

orosomuroid, fetuin-Aは既報でシアル酸蛋白質であることが報告されているため、これら3つの尿中マーカーについて糖尿病や腎症の臨床データとの横断的に比較検討を行った。なお α 1-microglobulinは腎臓の間質マーカーとして保険収載されており、またorosomuroidは糖尿病性腎症の尿中マーカーとして報告されているが、尿中fetuin-AについてはELISAによる尿中濃度の検討はまだ報告がない。

アルブミン尿のステージ (A1, A2, A3) の進行に従って、年齢、血清総蛋白、血清アルブミン、血清クレアチニン、尿素窒素、尿酸、HDL-コレステロール、eGFR、尿中アルブミン排泄量 (ACR) は有意差を持って変化した (Kruskal-Wallisテスト) (表1)。さらに α 1-microglobulin, orosomuroid, fetuin-Aの尿中濃度のいずれもが有意差をもってアルブミン尿の病期の進行に従って上昇した (表1、図1)。さらにGFRステージ (G1, G2, G3, G4) の進行に従って、血清総蛋白、血清アルブミン、血清クレアチニン、尿素窒素、尿酸、eGFR、尿中アルブミン排泄量 (ACR) が有意差を持って変化した (Kruskal-Wallisテスト) (表2)。またアルブミン尿病期と同様に、GFRの病期の進行によって α 1-microglobulin, orosomuroid, fetuin-Aの尿中濃度のいずれもが有意差をもって上昇した (表2、図1)。

α 1-microglobulin, orosomuroid, fetuin-Aの尿中濃度は血清クレアチニン、尿素窒素、尿中アルブミン排泄量 (ACR) と正の相関を示し、また血清アルブミン、HDL-コレステロール、eGFRと負の相関を示した (表3、図2)。eGFR、尿中アルブミン排泄量 (ACR)、HDL-コレステロールを独立変数として、尿中 α 1-microglobulin, orosomuroid, fetuin-A排泄量をそれぞれ従属変数として重回帰分析を施行した。尿中 α 1-microglobulin排泄量に関しては、eGFRと尿中微量アルブミン (ACR) が、尿中fetuin-A排泄量に関しては尿中アルブミン排泄量 (ACR) が有意差をもって独立した説明変数であることが示された (表4)。さらに尿中orosomuroid排泄量に関しては、尿中アルブミン排泄量 (ACR) とHDL-コレステロールが有意差をもって独立した説明変数であることが明らかとなった (表4)。

さらにステップワイズ多項ロジスティック解析を施行した。微量アルブミン尿陽性あるいはeGFR 60 mL/min未満に対するリスク因子として尿中 α 1-microglobulin, orosomuroid, fetuin-A排泄量を検討した。ステップ多項ワイズロジスティック解析では微量アルブミン尿陽性あるいはeGFR 60 mL/min未満に対するリスク因子として尿中

fetuin-A排泄量のみが採択された (表5)。

D. 考察

本研究においてシアル酸含有糖蛋白質であるfetuin-Aの尿中排泄量が安定して測定可能であり、かつ糖尿病性腎症の新たな尿中バイオマーカーであることが示された。Fetuin-Aは肝臓より産生される64 kDaの糖蛋白質である。Fetuin-Aは肥満状態で発現が亢進し、それは脂肪細胞におけるアディポネクチンmRNAの発現を抑制して血清アディポネクチン濃度を低下させると報告されている。それによってインスリン抵抗性、糖尿病と腎症の進展が促進されると考えられている。さらにfetuin-Aは遊離脂肪酸(FFA)の担体でありそれがToll-like receptor 4 (TLR4)に結合することも報告されている。FFA-fetuin-A複合体はTLR4受容体を刺激して脂質による炎症を惹起して糖尿病における慢性炎症とそれによるインスリン抵抗性を惹起していると最近報告されている。

糖尿病患者の血中fetuin-A濃度は大血管障害と相関があるという報告がある一方、細小血管障害とは相関がないとの報告や、微量アルブミン尿が陽性の糖尿病患者や動脈硬化の認められる糖尿病では血中fetuin-A濃度が低いとの報告もあり、一定の見解が得られていない。

一方尿中fetuin-A排泄量は尿中アルブミン排泄量 (ACR) と正の相関を呈し、eGFRと負の相関を呈した。また横断研究ではあるが、ステップワイズロジスティック解析では微量アルブミン尿陽性あるいはeGFR 60 mL/min未満に対するリスク因子として尿中fetuin-A排泄量のみが採択された。従って本研究によって糖尿病性腎症の進展を予測するバイオマーカーの候補であることが示された。尿中fetuin-A排泄量の増加は肝臓での産生増加や糸球体毛細血管における透過性、あるいは尿細管の再吸収など複数の要因が関与していると考えられる。

E. 結論

糖尿病性腎症の新規バイオマーカーとしては、haptoglobin, α 2-macroglobulin, apolipoprotein A-I, protein AMBP (α 1-microglobulin), ceruloplasmin, α 1-acid glycoprotein (orosomuroid), α 2-HS-glycoprotein (fetuin-A), angiotensinogenを糖尿病性腎症患者の尿サンプルを用いて測定した。感度以下とならず安定して測定できたのは、 α 1-microglobulin, orosomuroid, fetuin-A, angiotensinogenであった。尿中fetuin-A排泄量は尿中アルブミン排泄量と正の相関を、eGFRと負の相関を示し、新たな糖尿病性腎症の尿中バイオマーカーであると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- ① Nakatsuka A, Wada J, Makino H. Cell cycle abnormality in metabolic syndrome and nuclear receptors as an emerging therapeutic target. *Acta Medica Okayama* 67(3), 129-134, 2013
- ② 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(10): e77118, 2013
- ③ Terami T, Wada J, Inoue K, Nakatsuka A, Ogawa D, Teshigawara S, Murakami K, Katayama A, Eguchi J, Makino H. Urinary angiotensinogen is a marker for tubular injuries in patients with type 2 diabetes. *Int J Nephrol Renovasc Dis* 6, 233-240, 2013

