

森 潔	京都大学大学院医学研究科メディカルイノベーションセンター
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
山本 格	新潟大学大学院医歯学総合研究科附属腎研究施設構造病理学分野
横山 仁	金沢医科大学医学部腎臓内科学
横山 宏樹	自由が丘横山内科クリニック
清水 美保	金沢大学保健管理センター

研究要旨

糖尿病とその合併症である糖尿病性腎症の克服は国民の強い願いであり、医学的、社会的、医療経済に加えて、厚生労働行政の喫緊の課題である。また、透析導入患者の4割以上を占め、透析導入の原疾患の第1位を占める糖尿病性腎症の透析導入患者を減らすことは、増加の一途をたどる透析医療においても重要な課題である。

本研究班では、平成21年度より開始された「糖尿病性腎症例を対象とした予後、合併症、治療に関する観察研究（Japan Diabetic Nephropathy Cohort Study (JDN-CS)）」の運用を引き継ぎ、日本腎臓学会の腎臓病総合レジストリーと密接に連携し、長期に利用可能なデータベースとして、拡充・整備した。本レジストリーは、腎症前期から顕性腎症にいたる幅広い病期の糖尿病性腎症例を対象としており、尿検体の収集ならびに腎生検例が含まれることを特色としている。この臨床・病理所見ならびに尿検体を用いて、本邦の糖尿病性腎症の病態、予後を検討した。

平成26年12月末までに17施設から607例が登録され、腎症前期から顕性腎症まで幅広い病期の症例登録が確認された。また、本研究は定期的な経過観察を行う計画となっており、予後に関するデータを479例より収集した。また、尿検体の保存も進められた。

このレジストリーの取り組みが、糖尿病性腎症の病態解明、予後改善や有効な治療法開発に向けた総合的なシステムの構築につながる可能性がある。今後も経過観察のデータ集積を継続し、日本腎臓学会や関連学会と密接に連携して、本邦の糖尿病性腎症の病態解析や予後評価を行う予定である。本レジストリーは、臨床的、疫学的、ならびに病理学的な研究と密接に関連させて、推進するものとする。さらに、レジストリー登録例の尿検体を用いたバイオマーカー候補の検証も順調に進行している。

A. 研究目的

糖尿病を背景とした糖尿病性腎症例ならびに高血圧や高齢化を背景とした腎硬化症例が増加している。糖尿病性腎症および腎硬化症の克服にむけて、疫学、治療、および予後を把握する必要がある。しかしながら、本邦では、糖尿病性腎症例の実態把握のための症例登録システム（レジストリー）

が整備されておらず、病態の解析や予後調査は未だ不十分である。この課題を解決するために、本研究班では、平成21年度より開始された厚生労働科学研究費補助金腎疾患対策研究事業（課題番号 H21-腎疾患-一般-002 研究代表者 和田隆志）のうち、「糖尿病性腎症例を対象とした予後、合併症、治療に関する観察研究（Japan Diabetic Nephropathy Cohort Study (JDN-CS)）」の

運用を引き継ぎ、日本腎臓学会の腎臓病総合レジストリーと密接に連携して、長期に利用可能なデータベースとして拡充・整備した。これを用いて予後評価、予後関連因子の検討などを行うことにより、病態解明、予後改善や有効な治療法開発につながることを目的とした。

B. 研究方法

平成 21 年度より開始された「糖尿病性腎症例を対象とした予後、合併症、治療に関する観察研究 (Japan Diabetic Nephropathy Cohort Study (JDN-CS))」の運用を継続・拡充し、日本腎臓学会の腎臓病総合レジストリーと密接に連携して、長期に利用可能なデータベースとして整備した。

本レジストリーは、腎症前期から顕性腎症にいたる幅広い病期の糖尿病性腎症例を対象とし、尿検体の収集ならびに腎生検例が含まれることを特色としている。この臨床・病理所見ならびに尿検体を用いて、本邦の糖尿病性腎症の病態、予後を検討した。

検討項目を以下に示す。

1) 登録時および定期的観察点 (半年から 1 年毎) において収集するデータ

患者年齢 (生年)、性別、糖尿病歴 (登録時)、腎生検日、身長、体重、BMI、血圧、網膜症、ヘモグロビン値、血清クレアチニン値、血清総蛋白値、血清アルブミン値、血糖値、ヘモグロビン A1c 値、総コレステロール値、LDL コレステロール値、HDL コレステロール値、中性脂肪値、尿クレアチニン値、尿蛋白値、尿アルブミン値、尿蛋白/尿クレアチニン比、尿アルブミン/尿クレアチニン比。

なお、定期観察点のデータは、前後 2 週間以内のデータを登録可能とした。

2) 治療に関して収集するデータ
糖尿病治療薬、降圧薬、脂質低下薬の投与の有無および種類。

3) 生活習慣に関して収集するデータ
喫煙状況。

4) 予後に関して収集するデータ
最終観察日、最終観察時の血清クレアチニン値、観察終了の理由、死因、透析導入 (日)、心血管イベント (日、内容)。

5) 尿検体の収集に関するデータ
各施設において、登録時ならびに観察期間中に尿検体を収集した際には、採取方法と保存条件を記載する。収集された尿検体は、各施設で保管することとした。

(倫理面への配慮)

本研究にあたっては、ヘルシンキ宣言および厚生労働省の「臨床研究に関する倫理指針」および文部科学省の「疫学研究に関する倫理指針」を遵守した。バイオマーカー検索に用いる尿検体は、医学研究目的に用いられることについて同意を得た対象者より採取し、連結可能匿名化後に保存した。また、本研究の研究計画書は、日本腎臓学会ならびに各施設の臨床研究倫理委員会の承認を受けた。

C. 研究結果

本研究を通じて、尿検体収集を伴う本レジストリー (JDN-CS) は、日本腎臓学会腎臓病総合レジストリーの二次研究として、継続・整備された。

本研究計画は、平成 21 年 7 月に金沢大学医学倫理審査委員会にて承認された。研究計画書は日本腎臓学会のホームページに掲載され、各施設においても倫理委員会の承認を得て、症例登録が開始された。また、平成 22 年 6 月には日本腎臓学会倫理委員会においても承認され、独自に倫理委

委員会の組織を持たない日本腎臓学会会員の施設においても、症例登録が可能となった。

本レジストリーの症例登録期間は、日本腎臓学会倫理委員会の承認を得て、平成26年12月末まで延長され、17施設から607例（男性395例、女性212例、平均年齢64.8歳）が登録された（表1）。尿検体収集は347例、腎生検施行は21例であった（表2）。登録症例の内訳は、腎症前

