

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24～26年度 総合研究報告書

研究代表者 和田 淳

平成27(2015)年 3月

目 次

. 平成24～26年度研究班構成員名簿	-----	3
. 総合研究報告書 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	-----	4
. 総合分担研究報告書 1. 血液サンプル・尿サンプルのレクチンアレイ解析の基礎的検討 中司敦子、江口潤、勅使河原早苗、利根淳仁、肥田和之、伊勢田泉、和田淳	-----	10
2. 尿サンプルのレクチンアレイによる新規バイオマーカーの同定 中司敦子、江口潤、勅使河原早苗、利根淳仁、肥田和之、伊勢田泉、和田淳	-----	10
3. 尿中バイオマーカーのELISAによる測定 中司敦子、江口潤、勅使河原早苗、利根淳仁、肥田和之、伊勢田泉、和田淳	-----	10
4. Fetuin-A (Ahsg)臓器特異的ノックアウトマウスの樹立 中司敦子、江口潤、勅使河原早苗、利根淳仁、肥田和之、伊勢田泉、和田淳	-----	10
. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	33

・平成24～26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	楳野博史	岡山大学病院	病院長
	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
	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
	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
	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
	清水一紀	心臓病センター・榎原病院・糖尿病センター	副センター長
研究協力者	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	准教授
	中塔辰明	CKD・CVD地域連携・心腎血管病態解析学講座	
	滝上慶一	岡山済生会総合病院・糖尿病センター	センター長
	井上謙太郎	津山中央病院	副部長
	今村麻理子	三豊総合病院	内科医長
		岡山大学大学院医歯薬学総合研究科	大学院生

・総合研究報告書

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と同時に、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コ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 (BioVendor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モデル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。

研究分担者

楳野博史(岡山大学病院・病院長)、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)、利根淳仁(岡山大学病院・糖尿病センター・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)、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)、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・榎原病院・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。しかしそれらの糖鎖修飾は、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難い。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 -galacoside 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コ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。 α 1-microglobulin, orosomucoid, 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。 α 1-microglobulin は腎臓間質マーカーとして、また orosomucoid 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 α 1-microglobulin, orosomucoid, 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が開始した。

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(BioVendor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
榎原病院	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($R=0.207, p=2.05\times10^{-8}$)、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($R=0.186, p=4.10\times10^{-7}$)、尿素窒素($R=0.220, p=2.45\times10^{-9}$)、ACR($R=0.508, p=3.62\times10^{-46}$)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($R=-0.203, p=2.93\times10^{-8}$)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($R=-0.421, p=5.65\times10^{-33}$)と血清クレアチニン($R=-0.836, p=1.17\times10^{-193}$)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($R=0.142, p=1.17\times10^{-4}$)、血糖($R=0.073, p=0.046$)、総コレステロール($R=0.136,$

$p=2.42\times10^{-4}$)、HDLコレステロール ($R=0.116$, $p=0.002$)、LDLコレステロール ($R=0.131$, $p=3.89\times10^{-4}$)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 ($R=-0.563$, $p=8.07\times10^{-62}$)、尿酸 ($R=-0.397$, $p=4.78\times10^{-29}$)、ACR ($R=-0.287$, $p=1.58\times10^{-14}$)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 ($R=0.157$, $p=3.89\times10^{-5}$)、収縮期血圧 ($R=0.215$, $p=1.57\times10^{-8}$)、トリグリセリド ($R=0.118$, $p=0.002$)、血清クレアチニン ($R=0.226$, $p=1.94\times10^{-9}$)、尿素窒素 ($R=0.287$, $p=2.51\times10^{-14}$)、尿酸 ($R=0.209$, $p=3.37\times10^{-8}$)、尿中fetuin-A ($R=0.508$, $p=3.62\times10^{-46}$)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 ($R=-0.287$, $p=1.58\times10^{-14}$)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ニ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. Nakatsuka A, Wada J, Hida K, Hida A, Eguchi J, Teshigawara S, Murakami K, Kanzaki M, Inoue K, Terami T, Katayama A, Ogawa D, Kagechika H, Makino H. RXR antagonism induces G0/G1 cell cycle arrest and ameliorates obesity by