2. 学会発表

- ① 糖尿病性腎症の糖鎖プロファイリングによる新規バイオマーカーの同定(U-CARE 研究) 和田淳、井上謙太郎、中司敦子、江口潤、村上和敏、神崎資子、寺見隆宏、黒瀬祐子、片山晶博、樋口千草、渡邊真由、小川智央、山田雅雄、四方賢一、槇野博史 第 56 回日本腎臓学会学術総会（東京）平成 25 年 5 月 10 日
- ② Vaspin による小胞体ストレス制御と糖尿病性腎症の治療 中司敦子、和田淳、勅使川原早苗、村上和敏、井上謙太郎、寺見隆宏、片山晶博、江口潤、小川大輔、槇野博史 第 56 回日本腎臓学会学術総会（東京）平成 25 年 5 月 10 日
- ③ 糖尿病性腎症における PEMT 阻害の意義 中司敦子、和田淳、渡邊真由、勅使川原早苗、村上和敏、井上謙太郎、寺見隆宏、片山晶博、江口潤、小川大輔、槇野博史 第 56 回日本腎臓学会学術総会（東京）平成 25 年 5 月 11 日
- ④ マウス腎および培養腎細胞における核内受容体の発現と高糖濃度刺激による発現変化の検討 寺見直人、小川大輔、橋洋美、堀口千景、小寺亮、江口潤、中司敦子、和田淳、四方賢一、槇野博史 第 56 回日本腎臓学会学術総会（東京）平成 25 年 5 月 11 日
- ⑤ 嚢胞形成の新規分子機構—ACAM/CLMP 欠

損マウスの解析— 村上和敏、和田 淳、江口潤、中司敦子、佐藤美和、寺見直人、小川大輔、槇野博史 第 56 回日本腎臓学会学術総会（東京）平成 25 年 5 月 12 日

- ⑥ 内臓脂肪蓄積に伴って強発現する膜蛋白 GpnmB の脂肪肝炎抑制効果と可溶性分泌型の関与 片山晶博、和田淳、中司敦子、江口潤、村上和敏、勅使川原早苗、井上謙太郎、寺見隆宏、渡邊真由、樋口千草、肥田和之、四方賢一、槇野博史 第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会（熊本）平成 25 年 5 月 16 日
- ⑦ Vaspin inhibits apoptosis of endothelial cells as ligand for cell-surface GRP78/VDAC complex. J Wada, A Nakatsuka, S Teshigawara, K Murakami, T Terami, K Inoue, A Katayama, C Higuchi, M Watanabe, J Eguchi, H Makino. 第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会（熊本）平成 25 年 5 月 17 日
- ⑧ メタボリックシンドロームにおける Galectin-9-Tim-3 経路の意義 勅使川原早苗、和田淳、神崎資子、江口潤、中司敦子、村上和敏、井上謙太郎、寺見隆宏、片山晶博、槇野博史 第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会（熊本）平成 25 年 5 月 17 日
- ⑨ ACAM (adipocyte adhesion molecule) /CLMP の脂肪分化と肥満症における意義 村上和敏、和田淳、江口潤、中司敦子、寺見隆宏、井上謙太郎、片山晶博、勅使川原早苗、槇野博史 第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会（熊本）平成 25 年 5 月 17 日
- ⑩ 糖尿病マウス腎および高糖濃度刺激下での培養腎細胞における核内受容体の発現解析 寺見直人、小川大輔、橋洋美、堀口千景、小寺亮、江口潤、中司敦子、和田淳、四方賢一、槇野博史 第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会（熊本）平成 25 年 5 月 17 日
- ⑪ 糖尿病性腎症の糖鎖プロファイリングの検討 井上謙太郎、和田淳、小川大輔、中司敦子、江口潤、村上和敏、神崎資子、寺見隆宏、勅使川原早苗、片山晶博、小川智央、山田雅雄、四方賢一、槇野博史 第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会（熊本）平成 25 年 5 月 18 日
- ⑫ メタボリックシンドロームにおける脂肪組織由来血清 miRNA の同定 樋口千草、和田淳、中司敦子、村上和敏、勅使川原早苗、井上謙太郎、寺見隆宏、片山晶博、渡邊真由、江口潤、槇野博史 第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会（熊本）平成 25 年 5 月 18 日
- ⑬ メタボリックシンドロームにおける

phosphatidylethanolamine

N-methyltransferase(PEMT)の意義 中司敦子、和田淳、村上和敏、勅使川原早苗、井上謙太郎、寺見隆宏、片山晶博、渡邊真由、樋口千草、江口潤、槇野博史 第56回日本糖尿病学会年次学術集会(熊本)平成25年5月18日

- ⑭ Nuclear Hormone Receptor Expression in Mouse Kidney and Renal Cell Lines. D Ogawa, J Eguchi, H Tachibana, C Sato-Horiguchi, T. Hatanaka, A Nakatsuka, J Wada, H Makino. ADA 73th Scientific Session. (Chicago) June 22, 2013
- ⑮ Phosphatidylethanolamine N-Methyltransferase (PEMT) Deficiency Protects from Obesity and Insulin Resistance but Promote Steatohepatitis with Tumorigenesis. A Nakatsuka, J Wada, K Murakami, T Terami, J Eguchi, D Ogawa, H Makino. ADA 73th Scientific Session. (Chicago) June 23, 2013
- ⑯ ACAM (Adipocyte Adhesion Molecule) / CLMP Inhibits Adipocyte Hypertrophy in Obesity. K Murakami. J Wada, J Eguchi, D Ogawa, T Terami, N Terami, H Makino. ADA 73th Scientific Session. (Chicago) June 23, 2013
- ⑰ 肥満において Pemt 欠損がもたらす脂肪肝炎とエピゲノム 中司敦子、和田淳、渡邊真由、樋口千草、天田雅文、布上朋和、片山晶博、寺見隆宏、勅使川原早苗、村上和敏、江口潤、

槇野博史 第34回日本肥満学会年次学術集会(東京)平成25年10月12日

- ⑱ 内臓脂肪蓄積に伴って強発現する膜蛋白 Gpmb の脂肪肝炎抑制効果と可溶性分泌型の関与 片山晶博、和田淳、中司敦子、江口潤、村上和敏、勅使川原早苗、寺見隆宏、樋口千草、布上朋和、天田雅文、四方賢一、肥田和之、槇野博史 第34回日本肥満学会年次学術集会(東京)平成25年10月12日

