerular endothelial cells and enhances albumin permeability via a toll-like receptor-independent cytosolic DNA recognition pathway. *Am J Pathol*. 2009;175:1896–904.
70. Banas MC, Banas B, Hudkins KL, Wietecha TA, Iyoda M, Bock E, Hauser P, Pippin JW, Shankland SJ, Smith KD, Stoelcker B, Liu G, Grone HJ, Kramer BK, Alpers CE. TLR4 links podocytes with the innate immune system to mediate glomerular injury. *J Am Soc Nephrol*. 2008;19:704–13.
71. Pawar RD, Castrezana-Lopez L, Allam R, Kulkarni OP, Segerer S, Radomska E, Meyer TN, Schwesinger CM, Akis N, Grone HJ, Anders HJ. Bacterial lipopeptide triggers massive albuminuria in murine lupus nephritis by activating Toll-like receptor 2 at the glomerular filtration barrier. *Immunology*. 2009;128:e206–21.
72. Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest*. 2012;1(122):787–95.
73. Ricardo SD, van Goor H, Eddy AA. Macrophage diversity in renal injury and repair. *J Clin Invest*. 2008;118:3522–30.
74. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol*. 2004;25:677–86.
75. Lee S, Huen S, Nishio H, Nishio S, Lee HK, Choi BS, Ruhrberg C, Cantley LG. Distinct macrophage phenotypes contribute to kidney injury and repair. *J Am Soc Nephrol*. 2011;22:317–26.
76. Fujii K, Manabe I, Nagai R. Renal collecting duct epithelial cells regulate inflammation in tubulointerstitial damage in mice. *J Clin Invest*. 2011;121:3425–41.
77. Ito A, Suganami T, Yamauchi A, Degawa-Yamauchi M, Tanaka M, Kouyama R, Kobayashi Y, Nitta N, Yasuda K, Hirata Y, Kuziel WA, Takeya M, Kanegasaki S, Kamei Y, Ogawa Y. Role of CC chemokine receptor 2 in bone marrow cells in the recruitment of macrophages into obese adipose tissue. *J Biol Chem*. 2008;19(283):35715–23.
78. Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest*. 2007;117:175–84.
79. Mahnke K, Bhardwaj R, Sorg C. Heterodimers of the calcium-binding proteins MRP8 and MRP14 are expressed on the surface of human monocytes upon adherence to fibronectin and collagen. Relation to TNF-alpha, IL-6, and superoxide production. *J Leukoc Biol*. 1995;57:63–71.

プログラム・抄録集

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）
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

平成 25 年度 診療水準向上に向けた重症度評価法の開発分科会
第 1 回ワーキンググループ会議

プログラム

日時：平成 25 年 4 月 14 日（日）10：00～12：00
場所：東京国際フォーラム ガラス棟会議室 4 階 G408

研究代表者 和田 隆志

事務局 〒920-8640 金沢市宝町 13 番 1 号
金沢大学医薬保健研究域医学系
血液情報統御学

TEL：076-265-2499 FAX：076-234-4273

E-mail：lab-med@med.kanazawa-u.ac.jp

厚生労働科学研究費補助金
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

平成 25 年度 診療水準向上に向けた重症度評価法の開発分科会
第 1 回ワーキンググループ会議 プログラム
平成 25 年 4 月 14 日 (日)

- | | |
|--------------------|----------------------------|
| 1. 挨拶 | 10:00~10:05
研究代表者 和田 隆志 |
| | 10:05~10:10
分科会長 湯澤 由紀夫 |
| 2. 討議 | |
| I. 診断基準案、評価項目等について | 10:10~10:30
古市 賢吾 |
| II. ディスカッション | 10:30~11:55 |
| 3. 事務連絡
今後の予定 | 11:55~12:00 |

糖尿病性腎症、腎硬化症 スコアシート

施設名	
症例(ID)	
標本番号	
評価日	
評価者	

糖尿病性腎症評価項目

病変部位	病理学的所見の評価項目	Score	Score	Scoreの定義
糸球体病変 (糖尿病性腎症のみ)	びまん性病変(メサンギウム拡大, 基質増加)		0-3	0 メサンギウムの拡大がほとんど無い, 1メサンギウムの拡大 \leq 毛細血管腔, 2メサンギウムの拡大=毛細血管腔, 3 メサンギウムの拡大 \geq 毛細血管腔
	糸球体基底膜二重化・内皮下腔拡大		0-3	最も所見の強い糸球体における二重化の%(係蹄末梢部分で評価):0(<10%), 1(10-25%), 2(25-50%), 3(\geq 50%)
	滲出性病変		0, 1	0(なし), 1(有り)
	結節性病変(結節性硬化)		0, 1	0(なし), 1(有り) 全標本中に一カ所でも有れば, 有りとする, 結節の大きさは問わない
	メサンギウム融解・微小血管瘤		0, 1	0(なし), 1(有り)
糸球体病変 (糖尿病性腎症, 腎硬化症共通)	糸球体門部小血管増生		0, 1	0(なし), 1(有り) 全標本中に一カ所でも有れば, 有りとする
	全節性糸球体硬化		%	全糸球体数に占める全節性糸球体硬化を認める糸球体数の割合
	分節性糸球体硬化		%	全糸球体数に占める分節性糸球体硬化を認める糸球体数の割合
	虚脱・虚血性糸球体硬化		%	全糸球体数に占める虚脱・虚血性糸球体硬化を認める糸球体数の割合
	糸球体肥大		0, 1	250 μ m以上の糸球体 0(なし), 1(有り)
尿管間質病変	間質線維化・尿管萎縮 (IFTA)		0-3	0 (no IFTA), 1 (<25%), 2 (25-50%), 3 (\geq 50%)
(糖尿病性腎症, 腎硬化症共通)	間質の細胞浸潤		0-3	0 (no cell infiltration), 1 (<25%), 2 (25-50%), 3 (\geq 50%)
血管病変	細動脈硝子化		0-3	0 (硝子化なし), 1 (1個以上の細動脈に部分的な硝子化), 2 (50%程度の硝子化), 3 (50%以上の硝子化または, 部分的でも全層性の硝子化)
(糖尿病性腎症, 腎硬化症共通)	動脈硬化		0-2	0 (内膜肥厚なし), 1 (内膜肥厚があり内膜/中膜<1), 2 (内膜肥厚があり内膜/中膜 \geq 1) 動脈硬化の評価にはEVG染色を加えることが望ましい

