

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))

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

平成 2 6 年度 総括研究報告書

研究代表者 和田 淳

平成 2 7 (2 0 1 5) 年 3 月

目 次

. 平成 2 6 年度構成員名簿	-----	2
. 総括研究報告書		
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 和田淳	-----	3
. 分担研究報告書		
Fetuin-A (Ahsg)臓器特異的ノックアウトマウスの樹立 江口潤、中司敦子、勅使川原早苗、和田淳	-----	9
. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	32

平成26年度研究班構成員名簿

区分	氏名	所属	職名
研究代表者	和田 淳	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	准教授
研究分担者	江口 潤	岡山大学病院・腎臓・糖尿病・内分泌内科	助教
	中司敦子	岡山大学病院・腎臓・糖尿病・内分泌内科	助教
	勅使川原早苗	岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 地域医療人材育成講座	助教
	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(兼)糖尿病センター長
	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	センター長
研究協力者	清水一紀	心臓病センター榊原病院・糖尿病センター	副センター長
	四方賢一	岡山大学病院・新医療研究開発センター	教授
	小川大輔	岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 糖尿病性腎症治療学講座	准教授
	内田治仁	岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 CKD・CVD地域連携・心腎血管病態解析学講座	准教授
	利根淳仁	岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・糖尿病センター	助教
	伊勢田泉	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	常勤医
	中塔辰明	岡山済生会総合病院・糖尿病センター	センター長
	滝上慶一	津山中央病院	副部長
	今村麻理子	岡山大学大学院医歯薬学総合研究科	大学院生

総括研究報告書

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))
総括研究報告書

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

研究代表者 和田 淳

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 准教授

研究要旨

ヒトゲノムの配列が決定され、ポストゲノム研究が注目を集めるなか、糖尿病および糖尿病合併症の発症や進展に糖鎖異常が関与していることが報告されている。これらの糖鎖異常が明らかになれば、予後を推測するバイオマーカーとして有用であるのみならず、その糖鎖異常をターゲットとした治療戦略へと研究が展開する可能性がある。そこで糖尿病性腎症患者尿の糖鎖プロファイルを網羅的に解析した。健常人と糖尿病性腎症患者のセントリコンにより濃縮した尿サンプルをAgilentマルチプルアフィニティ除去システムで6種の主要蛋白を除去した後、透析膜を用いてPBSにバッファー交換した。健常人(n=12)、糖尿病性腎症正常アルブミン尿期(n=7)、微量アルブミン尿期(n=5)、顕性蛋白尿期(n=5)の尿サンプルを用いて、糖尿病性腎症の病期別にレクチンアレイ解析を行った。蛋白質濃度を測定し、Cy3標識したサンプルを濃度調製しGlycostationにより45種のレクチンへの結合性を測定した。腎症病期の進行にしたがって、シグナルが上昇していたのは α 2-6結合シアル酸関連レクチン(SNA,SSA,TJA-1)であった。さらにSSAレクチンカラムを用いたアフィニティークロマトグラフィーにより精製したサンプルをLC-MS/MSによるショットガン解析を施行したところ28種類の糖蛋白質を同定した。これらの糖蛋白質のうち8種類がELISA法で測定が可能であり、そのうち測定感度以下とならず安定して測定できたのは、 α 1-microglobulin, orosomucoid, fetuin-Aであった。

平成25年度に血液検査を施行しえた糖尿病患者737名について、年齢・BMI (body mass index)、外来血圧、HbA1c、随時血糖、血清コレステロール、トリグリセリド、HDLコレステロール、LDLコレステロール、血清クレアチニン、尿素窒素、尿酸、eGFR、尿中微量アルブミンを臨床項目について検討した。さらに糖尿病性腎症の新規バイオマーカー候補のうちfetuin-Aについて糖尿病性腎症患者の尿サンプルを用いて測定した。Human Fetuin-A ELISA (BioVender社)を用いて尿中の濃度を測定し、クレアチニン補正を行うことによって検討した。尿中fetuin-A排泄量、HbA1c、拡張期血圧、HDLコレステロール、LDLコレステロールを独立変数とし、eGFRを従属変数としてステップワイズ重回帰分析を施行した。すべての独立変数が投入されたModel 5ではいずれも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。さらにステップワイズ重回帰分析によって尿中Fetuin-A排泄量のみが有意な独立変数として採択された。従って尿中Fetuin-A排泄量はACRに匹敵あるいは凌駕する新規尿中バイオマーカーの候補であると考えられる。糖尿病患者コホート研究によって、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排泄量の有用性を確認する。

研究分担者

江口潤(岡山大学病院・腎臓・糖尿病・内分泌内科・助教)、中司敦子(岡山大学病院・腎臓・糖尿病・内分泌内科・助教)、勅使川原早苗(岡山大学院医歯薬学総合研究科・地域医療人材育成講座・助教)、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・(兼)糖尿病センター長)、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・センター長)、清水一紀

(心臓病センター榊原病院・糖尿病センター・副センター長)

A. 研究目的

生体内の蛋白質は酵素的に糖鎖修飾を受け、その機能に多大なる影響を与えており、その重要性は従来から認識されていた。しかしこれらの糖鎖修飾は、当該蛋白をコードする遺伝子とは別の糖鎖修飾酵素群によって制御されていること、またその糖鎖構造の解析は、核酸やペプチドと比較して困難であったこと

より、その解析は未だ十分に行われているとは言いがたい。近年、糖尿病や糖尿病合併症の進展においても、糖鎖異常が関連しているという報告が多くなされている。1991年、高血糖条件下においてヘキソサミン代謝経路が活性化されUDP-N-acetylglucosamineの生産が増加し、核内および細胞質内の糖蛋白質であるO-GlcNAcレベルを増加させると報告された(*JBC* 266:4706-4712, 1991)。その後、動物においてヘキソサミン経路の活性化により、インスリン抵抗性が出現することや(*Diabetes* 53:921-930, 2004)、糖尿病性腎症発症におけるマトリックス蛋白生合成に関与しているTGF- β の転写活性が亢進すること(*JCI* 101:160-169, 1998)、またヘキソサミン経路により糖尿病性腎症でみられる細胞周期の停止とメサンギウム細胞の肥大化が誘導されることもわかった(*Biochemical J* 388:537-544, 2005)。

我々は β -galactoside構造を認識し結合するガレクチンファミリーのひとつであるgalectin-9を発見し(*JBC* 28:6078-6086, 1997)、胸腺細胞や活性化T細胞にアポトーシスを誘導すること(*JCI* 99:2452-2461, 1997)、galectin-9は糖尿病性腎症に認められるG1期細胞周期停止を解除して腎症に対して治療効果を発揮することを見出した(*J Am Soc Nephrol* 16:3222-3242, 2005)。さらに最近galectin-9がT cell immunoglobulin mucin-3 (Tim-3)のリガンドとして作用して T_H1 細胞にアポトーシスを誘導することによって1型糖尿病マウス(NODマウス)に治療効果を発揮することを見出した(*Endocrinology* 153(2), 612-620, 2012)。これらの発表は、糖尿病や糖尿病性腎症の成因の一つとして、糖鎖の変化が関連していることを示している。

しかし、糖鎖の特徴として構造が複雑であり糖鎖構造を同定するためには大変な労力が必要であるため、多くの症例を検討することは困難であった。グライコテクニカの開発したレクチンアレイにより、糖と結合する蛋白であるレクチンを用いて被験糖鎖とそれぞれに特異性の異なる45種類のレクチンとの結合性が同時に検出可能となった(*Nature Methods* 2:851-856, 2005)。更にすべてのレクチンの詳細な特異性の情報を格納したデータベースの確立によりパターン認識による糖鎖構造推定が可能となったため、多くの検体について糖鎖を検討することが可能となった。

平成24年度から平成25年度にかけて、健常

人と糖尿病性腎症患者の尿のレクチンアレイ解析を行った。セントリコンにより濃縮した尿サンプルをAgilentマルチプルアフィニティ除去システムで6種の主要蛋白を除去した後、透析膜を用いてPBSにバッファー交換した。健常人(n=12)、糖尿病性腎症正常アルブミン尿期(n=7)、微量アルブミン尿期(n=5)、顕性蛋白尿期(n=5)の尿サンプルを用いて、糖尿病性腎症の病期別にレクチンアレイ解析を行った。蛋白濃度を測定し、Cy3標識したサンプルを濃度調製しGlycostationにより45種のレクチンへの結合性を測定した。腎症病期の進行にしたがって、シグナルが上昇していたのは $\alpha 2$ -6結合シアル酸関連レクチン(SNA, SSA, TJA-1)であった。さらにSSAレクチンカラムを用いたアフィニティークロマトグラフィーにより精製したサンプルをLC-MS/MSによるショットガン解析を施行したところ28種類の糖蛋白質を同定した。これらの糖蛋白質のうち8種類がELISA法で測定が可能であり、そのうち測定感度以下とならず安定して測定できたのは、 $\alpha 1$ -microglobulin, orosomuroid, fetuin-Aであった。 $\alpha 1$ -microglobulin, 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つの尿中マーカーと、糖尿病や腎症の臨床データとを横断的に比較検討を行った。 $\alpha 1$ -microglobulinは腎臓間質マーカーとして、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排泄量についてはELISAによる尿中濃度の検討はまだ報告がない。糖尿病性腎症正常アルブミン尿期(n=36)、微量アルブミン尿期(n=25)、顕性蛋白尿期(n=24)の患者から採取した尿サンプルを用いて検討したところ、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 (estimated glomerular filtration rate)と負の相関を示した。さらにステップワイズ多項ロジスティック解析によって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 $\alpha 1$ -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。以上より尿中fetuin-A排泄量は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。