- up-regulating the p53-p21^{Cip1} pathway in adipocytes. *J Pathol* 226(5), 784-795, 2012
2. Teshigawara S, Wada J, Hida K, Nakatsuka A, Eguchi J, Murakami K, Kanzaki M, Inoe K, Terami T, Katayama A, Iseda I, Matsushita Y, Miyatake N, McDonald JF, Hotta K, Makino H. Serum vaspin concentrations are closely related to insulin resistance and rs77060950 at SERPINA12 genetically defines distinct group with higher serum levels in Japanese population. *J Clin Endocrinol Metab* 97(7), E1202-1207, 2012
 3. Kawai D, Takaki A, Nakatsuka A, Wada J, Tamaki N, Yasunaka T, Koike K, Tsuzaki R, Matsumoto K, Miyake Y, Shiraha H, Morita M, Makino H, Yamamoto K. Hydrogen-rich water prevents progression of non-alcoholic steatohepatitis and accompanying hepatocarcinogenesis in mice. *Hepatology* 56(3), 912-921, 2012
 4. Kanzaki M, Wada J, Kikumoto Y, Akagi S, Nakao K, Sugiyama H, Makino H. The therapeutic potential of synthetic human atrial natriuretic peptide in nephrotic syndrome: a randomized controlled trial. *Int J Nephrol Renovasc Dis* 5, 91-96, 2012
 5. Nakatsuka A, Wada J, Iseda I, Teshigawara S, Higashio K, Murakami K, Kanzaki M, Inoue K, Terami T, Katayama A, Hida K, Eguchi J, Horiguchi CS, Ogawa D, Matsuki Y, Hiramatsu R, Yagita H, Kakuta S, Iwakura Y, Makino H. Vaspin is an adipokine ameliorating ER stress in obesity as a ligand for cell-surface GRP78/MTJ-1 complex. *Diabetes* 61(11), 2823-2832, 2012
 6. Tachibana H, Ogawa D, Matsushita Y, Bruemmer D, Wada J, Teshigawara S, Eguchi J, Sato-Horiguchi C, Uchida HA, Shikata K, Makino H. Activation of liver x receptor inhibits osteopontin and ameliorates diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 23(11), 1835-1846, 2012
 7. Inoue J, Wada J, Teshigawara S, Hida K, Nakatsuka A, Takatori U, Kojo S, Akagi S, Nakao K, Miyatake N, McDonald JF, Makino H. The serum vaspin levels are reduced in Japanese chronic hemodialysis patients. *BMC Nephrol* 13(1), 163, 2012
 8. Wada J and Makino H. Inflammation and the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Clin Sci* 124(3), 139-152, 2013
 9. Sugiyama K, Sada KE, Kurosawa M, Wada J, Makino H. Current status of the treatment of microscopic polyangiitis and granulomatosis with polyangiitis in Japan. *Clin Exp Nephrol* 17(1), 51-58, 2013
 10. Murakami K, Wada J, Ogawa D, Horiguchi CS, Miyoshi T, Sasaki M, Uchida HA, Nakamura Y, Makino H. The effects of telmisartan treatment on the abdominal fat depot in patients with metabolic syndrome and essential hypertension: Abdominal fat Depot Intervention Program of Okayama (ADIPO). *Diab Vasc Dis Res* 10(1), 93-96, 2013
 11. Sato-Horiguchi C, Ogawa D, Wada J, Tachibana H, Kodera R, Eguchi J, Nakatsuka A, Terami N, Shikata K, Makino H. Telmisartan attenuates diabetic nephropathy by suppressing oxidative stress in db/db mice. *Nephron Exp Nephrol* 121(3-4), e97-e108, 2013
 12. Nakatsuka A, Wada J, Iseda I, Teshigawara S, Higashio K, Murakami K, Kanzaki M, Inoue K, Terami T, Katayama A, Hida K, Eguchi J, Ogawa D, Matsuki Y, Hiramatsu R, Tagita H, Kakuta S, Iwakura Y, Makino H. Vaspin inhibits apoptosis of endothelial cells as a ligand for cell-surface GRP78/VDAC complex. *Circ Res* 112(5), 771-780, 2013
 13. Kurose Y, Wada J, Kanzaki M, Teshigawara S, Nakatsuka A, Murakami K, Inoue K, Terami T, Katayama A, Watanabe M, Higushi C, Eguchi J, Miyatake N, Makino H. Serum galectin-9 levels are elevated in the patients with type 2 diabetes and chronic kidney disease. *BMC Nephrol* 14, 23, 2013
 14. 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
 15. 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
 16. 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
 17. 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