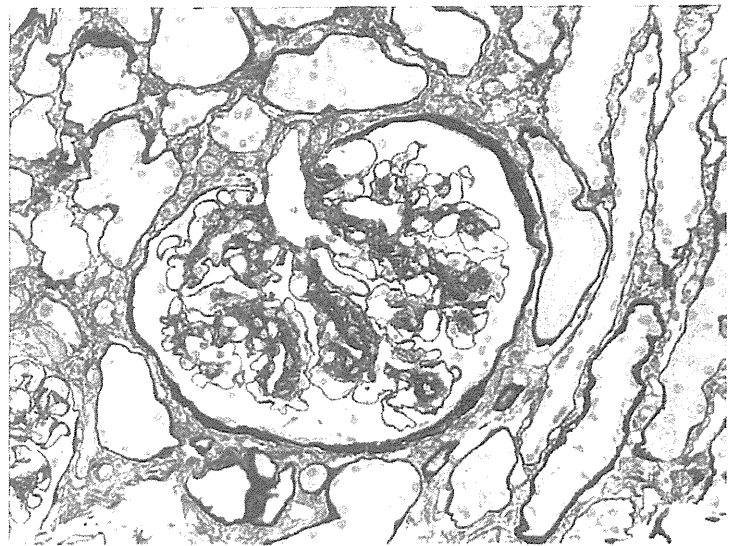
腎硬化症評価項目

病変部位	病理学的所見の評価項目	Score	Score	Scoreの定義
糸球体病変 (糖尿病性腎症, 腎硬化症共通)	全節性糸球体硬化		%	全糸球体数に占める全節性糸球体硬化を認める糸球体数の割合
	分節性糸球体硬化		%	全糸球体数に占める分節性糸球体硬化を認める糸球体数の割合
	虚脱・虚血性糸球体硬化		%	全糸球体数に占める虚脱・虚血性糸球体硬化を認める糸球体数の割合
	糸球体肥大		0, 1	250 μ m以上の糸球体 0(なし), 1(有り)
尿管間質病変	間質線維化・尿管萎縮 (IFTA)		0-3	0 (no IFTA), 1 (<25%), 2 (25-50%), 3 (\geq 50%)
(糖尿病性腎症, 腎硬化症共通)	間質の細胞浸潤		0-3	0 (no cell infiltration), 1 (<25%), 2 (25-50%), 3 (\geq 50%)
血管病変	細動脈硝子化		0-3	0 (硝子化なし), 1 (1個以上の細動脈に部分的な硝子化), 2 (50%程度の硝子化), 3 (50%以上の硝子化または, 部分的でも全層性の硝子化)
(糖尿病性腎症, 腎硬化症共通)	動脈硬化		0-2	0 (内膜肥厚なし), 1 (内膜肥厚があり内膜/中膜<1), 2 (内膜肥厚があり内膜/中膜 \geq 1) 動脈硬化の評価にはEVG染色を加えることが望ましい

◆メサンギウム拡大/メサンギウム基質増加

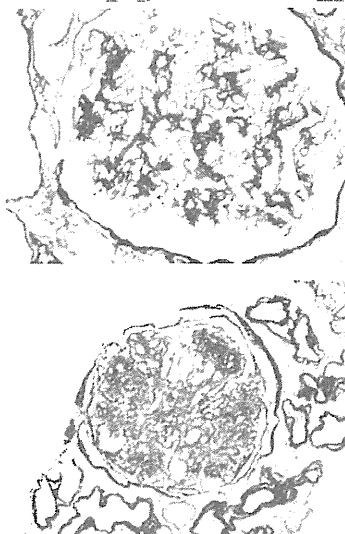
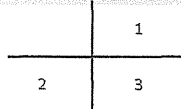
メサンギウムにおける細胞外基質の増加で、
少なくとも2つの分葉においてメサンギウム基質
の幅がメサンギウム細胞の核2個分を超える
(末梢係蹄で評価する)

- 0-3
- 0 メサンギウムの拡大がほとんど無い。
 - 1 メサンギウムの拡大 \leq 毛細血管腔。
 - 2 メサンギウムの拡大=毛細血管腔。
 - 3 メサンギウムの拡大 \geq 毛細血管腔



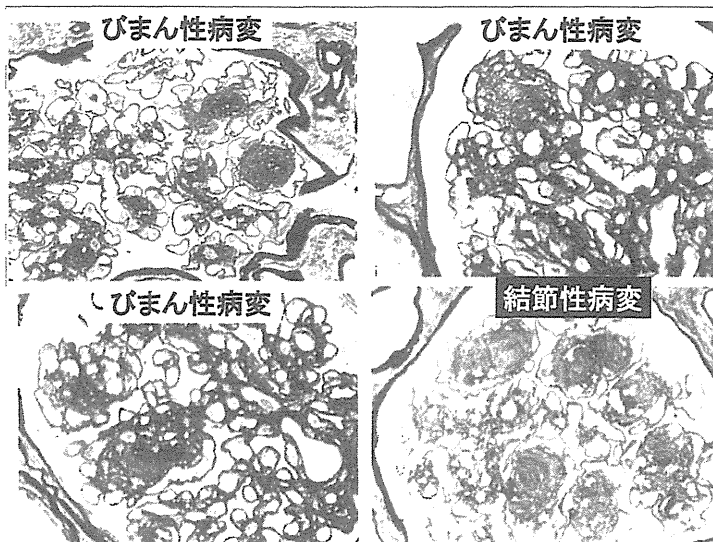
◆メサンギウム拡大

- 0-3
- 0 メサンギウムの拡大がほとんど無い。
 - 1 メサンギウムの拡大 \leq 毛細血管腔。
 - 2 メサンギウムの拡大=毛細血管腔。
 - 3 メサンギウムの拡大 \geq 毛細血管腔