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

- 1. 特許取得
なし
- 2. 実用新案登録
なし

表1 アルブミン尿のステージ (A1, A2, A3) における臨床パラメータの比較 (2型糖尿病患者 n=85)

	A1	A2	A3	Total	Kruskal-Wallis
Number (male/female)	36 (19 / 17)	25 (15 / 10)	24 (15 / 9)	85 (49 / 36)	
Age (years)	63.8±11.3	61.0±12.5	63.3±12.3	62.9±11.3	0.006*
BMI (kg/m ²)	24.8±5.1	25.7±4.5	24.2±3.9	24.9±4.6	0.543
SBP (mmHg)	124.0±12.6	129.5±20.5	126.0±19.7	126.2±17.3	0.484
DBP (mmHg)	73.9±10.3	72.6±8.1	69.1±14.4	72.2±11.1	0.261
HbA1c (%)	7.31±0.64	7.24±0.90	7.38±1.17	7.31±0.87	0.850
Total protein (g/L)	70.4±4.3	70.7±4.8	66.1±6.5	69.3±5.4	0.003*
Albumin (g/L)	42.9±2.5	41.2±3.2	35.7±7.0	40.4±5.3	1.80x10 ^{-16**}
Cr (μmol/L)	66.4±13.3	78.3±26.3	144.2±70.3	91.9±52.3	4.86x10 ^{-10**}
UN (μmol/L)	5.5±1.5	7.1±2.7	10.0±3.8	7.3±3.3	5.92x10 ^{-8**}
Uric acid (μmol/L)	305.8±61.5	352.8±96.2	396.2±68.0	344.6±83.1	9.68x10 ^{-5**}
T-Cho (mmol/L)	5.09±0.94	4.86±0.84	5.06±1.14	4.99±0.97	0.689
TG (mmol/L)	1.65±0.92	1.70±1.10	2.16±1.74	1.81±1.26	0.780
HDL-C (mmol/L)	1.49±0.41	1.35±0.31	1.23±0.39	1.38±0.39	0.031*
LDL-C (mmol/L)	2.85±0.81	2.70±0.65	2.80±0.95	2.79±0.80	0.271
eGFR (mL/min)	74.5±16.3	67.9±19.2	42.4±19.0	63.5±22.4	6.66x10 ^{-9**}
ACR (mg/gCr)	12.7±6.0	114.3±72.6	1424±996	441.2±812	1.81x10 ^{-16**}
Fetuin-A (ng/gCr)	0.40±0.43	0.60±0.53	1.57±1.13	0.79±0.87	7.29x10 ^{-8**}
α1-microglobulin (μg/gCr)	4.24±4.03	6.30±5.12	17.83±18.08	8.68±11.74	8.84x10 ^{-9**}
Orosomuroid (ng/gCr)	17.5±9.1	17.9±8.7	91.4±87.2	38.5±57.0	3.34x10 ^{-8**}

BMI, body mass index; SBP, Systolic Blood Pressure; DPB, Diastolic Blood Pressure; Cr, serum creatinine; UN, serum urea nitrogen; T-Cho, Total cholesterol; TG, Triglyceride; HDL-C, HDL cholesterol; LDL-C, LDL cholesterol; eGFR, estimated glomerular filtration ratio; ACR, albumin / creatinine ratio; *, p < 0.05; **, p < 0.01.

表2 GFR ステージ (G1, G2, G3, G4) における臨床パラメータの比較 (2型糖尿病患者 n=85)

	G1	G2	G3	G4	Total	Kruskal-Wallis
Number (male/female)	9 (6 / 3)	42 (22 / 20)	29 (19 / 10)	5 (2 / 3)	85 (49 / 36)	
Age (years)	51.9±13.9	62.9±10.3	66.5±9.2	59.6±15.3	62.9±11.3	0.647
BMI (kg/m ²)	27.6±8.1	25.1±4.6	24.1±3.1	22.6±2.2	24.9±4.6	0.155
SBP (mmHg)	129.7±13.8	127.6±17.3	124.0±19.1	120.2±11.1	126.2±17.3	0.640
DBP (mmHg)	76.5±13.8	74.6±8.0	69.5±12.4	59.4±9.2	72.2±11.1	0.006
HbA1c (%)	7.54±0.79	7.27±0.83	7.40±0.94	6.68±0.82	7.31±0.87	0.323
Total protein (g/L)	70.4±3.7	70.9±4.4	67.6±6.2	63.0±5.0	69.3±5.44	0.002*
Albumin (g/L)	41.4±4.6	42.3±2.9	38.3±6.6	33.4±5.0	40.4±5.3	1.10x10 ^{-4**}
Cr (μmol/L)	60.9±16.0	65.9±11.6	115.7±40.7	227.1±88.2	91.9±52.3	1.89 x10 ^{-17**}
UN (μmol/L)	5.5±2.2	5.8±1.6	8.6±2.7	14.6±5.1	7.3±3.3	9.85x10 ^{-12**}
Uric acid (μmol/L)	329.1±39.5	312.8±74.4	388.7±82.6	391.4±99.8	344.6±83.1	6.59 x10 ^{-4**}
T-Chol (mmol/L)	5.11±0.96	4.97±0.89	5.06±1.02	4.52±1.39	4.99±0.97	0.695
TG (mmol/L)	2.04±1.30	1.68±1.06	1.95±1.57	1.58±0.63	1.81±1.26	0.487
HDL-C (mmol/L)	1.25±0.26	1.44±0.37	1.32±0.41	1.45±0.51	1.38±0.39	0.427
LDL-C (mmol/L)	2.96±0.95	2.79±0.67	2.83±0.92	2.28±0.87	2.79±0.80	0.740
eGFR (mL/min)	96.2±15.6	74.8±8.1	44.4±9.2	20.6±8.3	63.5±22.4	1.16x10 ^{-30**}
ACR (mg/gCr)	179.7±451.6	108.3±227.7	824.5±0.80	1484±1168	441.2±812	1.09x10 ^{-5**}
Fetuin-A (ng/gCr)	0.39±0.39	0.49±0.45	1.25±1.18	1.34±0.80	0.79±0.87	3.89x10 ^{-4**}
α1-microglobulin (μg/gCr)	3.74±4.26	4.94±4.92	11.90±11.04	30.32±29.93	8.68±11.74	2.49x10 ^{-6**}
Orosomuroid (ng/gCr)	22.5±11.4	19.7±14.8	62.7±84.3	84.4±69.4	38.5±57.0	2.21x10 ^{-3**}

BMI, body mass index; SBP, Systolic Blood Pressure; DPB, Diastolic Blood Pressure; Cr, serum creatinine; UN, serum urea nitrogen; T-Chol, Total cholesterol; TG, Triglyceride; HDL-C, HDL cholesterol; LDL-C, LDL cholesterol; eGFR, estimated glomerular filtration ratio; ACR, albumin / creatinine ratio; *, p < 0.05; **, p < 0.01.