平成24年度より岡山大学病院および岡山県内の7病院で、ゲノムDNA(平成24年度)および血清・尿を平成24-26年度にわたって保存

した。最終的に 779 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を開始した。

平成 26 年度は平成 25 年度にストックした尿検体を用いて、尿中 fetuin-A 排泄量を ELISA によって測定し、腎症の進展を予測するバイオマーカーとしての意義を検討した。

B . 研究方法

平成25年度に血液検査を施行しえた糖尿病患者737名について、年齢・BMI (body mass index)、外来血圧、HbA1c、随時血糖、血清コレステロール、トリグリセリド、HDLコレステロール、LDLコレステロール、血清クレアチニン、尿素窒素、尿酸、eGFR、尿中微量アルブミンを臨床項目について検討した。

さらに糖尿病性腎症の新規バイオマーカー候補のうちfetuin-Aについて糖尿病性腎症患者の尿サンプルを用いて測定した。Human Fetuin-A ELISA (BioVender社)を用いて尿中の濃度を測定し、クレアチニン補正を行うことによって検討した。

岡山大学病院	151	例
岡山医療センター	96	例
岡山済生会病院	49	例
倉敷中央病院	111	例
榊原病院	31	例
津山中央病院	188	例
岡山赤十字病院	96	例
岡山市民病院	15	例
総計	737	例

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

アルブミン尿ステージによる検討

尿中微量アルブミンを測定しえた683例について検討した。A1(442例)、A2(169例)、A3(77例)の検討では、アルブミン尿のステージ(A1, A2, A3)の進行に従って、年齢、BMI、収縮期血圧、トリグリセリド、血清クレアチニン、尿素窒素、尿酸、尿中アルブミン排泄量(ACR)が有意差を持って上昇し、eGFRは減少した(表1、図1、Kruskal-Wallisテスト)。尿中fetuin-A排泄量は、病期の進行に伴って有意に上昇していた(表1、図1)。

GFRステージによる検討

血清クレアチニンを測定できた737例について検討した。G1(127例)、G2(391例)、G3(188例)、G4(31例)の検討では、GFRステージ(G1, G2, G3, G4)の進行に従って、年齢、BMI、拡張期血圧、HbA1c、血糖、総コレステロール、トリグリセリド、HDLコレステロール、LDLコレステロール、血清クレアチニン、尿素窒素、尿酸、eGFR、ACRが有意に変化していた(表2、図1、Kruskal-Wallisテスト)。尿中fetuin-A排泄量は、Gステージの進行に伴って有意に上昇していた(表2、図1)。

尿中Fetuin-A排泄量と臨床パラメータとの単相関

尿中fetuin-A排泄量は年齢($R=0.125$, $p=0.001$)、BMI($R=0.096$, $p=0.010$)、収縮期血圧($R=0.207$, $p=2.05 \times 10^{-8}$)、血糖($R=0.079$, $p=0.032$)、トリグリセリド($R=0.099$, $p=0.008$)、血清クレアチニン($R=0.186$, $p=4.10 \times 10^{-7}$)、尿素窒素($R=0.220$, $p=2.45 \times 10^{-9}$)、ACR($R=0.508$, $p=3.62 \times 10^{-46}$)と有意な正の相関を示し、HDLコレステロール($R=-0.090$, $p=0.015$)、eGFR($R=-0.203$, $p=2.93 \times 10^{-8}$)と有意な負の相関を示した(表3、図2)。

eGFRと臨床パラメータとの単相関

eGFRは年齢($R=-0.421$, $p=5.65 \times 10^{-33}$)と血清クレアチニン($R=-0.836$, $p=1.17 \times 10^{-193}$)から算出されるため、当然両者とは強い相関を示した。それ以外のパラメータでは拡張期血圧($R=0.111$,

p=0.003)、HbA1c (R=0.142, p=1.17×10⁻⁴)、血糖 (R=0.073, p=0.046)、総コレステロール (R=0.136, p=2.42×10⁻⁴)、HDLコレステロール (R=0.116, p=0.002)、LDLコレステロール (R=0.131, p=3.89×10⁻⁴)と正の相関を示し、トリグリセリド (R=-0.104, p=0.005)、尿素窒素 (R=-0.563, p=8.07×10⁻⁶²)、尿酸 (R=-0.397, p=4.78×10⁻²⁹)、ACR (R=-0.287, p=1.58×10⁻¹⁴)と有意な負の相関を示した(表4)。

ACRと臨床パラメータとの単相関

ACRは年齢 (R=0.125, p=0.001)、BMI (R=0.157, p=3.89×10⁻⁵)、収縮期血圧 (R=0.215, p=1.57×10⁻⁸)、トリグリセリド (R=0.118, p=0.002)、血清クレアチニン (R=0.226, p=1.94×10⁻⁹)、尿素窒素 (R=0.287, p=2.51×10⁻¹⁴)、尿酸 (R=0.209, p=3.37×10⁻⁸)、尿中fetuin-A (R=0.508, p=3.62×10⁻⁴⁶)と有意な正の相関を示し、総コレステロール、HDLコレステロール (R=-0.090, p=0.015)、eGFR (R=-0.287, p=1.58×10⁻¹⁴)と有意な負の相関を認めた(表5)。

ステップワイズ重回帰分析による検討

ACR、HbA1c、拡張期血圧、HDLコレステロール、LDLコレステロールを独立変数とし、eGFRを従属変数としてステップワイズ重回帰分析を施行した(表6)。すべての独立変数が投入されたModel 5ではいずれも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。さらにステップワイズ重回帰分析によってACRのみが有意な独立変数として採択された(表6, Model 1)。

次に尿中fetuin-A排泄量、HbA1c、拡張期血圧、HDLコレステロール、LDLコレステロールを独立変数とし、eGFRを従属変数としてステップワイズ重回帰分析を施行した(表7)。すべての独立変数が投入されたModel 5ではいずれも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。さらにステップワイズ重回帰分析によって尿中Fetuin-A排泄量のみが有意な独立変数として採択された(表7, Model 1)。

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(JASN 21, 406-412, 2010)。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FFA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報告されている(Nature Medicine 18(8), 1279-1285, 2012)。

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。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。本研究において尿中fetuin-A排泄量、HbA1c、拡張期血圧、HDLコレステロール、LDLコレステロールを独立変数とし、eGFRを従属変数としてステップワイズ重回帰分析を施行したところ、尿中Fetuin-A排泄量のみが有意な独立変数として採択された。従って尿中Fetuin-A排泄量はACRに匹敵あるいは凌駕する新規尿中バイオマーカーの候補であると考えられる。今後737例のコホート研究によって、糖尿病性腎症の進展を予測する上で尿中Fetuin-A排泄量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であることを実証する予定である。

E. 結論

レクチンマイクロアレイによる糖鎖プロファイルとレクチンアフィニティークロマトグラフィーによる糖蛋白質の同定は、尿中新規バイオマーカーの同定に有用な方法であり、fetuin-Aを同定した。さらに糖尿病患者コホート研究によって、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排泄量の有用性を確認する。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Ogawa D, Eguchi J, Wada J, Terami N, Hatanaka T, Tachibana H, Nakatsuka A, Horiguchi CS, Nishii N, Makino H. Nuclear hormone receptor expression in mouse kidney

and renal cell lines. *PLoS ONE* 9(1), e85594, 2014

2. Watanabe M, Nakatsuka A, Murakami K, Inoue K, Terami T, Higuchi C, Katayama A, Teshigawara S, Eguchi J, Ogawa D, Watanabe E, Wada J, Makino H. Pemt deficiency ameliorates endoplasmic reticulum stress in diabetic nephropathy. *PLoS ONE* 9(3), e92647, 2014
3. Miyoshi T, Nakamura K, Yoshida M, Miura D, Oe H, Akagi S, Sugiyama H, Akazawa K, Yonezawa T, Wada J and Ito H. Effect of vildagliptin, a dipeptidyl peptidase 4 inhibitor, on cardiac hypertrophy induced by chronic beta-adrenergic stimulation in rats. *Cardiovascular Diabetology* 13:43, 2014
4. Terami N, Ogawa D, Tachibana H, Hatanaka T, Wada J, Nakatsuka A, Eguchi J, Horiguchi CS, Nishii N, Yamada H, Takei K, Makino H. Long-term treatment with the sodium glucose cotransporter 2 inhibitor, dapagliflozin, ameliorates glucose homeostasis and diabetic nephropathy in db/db mice. *PLoS ONE* 9(6), e100777, 2014.
5. Ono T, Shikata K, Obika M, Miyatake N, Kodera R, Hirota D, Wada J, Kataoka H, Ogawa D, Makino H. Factors associated with remission and/or regression of microalbuminuria in type 2 diabetes mellitus. *Acta Med Okayama* 68(4), 235-241, 2014
6. Hishikawa N, Yamashita T, Deguchi K, Wada J, Shikata K, Makino H, Abe K. *Eur J Neurol* 2014 Sep 15. [Epub ahead of print]