■びまん性病変

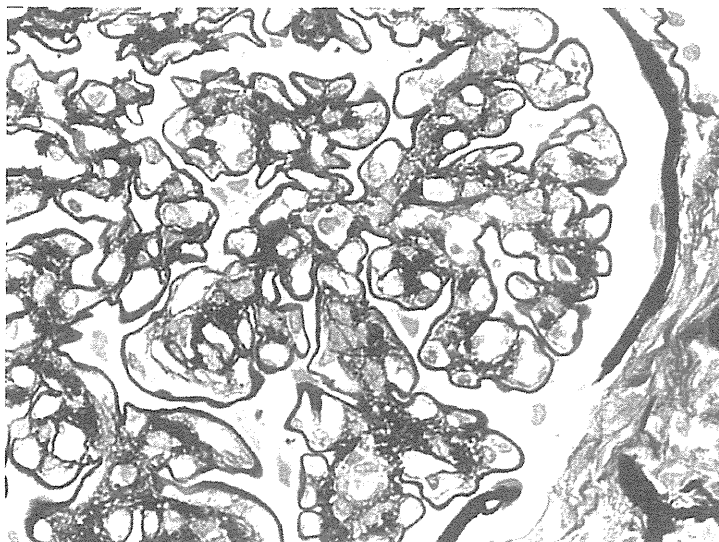
病変の周囲に係蹄が有る場合は結節病変ではなく
びまん性病変とする



◆GBM二重化・内皮下腔開大

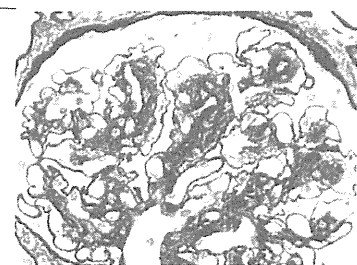
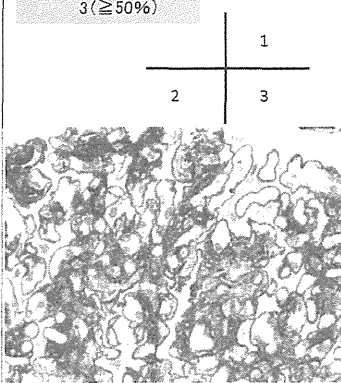
内皮下腔が浮腫状に拡大し、基底膜の新生を
伴い糸球体基底膜が二重の輪郭を示す

- 最も所見の強い糸球体における二重化の%(係蹄末梢部分で評価):
- 0-3
- 0 (<10%),
 - 1 (10-25%),
 - 2 (25-50%),
 - 3 (\geq 50%)



GBM二重化・内皮下腔開大

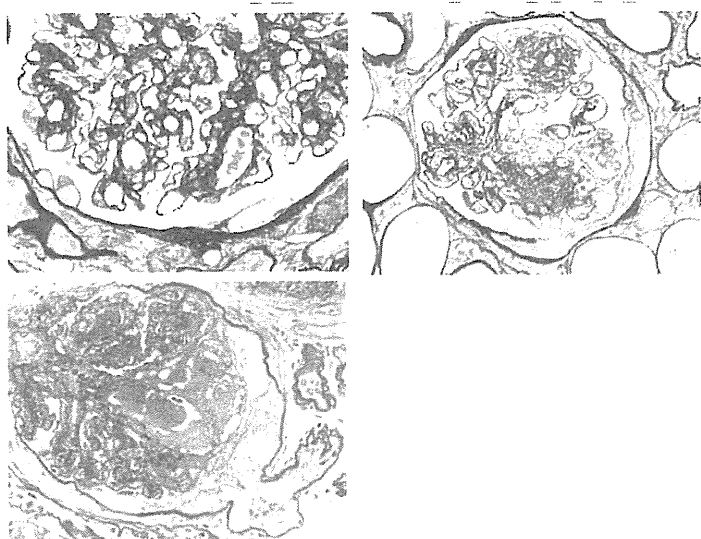
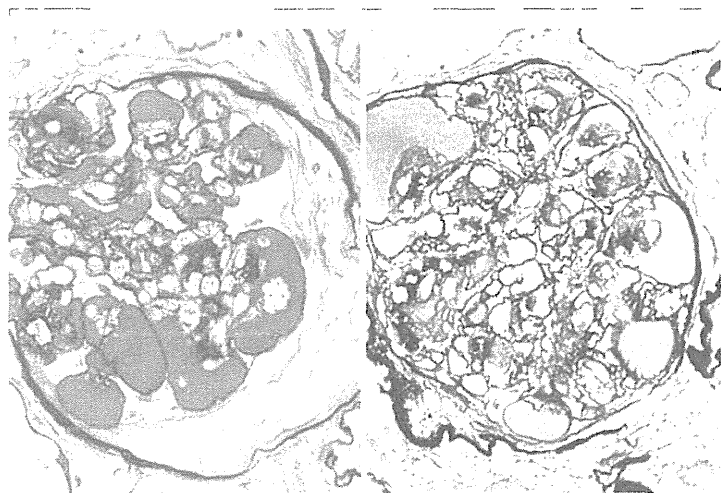
0 (<10%),
1 (10-25%),
2 (25-50%),
3 (≥50%)