表1 登録症例数(～2014年12月31日) 607例

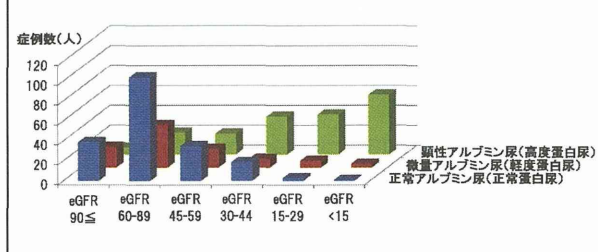
施設名	症例数
金沢大学附属病院	218
岡山大学病院	102
金沢医科大学病院	101
泉が丘内科クリニック	35
みずほ病院	26
徳島大学病院	23
京都大学医学部附属病院	19
福島県立医科大学附属病院	17
大阪市立総合医療センター	16
奈良県立医科大学附属病院	15
加登病院	14
自治医科大学附属病院	4
藤田保健衛生大学病院	4
新潟大学歯学総合病院	3
宮崎大学医学部附属病院	3
内藤内科クリニック	2
久留米大学病院	1
不明	4
計	607例

表2 登録時患者背景と血液検査所見 (n=607)

- ▶ 性別 : 男性 395例, 女性 212例
- ▶ 腎生検施行 : 21例
- ▶ 尿検体収集 : 347例

検査項目	症例数	平均値	標準偏差	最低値	最高値	単位
年齢	606	64.8 ± 11.3	(23 - 93)			歳
糖尿病罹病期間	546	13.8 ± 10.0	(0 - 50)			年
BMI	578	25.2 ± 4.7	(15.0 - 56.4)			kg/m ²
収縮期血圧値	595	130.5 ± 18.9	(80 - 217)			mmHg
拡張期血圧値	595	73.3 ± 12.1	(40 - 124)			mmHg
血清クレアチニン値	582	1.5 ± 1.6	(0.3 - 12.3)			mg/dl
血清総蛋白値	557	6.9 ± 0.8	(3.7 - 8.9)			g/dl
血清アルブミン値	540	3.9 ± 0.7	(1.4 - 6.1)			g/dl
総コレステロール値	453	183.4 ± 44.6	(65 - 370)			mg/dl
LDLコレステロール値	387	103.9 ± 31.8	(23 - 283)			mg/dl
HDLコレステロール値	534	50.9 ± 17.1	(20 - 160)			mg/dl
中性脂肪値	571	140.9 ± 90.6	(29 - 799)			mg/dl
血糖値	591	150.5 ± 60.3	(50 - 431)			mg/dl
ヘモグロビンA1c値	582	6.9 ± 1.4	(4.2 - 13.5)			%
ヘモグロビン値	578	12.6 ± 2.2	(5.4 - 19.1)			g/dl

図1 登録時のアルブミン(蛋白)尿と推算GFR



期から顕性腎症まで幅広い病期の症例が登録されていることが確認された(図1)。

また、本レジストリーでは定期的な経過観察を行う計画となっている。平成26年12月末までに登録された経時データのうち、3年後のデータ(186例)を登録時と比較すると、腎機能や尿アルブミン・尿蛋白排泄量には変化を認めなかったが(図2)、尿アルブミン(尿蛋白)カテゴリーの変化を検討可能であった132例のうち37例(改善16例/増悪21例)、推算GFRカテゴリーの変化を185例のうち54例(改善11例/増悪43例)に認めた(表3)。さらに、予後に関するデータが479例より収集され、イベント発生数は、透析導入45例、心血管疾患発症(狭心症、心筋梗塞、一過性脳虚血発作、脳梗塞、脳出血、足潰瘍)27例、総死亡6例であった。多変量解析では、透析導入関連因子として推算GFR低値とnonHDLコレステロール高値、心血管疾

図2 観察期間3年を経過した症例では、腎機能ならびに尿アルブミン・尿蛋白に変化を認めなかった

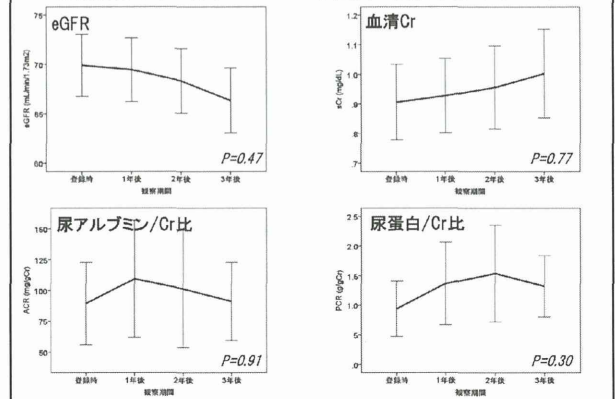


表3 観察期間3年で、尿アルブミン(蛋白)やeGFRカテゴリーが変化した症例が存在 <尿アルブミン(蛋白)カテゴリーの遷化> 解析対象132例

(A1, 85例; A2, 37例; A3, 10例)

改善 16例

●A2→A1 : 12例 (32.4%)

●A3→A2 : 4例 (40%)

増悪 21例

●A1→A2/A3 : 15例 (17.6%)/2例 (2.3%)

●A2→A3 : 4例 (10.8%)

<eGFRカテゴリーの変化> 解析対象185例

(G1, 26例; G2, 106例; G3a, 34例; G3b, 16例; G4, 1例; G5, 2例)

改善 11例

●G2→G1 : 2例 (2.2%)

●G3a→G2 : 6例 (17.6%)

●G3b→G3a : 3例 (18.8%)

増悪 43例

●G1→G2 : 9例 (34.6%)

●G2→G3a/G3b : 19例 (17.9%)/1例 (0.9%)

●G3a→G3b/G4 : 8例 (23.5%)/1例 (2.9%)

●G3b→G4 : 4例 (25%)

●G4→G5 : 1例 (100%)

表4 イベント発生関連因子			
透析導入関連因子: 推算GFR低値, non HDL-C高値			
Parameters	HR	(95% CI)	p
推算GFR低値 (<1mL/min/1.73m ²)	1.09	(1.060 - 1.123)	<0.01
non HDL-C高値 (+1mg/dL)	1.01	(1.003 - 1.019)	<0.01
心血管疾患発症関連因子: 高年齢			
Parameters	HR	(95% CI)	p
年齢(+1歳)	1.07	(1.016 - 1.117)	<0.01
総死亡関連因子: 高年齢			
Parameters	HR	(95% CI)	p
年齢(+1歳)	1.17	(1.036 - 1.317)	<0.05
※共変量: 年齢, 性別, 推算GFR, 微量アルブミン尿(軽度蛋白尿), 顕性アルブミン尿(高度蛋白尿), ヘモグロビンA1c, BMI, 収縮期血圧, 拡張期血圧, non HDLコレステロール, HDLコレステロール, 中性脂肪, ヘモグロビン			