表3 尿中シアル酸糖蛋白質排泄量と臨床パラメータとの単相関（2型糖尿病患者 n=85）

	Fetuin-A (ng/gCr)	α 1-microglobulin (μ g/gCr)	Orosomuroid (ng/gCr)
Age (years)	R=0.009, p=0.937	R=0.123, p=0.261	R=-0.008, p=0.944
BMI (kg/m ²)	R=-0.139, p=0.205	R=-0.067, p=0.541	R=-0.032, p=0.770
SBP (mmHg)	R=0.043, p=0.693	R=-0.005, p=0.964	R=0.103, p=0.348
DBP (mmHg)	R=-0.145, p=0.186	R=-0.214, p=0.049*	R=-0.027, p=0.807
HbA1c (%)	R=0.113, p=0.307	R=0.110, p=0.318	R=0.056, p=0.612
Total protein (g/L)	R=-0.261, p=0.017*	R=-0.275, p=0.012*	R=-0.213, p=0.053
Albumin (g/L)	R=-0.377, p=4.36x10 ^{-4**}	R=-0.376, p=4.67x10 ^{-4**}	R=-0.394, p=2.28x10 ^{-4**}
Cr (μ mol/L)	R=0.368, p=5.23x10 ^{-4**}	R=0.388, p=2.40x10 ^{-4**}	R=0.399, p=1.53x10 ^{-4**}
UN (μ mol/L)	R=0.405, p=1.31x10 ^{-4**}	R=0.439, p=2.96x10 ^{-5**}	R=0.363, p=6.85x10 ^{-4**}
Uric acid (μ mol/L)	R=0.079, p=0.474	R=0.073, p=0.509	R=0.295, p=0.006**
T-Chol (mmol/L)	R=-0.099, p=0.372	R=-0.080, p=0.471	R=0.062, p=0.576
TG (mmol/L)	R=0.060, p=0.582	R=0.055, p=0.615	R=0.186, p=0.088
HDL-C (mmol/L)	R=-0.313, p=0.004**	R=-0.258, p=0.017*	R=-0.244, p=0.025*
LDL-C (mmol/L)	R=-0.007, p=0.948	R=-0.043, p=0.697	R=0.067, p=0.544
eGFR (mL/min)	R=-0.395, p=1.80x10 ^{-4**}	R=-0.472, p=5.23x10 ^{-6**}	R=-0.431, p=3.90x10 ^{-5**}
ACR (mg/gCr)	R=0.548, p=5.76x10 ^{-8**}	R=0.466, p=7.02x10 ^{-6**}	R=0.652, p=1.40x10 ^{-11**}

BMI, body mass index; SBP, Systolic Blood Pressure; DPB, Diastolic Blood Pressure; Cr, serum creatinine; UN, serum urea nitrogen; T-Chol, Total cholesterol; TG, Triglyceride; HDL-C, HDL cholesterol; LDL-C, LDL cholesterol; eGFR, estimated glomerular filtration ratio; ACR, albumin / creatinine ratio; *, p < 0.05; **, p < 0.01.

表4 尿中シアル酸糖蛋白質排泄量を従属変数とした重回帰分析（2型糖尿病患者 n=85）

Dependent variable	Independent variable	Unstandardized coefficient		Standardized coefficient	t value	P value	Adjusted R ²
		B	Standard error	β			
Fetuin-A (ng/gCr)	eGFR (mL/min)	-0.076	0.042	-0.196	-1.813	0.074	0.335
	ACR (mg/gCr)	0.004	0.001	0.395	3.645	4.71x10 ^{-4**}	
	HDL-C (mmol/L)	-4.048	2.035	-0.182	-1.989	0.050	
α1-microglobulin (μg/gCr)	eGFR (mL/min)	-0.138	0.053	-0.263	-2.617	0.011*	0.423
	ACR (mg/gCr)	0.007	0.001	0.461	4.560	4.71x10 ⁻⁵	
	HDL-C (mmol/L)	-1.443	2.548	-0.048	-0.566	0.573	
Orosomuroid (ng/gCr)	eGFR (mL/min)	-0.136	0.212	-0.053	-0.642	0.523	0.605
	ACR (mg/gCr)	0.049	0.006	0.703	8.405	1.19x10 ^{-12**}	
	HDL-C (mmol/L)	-26.65	10.240	-0.183	-2.603	0.011	

Estimated glomerular filtration rate (eGFR), albumin / creatinine ratio and HDL cholesterol (HDL-C) are used as independent variables in stepwise multiple linear regression analysis in model 1. In model 2, all parameters are included in the analysis. *, p < 0.05; **, p < 0.01.

表5 ステップワイズ多項ロジスティック解析による微量アルブミン尿陽性あるいは eGFR 60 mL/min 未満のリスク因子としての尿中シアル酸糖蛋白質排泄量（2型糖尿病患者 n=85）

Risk factor for microalbuminuria	B	Standard error	p	Odds ratio (95% confident intervals)	Predictive accuracy
Fetuin-A (ng/gCr) (1SD increments)	1.784	0.539	9.424x10 ^{-4**}	4.721 (1.881-11.844)	74.1%

Risk factor for GFR < 60 mL/min	B	Standard error	p	Odds ratio (95% confident intervals)	Predictive accuracy
Fetuin-A (ng/gCr) (1SD increments)	1.516	0.434	4.755x10 ^{-4**}	3.739 (1.785-7.841)	72.9%

** , p < 0.01.

図1 アルブミン尿のステージ (A1, A2, A3) および GFR ステージ (G1, G2, G3, G4) における尿中アルブミンおよびシアル酸糖蛋白質排泄量 (2型糖尿病患者 n=85)