18. 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
19. 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
20. 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
21. 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.
22. 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
23. 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. PEMT deficiency protects from obesity and insulin resistance, but induces severe steathepatitis. シンポジウム3:慢性炎症とインスリン抵抗性 和田淳、中司敦子、楳野博史 第55回日本糖尿病学会年次学術集会パシフィコ横浜(横浜市)平成24年5月17日
2. Identification of transmembrane proteins expressed in adipocytes under obese-state and the roles soluble forms in fat accumulation. Jun Wada, International Symposium for the Study of Obesity “Translational Science and Epidemiology on Adipomedicine; From Lipodystrophy to Obesity”, Oct 13-14, 2012, Shiran Kaikan of Kyoto University, Kyoto
3. ガレクチノミクス解析からグライコミクス解析へ 和田淳 平成24年度金沢大学戦略的研究推進プログラム - 次世代重点研究プログラム - 第2回シンポジウム 金沢市文化ホール(金沢市)平成24年9月14日
4. Phosphatidylethanolamine N-methyltransferase (PEMT) deficiency protects from obesity and insulin resistance but promote non-alcoholic steatohepatitis with tumorigenesis. Atsuko Nakatsuka, Jun Wada, Kazutoshi Murakami, Takahiro Terami, Akihiro Katayama, Jun Eguchi, Hirofumi Makino, Keystone Symposia, Diabetes — New Insights into Mechanism of Disease and its Treatment (J6), Keystone Resort, Keystone, Colorado, January 29, 2013
5. The pathological role of galectin-9 in metabolic syndrome. Sanae Teshigawara, Jun Wada, Motoko Kanzaki, Kazutoshi Murakami, Akihiro Katayama, Takahiro Terami, Kentaro Inoue, Jun Eguchi, Hirofumi Makino, Keystone Symposia, Diabetes — New Insights into Mechanism of Disease and its Treatment (J6), Keystone Resort, Keystone, Colorado, January 30, 2013
6. Soluble form of transmembrane protein, Gpnmb, is a novel adipokine with a protective role in fatty liver disease in obesity. Akihiro Katayama, Jun Wada, Atsuko Nakatsuka, Jun Eguchi, Kazutoshi Murakami, Motoko Kanzaki, Sanae Teshigawara, Takahiro Terami, Kentaro Inoue, Kazuyuki Hida, Hirofumi Makino, Keystone Symposia, Diabetes — New Insights into Mechanism of Disease and its Treatment (J6), Keystone Resort, Keystone, Colorado, January 19, 2013
7. メタボリックシンドロームにおける Galectin-9 の機能解析神崎資子、和田淳、中司敦子、村上和敏、勅使川原早苗、寺見隆宏、井上謙太郎、片山晶博、四方賢一、秋葉久弥、八木田秀雄、楳野博史 第55回日本糖尿病学会年次学術集会 パシフィコ横浜(横浜市)平成24年5月17日
8. メタボリックシンドロームにおける Gpnmb の意義 片山晶博、和田淳、中司敦子、村上和敏、神崎資子、勅使川原早苗、井上謙太郎、寺見隆宏、肥田和之、四方賢一、楳野博史 第55回日本糖尿病学会年次学術集会 パシフィコ横浜(横浜市)平成24年5月17日
9. 糖尿病性腎症発症および病態進展における miR-34a の発現変化とその機能解析高塚哲全、四方賢一、小寺亮、宮本聰、廣田大昌、梶谷展生、佐藤千景、小川大輔、和田淳、片岡仁美、楳野博史 第55回日本糖尿病学会年次学術集会 パシフィコ横浜(横浜市)平成24年5月17日
10. 早期糖尿病性腎症における Telmsartan の抗酸化作用の検討佐藤千景、小川大輔、松下裕一、橘洋美、小寺亮、廣田大昌、宮本聰、梶