患発症ならびに総死亡の関連因子として高年齢が抽出された (表 4)。

D. 考察

本研究において、尿検体収集ならびに腎生検例が含まれた長期経過観察可能な特色ある糖尿病性腎症レジストリーの運用が継続・拡充された。症例登録は、当初の予定通り、腎症前期から顕性腎症に至る幅広い病期の糖尿病性腎症の実態を把握する形で進められた。また、本レジストリーで収集された尿検体を用いて、バイオマーカー候補の検証も順調に進行している。本レジストリーの取り組みが、糖尿病性腎症の病態解明、予後改善や有効な治療法開発に向けた総合的なシステムの構築につながる可能性がある。今後も経時データの集積を継続し、日本腎臓学会や関連学会と密接に連携して、本邦の糖尿病性腎症の病態解析、予後評価を行う予定である。すでに登録時データを論文化 (Furuichi 他: Clin Exp Nephrol 2013) しており、今後は平成 26 年度末までの経時的データによる予後解析結果の論文化を予定している。

E. 結論

尿検体収集ならびに腎生検例が含まれた長期経過観察可能な、本邦の特色ある糖尿病性腎症レジストリーの運用が継続・拡充された。症例登録は 607 例であり、現在

までに約 5 年の経過観察を行っている。当初の予定通り、腎症前期から顕性腎症に至る幅広い病期の糖尿病性腎症の実態を把握する形で進められた。すでに登録時データを論文化しており、今後は予後解析結果の論文化を予定している。また、本レジストリーで収集された尿検体を用いて、バイオマーカー候補の検証も順調に進行している。今後も引き続き、レジストリー例の経過観察とバイオマーカー研究を進展させる予定である。本レジストリーの取り組みが、糖尿病性腎症の病態解明、予後改善や有効な治療法開発に向けた総合的なシステムの構築につながる可能性がある。

F. 研究発表

総合研究報告を参照

G. 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

【分科会：診療水準向上にむけた重症度評価法の開発】

厚生労働科学研究費補助金難治性疾患等克服研究事業
(難治性疾患等実用化研究事業(腎疾患実用化研究事業))

分担研究報告書

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

【研究課題名】 診療水準向上にむけた重症度評価法の開発

【研究分担者】

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	千葉東病院臨床研究センター 腎病理研究部

【研究協力者】

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 病理診断科
乳原 善文	虎の門病院分院 腎センター内科・リウマチ膠原病科
古波蔵 健太郎	琉球大学医学部附属病院 第三内科
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腎臓・免疫内科学分野腎臓内科学部門
西野 友哉	長崎大学病院腎臓内科
馬場園 哲也	東京女子医科大学糖尿病センター
原 茂子	原プレスセンタークリニック
久野 敏	福岡大学医学部 病理
守屋 達美	北里大学医学部内分泌代謝内科学
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

研究要旨

糖尿病性腎症は維持透析療法に導入される原疾患で最多である。また、高血圧などに伴う腎硬化症は慢性糸球体腎炎に次いで3番目であるが、高齢社会を反映して近年増加傾向にある。糖尿病性腎症および高血圧性腎硬化症の診療水準の向上と診断の標準化は、病態の理解とともに進展を阻止する上で有益である。本分科会ではこれらの背景を踏まえ、腎生検および各種検査結果を用い、糖尿病性腎症および高血圧性腎硬化症の臨床を裏付ける病理像の特長、進展と関連する臨床病理学的因子の抽出と理解、予後解析と関連因子の同定を行うことを目的とした。

全国13施設より、高血圧性腎硬化症163例、糖尿病性腎症367例合計530例の病理表本データおよび臨床データを収集した。糖尿病性腎症および高血圧性腎硬化症の病理表本に関しては、当班会議で作製した、図譜を伴う病理評価法の判定基準に従って判定した。これら病理学的所見および臨床データから、腎予後、心血管イベント、生命予後に関する臨床病理学的因子の特定をおこなった。また、腎生検をしない症例も診断可能な臨床診断フローチャートの作成も試みた。

本分科会の総括として、「糖尿病性腎症・高血圧性腎硬化症の病理診断への手引」を作成した。本手引きの作成に関しては、会議での議論各執筆者の校正を行った。また、事務局にて全体の構成の統一を図るための調整を行った。平成26年12月に完成した。

糖尿病性腎症のデータ解析に関しては、356例のデータ解析を行い論文文化に向けて準備中である。平均観察期間は76.3ヶ月、169例に腎複合イベント（透析導入、Cr倍化、eGFR半減）、94例に腎死、34例に心血管イベント、30例に死亡が認められた。このうち、腎複合イベントおよび腎死はタンパク尿増加およびeGFR低下に従い発症頻度が増加する事が確認された。特に、タンパク尿が少なく、腎機能が保持されているCKD分類G1-3 a A1-2の症例において基底膜二重化および間質細胞浸潤が腎複合イベントの、糸球体肥大が心血管イベントの危険因子であった。

また、4つの病理学的あるいは臨床学的因子（基底膜二重化または結節病変の有無、間質細胞浸潤の有無、eGFR 60 ml/min/1.73 m²未満、タンパク尿1.0 g/gCr以上）でスコア化した場合、腎複合イベントおよび腎死の100人年で表す発症頻度を的確に表す事を確認した。

高血圧性腎硬化症に関しては、IFTA、細胞浸潤、硝子化が生検時および最終観察時のeGFRと相関した。これらの因子のうち細胞浸潤は、年齢、BMI、血圧の影響を受ける事が確認された。高血圧性腎硬化症に関しては、腎イベント、心血管イベント、死亡などの発症頻度が低く、それらに関する因子を抽出する事は出来なかった。

くわえて、腎生検が施行出来ない症例の診断にツールとして、糖尿病性腎症ならびに高血圧性腎硬化症に関して、臨床的に診断可能なフローチャートを作成した。これらを通じて、今後の糖尿病性腎症ならびに高血圧性腎硬化症の診療水準向上と重症化防止につながることが期待される。

A. 研究目的

「わが国の慢性透析療法の現況 2013（日本透析医学会）」によると、糖尿病性腎症は維持透析療法に導入される原疾患で最多である。高血圧などに伴う腎硬化症は慢性糸球体腎炎に

次いで3番目であるが、高齢社会を反映して近年増加傾向にある。

この糖尿病性腎症および高血圧性腎硬化症の診療水準の向上と診断の標準化は、病態の理解とともに進展を阻止する上で有益である。さらに、患者の健康寿命の延伸、生命予後の

改善、透析医療に費やされている医療費の削減をはじめ国民の福祉向上に寄与する可能性があり、その社会貢献度は高いと考える。しかし、いずれの疾患も、慢性糸球体腎炎に比べて日常臨床上腎生検が行われることが稀であり、臨床の発症・進展を裏付ける腎病理学的な知見が少ない。この臨床病態や予後を反映する病理所見が明確になることにより、かかる疾患の重症化防止および診療水準の向上に対する対策を構築することが可能となる。