2. 学会発表

1. 肥満により脂肪組織に誘導される膜蛋白 Gpnmb の脂肪肝炎抑制効果 片山晶博、和田淳、中司敦子、江口潤、村上和敏、勅使川原 早苗、樋口千草、布上朋和、天田雅文、肥田 和之、槇野博史 第 57 回日本糖尿病学会総会（大阪）平成 26 年 5 月 22 日
2. 2 型糖尿病マウスにおける SGLT2 阻害薬ダパグリフロジンの腎保護効果の検討 小川大輔、寺見直人、畑中崇志、橘洋美、江口潤、中司敦子、和田淳、槇野博史 第 57 回日本糖尿病学会総会（大阪）平成 26 年 5 月 22 日
3. 岡田震一、宮下雄博、重松照伸、藤井総一郎、早川信彦、岡崎守宏 ビルダグリプチンとミチグリニド併用症例に対する検討 第 57 回日本糖尿病学会年次学術集会（大阪）岡田震一、宮下雄博、重松照伸、藤井総一郎、早川

- 信彦、岡崎守宏 第 57 回日本糖尿病学会年次学術総会（大阪）平成 26 年 5 月 22 日
4. デグルデク切り替えについての実態調査—瀬戸内 2 型糖尿病治療研究会— 吉田 淳、松岡 孝 第 57 回日本糖尿病学会年次学術総会（大阪）平成 26 年 5 月 22 日
5. 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 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 57 回日本糖尿病学会年次学術総会（大阪）平成 26 年 5 月 22 日
6. 2 型糖尿病に合併した脂質異常症におけるスタチンとフェノフィブラートの長期併用療法の有効性と安全性に関する検討 和田侑子、松岡 孝、和田美輝、合田 悟、中井志保、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、鈴木貴博、高橋健二 第 57 回日本糖尿病学会年次学術総会（大阪）平成 26 年 5 月 22 日
7. 2 型糖尿病に対するインスリン治療選択指標の分析（肥満・非肥満の比較）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 57 回日本糖尿病学会年次学術総会（大阪）平成 26 年 5 月 22 日
8. DPP4 阻害薬導入前後における 2 型糖尿病治療法の変化に関する検討 志伊真和、松岡 孝、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、中島佑佳子、藤原大介、武川 郷、鈴木貴博、高橋健二 第 57 回日本糖尿病学会年次学術総会（大阪）平成 26 年 5 月 22 日
9. 2 型糖尿病患者における脂肪酸分画の検討 松岡 孝、合田 悟、和田美輝、木村友香、和田侑子、中井志保、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 57 回日本糖尿病学会年次学術総会（大阪）平成 26 年 5 月 22 日
10. 2 型糖尿病患者を対象としたレパグリニドによる臨床試験—香川 study 第六報— 大山知代、松岡 孝 第 57 回日本糖尿病学会年次学術総会（大阪）平成 26 年 5 月 22 日
11. コミュニケーションを大切にしたい糖尿病友の会のウォーキング 安藤晋一郎、安藤美華代、羽井佐茂、井上恵子、坂手美和子、安永沙織、宇田茜、大森登志樹、宮本秀美、横井

- 尋和 第 57 回日本糖尿病学会年次学術総会 (大阪) 平成 26 年 5 月 23 日
12. 糖毒性状態における空腹時 CPI (CPI0) と食後 2 時間 CPI (CPI120) の臨床的有用性の検討 -インクレチン効果を踏まえて- 肥田和之、伊勢田泉、寺見隆宏、吾郷太介、服部瑞穂、笹木 晋、岡田早未、林恭加、梶谷展生、利根淳仁 第 57 回日本糖尿病学会年次学術総会 (大阪) 平成 26 年 5 月 23 日
 13. エクソーム解析を行った若年発症糖尿病の 1 例 布上朋和、江口潤、天田雅文、和田淳、四方賢一、槇野博史 第 57 回日本糖尿病学会総会 (大阪) 平成 26 年 5 月 23 日
 14. 糖尿病腎症第 1 期および第 2 期における腎機能低下要因の解析 小比賀美香子、四方賢一、小野哲一郎、小寺亮、江口潤、廣田大昌、村上和敏、中司敦子、小川大輔、和田淳、片岡仁美、槇野博史 第 57 回日本糖尿病学会総会 (大阪) 平成 26 年 5 月 24 日
 15. ACAM (adipocyte adhesion molecule) /CLMP の一次繊毛機能を介した脂肪細胞分化と肥満症における意義 村上和敏、和田淳、佐藤美和、江口潤、布上朋和、片山晶博、中司敦子、小川大輔、四方賢一、槇野博史 第 57 回日本糖尿病学会総会 (大阪) 平成 26 年 5 月 24 日
 16. 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、片山晶博、渡邊真由、樋口千草、天田雅文、布上朋和、江口潤、小川大輔、槇野博史 第 57 回日本糖尿病学会総会 (大阪) 平成 26 年 5 月 24 日
 17. インスリンポンプ治療における Active Insulin Time 設定の意義 利根淳仁、吾郷太介、服部瑞穂、岡田早未、寺見隆宏、伊勢田泉、肥田和之 第 57 回日本糖尿病学会年次学術総会 (大阪) 平成 26 年 5 月 24 日
 18. レパグリニド (R) とテネグリプチン (T) が糖代謝に及ぼす効果の検討—CGM, 食事負荷試験を用いて— 吾郷太介、寺見隆宏、服部瑞穂、岡田早未、利根淳仁、伊勢田泉、肥田和之 第 57 回日本糖尿病学会年次学術総会 (大阪) 平成 26 年 5 月 24 日
 19. ワークショップ 2 動物モデルを用いた NASH 病態解析 脂肪肝炎における Pemt の意義 中司敦子、松山誠、村上和敏、勅使川原早苗、江口潤、小川大輔、高木章乃夫、福島正樹、山本和秀、槇野博史、和田淳 第 1 回肝臓と糖尿病・代謝研究会 (東京) 平成 26 年 7 月 4 日
 20. 早期糖尿病性腎症患者における尿中 TFF3 (Urinary Trefoil Factor 3) と尿中アルブミンの関連についての検討 寺見直人、小川大輔、山成俊夫、杉山斉、畑中崇志、和田淳、四方賢一、西井尚子、槇野博史 第 57 回日本腎臓学会総会 (横浜) 平成 26 年 7 月 4 日
 21. 顕性蛋白尿期の 2 型糖尿病患者におけるアルダクトンの蛋白尿減少効果 加藤佐和子、丸山彰一、槇野博史、和田淳、宇津貴、荒木久澄、古家大祐、金崎啓造、西山成、今井圓裕、安藤昌彦 第 57 回日本腎臓学会総会 (横浜) 平成 26 年 7 月 5 日
 22. ワークショップ 2 ネフローゼ症候群を呈する疾患の最新の診断・治療 レクチンマイクロアレイによる糖尿病性腎症の新規バイオマーカーの同定 和田淳、勅使河原早苗、中司敦子、江口潤 第 44 回日本腎臓学会西部学術集会 (神戸) 平成 26 年 10 月 3 日
 23. 早期糖尿病性腎症におけるバイオマーカーとしての尿中 TFF (Trefoil factor) の検討 寺見直人、小川大輔、畑中崇志、山成俊夫、杉山斉、四方賢一、槇野博史、和田淳 日本糖尿病学会中国四国地方会第 52 回総会 (広島) 平成 26 年 10 月 24 日
 24. メタボリックシンドロームにおける脂肪組織と骨格筋の機能異常を制御する新規因子の探索 天田雅文、江口潤、柴田祐助、布上朋和、片山晶博、勅使河原早苗、村上和敏、中司敦子、和田淳 第 35 回日本肥満学会 (宮崎) 平成 26 年 10 月 25 日
 25. メタボリックシンドロームに伴う脂肪肝炎と Pemt の意義 中司敦子、村上和敏、勅使河原早苗、片山晶博、布上朋和、天田雅文、山口哲史、江口潤、和田淳 第 35 回日本肥満学会 (宮崎) 平成 26 年 10 月 25 日
 26. メタボリックシンドロームにおける Galectin-9 の意義 布上朋和、勅使河原早苗、柴田祐助、天田雅文、片山晶博、村上和敏、江口潤、中司敦子、和田淳 第 35 回日本肥満学会 (宮崎) 平成 26 年 10 月 25 日
 27. 脂肪細胞における接着とアクチン重合を介した ACAM の抗肥満作用 村上和敏、江口潤、中司敦子、和田淳 第 35 回日本肥満学会 (宮崎) 平成 26 年 10 月 25 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