◆ 滲出性病変

血漿成分を主体とする無構造な物質が
糸球体の内皮下腔(fibrin cap)ないし
ボウマン嚢壁(capsular drop)に貯留。

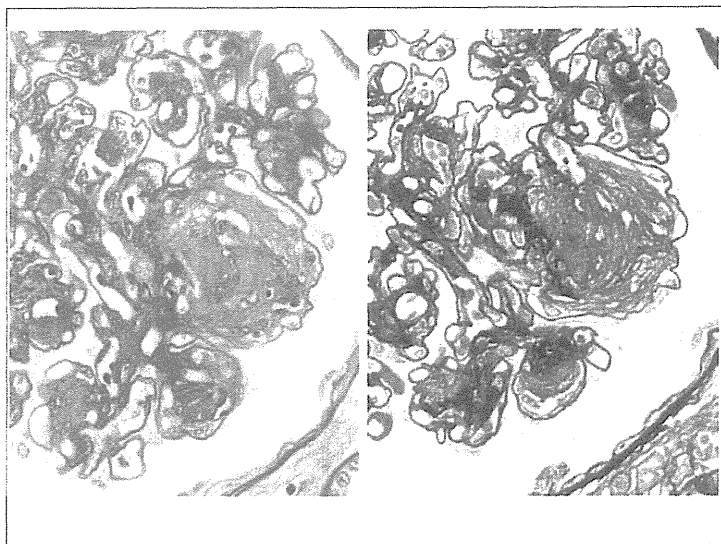
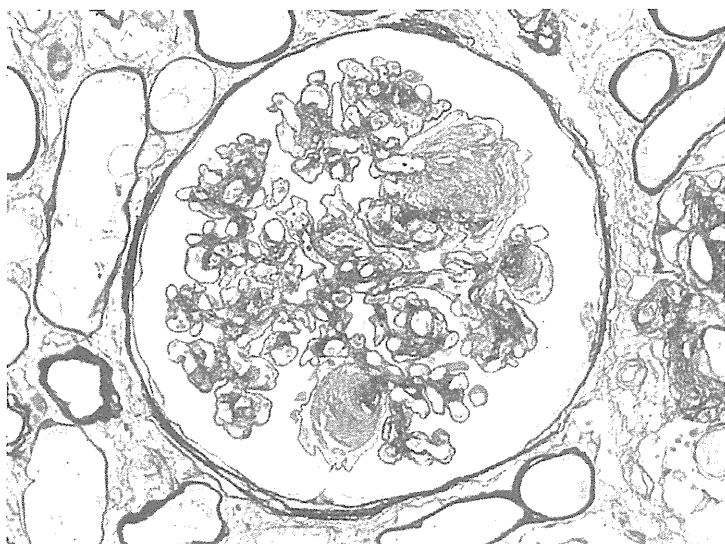
0, 1 0(なし), 1(有り)



◆ 結節性病変

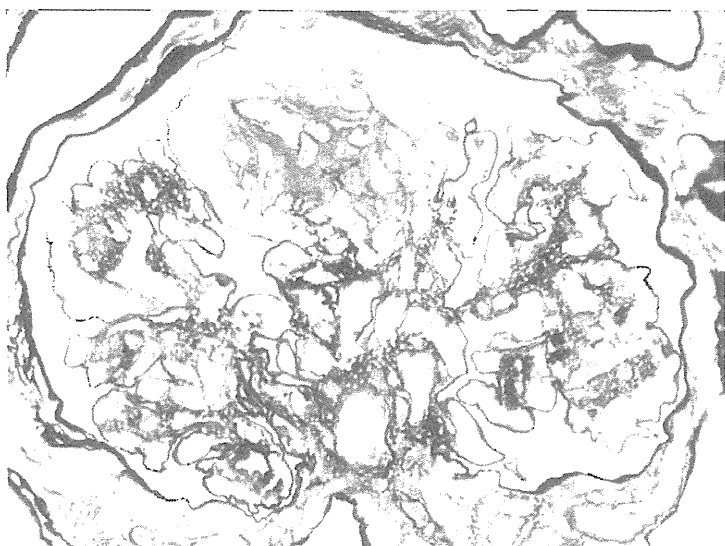
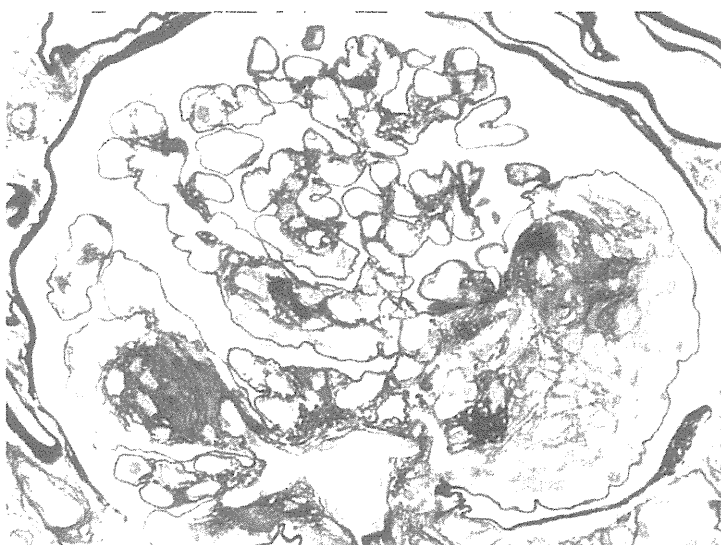
基質が増加しメサンギウム領域が類円形に拡大
本来の係蹄構築が保持されていない(認められない)

0, 1 全標本中に一カ所でも有れば、有りとする。結節の大きさは問わない
0(なし), 1(有り)