本分科会ではこれらの背景を踏まえ、臨床上必要であると判断され施行された、腎生検および各種検査結果を用い、糖尿病性腎症および高血圧性腎硬化症の臨床を裏付ける病理像の特長、進展と関連する臨床病理学的因子の抽出と理解、予後解析と関連因子の同定を行うことを目的とした。最終的に、糖尿病性腎症および高血圧性腎硬化症の診療水準向上に向けた病理診断への手引きの作成、診断のための臨床的フローチャートの作成により重症度評価法の開発を目指した。

B. 研究方法

全国 13 施設より、高血圧性腎硬化症 163 例、糖尿病性腎症 367 例合計 530 例の病理表本データおよび臨床データを収集した、糖尿病性腎症および高血圧性腎硬化症の病理表本に関しては、当班会議で作製した、図譜を伴う病理評価法の判定基準に従って判定した（表 1）。代表的な病理所見を図 1 に示す。これら病理学的所見および臨床データから、腎予後、心血管イベント、生命予後に関する臨床病理学的因子の特定をおこなった。また、腎生検を施行出来な

い症例に対して、臨床的に糖尿病性腎症および高血圧性腎硬化症を診断するための臨床的フローチャートを作成した。

（倫理面への配慮）

本研究にあたっては、ヘルシンキ宣言および文部科学省・厚生労働省・経済産業省の「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」、厚生労働省の「臨床研究に関する倫理指針」および文部科学省の「疫学研究に関する倫理指針」を遵守して行った。

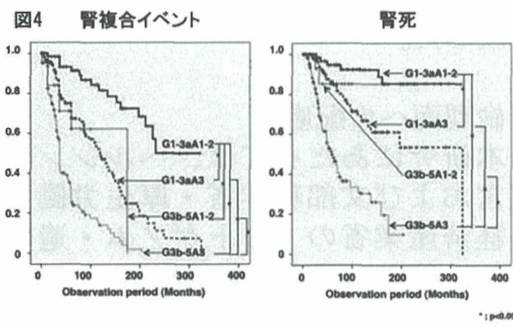
承認時までにはすでに腎生検施行済みの過去の症例に関しては、臨床データおよび組織画像データとして取り扱い、連結可能匿名化後に保存した。また、各研究の分担研究者は、臨床研究のプロトコールを作成し、各施設の臨床研究倫理委員会の承認を受けた。

個人遺伝子情報に関する保護と管理についても上記の倫理指針を遵守して行った。データはすべて連結可能匿名化とし、個人識別に関するデータは個人識別情報管理分担者が管理することとした。データは専用コンピュータにて一括管理し、データアクセスは研究従事者がパスワードを用いて行う事とした。

C. 研究結果

本分科会の総括として、「糖尿病性腎症と高血圧性腎硬化症の病理診断への手引き」を作成した。本手引きの作成に関しては、会議での議論各執筆者の校正を行った。また、事務局にて全体の構成の統一を図るための調整を行った。現在校正中であり、平成26年12月に発行予定である（最終PDF別添）。

糖尿病性腎症のデータ解析に関しては、356例のデータ解析を行い論文



化に向けて準備中である。平均観察期間は76.3ヶ月、169例に腎複合イベント（透析導入、Cr倍化、eGFR半減）、94例に腎死、34例に心血管イベント、30例に死亡が認められた。

表4 多変量解析

全ての病理所見 Gender, age, HbA1c, TChol, Hb, eGFR and urinary protein							
腎複合イベント			腎死				
Factor	HR	95% CI	p	Factor	HR	95% CI	p
Double	9.7	(2.656-35.58)	0.001	SBcl	1.4	(1.063-1.820)	0.016
iCell	3.3	(1.302-8.556)	0.012		N/A		
臨床	N/A			臨床	N/A		
心血管イベント			総死亡				
Factor	HR	95% CI	p	Factor	HR	95% CI	p
Qleg	8.4	(1.121-63.309)	0.038		N/A		
臨床	N/A			臨床	N/A		

このうち、腎複合イベントおよび腎死はタンパク尿増加およびeGFR低下に従い発症頻度が増加する事が確認された（図4）。特に、タンパク尿が少なく、腎機能が保持されているCKD分類G1-3 a A1-2の症例において基底膜二重化および間質細胞浸潤が腎複合イベントの、糸球体肥大が心血管イベントの危険因子であった（表4）。

また、4つの病理学的あるいは臨床学的因子（基底膜二重化または結節病変の有無、間質細胞浸潤の有無、eGFR 60 ml/min/1.73 m²未満、タンパク尿1.0 g/gCr以上）でスコア化した場合、腎複合イベントおよび腎死の100人年で表す発症頻度を的確に表す事を確認した。現在、論文発表に向けて準備中である（表5）。

表5 Scoring system for kidney events

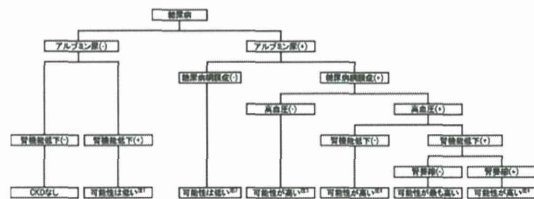
A		病理score	臨床score						
		1. Double≥25% and/or Nodular +	3. eGFR<60						
		2. iCell≥25%	4. uPro>=1.0 g/gCr						
		Each score is 1.							
B		腎複合イベント		腎死					
Score	Event (30persons n-year)	95% Conf. Interval	Observation period (Person-year)	Events	Score	Event (30persons n-year)	95% Conf. Interval	Observation period (Person-year)	Events
0	1.75	0.73-4.21	285.1	5	0	1.05	0.34-3.26	285.1	3
1	5.69	3.30-9.80	228.5	13	1	1.34	0.43-4.16	223.5	3
2	9.00	5.38-13.54	255.6	23	2	3.84	2.00-7.39	234.2	9
More than 3	15.60	11.03-22.05	205.2	32	More than 3	7.53	4.54-12.49	199.1	15

Double: double contour of basement membrane/endothelial space widening, iCell: interstitial cell infiltration, eGFR: estimated glomerular filtration rate, uPro: urinary protein.