図1 アルブミン尿ステージと GFR ステージにおける尿中 fetuin-A 排泄量

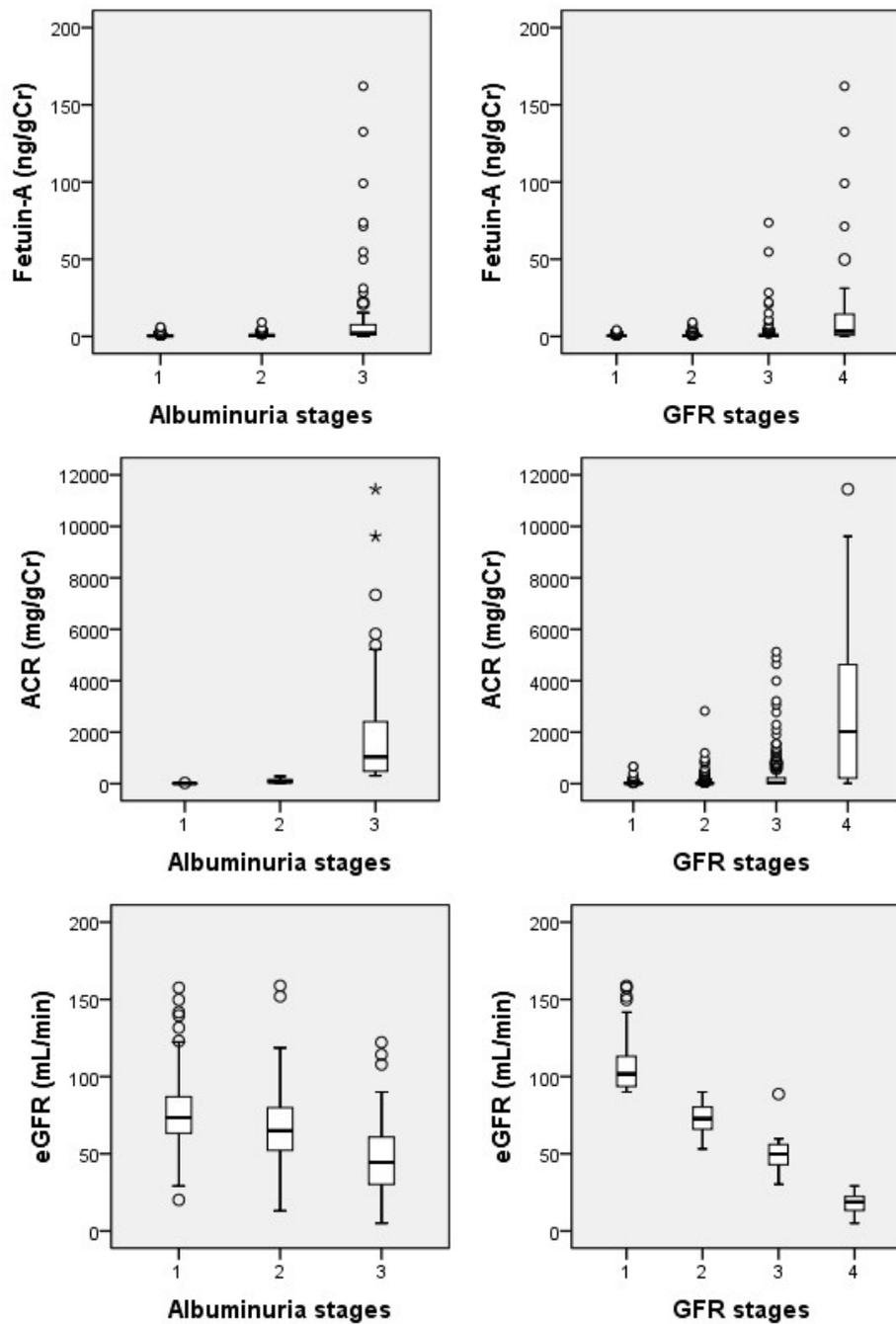


図2 尿中 fetuin-A 排泄量と臨床パラメータとの単相関

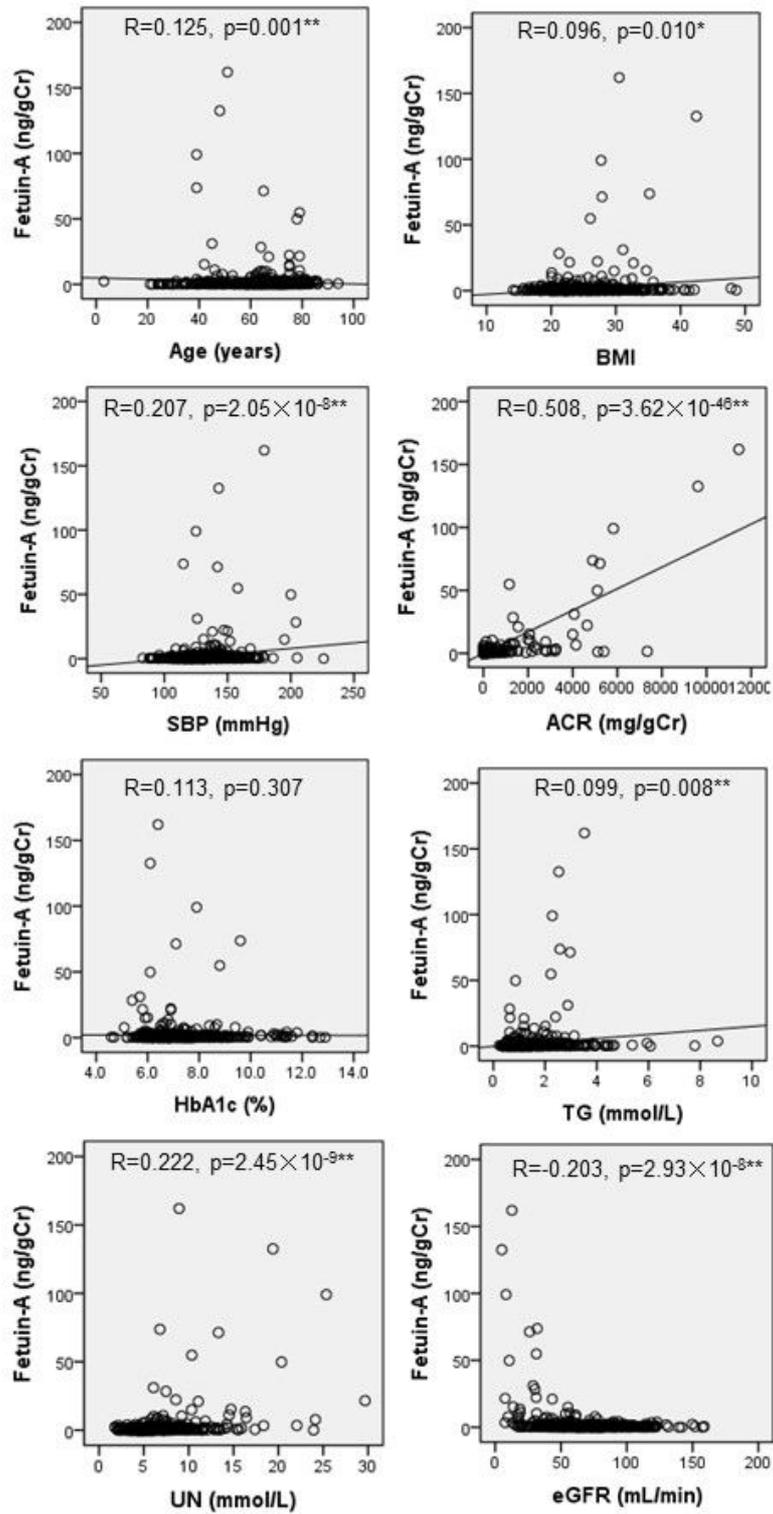


表1 アルブミン尿ステージと臨床データ (n=688).