◆メサンギウム融解・微小血管瘤

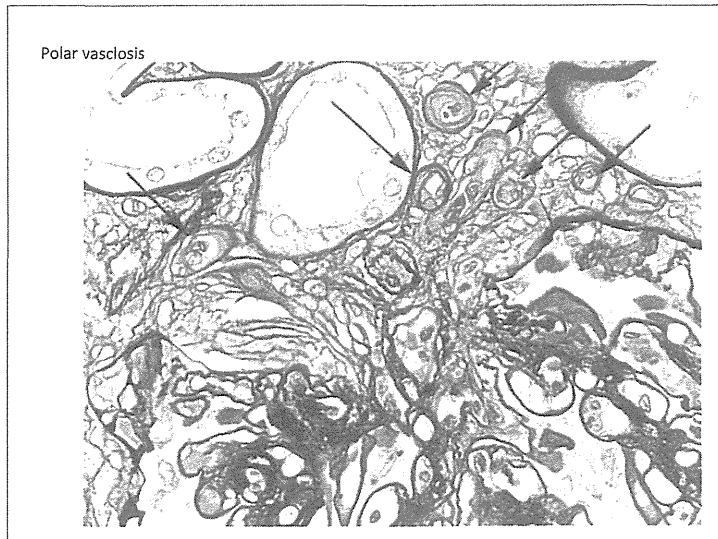
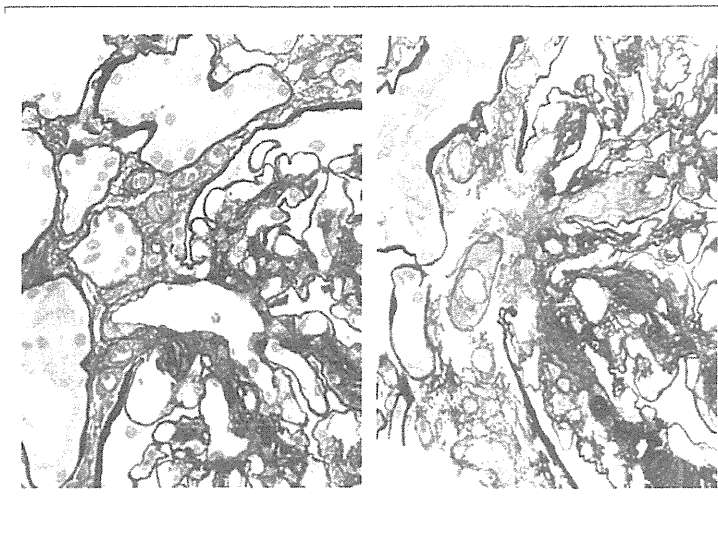
0, 1 0(なし), 1(有り)



◆糸球体門部小血管増生

- 糸球体の門部に輸出入細動脈以外の小血管が増生。
- 血管壁にしばしば硝子化を伴う

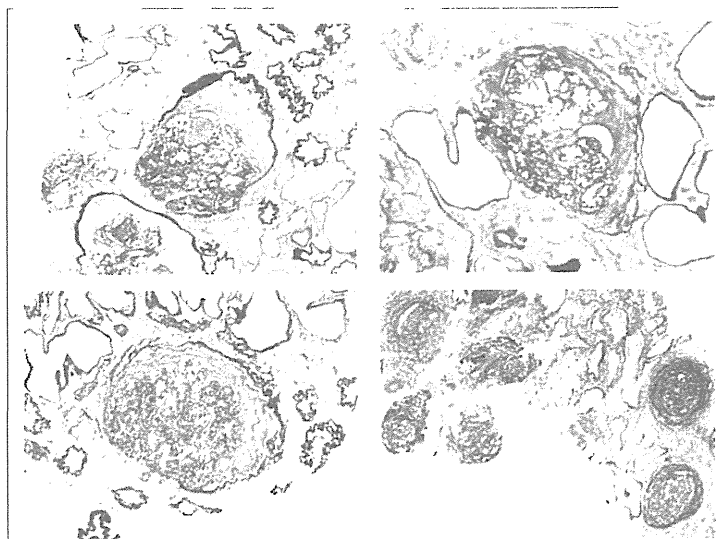
0, 1 全標本中に一カ所でも有れば、有りとする
0(なし), 1(有り)