高血圧性腎硬化症に関しては、間質線維化・尿細管萎縮（IFTA）、細胞浸潤、硝子化が生検時および最終観察時のeGFRと相関した。これらの因子のうち細胞浸潤は、年齢、BMI、血圧の影響を受けることが確認された。高血圧性腎硬化症に関しては、腎イベント、心血管イベント、死亡などの発症頻度が低く、それらに関する因子を抽出する事は出来なかった。

くわえて、腎生検が施行出来ない症例の診断にツールとして、糖尿病性腎症ならびに高血圧性腎硬化症に関して、臨床的に診断可能なフローチャートを作成した（表6、7）。

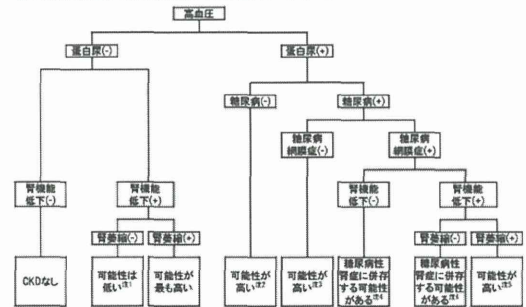
表6 糖尿病性腎症の臨床的診断フローチャート



補足
1. 糖尿病発症前にも参考にする。
2. 2型糖尿病では、血糖コントロールや合併する生活習慣病などにより、糖尿病性腎症の臨床像に多様性がある。
3. 加齢、高血圧などで腎硬化症の所見を呈する。
4. 腎硬化性下は、血算が60ml/分/1.73m²未満を目安とする。
5. 腎硬化は、エコー検査やCT検査などの画像診断により、尿質の尿蛋白、尿蛋白、エコー程度の上下などを参考に判断する。
6. 正常アルブミン尿の血尿率は低い。

注
1. 腎硬化症のみならず尿蛋白陽性腎症を主とする非糖尿病性腎症の可能性が高いが、糖尿病性腎症も否定できない。
2. 非糖尿病性腎症の可能性が高いが、糖尿病性腎症も否定できない。
3. 非糖尿病性腎症が併存する可能性がある。
4. 高血圧性腎硬化症を含む非糖尿病性腎症も併存する可能性がある。
5. 高血圧性腎硬化症の可能性が高いが、糖尿病性腎症も併存する可能性がある。

表7 高血圧性腎硬化症の臨床的診断フローチャート



補足
1. 高血圧発症前にも参考にする。
2. 高血圧性腎硬化症では、尿蛋白量を認めないことが少ないが、高血圧由来を呈することもある。
3. 腎機能低下は、血算が60ml/分/1.73m²未満を目安とする。
4. 腎硬化は、エコー検査やCT検査などの画像診断により、尿質の尿蛋白、尿蛋白、エコー程度の上下などを参考に判断する。

注
1. 他の腎疾患の可能性が高いが、高血圧性腎硬化症も否定できない。
2. 他の非糖尿病性腎症も併存する可能性があるが、糖尿病性腎症も否定できない。
3. 糖尿病性腎症の可能性も高いが、高血圧性腎硬化症を含む非糖尿病性腎症も併存する可能性がある。
4. 高血圧性腎硬化症の可能性が高いが、糖尿病性腎症も併存する可能性がある。

なお、糖尿病性腎症と腎硬化症の共通病態である虚血の診断法に関して特許を出願した（急性腎障害の予後予測方法，特願2013-120285（平成25年6月6日出願））。

D. 考察

診療水準向上に向けた重症度評価法の開発

本研究により「糖尿病性腎症と高

血圧性腎硬化症の病理診断への手引き」がまとまった。

ここには、13施設より、予後が判明している腎生検 530 例（糖尿病性腎症 367 例、高血圧性腎硬化症 163 例）を検討した内容が含まれている。糖尿病性腎症、高血圧性腎硬化症の病理学的定義、診療水準の標準化・向上にむけた、糖尿病性腎症・高血圧性腎硬化症の病理診断評価項目とその定義、典型的な病理像の診断用アトラス、重症化予防にむけた、糖尿病性腎症の腎予後を推定する臨床・病理スコアを提言することができた。腎臓学会・糖尿病学会・高血圧学会・腎病理協会の代表から序文を寄稿頂き、関連学会等密接な連携のもと、まとめることができた。

さらに、糖尿病性腎症・高血圧性腎硬化症の臨床的診断フローチャートを提案した。

これらを通じて、今後の糖尿病性腎症ならびに高血圧性腎硬化症の診療水準向上と重症化防止につながることを期待される。

E. 結論

診療水準向上に向けた重症度評価法の開発では、本研究により「糖

尿病性腎症と高血圧性腎硬化症の病理診断への手引き」がまとまった。糖尿病性腎症、高血圧性腎硬化症の病理学的定義、診療水準の標準化・向上にむけた、糖尿病性腎症・高血圧性腎硬化症の病理診断評価項目とその定義、典型的な病理像の診断用アトラス、重症化予防にむけた、糖尿病性腎症の腎予後を推定する臨床・病理スコアを提言することができた。今後、本邦ならびにアジア諸国を中心に検証ならびに国際比較を行う。

F. 研究発表

G. 知的所有権の取得状況

- 1 特許取得
 - 1) 該当なし
 - 2 実用新案登録
該当なし
 - 3 その他
該当なし

【分科会：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】

厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患等克服研究事業(難治性疾患等実用化研究事業
(腎疾患実用化研究事業)))

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

研究分担者

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

慢性腎臓病 (CKD) の早期診断及び疾患進行・予後予測に有用なバイオマーカーの開発が必要である。今回、既に承認を受けた診断薬である尿 L-FABP を含めたバイオマーカーを用いて、その早期診断能や予後予測能を糖尿病性腎症・腎硬化症の患者 294 名の検体を用いて横断的研究および後ろ向き縦断研究を行い、評価した。その結果、尿中 L-FABP、アルブミン、NAG 共に、CKD の予後予測の優れたバイオマーカーであることが示された。特に、尿中 L-FABP は感度・特異度共に高かった。しかし、今回の症例では尿 L-FABP と eGFR の相関が強く、eGFR を超える診断・予後予測能を示すことが出来なかった。

A. 研究目的

慢性腎不全で透析導入となる原因疾患のそれぞれ第 1 位と第 3 位である糖尿病腎症および腎硬化症には、根治療法がない。そこで慢性腎臓病 (CKD) の早期診断及び疾患進行・予後予測に有用なバイオマーカーの開発が必要である。

本研究は、すでに体外診断薬として公式に承認を受けたバイオマーカーを用いて、糖尿病性腎症および腎硬化症の早期診断、重症化防止に有用なバイオマーカー及びその最適な組み合わせを見出すことを目的に計画した。

B. 研究方法

対象患者：糖尿病性腎症および腎硬化症にて通院していた外来患者で、既に検体を保存し他の研究に用いることの同意を文書で得ている患者である。本研究では、聖マリ

アンナ医科大学 244 例、金沢大学 50 例、合計 294 例を対象とした。

試験方法：後ろ向き研究

評価項目：

1. 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. 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

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・品質保証体制整備) (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