	A1	A2	A3	Total	Kruskal-Wallis
Number	442			688	
(male/female)	(257/185)	169 (94/75)	77 (44/33)	(395/293)	
Age (years)	61.7±13.1	66.0±11.2	60.4±12.8	62.6±12.8	0.002**
BMI (kg/m ²)	24.6±4.3	25.1±4.2	27.6±5.8	25.0±4.6	0.000**
SBP (mmHg)	127.9±16.9	131.6±16.8	139.1±22.0	130.0±17.8	0.000**
DBP (mmHg)	73.4±11.1	72.0±11.5	75.3±13.0	73.3±11.4	0.228
HbA1c (%)	7.10±1.07	7.20±1.19	7.15±1.31	7.13±1.13	0.471
Glucose (mmol/L)	8.61±3.22	8.67±3.58	8.34±2.99	8.60±3.28	0.829
T-Cho (mmol/L)	4.67±0.81	4.56±0.82	4.71±1.11	4.65±0.85	0.381
TG (mmol/L)	1.37±0.89	1.50±0.78	1.74±0.99	1.44±0.89	0.000**
HDL-C (mmol/L)	1.49±0.45	1.43±0.43	1.38±0.45	1.47±0.44	0.059
LDL-C (mmol/L)	2.62±0.65	2.53±0.70	2.61±0.79	2.59±0.68	0.177
Cr (μmol/L)	67.7±18.9	79.5±35.9	146.2±129.2	79.4±54.6	0.000**
UN (mmol/L)	5.64±1.92	6.51±2.57	9.03±4.79	6.24±2.77	0.000**
Uric acid (μmol/L)	298.7±73.6	332.1±84.5	382.1±235.9	316.3±110.3	0.000**
eGFR (mL/min)	76.1±19.7	66.5±22.8	46.4±25.6	70.4±23.2	0.000**
ACR (mg/gCr)	11.0±6.9	72.0±11.5	1900±2166	246.5±931	0.000**
Fetuin-A (ng/gCr)	0.52±0.60	0.96±1.07	12.3±28.6	1.96±10.2	0.000**

BMI, body mass index; SBP, Systolic Blood Pressure; DBP, 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 rate; ACR, albumin / creatinine ratio; *, p < 0.05; **, p < 0.01.

表2 糸球体濾過量によるステージ分類と臨床データ (n=737).

	G1	G2	G3	G4	Total	Kruskal-Wallis
Number		391	188		737	
(male/female)	127 (66/61)	(237/154)	(104/84)	31 (15/16)	(422/315)	
Age (years)	52.5±15.3	62.9±10.3	65.0±16.2	65.0±16.2	63.0±12.7	0.000**
BMI (kg/m ²)	25.3±5.1	25.0±4.7	25.0±4.2	26.2±4.8	25.1±4.6	0.406
SBP (mmHg)	129.6±15.1	129.9±18.0	130.2±18.9	138.1±20.5	130.3±18.0	0.127
DBP (mmHg)	74.6±11.2	74.4±11.5	70.5±10.8	73.0±12.5	73.4±11.4	0.001**
HbA1c (%)	7.48±1.42	7.13±1.09	6.96±0.88	6.71±0.81	7.13±1.11	0.002**
Glucose (mmol/L)	8.60±3.06	8.80±3.37	8.25±3.14	7.79±2.90	8.58±3.25	0.035*
T-Cho (mmol/L)	4.78±0.87	4.68±0.82	4.51±0.80	4.61±1.19	4.65±0.84	0.004**
TG (mmol/L)	1.41±1.12	1.41±0.84	1.47±0.77	1.66±0.72	1.43±0.87	0.005**
HDL-C (mmol/L)	1.52±0.44	1.50±0.47	1.38±0.35	1.30±0.31	1.30±0.31	0.008**
LDL-C (mmol/L)	2.74±0.73	2.60±0.65	2.52±0.63	2.55±0.91	2.60±0.67	0.016
Cr (μmol/L)	50.0±9.42	66.8±11.6	95.0±23.7	272.0±153.1	79.7±55.2	0.000**
UN (mmol/L)	4.85±1.58	5.50±1.37	7.23±2.03	15.5±5.45	6.26±2.87	0.000**
Uric acid (μmol/L)	268.2±69.8	307.2±73.9	348.0±163.5	415.8±58.1	315.5±108.5	0.000**
eGFR (mL/min)	105.0±14.3	73.3±8.2	48.8±9.0	18.1±6.7	70.2±23.2	0.000**
ACR (mg/gCr)	44.5±102.0	66.4±200.3	363.0±865.1	2736±3087	246.9±932.0	0.000**
Fetuin-A (ng/gCr)	0.64±0.73	0.70±0.96	2.30±7.42	21.2±40.6	1.97±9.96	0.000**

BMI, body mass index; SBP, Systolic Blood Pressure; DBP, 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 rate; ACR, albumin / creatinine ratio; *, p < 0.05; **, p < 0.01.

表3 尿中 fetuin-A 排泄量と臨床データの単相関(n=737)

	Fetuin-A (ng/gCr)
Age (years)	R=0.125, p=0.001**
BMI (kg/m ²)	R=0.096, p=0.010*
SBP (mmHg)	R=0.207, p=2.05×10 ^{-8**}
DBP (mmHg)	R=0.061, p=0.104
HbA1c (%)	R=0.113, p=0.307
Glucose (mmol/L)	R=0.079, p=0.032*
T-Cho (mmol/L)	R=-0.008, p=0.824
TG (mmol/L)	R=0.099, p=0.008**
HDL-C (mmol/L)	R=-0.090, p=0.015*
LDL-C (mmol/L)	R=0.007, p=0.858
Cr (μmol/L)	R=0.186, p=4.10×10 ^{-7**}
UN (μmol/L)	R=0.220, p=2.45×10 ^{-9**}
Uric acid (μmol/L)	R=0.046, p=0.218
eGFR (mL/min)	R=-0.203, p=2.93×10 ^{-8**}
ACR (mg/gCr)	R=0.508, p=3.62×10 ^{-46**}

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 rate; ACR, albumin / creatinine ratio; *, p < 0.05; **, p < 0.01.

表4 糸球体濾過量と臨床データの単相関(n=737)

	eGFR (mL/min)
Age (years)	R=-0.421, p=5.65×10 ^{-33**}
BMI (kg/m ²)	R=-0.021, p=0.564
SBP (mmHg)	R=-0.046, p=0.218
DBP (mmHg)	R=0.111, p=0.003*
HbA1c (%)	R=0.142, p=1.17×10 ^{-4**}
Glucose (mmol/L)	R=0.073, p=0.046*
T-Cho (mmol/L)	R=0.136, p=2.42×10 ^{-4**}
TG (mmol/L)	R=-0.104, p=0.005**
HDL-C (mmol/L)	R=0.116, p=0.002*
LDL-C (mmol/L)	R=0.131, p=3.89×10 ^{-4**}
Cr (μmol/L)	R=-0.836, p=1.17×10 ^{-193**}
UN (μmol/L)	R=-0.563, p=8.07×10 ^{-62**}
Uric acid (μmol/L)	R=-0.397, p=4.78×10 ^{-29**}
ACR (mg/gCr)	R=-0.287, p=1.58×10 ^{-14**}
Fetuin-A (ng/gCr)	R=-0.203, p=2.94×10 ^{-8**}

BMI, body mass index; SBP, Systolic Blood Pressure; DBP, 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 rate; ACR, albumin / creatinine ratio; *, p < 0.05; **, p < 0.01.

表5 尿中アルブミン排泄量と臨床データの単相関(n=737)

	ACR (mg/gCr)
Age (years)	R=0.125, p=0.001**
BMI (kg/m ²)	R=0.157, p=3.89×10 ^{-5**}
SBP (mmHg)	R=0.215, p=1.57×10 ^{-8**}
DBP (mmHg)	R=0.024, p=0.529
HbA1c (%)	R=0.032, p=0.407
Glucose (mmol/L)	R=0.005, p=0.906
T-Cho (mmol/L)	R=-0.031, p=0.426
TG (mmol/L)	R=0.118, p=0.002**
HDL-C (mmol/L)	R=-0.090, p=0.015*
LDL-C (mmol/L)	R=-0.052, p=0.177
Cr (μmol/L)	R=0.226, p=1.94×10 ^{-9**}
UN (μmol/L)	R=0.287, p=2.51×10 ^{-14**}
Uric acid (μmol/L)	R=0.209, p=3.37×10 ^{-8**}
eGFR (mL/min)	R=-0.287, p=1.58×10 ^{-14**}
Fetuin-A (ng/gCr)	R=0.508, p=3.62×10 ^{-46**}

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 rate; ACR, albumin / creatinine ratio; *, p < 0.05; **, p < 0.01.

表6 糸球体濾過量を従属変数としたステップワイズ重回帰分析(n=737).