- 谷展生、和田淳、四方賢一、楳野博史第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会 パシフィコ横浜（横浜市）平成 24 年 5 月 17 日
11. ACAM (adipocyte adhesion molecule)の脂肪分化とメタボリックシンドロームにおける意義 村上和敏、和田淳、江口潤、中司敦子、神崎資子、寺見隆宏、井上謙太郎、片山晶博、勅使川原早苗、楳野博史 第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会 パシフィコ横浜（横浜市）平成 24 年 5 月 18 日
12. 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、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、黒瀬祐子、片山晶博、樋口千草、渡邊真由、小川智優央、山田雅雄、四方賢一、楳野博史 第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会 パシフィコ横浜（横浜市）平成 24 年 5 月 19 日
13. 2 型糖尿病患者の腎症に関連する因子の横断的解析 小比賀美香子、四方賢一、小野哲一郎、梶谷展生、小寺亮、宮本聰、廣田大昌、村上和敏、佐藤千景、小川大輔、和田淳、片岡仁美、楳野博史 第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会 パシフィコ横浜（横浜市）平成 24 年 5 月 19 日
14. メタボリック症候群におけるマクロファージ IRF4 (Interferon Regulatory Factor 4)の病態生理学的意義 江口潤、和田淳、楳野博史、Evan Rosen 第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会 パシフィコ横浜（横浜市）平成 24 年 5 月 19 日
15. メタボリックシンドロームにおける phosphatidylethanolamine N-methyl transferase (PEMT)の意義 中司敦子、和田淳、村上和敏、神崎資子、勅使川原早苗、寺見隆宏、井上謙太郎、片山晶博、四方賢一、楳野博史 第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会 パシフィコ横浜（横浜市）平成 24 年 5 月 19 日
16. PSGL-1 を阻害することにより、肥満マウスにおける内臓脂肪と肝臓の炎症とインスリン抵抗性が改善される 廣田大昌、四方賢一、佐藤千景、高塚哲全、宮本聰、小寺亮、梶谷展生、小川大輔、和田淳、片岡仁美、和田淳、楳野博史 第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会 パシフィコ横浜（横浜市）平成 24 年 5 月 19 日
17. 糖尿病性腎症モデルラットにおけるメタロチオネイン(metallothionein)の発現の検討 橋洋美、小川大輔、松下裕一、佐藤千景、和田淳、喜多村真治、前島洋平、四方賢一、楳野博史 第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会 パシフィコ横浜（横浜市）平成 24 年 5 月 19 日
- 会 パシフィコ横浜（横浜市）平成 24 年 5 月 19 日
18. 2 型糖尿病における腎症の発症および進展に関与する因子の解析 小野哲一郎、四方賢一、小比賀美香子、梶谷展生、小寺亮、宮本聰、廣田大昌、村上和敏、佐藤千景、小川大輔、和田淳、片岡仁美、楳野博史 第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会 パシフィコ横浜（横浜市）平成 24 年 5 月 19 日
19. グライコーム解析による糖尿病性腎症バイオマーカーの探索 井上謙太郎、和田淳、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、勅使川原早苗、樋口千草、渡邊真由、小川智優央、山田雅雄、四方賢一、楳野博史 第 55 回日本腎臓学会年次学術集会 パシフィコ横浜（横浜市）平成 24 年 6 月 3 日
20. メタボリックシンドロームにおける phosphatidylethanolamine N-methyl transferase (PEMT)の意義 中司敦子、和田淳、村上和敏、神崎資子、勅使川原早苗、井上謙太郎、寺見隆宏、片山晶博、楳野博史 第 33 回日本肥満学会 ホテルグランビア京都（京都市）平成 24 年 10 月 11 日
21. ACAM (adipocyte adhesion molecule)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、神崎資子、寺見隆宏、井上謙太郎、片山晶博、勅使川原早苗、楳野博史 ホテルグランビア京都（京都市）平成 24 年 10 月 12 日
22. メタボリックシンドロームにおける Gpnmb の意義 片山晶博、和田淳、中司敦子、江口潤、村上和敏、神崎資子、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、楳野博史 ホテルグランビア京都（京都市）平成 24 年 10 月 12 日
23. GWAS で同定されたウエスト：ヒップ比関連 SNP と CT で測定した内臓脂肪面積との関係 堀田紀久子、中田由夫、松尾友明、和田淳、小谷一晃、嶺尾郁夫、浜口和之、益崎裕章、船橋徹、宮崎滋、徳永勝人、山田研太郎、田中喜代次、花房俊昭、及川眞一、坂田利家、松澤佑次、中尾一和 第 33 回日本肥満学会 ホテルグランビア京都（京都市）平成 24 年 10 月 12 日
24. 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、楳野博史 第 56

回日本腎臓学会学術総会（東京）平成 25 年 5 月 10 日

25. 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、楳野博史 第 56 回日本腎臓学会学術総会（東京）平成 25 年 5 月 10 日
26. 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、楳野博史 第 56 回日本腎臓学会学術総会（東京）平成 25 年 5 月 11 日
27. 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、楳野博史 第 56 回日本腎臓学会学術総会（東京）平成 25 年 5 月 11 日
28. 囊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、楳野博史 第 56 回日本腎臓学会学術総会（東京）平成 25 年 5 月 12 日
29. 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、楳野博史 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
30. 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
31. 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
32. Vaspin inhibits apoptosis of endothelial cells as ligand for cell-surfce 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

33. 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、楳野博史 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
34. 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、楳野博史 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
35. 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、橘洋美、堀口千景、小寺亮、江口潤、中司敦子、和田淳、四方賢一、楳野博史 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
36. 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
37. 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
38. 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、楳野博史 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
39. 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、楳野博史 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
40. 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、楳野博史 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