◆全節性硬化

糸球体のすべての係蹄が硬化
ボウマン腔が開いていない事が指標になる

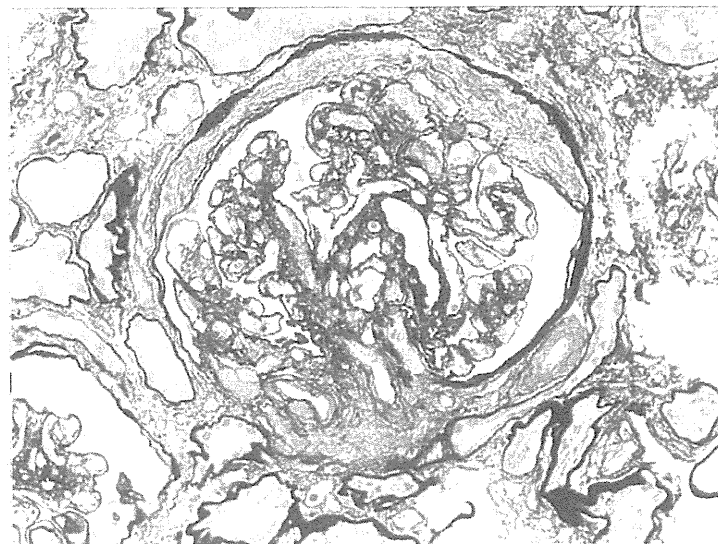
% 全糸球体数に占める全節性糸球体硬化を認める糸球体数の割合



◆分節性硬化

すべての係蹄に及ばない糸球体係蹄の硬化

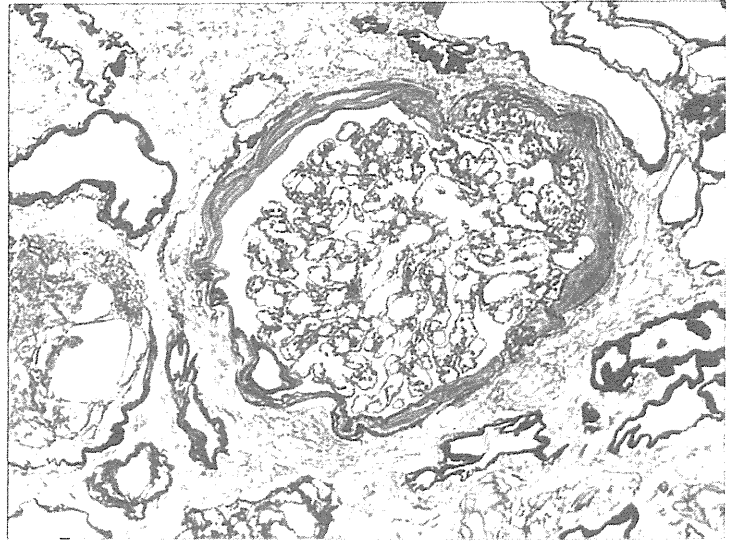
% 全糸球体数に占める分節性糸球体硬化を認める糸球体数の割合



◆虚脱

糸球体毛細血管係蹄が虚脱を示す糸球体

% 全糸球体数に占める虚脱・虚血性糸球体硬化を認める糸球体数の割合



◆糸球体肥大

血管極を通る最大断面において直径が $250\mu\text{m}$ 以上
(通常40倍視野の直径が $500\mu\text{m}$ である)

0.1 250 μm 以上の糸球体
0 (なし), 1 (有り)



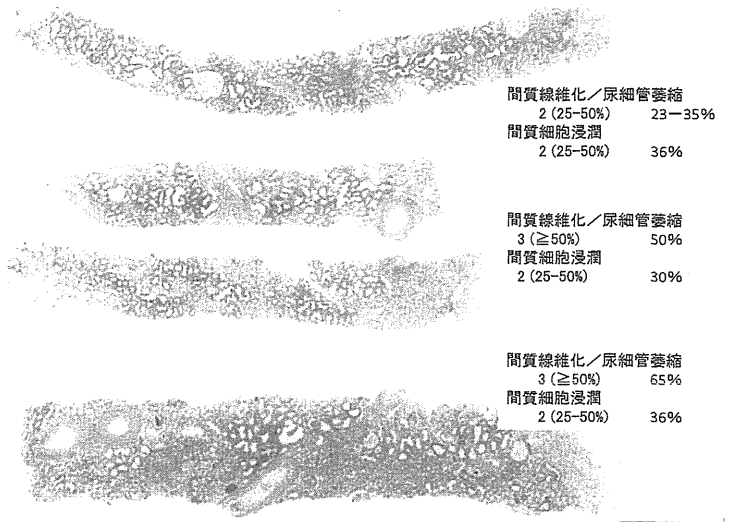
間質線維化／尿管萎縮 (IFTA)

間質線維化／尿管萎縮 (IFTA)

0-3 0 (no IFTA), 1 (<25%), 2 (25-50%), 3 (≥50%)

間質の細胞浸潤

0-3 0 (no cell infiltration), 1 (<25%), 2 (25-50%), 3 (≥50%)



間質線維化／尿管萎縮
2 (25-50%) 23-35%
間質細胞浸潤
2 (25-50%) 36%

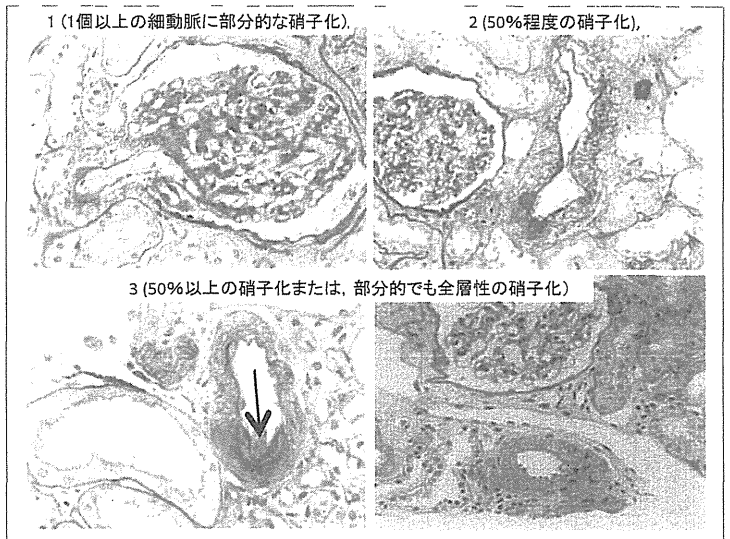
間質線維化／尿管萎縮
3 (≥50%) 50%
間質細胞浸潤
2 (25-50%) 30%

間質線維化／尿管萎縮
3 (≥50%) 65%
間質細胞浸潤
2 (25-50%) 36%

血管病変

細動脈硝子化

0-3 0 (硝子化なし),
1 (1個以上の細動脈に部分的な硝子化),
2 (50%程度の硝子化),
3 (50%以上の硝子化または、部分的でも全層性の硝子化)

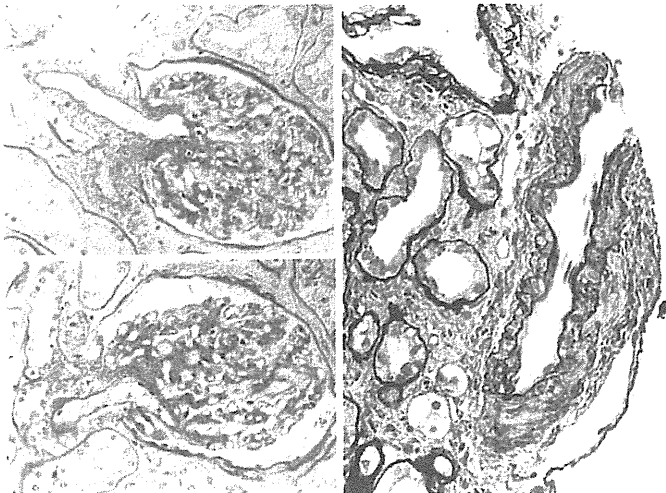


1 (1個以上の細動脈に部分的な硝子化)