Dependent variable	Independent variable	Unstandardized coefficient		Standardized coefficient	t value	P value	Adjusted R ²
		B	Standard Error	Beta			
Model 1	ACR (mg/gCr)	-0.010	0.001	-0.390	-10.969	7.26 x10 ⁻²⁶	0.151
Model 2	ACR (mg/gCr)	-0.009	0.001	-0.385	-11.066	2.93 x10 ^{-26**}	0.186
	HbA1c (%)	3.937	0.716	0.191	5.498	5.47x10 ^{-8**}	
Model 3	ACR (mg/gCr)	-0.010	0.001	-0.401	-11.574	2.27x10 ^{-28**}	0.204
	HbA1c (%)	3.614	0.712	0.176	5.073	5.08x10 ^{-7**}	
	DBP (mmHg)	0.286	0.070	0.142	4.068	5.30x10 ^{-5**}	
Model 4	ACR (mg/gCr)	-0.010	0.001	-0.392	-11.466	6.53x10 ^{-28**}	0.226
	HbA1c (%)	3.730	0.703	0.181	5.305	1.54x10 ^{-7**}	
	DBP (mmHg)	0.320	0.070	0.158	4.581	5.51x10 ^{-6**}	
	HDL-C (mmol/L)	7.870	1.779	0.151	4.424	1.13x10 ^{-5**}	
Model 5	ACR (mg/gCr)	-0.010	0.001	-0.401	-11.784	2.27x10 ^{-29**}	0.238
	HbA1c (%)	3.488	0.701	0.169	4.973	8.14x10 ^{-7**}	
	DBP (mmHg)	0.290	0.070	0.143	4.152	3.72x10 ^{-5**}	
	HDL-C (mmol/L)	7.711	1.766	0.148	4.367	1.46x10 ^{-5**}	
	LDL-C (mmol/L)	3.982	1.177	0.116	3.383	0.001*	

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 models 1 to 4. In model 5, all parameters are included in the analysis.

*, p < 0.05; **, p < 0.01.

表7 糸球体濾過量を従属変数としたステップワイズ重回帰分析(n=737).

Dependent variable	Independent variable	Unstandardized coefficient		Standardized coefficient	t value	P value	Adjusted R ²
		B	Standard Error	Beta			
Model 1	Fetuin-A (ng/gCr)	-0.643	0.083	-0.279	-7.761	2.92x10 ^{-14**}	0.078
Model 2	Fetuin-A (ng/gCr)	-0.641	0.081	-0.278	-7.866	1.16x10 ^{-14**}	0.114
	HbA1c (%)	4.004	0.736	0.191	5.440	7.30x10 ^{-8**}	
Model 3	Fetuin-A (ng/gCr)	-0.630	0.081	-0.273	-7.812	1.88x10 ^{-14**}	0.130
	HbA1c (%)	4.136	0.731	0.198	5.662	2.17x10 ^{-8**}	
	HDL-C (mmol/L)	6.674	1.836	0.127	3.635	2.98x10 ^{-4**}	
Model 4	Fetuin-A (ng/gCr)	-0.661	0.080	-0.287	-8.242	8.09x10 ^{-16**}	0.148
	HbA1c (%)	3.832	0.728	0.183	5.265	1.86x10 ^{-7**}	
	HDL-C (mmol/L)	7.462	1.830	0.142	4.078	5.06x10 ^{-5**}	
	DBP (mmHg)	0.275	0.072	0.135	3.846	1.31x10 ^{-4**}	
Model 5	Fetuin-A (ng/gCr)	-0.666	0.080	-0.288	-8.327	4.24x10 ^{-16**}	0.156
	HbA1c (%)	3.624	0.730	0.173	4.966	8.55x10 ^{-7**}	
	HDL-C (mmol/L)	7.376	1.823	0.140	4.045	5.80x10 ^{-5**}	
	DBP (mmHg)	0.250	0.072	0.123	3.479	0.001**	
	LDL-C (mmol/L)	3.077	1.213	0.089	2.538	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 models 1 to 4. In model 5, all parameters are included in the analysis.

*, p < 0.05; **, p < 0.01.

・ 分担研究報告書

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

Fetuin-A (Ahsg)臓器特異的ノックアウトマウスの樹立

研究分担者 中司敦子・岡山大学病院・腎臓・糖尿病・内分泌内科・助教

研究分担者 江口潤・腎臓・糖尿病・内分泌内科・助教

研究分担者 勅使川原早苗・岡山大学院医歯薬学総合研究科・地域医療人材育成講座・助教

研究代表者 和田淳・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・准教授

研究要旨

レクチンマイクロアレイによる糖鎖プロファイルとレクチンアフィニティークロマトグラフィーによる糖蛋白質の同定は、尿中新規バイオマーカーの同定に有用な方法であり、fetuin-Aを同定した。さらに糖尿病性腎症患者の尿中fetuin-A排泄量は、腎症の進展に伴って増加することを本研究で明らかにした。Fetuin-Aの糖尿病性腎症における病態における役割を明らかにするために、臓器特異的なfetuin-Aノックアウトマウスの作製を行った。ターゲットコンストラクトを構築し、マウスES細胞に遺伝子導入して、リコンビネーションを起こした細胞についてPCRを用いてスクリーニングして陽性細胞を得た。現在キメラマウスを作製している。

A . 研究目的

レクチンマイクロアレイによる糖鎖プロファイルとレクチンアフィニティークロマトグラフィーによる糖蛋白質の同定は、尿中新規バイオマーカーの同定に有用な方法であり、fetuin-Aを同定した。さらに糖尿病性腎症患者の尿中fetuin-A排泄量は、腎症の進展に伴って増加することを本研究で明らかにした。

Fetuin-A (α -HS glycoprotein; AHSG) mRNAは主に肝臓および骨組織で発現しており、Fetuin-Aそのものは血中にも分泌されている。またその発現量は少ないものの腎結石などの疾患では腎組織のFetuin-A mRNAの発現が上昇することが知られている (*Urolithiasis* 42(1), 29-37, 2014)。従って糖尿病性腎症が進展してくると、血中に存在する肝臓や骨組織由来のfetuin-Aが、糸球体への濾過が亢進して尿中排泄量が亢進する可能性と、腎局所でのmRNA発現が亢進して尿中排泄が上昇する可能性が考えられる。

従ってFetuin-Aの糖尿病性腎症における病態における役割を明らかにするために、臓器特異的なfetuin-Aノックアウトマウスの作製は有用であると考えた。

B . 研究方法

Figure 1にあるようにエクソン 1 の前後にloxP配列を有するコンストラクトを構築した。5'末端には7 Kb、3'末端には10.2Kbのアームを有している。Figure 2 および 3には野生型とノックアウトマ

ウスのシーケンスを示した。

C . 研究結果

ターゲットコンストラクトを構築し、マウスES細胞に遺伝子導入して、リコンビネーションを起こした細胞についてPCRを用いてスクリーニングして陽性細胞を得た。現在キメラマウスを作製している。

D . 考察

Creトランジェニックマウスを用いて肝臓特異的なfetuin-Aノックアウトマウスや腎尿細管細胞特異的ノックアウトマウスを作出する予定である。これらのマウスにストレプトゾトシンを投与した1型糖尿病モデルや、高脂肪高蔗糖食を用いた肥満糖尿病マウスモデルを作成して、腎症の進展について検討する予定である。

Fetuin-Aは異所性石灰化の抑制因子あるいは、炎症を抑制する因子として知られている。またFetuin-Aは肥満状態で発現が亢進し、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 (*JASN* 21, 406-412, 2010)。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FFA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報告されている (*Nature Medicine* 18(8), 1279-1285, 2012)。

Fetuin-Aが腎症の進展に従ってその尿中排泄が増加するが、それが腎症の進展に抑制的に作用しているのかあるいは促進的に作用しているのかは不明である。このたびのfetuin-A臓器特異的ノックアウトマウスの作出によってそのメカニズムが明らかになるものと思われる。

E . 結論

Fetuin-Aの糖尿病性腎症における病態における役割を明らかにするために、臓器特異的なfetuin-Aノックアウトマウスの作製を行った。ターゲットコンストラクトを構築し、マウスES細胞に遺伝子導入して、リコンビネーションを起こした細胞についてPCRを用いてスクリーニングして陽性細胞を得た。現在キメラマウスを作製している。

F . 健康危険情報

なし

G . 研究発表

1. 論文発表

1. Ogawa D, Eguchi J, Wada J, Terami N, Hatanaka T, Tachibana H, Nakatsuka A, Horiguchi CS, Nishii N, Makino H. Nuclear hormone receptor expression in mouse kidney and renal cell lines. *PLoS ONE* 9(1), e85594, 2014
2. Watanabe M, Nakatsuka A, Murakami K, Inoue K, Terami T, Higuchi C, Katayama A, Teshigawara S, Eguchi J, Ogawa D, Watanabe E, Wada J, Makino H. Pemt deficiency ameliorates endoplasmic reticulum stress in diabetic nephropathy. *PLoS ONE* 9(3), e92647, 2014
3. Miyoshi T, Nakamura K, Yoshida M, Miura D, Oe H, Akagi S, Sugiyama H, Akazawa K, Yonezawa T, Wada J and Ito H. Effect of vildagliptin, a dipeptidyl peptidase 4 inhibitor, on cardiac hypertrophy induced by chronic beta-adrenergic stimulation in rats. *Cardiovascular Diabetology* 13:43, 2014
4. Terami N, Ogawa D, Tachibana H, Hatanaka T, Wada J, Nakatsuka A, Eguchi J, Horiguchi CS, Nishii N, Yamada H, Takei K, Makino H. Long-term treatment with the sodium glucose cotransporter 2 inhibitor, dapagliflozin, ameliorates glucose homeostasis and diabetic nephropathy in db/db mice. *PLoS ONE* 9(6), e100777, 2014.