日

41. 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、楳野博史 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
42. 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
43. 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
44. 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
45. 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
46. 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
47. 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、楳野博史 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
48. 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、寺見隆宏、樋口千草、布上朋和、天田雅文、四方賢一、肥田和之、楳野博史 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
49. 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
50. 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
51. 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
52. 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
53. 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、楳野博史 第 57 回日本糖尿病学会総会 (大阪) 平成 26 年 5 月 22 日
54. 2 型糖尿病マウスにおける SGLT2 阻害薬ダバグリフロジンの腎保護効果の検討 小川大輔、寺見直人、畠中崇志、橋洋美、江口潤、中司敦子、和田淳、楳野博史 第 57 回日本糖尿病学会総会 (大阪) 平成 26 年 5 月 22 日尿病とともに生きる人への家族療法的アプローチ 安藤美華代、安藤晋一郎 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
55. 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
56. 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
57. 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
58. 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ロ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
59. 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
60. 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
61. 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
62. 2 型糖尿病患者を対象としたレバ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
63. コミュニケーションを大切にした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
64. 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、笠木 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
65. 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、楳野博史 第 57 回本糖尿病学会総会(大阪)平成 26 年 5 月 23 日
66. 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、楳野博史 第 57 回本糖尿病学会総会(大阪)平成 26 年 5 月 24 日
67. ACAM (adipocyte adhesion molecule) /CLMP の一次纖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、楳野博史 第 57 回本糖尿病学会総会(大阪)平成 26 年 5 月 24 日
68. メタボリックシンドrome 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、楳野博史 第 57 回本糖尿病学会総会(大阪)平成 26 年 5 月 24 日
69. 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
70. レバグリニド (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
71. 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、楳野博史、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
72. 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、杉山育、畠中崇志、和田淳、四方賢一、西井尚子、楳野博史 第 57 回日本腎臓学会総会(横浜)平成 26 年 7 月 4 日
73. 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、楳野博史、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

74. 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
75. 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、畠中崇志、山成俊夫、杉山斎、四方賢一、楳野博史、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
76. 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
77. 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

78. 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
79. 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