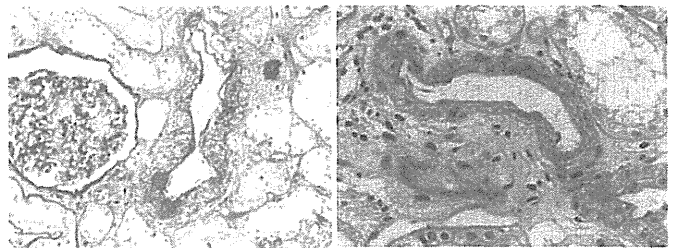
2 (50%程度の硝子化)

3 (50%以上の硝子化または、部分的でも全層性の硝子化)

1 (1個以上の細動脈に部分的な硝子化)

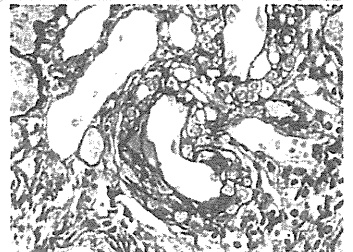


2 (50%程度の硝子化)

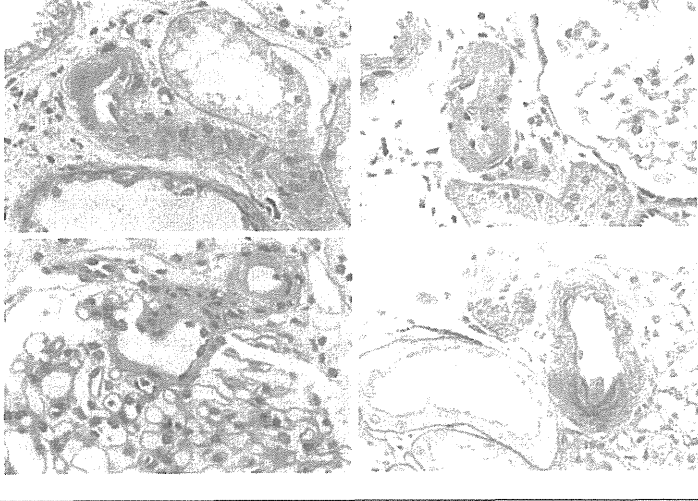


2 (50%程度の硝子化)

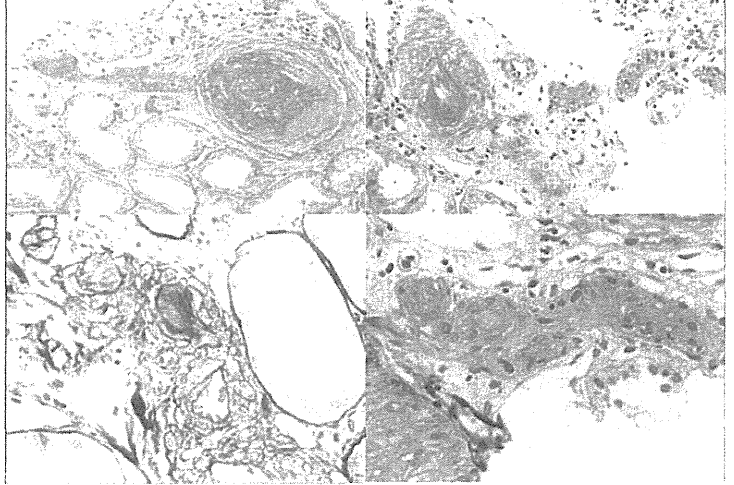
Aah2 banff の定義は2箇以上の動脈に、硝子様沈着物によって変性した平滑筋が置換されている状態、全周性病変はみあたらない。



3 (50%以上の硝子化または、部分的でも全層性の硝子化)



3 (50%以上の硝子化または、部分的でも全層性の硝子化)
全く閉塞している部分もカウントする。硬化系球体につながるものも評価する。



血管病変

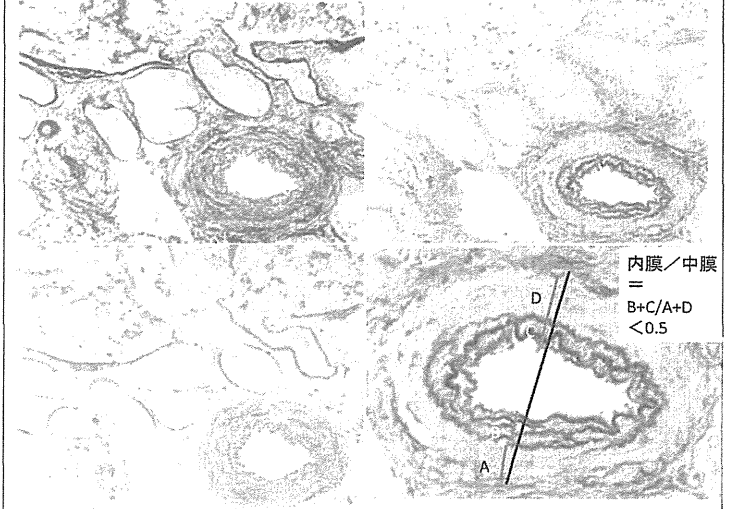
血管腔をまたぐ対側の壁と合わせて評価する。

動脈硬化

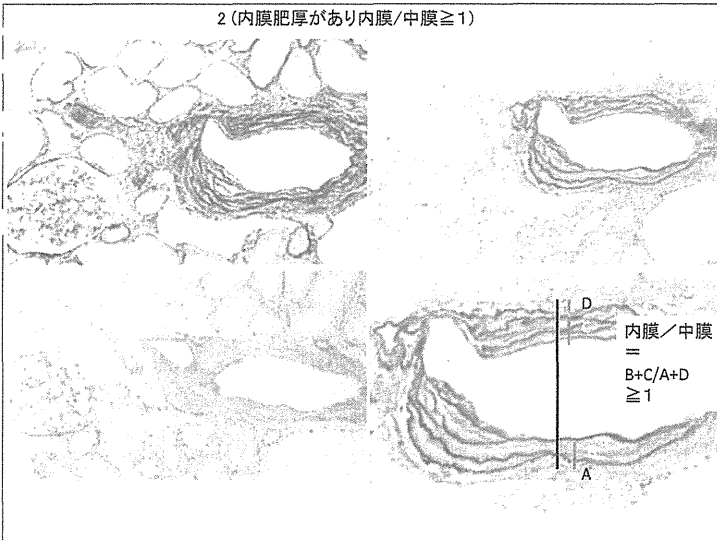
0-2

動脈硬化の評価にはEVG染色を加えることが望ましい
0 (内膜肥厚なし),
1 (内膜肥厚があり内膜/中膜<1),
2 (内膜肥厚があり内膜/中膜≥1)