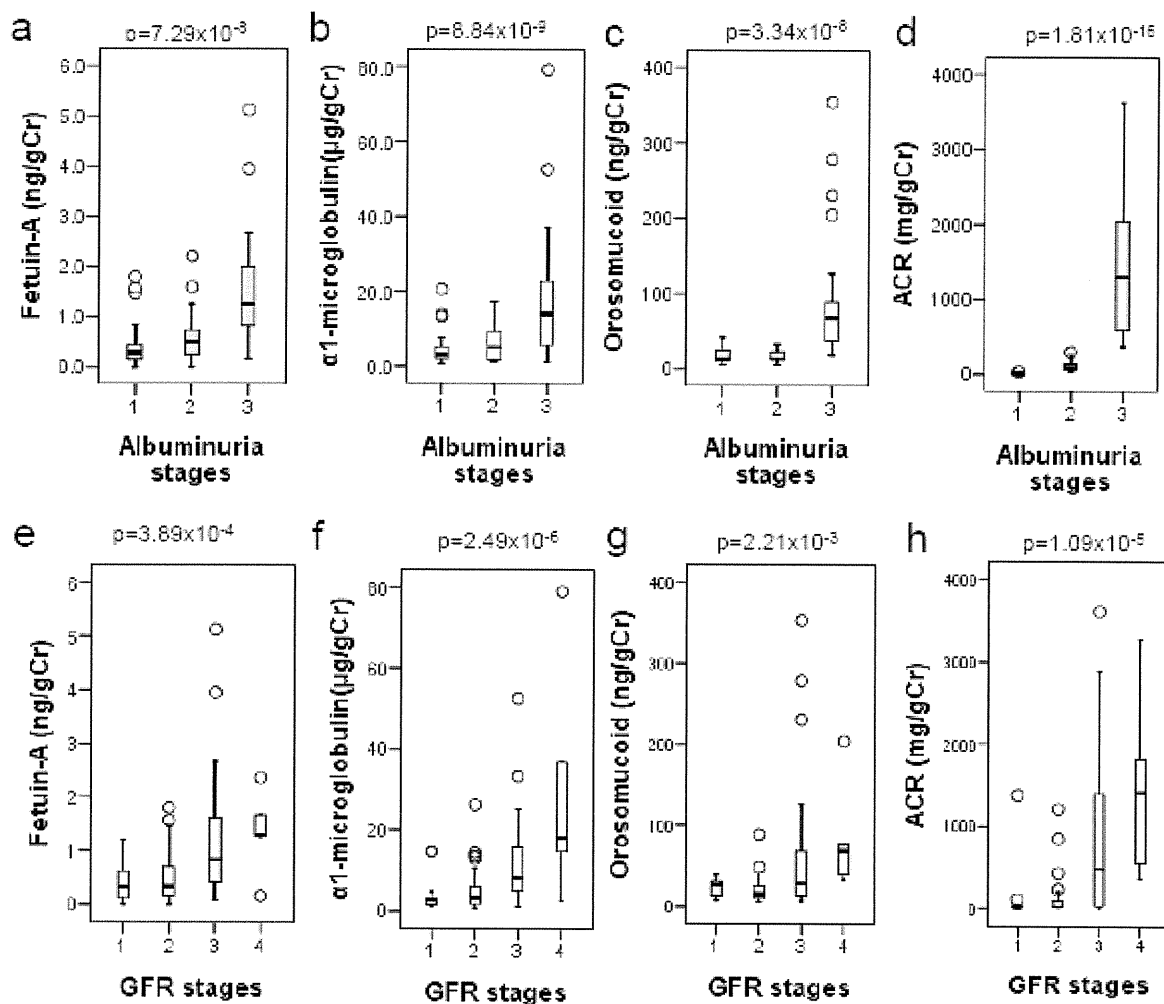
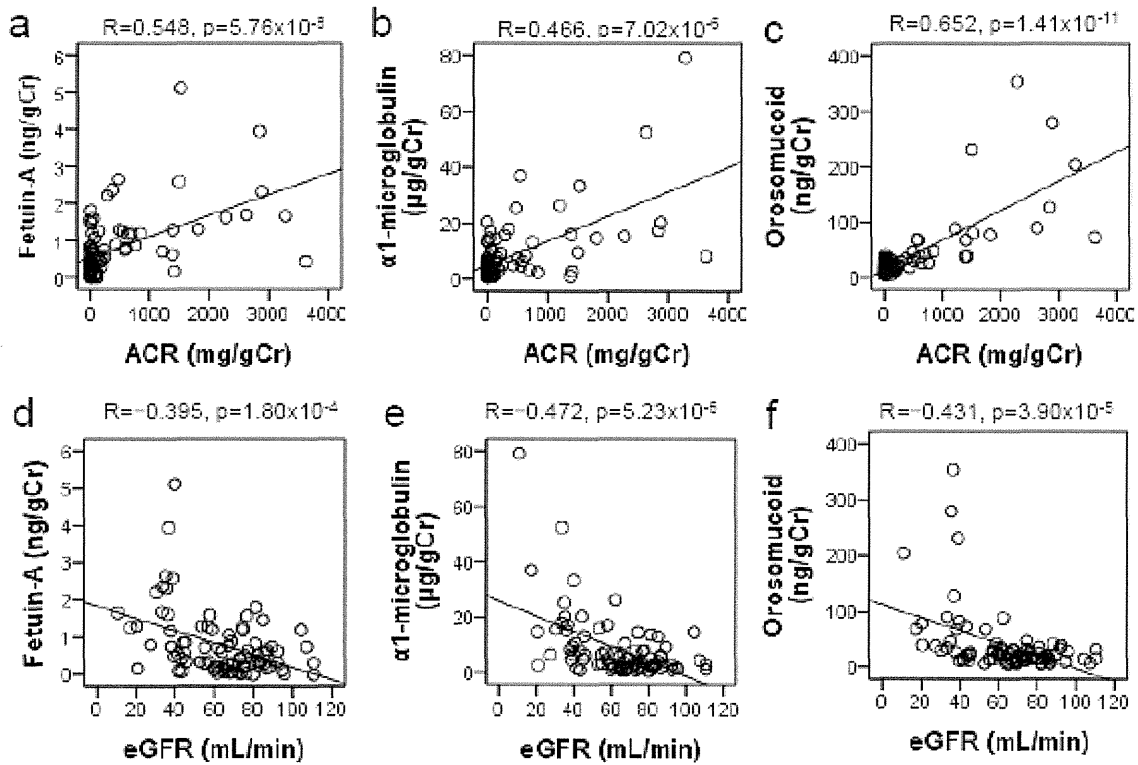