1. 横断解析

聖マリアンナ医大と金沢大学全患者のデータ解析を行った。CKD (eGFR と尿中アルブミンで定義) は 216 人 (73.5%) であった。以下、【CKD vs 非 CKD】の値を示す。年齢: 65±13 vs 61±15 歳、eGFR 40±23 vs 77±13 ml/min/1.73m²、L-FABP > 8.4 µg/gCr (基準値以上) 111(51%) vs 12 (15%)、L-FABP median (IQR) 9.19 (1.43-38.3) vs 4.47 (0.26-7.17)、尿アルブミン > 30 mg/gCr (微量アルブミン尿以上) 160 (74%) vs 8(10%)、尿アルブミン median (IQR) 240 (26-996) vs 10 (5-20)、NAG > 4.2 U/L (基準値以上) 128(59%) vs 21 (27%)、NAG median (OQR) 5.2 (2.5-8.8) vs 2.8 (1.5-4.7)。疾患としては、糸球体腎炎 47(16%)、腎硬化症 92 (31%)、糖尿病性腎症 59 (20%)、その他 18(6%)であった。それぞれの尿中バイオマーカーと eGFR の間には相関関係は見られなかった。

2. 縦断解析 (予後解析)

臨床経過の明らかな 244 例で、平均観察期間 3.7 年の間に、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)は 39 例に発症した。Kaplan-Meier 生存曲線では、尿中 L-FABP、アルブミンおよび NAG が基準値を超えた群は予後が明らかに悪かった。

ROC 曲線による検討では、曲線下の面積 (AUC) は尿中 L-FABP 0.825、アルブミン 0.797、NAG 0.722 で、L-FABP が最も大きかった。さらに、感度・特異度はそれぞれ、82.1%・72.2%、92.3%・55.1%および 66.7%・57.6%で、尿中 L-FABP が感度・特異度ともに高かった。Cox 比例ハザード

モデルによる解析によるハザード比は、尿中 L-FABP 9.9 (95%CI: 4.4-22.5, p<0.001)、アルブミン 12.7 (95%CI: 3.9-41.3, p<0.001)、NAG 2.5 (95%CI: 1.3-4.9, p<0.007)で尿中アルブミンが最も高値であった。

しかし、本研究の対象患者は、尿 L-FABP と eGFR が強い相関を示したため、尿 L-FABP が eGFR を上回る予後予測性能を示すことは確認できなかった。実際、eGFR に加えて、尿 L-FABP を検査に加えることで予後予測能が改善するか AUC 解析で検討し、eGFR に尿 L-FABP を追加した場合 (AUC 0.8622 95%CI 0.7866- 0.9377) としない場合 (AUC 0.8588 95%CI 0.7847-0.9329) で差を認めなかった。

D. 考察

今回の横断研究及び後ろ向き縦断研究では、尿中 L-FABP、アルブミン、NAG 共に、CKD の予後予測の優れたバイオマーカーであることが示された。特に、尿中 L-FABP は感度・特異度共に高かった。しかし、今回の症例では尿 L-FABP と eGFR の相関が強く、eGFR を超える診断能を示すことが出来なかった。

1) 達成度について

今回の研究では尿 L-FABP という新規尿バイオマーカーが尿マーカーの中では最も予後予測能が高いことを示したが、eGFR を超える診断能を示すことが出来ず、パネル化の検討までは至らなかった。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

CKD 患者の簡便に測定できるバイオマーカー開発が喫緊の課題である中、尿 L-FABP が CKD 予後予測因子となりえることを初めて示した成果は学術的価値の高い成果である。

3) 今後の展望について

新たなサンプルを集積し、eGFR がほぼ同等な群での尿 L-FABP の高低が、CKD 患者の予後予測因子となりうるかの検証が必要である。特に、腎機能が良好かつ、蛋白尿の少ないサンプルでの検討が重要であると考えられる。

4) 研究内容の効率性について

本研究は新規尿バイオマーカーの測定という時間のかかるプロセスがある中で、比較的短期間に横断的解析のみならず、縦断研究の結果を限られた予算の中で達成した点で効率性のある研究内容であったと思われる。

E. 結論

新規尿バイオマーカーである尿 L-FABP は優れた CKD 患者の予後予測因子となる可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Matsui K, Kamijo-Ikemori A, Imai N, Sugaya T, Yasuda T, Toyama T, Wada T, Furuichi K, Shimizu M, Kimura K, Shibagaki Y · Urinary Liver-Type Fatty Acid Binding Protein Predicts Risk of ESRD and Cardiovascular Disease in CKD patients. (投稿準備中)

2) Kamijo-Ikemori A, Sugaya T, Kimura K · Novel urinary biomarkers in early diabetic kidney disease. *Curr Diab Rep* · 14 · 513 · 2014

3) Kamijo-Ikemori A, Sugaya T, Kimura K · L-type fatty acid binding protein (L-FABP) and kidney disease.

Rinsho Byori · 62 · 163-70 · 2014

4) Kamijo-Ikemori A, Sugaya T, Ichikawa D, Hoshino S, Matsui K, Yokoyama T, Yasuda T, Hirata K, Kimura K · Urinary liver type fatty acid binding protein in diabetic nephropathy. *Clin Chim Acta* · 424 · 104-8 · 2013

5) Kamijo-Ikemori A, Ichikawa D, Matsui K, Yokoyama T, Sugaya T, Kimura K · Urinary L-type fatty acid binding protein (L-FABP) as a new urinary biomarker promulgated by the Ministry of Health, Labour and Welfare in Japan. *Rinsho Byori* · 61 · 635-40, 2013

2. 学会発表

1) 松井勝臣、池森敦子、今井直彦、木戸亮、菅谷健、安田隆、遠山直志、和田隆志、古市賢吾、清水美保、木村健二郎、柴垣有吾。CKD 患者を対象にした腎不全および心血管疾患発症予測における尿中バイオマーカーの有用性。第 58 回日本腎臓学会学術総会 発表予定、2015

H. 知的所有権の出願・取得状況

1 特許取得

該当無し

2 実用新案登録

該当無し

3 その他

該当無し

分担・総合研究報告書

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 腎臓内科学

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において、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。どのような障害を受けてポドサイト脱落に至るかの分子機序は、ヒトではあまり明らかにされていなかったが、腎生検の組織評価と尿中エクソゾームの解析により、その障害の機構が徐々に明らかになりつつある。尿中エクソゾームの解析により候補分子を抽出し、podocyte-derived signal transduction factors (PDSTFs)を現在までに8分子同定した。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すすめて、ヒト尿サンプルでの評価が可能となってきた。脱落以前のポドサイト障害を早期に検出し、糖尿病性腎症の病態把握を詳細なものにするとともに、治療効果の判定、早期発見、予後予測に有用な、3年後の腎機能低下予測マーカーと治療奏功性を予測するマーカーを得た。

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へ至る。この、ポドサイト内における障害を非侵襲的かつ継続的に評価するマーカーを同定し、ポドサイト障害の分子病態の解析とともに、侵襲性の高い腎生検によらない、診断かつ予後予測に有用なバイオマーカー測定法を樹立する。