1 (内膜肥厚があり内膜/中膜<1),



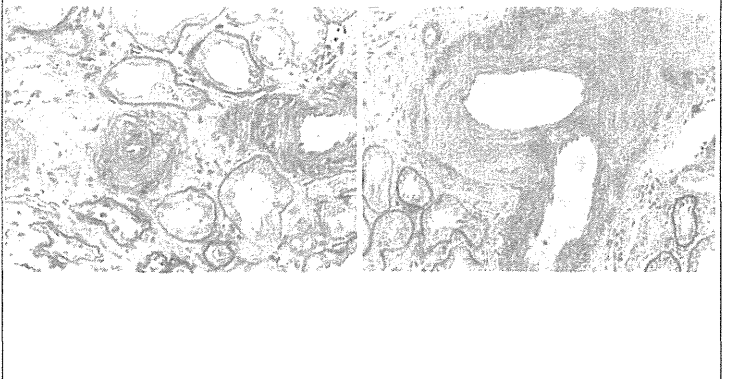
2 (内膜肥厚があり内膜/中膜≥1)



2 (内膜肥厚があり内膜/中膜≥1)

進行した病変では、中膜がほとんど無くなり、内膜だけのようにみえることもある。

分岐直前の血管は評価しない



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）

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

平成 25 年度 第 1 回班会議

プログラム

日時：平成 25 年 4 月 21 日（日）9：00～11：00
場所：東京ステーションコンファレンス 5F 「503B」

研究代表者 和田 隆 志

事務局 〒920-8640 金沢市宝町 13 番 1 号
金沢大学医薬保健研究域医学系
血液情報統御学

TEL：076-265-2499 FAX：076-234-4273

E-mail：lab-med@med.kanazawa-u.ac.jp

厚生労働科学研究費補助金
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

平成 25 年度 第 1 回班会議 プログラム
平成 25 年 4 月 21 日 (日)

1. 挨拶 9 : 00～9 : 10
研究代表者 和田 隆志
日本腎臓学会理事長 松尾 清一

2. 活動計画
- I. 全体研究：糖尿病性腎症症例のレジストリーの運用 9 : 10～9 : 20
清水 美保

- II. 「診療水準向上にむけた重症度評価法の開発」分科会 活動予定 9 : 20～10 : 10
湯澤 由紀夫

- III. 「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 活動予定 10 : 10～10 : 25
木村 健二郎

3. 事務連絡 10 : 25～10 : 30
今後の予定

平成24年度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））
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

1) 研究推進管理委員会

分担研究者：

榎野 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

松尾 清一 名古屋大学大学院医学系研究科 病態内科学講座 腎臓内科学

羽田 勝計 旭川医科大学内科学講座病態代謝内科学分野

協力研究者：

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

2) 全体研究：糖尿病性腎症症例のレジストリーの運用

分担研究者：

全員

協力研究者：

古市 賢吾 金沢大学附属病院血液浄化療法部

3) 分科会名：診療水準向上にむけた重症度評価法の開発

分担研究者：

湯澤 由紀夫 藤田保健衛生大学医学部腎内科学

佐藤 博 東北大学大学院薬学研究科臨床薬学分野

鈴木 芳樹 新潟大学保健管理センター

北村 博司 国立病院機構千葉東病院臨床研究センター腎病理研究部

協力研究者：

荒木 信一 滋賀医科大学内科学講座 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 福井大学医学部病態制御医学講座 腎臓病態内科学領域

上杉 憲子 筑波大学医学医療科 腎血管病理

上田 善彦 獨協医科大学越谷病院 病理部

古波蔵 健太郎 琉球大学大学院医学研究科 循環器・腎臓・神経内科学講座

古家 大祐 金沢医科大学糖尿病・内分泌内科学

四方 賢一 岡山大学病院新医療研究開発センター

中山 昌明 福島県立医科大学医学部腎臓高血圧・糖尿病内分泌代謝内科学講座

西 慎一 神戸大学大学院医学研究科糖尿病・内分泌・腎臓内科学分野腎臓内科学部門

西野 友哉 長崎大学病院第二内科

馬場園 哲也 東京女子医科大学糖尿病センター

原 茂子 虎の門病院腎センター

久野 敏 福岡大学医学部 病理

守屋 達美 北里大学健康管理センター

山縣 邦弘 筑波大学医学医療系臨床医学域腎臓内科学

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

4) 分科会名：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

分担研究者：

木村 健二郎 聖マリアンナ医科大学 腎臓・高血圧内科
丸山 彰一 名古屋大学医学部附属病院 腎臓内科
安部 秀斉 徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部病態情報医学講座腎臓内科学

協力研究者：

森 潔 京都大学大学院医学研究科内科学講座内分泌代謝内科
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

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）

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

和田隆志

平成25年度 第1回班会議
平成25年4月21日（日曜日）

第1回班会議の目標

1. レジストリーの現状の報告と登録の推進
研究経過報告
2. 診療水準向上にむけた重症度評価法の開発
病理診断指針・フローチャート作成へのロードマップ
平成25年度第1回WG（4月14日開催）：定義と病理評価
3. バイオマーカー開発
 - 1) 臨床研究へのアプローチ
 - 2) 各個研究
4. 今後の予定