図2 アルブミン尿のステージ (A1, A2, A3) およびGFRステージ (G1, G2, G3, G4) における尿中アルブミンおよびeGFRとシアル酸糖蛋白質排泄量の単相関 (2型糖尿病患者n=85)



新規尿中バイオマーカー同定のための糖尿病患者コホート研究

研究分担者 榎野博史・岡山大学院医歯薬学総合研究科・腎・免疫・内分泌代謝内科学・教授
研究分担者 肥田和之・独立行政法人国立病院機構岡山医療センター・糖尿病・代謝内科・医長
研究分担者 宮下雄博・岡山赤十字病院・総合内科・健診部長
研究分担者 松岡 孝・倉敷中央病院・糖尿病内科・主任部長
研究分担者 安藤晋一郎 岡山市立市民病院・糖尿病センター・副センター長

研究要旨

糖尿病患者のコホート研究を行うことにより、糖尿病性腎症の病期の進展や腎機能低下や末期腎不全への移行を予測し、尿中微量アルブミンを凌駕する新規尿中バイオマーカーを同定することとした。岡山大学病院および岡山県内の7病院で、糖尿病患者のゲノムDNAを平成24年に、血清・尿を平成24-26年度にわたって1年間に一度保存する。725例の症例組み入れがあり、糖尿病性腎症の進展を予測する上で尿中微量アルブミンを凌駕するような新規尿中バイオマーカーの候補としてfetuin Aの意義を確認するに十分な症例数を有するコホート研究が開始できた。平成24-26年度にわたって新規尿中バイオマーカーを測定しその有用性を検証する予定である。

研究分担者

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・教授）、肥田和之（独立行政法人国立病院機構岡山医療センター・糖尿病・代謝内科・医長）、宮下雄博（岡山赤十字病院・総合内科・健診部長）、松岡孝（倉敷中央病院・糖尿病内科・主任部長）、安藤晋一郎（岡山市立市民病院・糖尿病センター・副センター長）

A. 研究目的

レクチンアレイ・レクチンアフィニティークロマトグラフィー・質量解析によって同定された尿中の糖蛋白質は糖尿病性腎症の新規尿中バイオマーカーの候補となる。現在尿中微量アルブミンが糖尿病性腎症の進展を予測するゴールドスタンダードと言えるが、尿中微量アルブミンをゴールドスタンダードとして比較する限りは、それを凌駕するような新規尿中バイオマーカーであるかどうかは判明しない。そこで糖尿病患者のコホート研究を行うことにより、糖尿病性腎症の病期の進展や腎機能低下や末期腎不全への移行を予測し、尿中微量アルブミンを凌駕する新規尿中バイオマーカーを同定することとした。

B. 研究方法

岡山大学病院および岡山県内の7病院で、糖尿病患者のゲノムDNAを平成24年に、血清・尿を平成24-26年度にわたって1年間に一度血清と尿の検体を保存する。これらのサンプルを用いて、

本研究の過程で判明した新規尿中バイオマーカーの測定を行い、糖尿病性腎症の予後判定に有用な因子を同定する予定である。またゲノムDNAについては同定されたバイオマーカーの遺伝子上の一塩基多型(SNPs)の検討を予定している。

倫理面への配慮

本研究に参加される患者には、検体の採取（採血）に伴う肉体的苦痛とその対処法について説明し、文書による承諾書を得た。個人情報については連結可能匿名化を行った後、臨床データについては各々の施設で管理し、尿レクチンアレイや尿バイオマーカー・遺伝子多型情報は岡山大学で管理する。従ってそれぞれの機関から同時に情報が漏洩しない限り、個人と臨床データ・遺伝子多型を特定できない。送付されてきた検体および診療情報等は連結しにくくするためにさらに二重匿名化を行なう。また、情報は非ネット下にて解析し複数（最低3重）の施設下で管理し、指紋認証およびパスワード入力が必要な専用のコンピューターを使用し、複写禁止ソフトをインストールしてプリンター（紙媒体）やUSBなどの媒体に情報を移せないようにした上で関係者のみが情報解析を行う。なお本研究は岡山大学ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会において承認され、さらに7病院の倫理委員会においても承認されている。

C. 研究結果

岡山大学病院および岡山県内の7病院で、平成

24年度に総計725例の症例の組み入れが終了し、患者の血清・尿・ゲノムDNAを保存した。平成25-26年度にわたって1年間に一度血清と尿の検体を保存する予定である。平成25年度は下記の725例中671症例をフォローアップしての検体を採取した。

岡山大学病院	151	例
岡山医療センター	68	例
岡山済生会	49	例
倉敷中央病院	90	例
榊原病院	50	例
津山中央病院	203	例
岡山赤十字病院	100	例
岡山市民病院	14	例
総計	725	例

D. 考察

コホート研究においては725例の症例組み入れがあり、糖尿病性腎症の進展を予測する上で尿中微量アルブミンを凌駕するような新規尿中バイオマーカーの候補としてfetuin Aの意義を確認する為に十分な症例数を有するコホート研究が開始できた。平成24-26年度にわたって新規尿中バイオマーカーとしての尿中fetuin A排泄量を測定しその有用性を検証する予定である。

E. 結論

糖尿病患者コホート研究を用いて、糖尿病性腎症の進展や治療効果を判定できる有用な新規尿中バイオマーカーとしての尿中fetuin A排泄量の意義を確認する予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- ① Nakatsuka A, Wada J, Makino H. Cell cycle abnormality in metabolic syndrome and nuclear receptors as an emerging therapeutic target. *Acta Medica Okayama* 67(3), 129-134, 2013
- ② 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(10): e77118, 2013