5. Ono T, Shikata K, Obika M, Miyatake N, Kodera R, Hirota D, Wada J, Kataoka H, Ogawa D, Makino H. Factors associated with remission and/or regression of microalbuminuria in type 2 diabetes mellitus. *Acta Med Okayama* 68(4), 235-241, 2014
6. Hishikawa N, Yamashita T, Deguchi K, Wada J, Shikata K, Makino H, Abe K. *Eur J Neurol* 2014 Sep 15. [Epub ahead of print]

2. 学会発表

1. 肥満により脂肪組織に誘導される膜蛋白 Gpnmb の脂肪肝炎抑制効果 片山晶博、和田淳、中司敦子、江口潤、村上和敏、勅使川原 早苗、樋口千草、布上朋和、天田雅文、肥田 和之、槇野博史 第 57 回本糖尿病学会総会 (大阪) 平成 26 年 5 月 22 日
2. 2 型糖尿病マウスにおける SGLT2 阻害薬ダパグリフロジンの腎保護効果の検討 小川大輔、寺見直人、畑中崇志、橘洋美、江口潤、中司敦子、和田淳、槇野博史 第 57 回本糖尿病学会総会 (大阪) 平成 26 年 5 月 22 日
3. エクソーム解析を行った若年発症糖尿病の 1 例 布上朋和、江口潤、天田雅文、和田淳、四方賢一、槇野博史 第 57 回本糖尿病学会総会 (大阪) 平成 26 年 5 月 23 日
4. 糖尿病腎症第 1 期および第 2 期における腎機能低下要因の解析 小比賀美香子、四方賢一、小野哲一郎、小寺亮、江口潤、廣田大昌、村上和敏、中司敦子、小川大輔、和田淳、片岡仁美、槇野博史 第 57 回本糖尿病学会総会 (大阪) 平成 26 年 5 月 24 日
5. ACAM (adipocyte adhesion molecule) /CLMP の一次繊毛機能を介した脂肪細胞分化と肥満症における意義 村上和敏、和田淳、佐藤美和、江口潤、布上朋和、片山晶博、中司敦子、小川大輔、四方賢一、槇野博史 第 57 回本糖尿病学会総会 (大阪) 平成 26 年 5 月 24 日
6. 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、片山 晶博、渡邊 真由、樋口 千草、天田 雅文、布上 朋和、江口 潤、小川 大輔、槇野 博史 第 57 回本糖尿病学会総会 (大阪) 平成 26 年 5 月 24 日
7. ワークショップ 2 動物モデルを用いた NASH 病態解析 脂肪肝炎における Pemt の意義 中司敦子、松山誠、村上和敏、勅使川原早苗、江口潤、小川大輔、高木章乃夫、福島正樹、山本和秀、槇野博史、和田淳 第 1 回肝臓と糖尿病・代謝研究会 (東京) 平成

26年7月4日

8. 早期糖尿病性腎症患者における尿中 TFF3 (Urinary Trefoil Factor 3)と尿中アルブミンの関連についての検討 寺見直人、小川大輔、山成俊夫、杉山斉、畑中崇志、和田淳、四方賢一、西井尚子、榎野博史 第57回日本腎臓学会総会(横浜)平成26年7月4日
9. 顕性蛋白尿期の2型糖尿病患者におけるアルダクトンの蛋白尿減少効果 加藤佐和子、丸山彰一、榎野博史、和田淳、宇津貴、荒木久澄、古家大祐、金崎啓造、西山成、今井圓裕、安藤昌彦 第57回日本腎臓学会総会(横浜)平成26年7月5日
10. ワークショップ2 ネフローゼ症候群を呈する疾患の最新の診断・治療 レクチンマイクロアレイによる糖尿病性腎症の新規バイオマーカーの同定 和田淳、勅使河原早苗、中司敦子、江口潤 第44回日本腎臓学会西部学術集会(神戸)平成26年10月3日
11. 早期糖尿病性腎症におけるバイオマーカーとしての尿中 TFF (Trefoil factor)の検討 寺見直人、小川大輔、畑中崇志、山成俊夫、杉山斉、四方賢一、榎野博史、和田淳 日本糖尿病学会中国四国地方会第52回総会(広島)平成26年10月24日
12. メタボリックシンドロームにおける脂肪組

織と骨格筋の機能異常を制御する新規因子の探索 天田雅文、江口潤、柴田祐助、布上朋和、片山晶博、勅使河原早苗、村上和敏、中司敦子、和田淳 第35回日本肥満学会(宮崎)平成26年10月25日

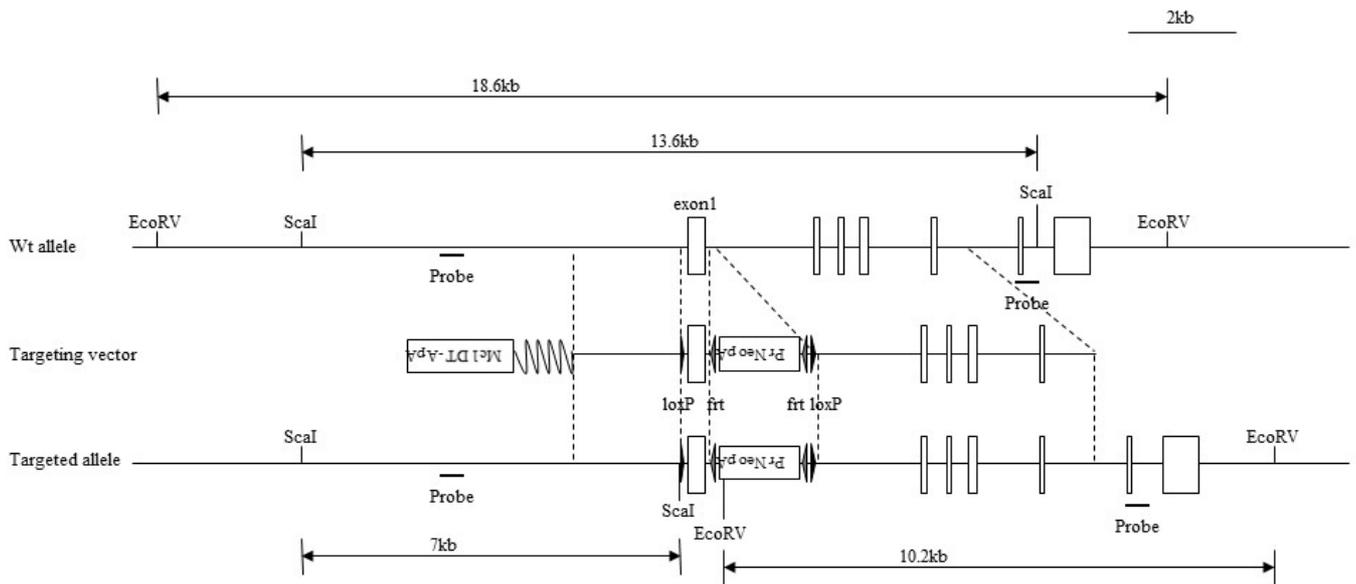
13. メタボリックシンドロームに伴う脂肪肝炎と Pemt の意義 中司敦子、村上和敏、勅使河原早苗、片山晶博、布上朋和、天田雅文、山口哲史、江口潤、和田淳 第35回日本肥満学会(宮崎)平成26年10月25日
14. メタボリックシンドロームにおける Galectin-9 の意義 布上朋和、勅使河原早苗、柴田祐助、天田雅文、片山晶博、村上和敏、江口潤、中司敦子、和田淳 第35回日本肥満学会(宮崎)平成26年10月25日
15. 脂肪細胞における接着とアクチン重合を介した ACAM の抗肥満作用 村上和敏、江口潤、中司敦子、和田淳 第35回日本肥満学会(宮崎)平成26年10月25日

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

1 Target construct of Ahsg knockout mice.

Ahsg(loxP)