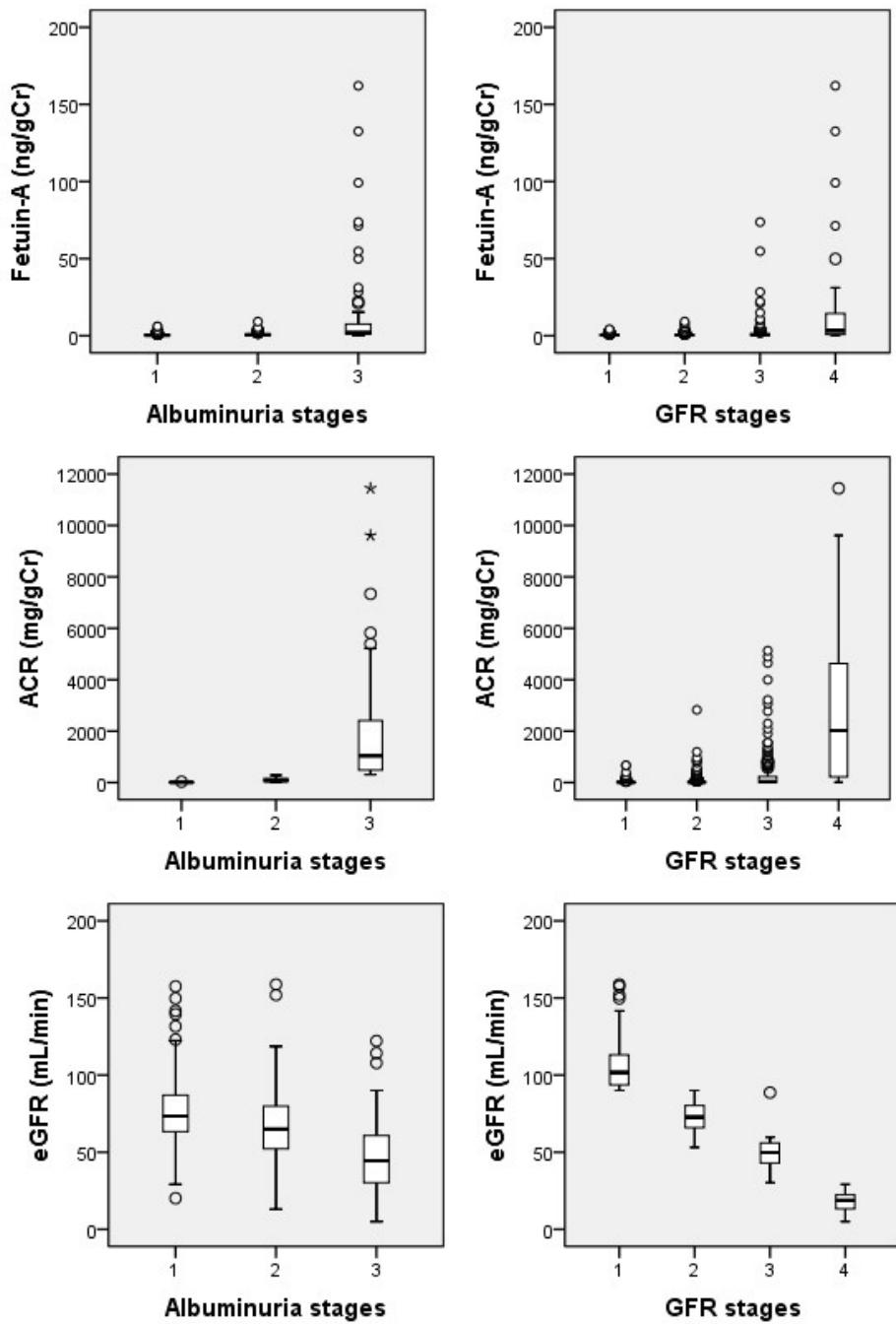


図2 尿中 fetuin-A 排泄量と臨床パラメータとの単相関

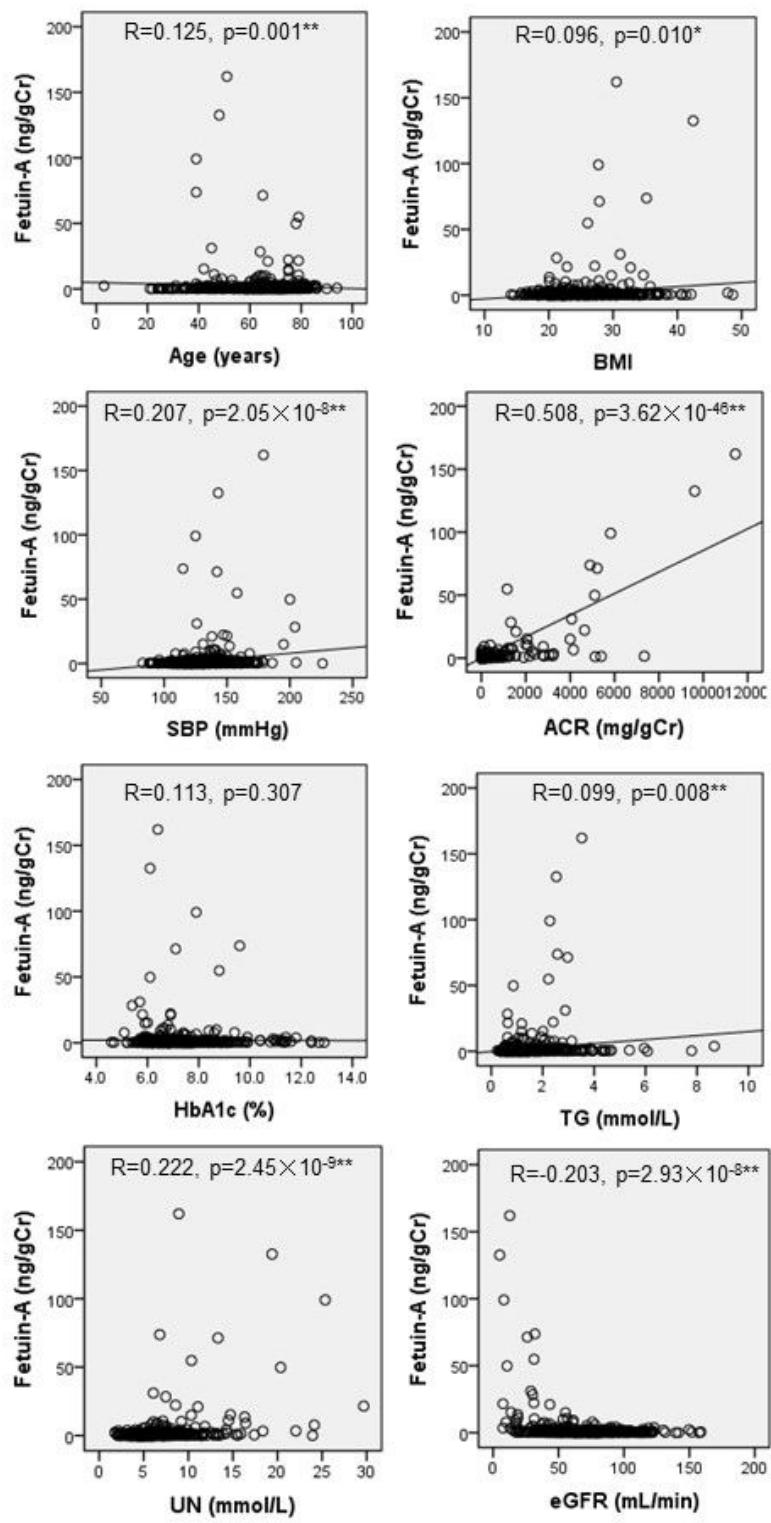


表1 アルブミン尿ステージと臨床データ (n=688).