- ③ Terami T, Wada J, Inoue K, Nakatsuka A, Ogawa D, Teshigawara S, Murakami K, Katayama A, Eguchi J, Makino H. Urinary angiotensinogen is a marker for tubular injuries in patients with type 2 diabetes. *Int J Nephrol Renovasc Dis* 6, 233-240, 2013
- ④ Fujiwara D, Takahashi K, Suzuki T, Shii M, Nakashima Y, Takekawa S, Yoshida A, Matsuoka T. Postprandial serum C-peptide value is the optimal index to identify patients with non-obese type 2 diabetes who require multiple daily insulin injection: Analysis of C-peptide values before and after short-term intensive insulin therapy. *Journal of Diabetes Investigation* 4(6), 618-625, 2013

2. 学会発表

- ① 糖尿病性腎症の糖鎖プロファイリングによる新規バイオマーカーの同定(U-CARE 研究) 和田淳、井上謙太郎、中司敦子、江口潤、村上和敏、神崎資子、寺見隆宏、黒瀬祐子、片山晶博、樋口千草、渡邊真由、小川智央、山田雅雄、四方賢一、槇野博史 第56回日本腎臓学会学術総会（東京）平成25年5月10日
- ② Vaspin による小胞体ストレス制御と糖尿病性腎症の治療 中司敦子、和田淳、勅使川原早苗、村上和敏、井上謙太郎、寺見隆宏、片山晶博、江口潤、小川大輔、槇野博史 第56回日本腎臓学会学術総会（東京）平成25年5月10日
- ③ 糖尿病性腎症における PEMT 阻害の意義 中司敦子、和田淳、渡邊真由、勅使川原早苗、村上和敏、井上謙太郎、寺見隆宏、片山晶博、江口潤、小川大輔、槇野博史 第56回日本腎臓学会学術総会（東京）平成25年5月11日
- ④ マウス腎および培養腎細胞における核内受容体の発現と高糖濃度刺激による発現変化の検討 寺見直人、小川大輔、橘洋美、堀口千景、小寺亮、江口潤、中司敦子、和田淳、四方賢一、槇野博史 第56回日本腎臓学会学術総会（東京）平成25年5月11日
- ⑤ 嚢胞形成の新規分子機構—ACAM/CLMP 欠損マウスの解析— 村上和敏、和田淳、江口潤、中司敦子、佐藤美和、寺見直人、小川大輔、槇野博史 第56回日本腎臓学会学術総会（東京）平成25年5月12日
- ⑥ 内臓脂肪蓄積に伴って強発現する膜蛋白 Gpnmb の脂肪肝炎抑制効果と可溶性分泌型の関与 片山晶博、和田淳、中司敦子、江口潤、村上和敏、勅使川原早苗、井上謙太郎、

- 寺見隆宏、渡邊真由、樋口千草、肥田和之、四方賢一、槇野博史 第56回日本糖尿病学会年次学術集会（熊本）平成25年5月16日
- ⑦ 2型糖尿病のインスリン分泌の経年低下指標には何が最も役に立つか：断面調査より中井志保、鈴木貴博、和田侑子、志伊真和、中島佑佳子、藤原大介、武川郷、吉田淳、松岡孝、高橋健二 第56回日本糖尿病学会年次学術集会（熊本）平成25年5月16日
- ⑧ 糖尿病心血管系自律神経障害の早期診断における安静時心拍数の重要性 志伊真和、松岡孝、和田侑子、中井志保、中島佑佳子、藤原大介、武川郷、吉田淳、鈴木貴博、高橋健二 第56回日本糖尿病学会年次学術集会（熊本）平成25年5月16日
- ⑨ Vaspin inhibits apoptosis of endothelial cells as ligand for cell-surface GRP78/VDAC complex. J Wada, A Nakatsuka, S Teshigawara, K Murakami, T Terami, K Inoue, A Katayama, C Higuchi, M Watanabe, J Eguchi, H Makino. 第56回日本糖尿病学会年次学術集会（熊本）平成25年5月17日
- ⑩ メタボリックシンドロームにおける Galectin-9-Tim-3 経路の意義 勅使川原早苗、和田淳、神崎資子、江口潤、中司敦子、村上和敏、井上謙太郎、寺見隆宏、片山晶博、槇野博史 第56回日本糖尿病学会年次学術集会（熊本）平成25年5月17日
- ⑪ ACAM (adipocyte adhesion molecule) /CLMP の脂肪分化と肥満症における意義 村上和敏、和田淳、江口潤、中司敦子、寺見隆宏、井上謙太郎、片山晶博、勅使川原早苗、槇野博史 第56回日本糖尿病学会年次学術集会（熊本）平成25年5月17日
- ⑫ 糖尿病マウス腎および高糖濃度刺激下での培養腎細胞における核内受容体の発現解析 寺見直人、小川大輔、橋洋美、堀口千景、小寺亮、江口潤、中司敦子、和田淳、四方賢一、槇野博史 第56回日本糖尿病学会年次学術集会（熊本）平成25年5月17日
- ⑬ 糖毒性患者にインスリン療法導入後、6ヶ月以内に離脱可能を推測させる導入前における内因性インスリン分泌能マーカーの検討 肥田和之、伊勢田泉、太田徹、林恭加、柴田祐助、利根淳仁 第56回日本糖尿病学会年次学術集会（熊本）平成25年5月17日
- ⑭ CSII を施行されている1型糖尿病患者の血糖コントロールに影響を与える因子について 利根淳仁、伊勢田泉、太田徹、林恭加、柴田祐助、真邊香江、藤原喜子、肥田和之 第56回日本糖尿病学会年次学術集会（熊本）平成25年5月17日
- ⑮ 糖尿病性腎症の糖鎖プロファイリングの検討 井上謙太郎、和田淳、小川大輔、中司敦子、江口潤、村上和敏、神崎資子、寺見隆宏、勅使川原早苗、片山晶博、小川智央、山田雅雄、四方賢一、槇野博史 第56回日本糖尿病学会年次学術集会（熊本）平成25年5月18日
- ⑯ メタボリックシンドロームにおける脂肪組織由来血清 miRNA の同定 樋口千草、和田淳、中司敦子、村上和敏、勅使川原早苗、井上謙太郎、寺見隆宏、片山晶博、渡邊真由、江口潤、槇野博史 第56回日本糖尿病学会年次学術集会（熊本）平成25年5月18日
- ⑰ メタボリックシンドロームにおける phosphatidylethanolamine N-methyltransferase (PEMT) の意義 中司敦子、和田淳、村上和敏、勅使川原早苗、井上謙太郎、寺見隆宏、片山晶博、渡邊真由、樋口千草、江口潤、槇野博史 第56回日本糖尿病学会年次学術集会（熊本）平成25年5月18日
- ⑱ メタボリック症候群におけるアルブミン尿と炎症およびインスリン抵抗性についての検討 梶谷展生、四方賢一、石井啓太、平田教至、小寺亮、廣田大昌、和田淳、槇野博史 第56回日本糖尿病学会年次学術集会（熊本）平成25年5月18日
- ⑲ 当院におけるシタグリプチンの使用経験 重松照伸、宮下雄博、岡田震一、藤井総一郎、早川信彦、岡崎守宏 第56回日本糖尿病学会年次学術集会（熊本）平成25年5月18日
- ⑳ 高齢糖尿病患者におけるグリメピリドとシタグリプチン併用症例の検討 宮下雄博、早川信彦 第55回日本老年医学会学術集会（大阪）平成25年6月4日
- ㉑ Nuclear Hormone Receptor Expression in Mouse Kidney and Renal Cell Lines. D Ogawa, J Eguchi, H Tachibana, C Sato-Horiguchi, T Hatanaka, A Nakatsuka, J Wada, H Makino. ADA 73th Scientific Session. (Chicago) June 22, 2013
- ㉒ Phosphatidylethanolamine N-Methyltransferase (PEMT) Deficiency Protects from Obesity and Insulin Resistance but Promote Steatohepatitis with Tumorigenesis. A Nakatsuka, J Wada, K Murakami, T Terami, J Eguchi, D Ogawa, H Makino. ADA 73th Scientific Session. (Chicago) June 23, 2013
- ㉓ ACAM (Adipocyte Adhesion Molecule) /