2 Sequence of target construct of Ahsg knockout mice.

5arm

ggtacagagaagtgagggtgtgtggttaagagcgactgctatctctctcaccacgctcgtgggggagagacagccaaccgctagcttaaatgccactgtttgttacactgcta
tctgtgttccacccccatgtgaaatftcattttgatagcatttaaatctctccccaggcagacaggtgtgactggtggagatgctcccagtggtggctggctggctggctggc
agaccattgctfcaggggtcccatgcatgagggtgtgaaagctacftcccaaatftcccaatctcatatggacaaagcagctccatctcccaagttcaagaagggtgtga
aagaaagcctaaaagactctctgctgggattgggagccccgaggacgtgagctgaagggagggttaaagcagagccaaggaagagagacatactgctcacaggtaca
gctgtcacgftacctgacagaggattccggagcaggctctfacaacaaaggggaggtgtatatacttccaccctftgactaatgagggtctccataaagaatccctttcattt
gtggctgttctaacccccagtggggacaagctacacttagtagggcagggttcaatccaaggatctgaaattggggtatgtgaaagagagtagattaggtattcgcaaaagaag
gttaagtcagcatttcagctataaatactctctgtggagagtaaaattgcggttcatgtgcctgagctfacaactaaaaagcatccctgtctttccaaatatccattaatgtccagatt
tagtattctgaggaaaagcttagctctctcaaaagagttcctatgtcatgcctttacattaaatgggtacacggftaatagaaaactaaatgactagctagatgtctctgagcgttatg
gcccctctccaagagaactgggagttccattcaggctgtacatgtgcgtgtggctggaagcaaatgcaaaatgagccctgctaccactgtctctgcccctgcaccctccctctc
taccacaaccaagtcgtcgcctacaaagttggtgccaatttagatttccatcagaagttcttctctcttttgaacaagtattccccccccccccgaagcaatgttaaaaacc
acaggcaaatccatccaaatgtaacgggtgacttcgcggtatttgaagtatgtctttgtgtgaaggcttctgtgctcccggctctacatgacatttctgaaacctgicagtgtcctg
cacacactctgaagatcatatctgggactgtcaaaacccacagccacactaacctctgttgagattgcaaaagagtgacagcagaccttgttcataattgctcttgacgtacc
tcaacctgaaatgctggagtcacaaccagaacctgtcaaatgatggctcagaggccagaactccatggtgtgacttgtgcttggctgggaccagagtgctactgtgtgctg
aatggccacacagaagacacagagcagtgctgcctgtctgttccctgcagggctgtgtgtgaggttgcaggggtgaggggtgagggaaaagaggaggcaaacagcta
caccggtcacaccctcgatgtataatcattttactgacttgagcatctccatggctcacggatcttctgacatgtgtggactctctctctctctgactctcttgaggggagat
caatcatcaacgftagaagattaccagagcatgtatagccctatctgctcatattcaggggtgcaaaagcatgtcatattcacgtggatgaccctcacccccacccccaccg
ccactgcagctgcctctgtgctggccatgtccatttaccacctcagccacctctctctctgctgttaccatgttccaggcagactttggaatactttg

agtactcaactttattatacaaaagttgatttaaatgctagc

loxP

ATAACTTCGTATAGCATACATTATACGAAGTTAT

cacatc

Flox arm

cccacagcagcattgactttggcagatctgtggggagagatgatgtcctaacttattgttttccagagctgctgtttgcaaggattatttgaaccagaacagaatctgccac
gccttacgcaattccttggcgggctctgtcagatAAATTAGGCCCTCTGCCCTCTATTGGTCTAGCTCTCCAAGCTGATTATCC
GGGCTGCTCCTGACATTTGCCCATTTTCCAGGGCTCTCTGGAGCAACCATGAAGTCCCTGGTCTTGCTCCT
TTGTTTTGCTCAGCTCTGGGGCTGCCAATCCGCTCCACAAGGTACAGGACTGGGTTTTAGAGAATTGGCTTG
TGATGATCCAGAAGCAGAGCAAGTAGCTTTGTTGGCCGTGACTACCTCAATAATCATCTTCTTCAGGGATT
CAAACAGGTCTTGAATCAGATCGACAAAGTCAAGGTGTGGTCTCGGgtaagtgagcctaccaggaatgagctgaatgaatctggg
taggggatctaaccagtgctcaaggctagcatctcccag

gtcagagcccagcggcccgtagaatcgccgctctagaactagaattct

frt

GAAGTTCCTATACTTTCTAGAGAATAGGAACTTC

ggaataggaactcaagcttgattcagggatctatagatcatgagtgaggaggaatgagctggcccttaatttggtttgctgt

PGK pA

TTAAATTATGATATCCAACCTATGAAACATTATCATAAAGCAATAGTAAAGAGCCTTCAGTAAAGAGCAGGCAT
TTATCTAATCCCACCCACCCCCACCCCGTAGCTCCAATCCTTCCATTCAAATGTAGGTACTCTGTTCTCA
CCCTTCTTAACAAAGTATGACAGGAAAACTTCCATTTAGTGGACATCTTTATTGTTTAATAGATCATCAATT
TCTGCAG

acttacagcggatcagcccc

Neo

TCAGAAGAACTCGTCAAGAAGGCGATAGAAGGCGATGCGCTGCGAATCGGGAGCGGCGATACCGTAAAGC
ACGAGGAAGCGGTCAGCCATTCGCCGCCAAGCTCTTCAGCAATATCACGGGTAGCCAACGCTATGTCCTG
ATAGCGGTCCGCCACACCAGCCGGCCACAGTCGATGAATCCAGAAAAGCGGCCATTTTCCACCATGATATT
CGGCAAGCAGGCATCGCCATGGGTACGACGAGATCCTCGCCGTCGGGCATGCGCGCCTTGAGCCTGGCG
AACAGTTCGGCTGGCGCGAGCCCCTGATGCTCTTCGTCCAGATCATCTGATCGACAAGACCGGCTTCCATC
CGAGTACGTGCTCGCTCGATGCGATGTTTCGCTTGGTGGTCAATGGGCAGGTAGCCGGATCAAGCGTATGC
AGCCGCCGATTGCATCAGCCATGATGGATACTTTCTCGGCAGGAGCAAGGTGAGATGACAGGAGATCCTG
CCCCGGCACTTCGCCAATAGCAGCCAGTCCCTTCCCGCTTCAGTGACAACGTCGAGCACAGCTGCGCAAG
GAACGCCCGTCGTGGCCAGCCACGATAGCCGCGCTGCCTCGTCTGAGTTCATTACGGGCACCGGACAGG
TCGGTCTTGACAAAAGAACCAGGCGCCCTGCGCTGACAGCCGGAACACGGCGGCATCAGAGCAGCCGA
TTGTCTGTTGTGCCAGTCATAGCCGAATAGCCTCTCCACCAAGCGGCCGGAGAACCTGCGTGCAATCCAT
CTTGTTCAATGGCCGATCCCAT

attgctgca

PGK promoter

GGTCGAAAGGCCCGGAGATGAGGAAGAGGAGAACAGCGCGGCAGACGTGCGCTTTTGAAGCGTGCAGAA
TGCCGGGCTCCGGAGGACCTTCGGGCGCCCGCCCGCCCTGAGCCCGCCCTGAGCCCGCCCGGAC
CCACCCCTTCCAGCCTCTGAGCCAGAAAGCGAAGGAGCAAAGCTGCTATTGGCCGCTGCCCAAAGGC

・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
和田淳	エビデンスに基づくCKD診療ガイドライン2013	福井次矢、北原光夫	今日の治療指針2014	医学書院	東京	2014	1831-1834

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
Ogawa D, Eguchi J, Wada J, Terami N, Hatanaka T, Tachibana H, Nakatsuka A, Horiguchi CS, Nishii N, Makino H.	Nuclear hormone receptor expression in mouse kidney and renal cell lines.	<i>PLoS ONE</i>	9(1)	e85594	2014
Watanabe M, Nakatsuka A, Murakami K, Inoue K, Terami T, Higuchi C, Katayama A, Teshigawara S, Eguchi J, Ogawa D, Watanabe E, Wada J, Makino H.	Pemt deficiency ameliorates endoplasmic reticulum stress in diabetic nephropathy.	<i>PLoS ONE</i>	9(3)	E92647	2014
Miyoshi T, Nakamura K, Yoshida M, Miura D, Oe H, Akagi S, Sugiyama H, Akazawa K, Yonezawa T, Wada J and Ito H.	Effect of vildagliptin, a dipeptidyl peptidase 4 inhibitor, on cardiac hypertrophy induced by chronic beta-adrenergic stimulation in rats.	<i>Cardiovascular Diabetology</i>	13	43	2014

Terami N, Ogawa D, Tachibana H, Hatanaka T, Wada J, Nakatsuka A, Eguchi J, Horiguchi CS, Nishii N, Yamada H, Takei K, Makino H.	Long-term treatment with the sodium glucose cotransporter 2 inhibitor, dapagliflozin, ameliorates glucose homeostasis and diabetic nephropathy in db/db mice.	<i>PLoS ONE</i>	9(6)	e100777	2014
Ono T, Shikata K, Obika M, Miyatake N, Koder R, Hirota D, Wada J, Kataoka H, Ogawa D, Makino H.	Factors associated with remission and/or regression of microalbuminuria in type 2 diabetes mellitus.	<i>Acta Med Okayama</i>	68(4)	235-241	2014
Hishikawa N, Yamashita T, Deguchi K, Wada J, Shikata K, Makino H, Abe K.	Cognitive and affective functions in diabetic patients associated with diabetes-related factors, white matter abnormality and aging.	<i>Eur J Neurol</i>	Sep 15		2014