	A1	A2	A3	Total	Kruskal-Wallis
Number (male/female)	442 (257/185)	169 (94/75)	77 (44/33)	688 (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; 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 (male/female)	127 (66/61)	391 (237/154)	188 (104/84)	31 (15/16)	737 (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; 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 (mmol/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 糖尿病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-Chol (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 (mmol/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-Chol, 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 (mmol/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; 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6 糖尿病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				
Model 1	ACR (mg/gCr)	-0.010	0.001	-0.390	-10.969	7.26×10^{-26}	0.151
Model 2	ACR (mg/gCr)	-0.009	0.001	-0.385	-11.066	$2.93 \times 10^{-26}^{**}$	0.186
	HbA1c (%)	3.937	0.716	0.191	5.498	$5.47 \times 10^{-8}^{**}$	
Model 3	ACR (mg/gCr)	-0.010	0.001	-0.401	-11.574	$2.27 \times 10^{-28}^{**}$	0.204
	HbA1c (%)	3.614	0.712	0.176	5.073	$5.08 \times 10^{-7}^{**}$	
	DBP (mmHg)	0.286	0.070	0.142	4.068	$5.30 \times 10^{-5}^{**}$	
Model 4	ACR (mg/gCr)	-0.010	0.001	-0.392	-11.466	$6.53 \times 10^{-28}^{**}$	0.226
	HbA1c (%)	3.730	0.703	0.181	5.305	$1.54 \times 10^{-7}^{**}$	
	DBP (mmHg)	0.320	0.070	0.158	4.581	$5.51 \times 10^{-6}^{**}$	
	HDL-C (mmol/L)	7.870	1.779	0.151	4.424	$1.13 \times 10^{-5}^{**}$	
Model 5	ACR (mg/gCr)	-0.010	0.001	-0.401	-11.784	$2.27 \times 10^{-29}^{**}$	0.238
	HbA1c (%)	3.488	0.701	0.169	4.973	$8.14 \times 10^{-7}^{**}$	
	DBP (mmHg)	0.290	0.070	0.143	4.152	$3.72 \times 10^{-5}^{**}$	
	HDL-C (mmol/L)	7.711	1.766	0.148	4.367	$1.46 \times 10^{-5}^{**}$	
	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 糖尿病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.

・総合分担研究報告書

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)総合分担研究報告書

1. 血液サンプル・尿サンプルのレクチンアレイ解析の基礎的検討

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

江口潤・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

利根淳仁(岡山大学病院・糖尿病センター・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

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

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

血清サンプルを用いたレクチンマイクロアレイ (GlycoStationTM, LecChipTM) による測定を行うための血清前処置の方法について検討した。血清10 μLをヒト血清用アフィニティ除去スピンドルカートリッジ (Agilent Technologies) にアプライして処理を行い、albumin, IgG, α1-antitrypsin, IgA, transferrin, haptoglobin の6種類の主要タンパク質を除去した。さらに溶出バッファーからPBSへとバッファー交換を行うことによりバッファー交換を施行することによってCy3標識の効率が上昇し、また凍結後のサンプルの凝集を防止することができた。糖尿病性腎症、膜性腎症、IgA腎症患者血清の糖鎖プロファイルの検出に成功し、さらに健常者と比較したが、糖尿病性腎症に特異的な糖鎖構造の変化は見いだせなかった。

尿サンプルを用いたレクチンマイクロアレイ (GlycoStationTM, LecChipTM) による測定を行うための尿前処置の方法について検討した。尿は50 mLをCentriconで5000g・40分、さらにMicroconで14,000g・70分遠心して約100倍に濃縮した。濃縮した尿10 μLをヒト血清用アフィニティ除去スピンドルカートリッジ (Agilent Technologies) にアプライして処理を行い、albumin, IgG, α1-antitrypsin, IgA, transferrin, haptoglobin の6種類の主要タンパク質を除去した。さらに溶出バッファーからPBSへとバッファー交換を行うことによりバッファー交換を施行することによってCy3標識の効率が上昇し、また凍結後のサンプルの凝集を防止することができた。さらに糖尿病性腎症、膜性腎症、腎硬化症患者血清の糖鎖プロファイルを健常者と比較したが、糖尿病性腎症に特異的な糖鎖構造の変化は見いだせたものの、尿サンプルの検討では、疾患により異なる糖鎖プロファイルが検出できた。

A. 研究目的

血清サンプルを用いたレクチンマイクロアレイ (GlycoStationTM, LecChipTM) による測定を行うための血清前処置の方法について検討した。さらに糖尿病性腎症(n=4)・膜性腎症(n=2)・IgA腎症(n=2)において健常人をコントロールとした血清のレクチンマイクロアレイによる糖鎖比較検討を行った。

い、albumin, IgG, α1-antitrypsin, IgA, transferrin, haptoglobin の6種類の主要タンパク質を除去した。この6種類で総タンパク質の85-90%を占めている。

バッファー交換と濃縮

ヒト血清用アフィニティ除去スピンドルカートリッジで最終的に用いる溶出バッファーからPBSへとバッファー交換を行った。溶出バッファーには第1級アミンが含まれており、Cy3標識の際に標識効率が低下してしまうためである。また凍結後サンプルに凝集(沈殿)が生じることが判明し、バッファー交換によって沈殿が回避できることが判明した。ULTRAFREE0.5 BIOMAX-5k (Millipore) にサンプル500 μLをアプライして、10倍濃縮を2回行い、最終的には50 μLに調整した。調整した最終サンプルは20倍希釈してMicroBCA Protein Assay Kit (PIERCE) を用いてタンパク定量