CLMP Inhibits Adipocyte Hypertrophy in Obesity. K Murakami, J Wada, J Eguchi, D Ogawa, T Terami, N Terami, H Makino. ADA 73th Scientific Session. (Chicago) June 23, 2013

- ②④ 肥満において Pemt 欠損がもたらす脂肪肝炎とエピゲノム 中司敦子、和田淳、渡邊真由、樋口千草、天田雅文、布上朋和、片山晶博、寺見隆宏、勅使川原早苗、村上和敏、江口潤、榎野博史 第 34 回日本肥満学会年次学術集会（東京）平成 25 年 10 月 12 日
- ②⑤ 内臓脂肪蓄積に伴って強発現する膜蛋白 Gpmb の脂肪肝炎抑制効果と可溶性分泌型の関与 片山晶博、和田淳、中司敦子、江口潤、村上和敏、勅使川原早苗、寺見隆宏、樋口千草、布上朋和、天田雅文、四方賢一、肥田和之、榎野博史 第 34 回日本肥満学会年次学術集会（東京）平成 25 年 10 月 12 日
- ②⑥ ビルダグリプチンと速効型インスリン分泌促進薬の併用療法の有用性 木村友香、松岡孝、合田悟、和田美輝、中井志保、和田侑子、三小田亜希子、志伊真和、中島佑佳子、藤原大介、武川郷、鈴木貴博、高橋健二 第 51 回日本糖尿病学会中国四国地方会総会（岡山）平成 25 年 10 月 15 日
- ②⑦ 非肥満 2 型糖尿病に対するインスリン治療選択指標 藤原大介、高橋健二、合田 悟、

和田美輝、木村友香、中井志保、和田侑子、三小田亜希子、志伊真和、中島佑佳子、武川郷、鈴木貴博、松岡 孝 第 51 回日本糖尿病学会中国四国地方会総会（岡山）平成 25 年 10 月 15 日

- ②⑧ 短期入院で決定した肥満 2 型糖尿病に対するインスリン療法の分析 鈴木貴博、合田悟、和田美輝、中井志保、和田侑子、木村友香、三小田亜希子、志伊真和、中島佑佳子、藤原大介、武川郷、松岡孝、高橋健二 第 51 回日本糖尿病学会中国四国地方会総会（岡山）平成 25 年 10 月 15 日
- ②⑨ 高齢発症 1 型糖尿病患者の膵島関連抗体に関する分析 三小田亜希子、松岡孝、藤原大介、武川郷、鈴木貴博、高橋健二 第 25 回日本老年医学会中国地方会（岡山）平成 25 年 11 月 23 日

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし

IV. 研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
松岡孝	糖尿病性足病変とフットケア	中村二郎	Visual 糖尿病臨床のすべて シリーズ 糖尿病性神経障害ー基礎から臨床のすべて	中山書店	東京	2013	188-195
和田淳	慢性腎臓病はなぜ悪い	伊藤浩	冠動脈疾患のパーフェクトマネジメント	南江堂	東京	2013	45-51
松岡孝	糖代謝, 脂質代謝を悪化させないβ遮断薬の選択	伊藤浩	β遮断薬を臨床で生かす!	南江堂	東京	2013	116-118
和田淳	慢性腎臓病患者に使用できるβ遮断薬は?	伊藤浩	β遮断薬を臨床で生かす!	南江堂	東京	2013	102-104

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Nakatsuka A, Wada J, Makino H	Cell cycle abnormality in metabolic syndrome and nuclear receptors as an emerging therapeutic target.	<i>Acta Medica Okayama</i>	67(3)	129-134	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 neohropathy in type 2 diabetes identified by lectin microarray.	<i>PLoS ONE</i>	8(10)	e77118	2013
Terami T, Wada J, Inoue K, Nakatsuka A, Ogawa D, Teshigawara S, Murakami K, Katayama A, Eguchi J, Makino H	Urinary angiotensinogen is a marker for tubular injuries in patients with type 2 diabetes.	<i>Int J Nephrol Renovasc Dis</i>	6	233-240	2013

Fujiwara D,Takahashi K, Suzuki T, Shii M, Nakashima Y, Takekawa S, Yoshida A, Matsuoka T.	Postprandial serum C-peptide value is the optimal index to identify patients with non-obese type 2 diabetes who require multiple daily insulin injection: Analysis of C-peptide values before and after short-term intensive insulin therapy.	<i>Journal of Diabetes Investigation</i>	4(6)	618-625	2013
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	------------------------------------------	------	---------	------