B. 研究方法

進行性の腎疾患においては、尿中にポドサイトが脱落することが知られているが、元の腎疾患の診断に用いることはできない。本研究では、病態の明確な動物モデルおよび実際のヒトの腎生検において確定診断のついたさまざまな腎疾患において尿中エクソゾームタンパクを抽出し、その解析によって、ポドサイト障害の詳細を分子レベルで明らかにし、特に糖尿病性腎症の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

尿中エクソゾーム解析において、まず、重症患者ほど尿タンパクは大量で、多種類であるため、純粋なエクソゾーム分画を得る方法を樹立した。このことで、正常および腎機能低下を伴わないネフローゼではほとんど検出されず、糖尿病性腎症におい

て検出される候補タンパクを複数個同定することができた。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、腎機能低下の程度に強くリンクした候補マーカーの探索を行った。podocyte-derived signal transduction factors (PDSTFs)を現在までに8分子同定した。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すすめて、ヒト尿サンプルでの評価が可能となってきた。脱落以前のポドサイト障害を早期に検出し、糖尿病性腎症の病態把握を詳細なものにするとともに、治療効果の判定、早期発見、予後予測に有用な、3年後の腎機能低下予測マーカーと治療奏功性を予測するマーカーを得た。

D. 考察

糖尿病によるポドサイトの障害は、他の原因によるものと分子機序として異なっていることが、尿中エクソゾーム蛋白のプロファイルの違いにより示唆された。本病態を反映したマーカーは糖尿病性腎症の評価のための非侵襲的バイオマーカーとして有用であると考えられる。糖尿病によるポドサイトの障害に関して、どのような障害を受けて脱落に至るかは、ヒトでの検討はあまりなされていなかったが、代謝異常・血行力学的な異常・炎症など、さまざまなストレスを反映して発現の変化するタンパク質群が明らかになりつつある。今回、得られた尿中分子マーカーである PDSTFs のうち、WT1 および Tpbg の発現を解析することで、こうした不確定であった腎予後を予測できるようになった。ポドサイト障害の分子機序の全容およびそれをとらえる尿中エクソゾーム蛋白のプロファイルの変化が糖尿病性腎症の病期進行を反映しており、病変の進展を検出するマーカーとして有用であると考えられる。

評価

1) 達成度について

・糸球体上皮細胞であるポドサイトの障害を分子レベルで病態解析し、同時にその変化を反映する尿中エクソゾームに着目した点は、予想以上に有効なバイオマーカーとなりうることが明らかになった。従来の腎生検よりは、侵襲性をなくした点で、また血清クレアチニンやアルブミン尿では鑑別が不可能であった、原疾患や進行度を評価可能とした点で、本研究の意義は大きいと考えられる。

・糖尿病性腎症は、発症前より腎不全期に至るまで、非常に長期の経過を辿るため、より正確な病期ごとの病態評価のためには、解析対象となる同患者の経時的な推移を長期にわたりフォローする必要があるが、今回、得られた尿中分子マーカーである PDSTFs のうち、WT1 は、こうした不確定であった腎予後を予測できるようになった。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

糖尿病性腎症の非侵襲的診断法としての尿中エクソゾーム解析は、国際的にも他に類をみないものであり、従来の血清・尿検査にはない、病態を反映するバイオマーカーである点から、本症の病態解明という観点においても、学術的な意義は大きい。さらに、糖尿病患者の増大という社会的な背景においても、非侵襲的で長期の経過観察に適した診断法の確立は意義深いものとする。

3) 今後の展望について

・糖尿病性腎症は、発症前より腎不全期に至るまで、非常に長期の経過を辿るため、より正確な病期ごとの病態評価のために、今後も引き続き尿中エクソゾームの採取・解析を行う。ヒトにおいては高血糖・高血圧・脂質尿酸異常・薬物などの影響が長期にわたりさまざまな割合で腎機能低下の原因となるため、各病態を反映するマーカーによるパネル化を構築することが不可欠である。

4) 研究内容の効率性について

病態を反映する分子マーカーとして、今回候補分子にあがったものは、いずれも転写因子やシグナル伝達因子などであり、本来の細胞内発現量が極めてわずかであるため、測定系の樹立のためには超高感度測定システムの確立が望まれる。現在、国内特許を申請し、診断薬メーカーとの共同開発中であり、より高感度の定量システムの樹立を目指している。

E. 結論

糖尿病性腎症における蛋白尿と腎機能低下の進展における分子病態の解明に、特にポドサイト障害の解析は重要である。糖尿病性腎症では、高血糖・高血圧・脂質異常症・加齢といったさまざまな要因が加わり病変が進展し、腎機能低下が進むため、その分子病態の解明に、ポドサイト障害を反映した尿中エクソゾームタンパク質を用いた解析は重要である。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、とくに、WT1 は、不可逆的腎機能低下の予測マーカーとしての価値が認められ、糖尿病性腎症の重症化の評価に有用である。

F. 研究発表

1) 国内

口頭発表 5 件
原著論文による発表 0 件
それ以外（レビュー等）の発表 0 件
そのうち主なもの

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

・第 53 回 日本臨床化学学会年次学術集会

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

2) 海外

口頭発表 0 件
原著論文による発表 2 件
それ以外（レビュー等）の発表 0 件
そのうち主なもの

・ Japan Diabetic Nephropathy Cohort Study: study design, methods, and implementation.

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.

Clin Exp Nephrol. 2013
17(6):819-26. doi:
10.1007/s10157-013-0778-8.

G. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

1 特許取得

特願 2014-041531

（平成 26 年 3 月 4 日出願）

2 実用新案登録

無し

3 その他

無し

厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患等克服研究事業(難治性疾患等実用化研究事業
(腎疾患実用化研究事業)))

分担・総合研究報告書

糖尿病性腎症の早期バイオマーカー探索研究

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。続いて、糖尿病患者において将来の腎機能低下を予測する新規尿中バイオマーカーの探索を行った。L-FABPとMCP-1は有用なマーカーとは言えなかったが、ベースラインの24hrアルブミン尿はごく微量の段階から将来の腎機能低下を予測する良いマーカーであった。今後、血清、尿を用いたメタボローム解析を実施する予定である。

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、①糖尿病性腎症を診断するための早期診断バイオマーカーを探索すること、および②腎機能低下を予測する早期バイオマーカーを探索することを目的とする。

B. 研究方法

研究①糖尿病性腎症診断マーカーの探索

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: 2014-0252)。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。

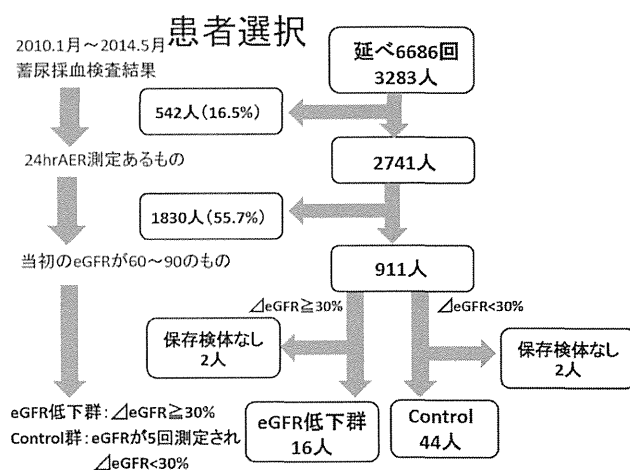
研究②腎機能低下予測マーカーの探索

2010年1月～2014年5月までの期間に大垣市民病院糖尿病腎臓内科に通院中の糖尿病患者で蓄尿検査と採血検査を行った3283人、のべ6686回の蓄尿を材料とした。24時間尿中アルブミン排泄量(24hrAER)が測定されており、初回eGFR値が60-90mL/min/1.73m²の911人を対象とした。

eGFR低下率が30%以上認められたのは18人であった。そのうち尿検体の保存を確認した16人をeGFR低下群とした。一方、観察期間中に毎年蓄尿採血検査が行われ、eGFRがいずれの時も30%を超えて低下しなかった46人を選択し、そのうち尿検体の保存されていた44人をControl群とした(図1)。

それら合計60人につき、-80℃で保存されていた蓄尿検体を用いて尿中L-FABP、尿中MCP-1を測定した。Baselineは初回蓄尿が行われた時点とした。蓄尿検体は本試験の目的で収集されたものではなく、すでに収集され保存されていたものを使用した。

図1 患者スクリーニング



(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)。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

研究①糖尿病性腎症診断マーカーの探索

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)。

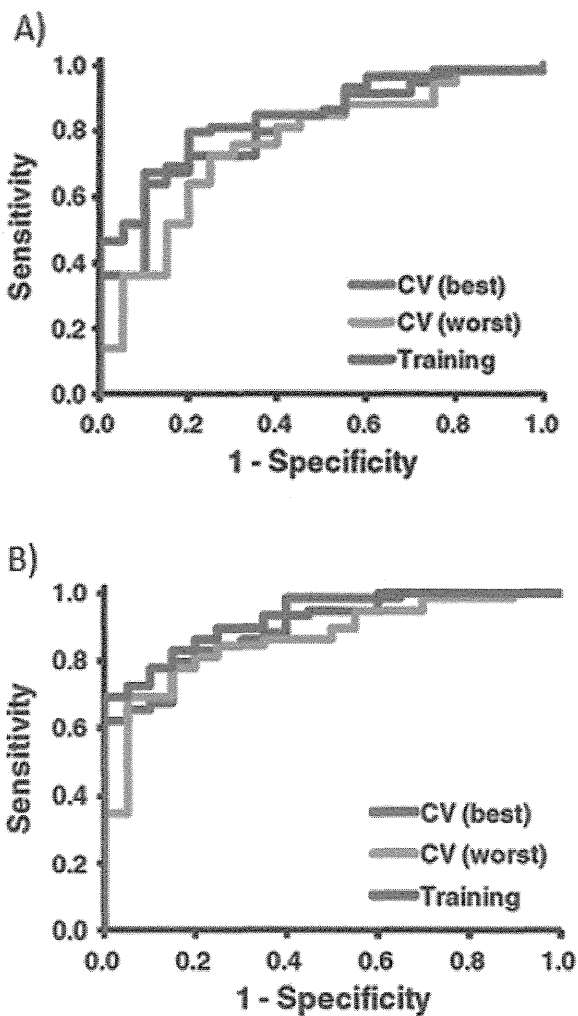


図 複数の代謝産物を用いた糖尿病性腎症の診断
 (A) 5 個の代謝物 (γ -ブチロベタイン、symmetric dimethylarginine、ID114、ID127 アゼライン酸) を採用した重回帰分析では、糖尿病性腎症診断における ROC 曲線の AUC は 0.927 と高値であった。
 (B) 4 個の既知の代謝物 (aspartic acid, SDMA,

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。

研究②腎機能低下予測マーカーの探索

患者背景では、eGFR 低下群では、コントロール群と同程度に血圧はコントロールされていたが、高血圧の診断のあるもの、RAS 阻害剤の内服の割合が優位に多かった。ベースラインデータを表 1 に示す。

eGFR 低下群ではコントロール群と比較して観察開始時の eGFR が低く、24hrAER も多かった。一方、L-FABP、MCP-1 には両群有意な差を認めなかった (表 2)。

表 1	eGFR低下群(n=16)	Control群(n=44)	P値(カイ二乗近似)
年齢	66.5 [56.75;68]	63.5 [56;69]	0.5248
男性 (%)	5 (31.25)	23 (52.27)	0.2417
身長	154 [148.75;166]	160 [153.75;167]	0.1946
体重	61.5 [68.75;52.75]	59.5 [53.25;68.75]	0.8344
BMI	23.85 [21.975;30.7]	23.6 [21.525;26.175]	0.4079
罹病期間	15 [7.5;19.75]	11 [7;14]	0.1395
2型糖尿病 (%)	16 (100)	42 (95.45)	1
Systolic BP	135 [124;152]	133 [117;140]	0.2131
Diastolic BP	74.5 [59;84.5]	73 [63;80]	0.8578
Hypertension	14 (93.33)	25 (58.14)	<u>0.0125</u>
Using RAS inhibitor (%)	14 (87.5)	19 (43.18)	<u>0.0029</u>
塩分摂取量	9.8 [8;15.3]	11 [9.125;13.525]	0.8007
タバコ摂取量	64.3 [44.1;78.7]	63.65 [58.425;72.5]	0.9722
HbA1c	7.3 [6.8;8.1]	7 [6.4;7.8]	0.2173
Tchol	193 [169;211]	195 [179;216]	0.2764
HDL	54 [44;66]	55 [46.25;66.5]	0.6569
LDL	98 [83;122]	115.5 [99.25;130.25]	0.0998
eGFR	72.4 [68.9;76.8]	77.6 [71.0;83.3]	<u>0.0304</u>
24hrAER	28.6 [7.65;200.15]	8.45 [4.825;24.725]	<u>0.023</u>

表 2	eGFR低下群(n=16)	Control群(n=44)	P値(カイ二乗近似)
eGFR	72.4 [68.9;76.8]	77.6 [71.0;83.3]	<u>0.0304</u>
24hrAER	28.6 [7.65;200.15]	8.45 [4.825;24.725]	<u>0.023</u>
LFABP(μ g/gcre)	2.091663 [1.312757;4.078164]	2.103919 [1.386176;2.720977]	0.6278
MCP-1(ng/ml)	8.93924 [1.84976;21.6098]	7.12916 [1.09556;16.63208]	0.5358
MCP1(μ g/gcre)	9.548923 [2.920811;38.4161]	11.40346 [1.614225;19.97917]	0.5639

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。

腎障害検出マーカーとして L-FABP や MCP-1 が期待されているが、本研究では