B. 研究方法

血清・尿の前処置

尿は50 mLをCentriconで5000g・40分、さらにMicroconで14,000g・70分遠心して約100倍に濃縮した。血清および濃縮した尿10 μLをそれぞれヒト血清用アフィニティ除去スピンドルカートリッジ (Agilent Technologies) にアプライして処理を行

量を行った。

Cy3標識およびレクチニアレイ解析

タンパク定量の結果をもとに、すべてのサンプルを50 µg/mLに調整し、うち20 µg/mLをCy3 (100 µgタンパク標識用)と混合して室温、暗所にて1時間反応させた。Cy3標識したサンプルをゲル濾過 (Zeba Desalt Spin Columns 0.5 ml, PIRECE)して未反応のCy3を除き、回収されたタンパク量を1 µgとして、Probing Bufferにて2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.063, 0.031 µg/mLの溶液を調整した。それぞれのサンプル各100 µL (1ウエルあたり)をレクチニアレイにアプライして、20 ℃、暗所にて15時間反応させた。

測定および解析

LecChipの測定はGlycoStationTMReader1200によって行った。測定条件は露光時間133 msec, Gain 85, 95, 105, 115とした。測定して得られたスキャン画像(16 bit TIFF)をArray-ProTMAnalyzerによって数値化して専用解析ソフトGlycoStation Toolsを用いて解析を施行した。

C . 研究結果

血清サンプルを用いた糖尿病性腎症、膜性腎症、IgA腎症とコントロールとの比較を図1-3に示した。タンパク濃度250ng/mLをGain 95で測定したシグナルで比較を行った。青が健常者コントロールで、紫色が各症例のシグナルを表している。健常者と患者のサンプルのシグナルの平均値が1となるように規格化を施行してグラフ化している。血清のレクチニアレイ解析では、いずれ症例においても、コントロールとほぼ同様のプロファイルが得られ、糖尿病性腎症に一定した糖鎖構造の変化は見出せなかった。

一方糖尿病性腎症患者の血清サンプル(図4)と尿サンプル(図5)のレクチニアレイを検討したところ、尿サンプルにおいてのみ異なる糖鎖プロファイルが検出できた。

D . 考察

血清のレクチニアレイを施行する際には血清中に多量に存在する主要タンパクを除去し、さらにその溶出バッファーからPBSへのバッファー交換が必要であることが判明した。バッファー交換を施行することによってCy3標識の効率が上昇し、また凍結後のサンプルの凝集を防止することができた。

さらに糖尿病性腎症、膜性腎症、IgA腎症患者血清の糖鎖プロファイルを健常者と比較したが、糖尿病性腎症に特異的な糖鎖構造の変化は見いだせなかった。

糖尿病性腎症、膜性腎症、腎硬化症とコントロールとの比較を図1-2に示した。タンパク濃度250ng/mLをGain 95で測定したシグナルで比較を行った。

青が健常者コントロールで、紫色が各症例のシグナルを表している。健常者と患者のサンプルのシグナルの平均値が1となるように規格化を施行してグラフ化している。血清のレクチニアレイ解析では、いずれ症例においても、コントロールとほぼ同様のプロファイルが得られ、糖尿病性腎症に一定した糖鎖構造の変化は見出せなかった(図1)が、尿レクチニアレイでは疾患により異なる糖鎖プロファイルが検出できた(図2)。

E . 結論

レクチニアレイによる糖鎖プロファイルにおいては、血清サンプルでは疾患特異的な変化が見出される可能性は低く尿サンプルの解析の方が、疾患特異的な変化が見出される可能性が高いと結論した。

F . 健康危険情報

なし

G . 研究発表

1. 論文発表

1. Nakatsuka A, Wada J, Hida K, Hida A, Eguchi J, Teshigawara S, Murakami K, Kanzaki M, Inoue K, Terami T, Katayama A, Ogawa D, Kagechika H, Makino H. RXR antagonism induces G0/G1 cell cycle arrest and ameliorates obesity by up-regulating the p53-p21^{Cip1} pathway in adipocytes. *J Pathol* 226(5), 784-795, 2012
2. Teshigawara S, Wada J, Hida K, Nakatsuka A, Eguchi J, Murakami K, Kanzaki M, Inoue K, Terami T, Katayama A, Iseda I, Matsushita Y, Miyatake N, McDonald JF, Hotta K, Makino H. Serum vaspin concentrations are closely related to insulin resistance and rs77060950 at SERPINA12 genetically defines distinct group with higher serum levels in Japanese population. *J Clin Endocrinol Metab* 97(7), E1202-1207, 2012
3. Kawai D, Takaki A, Nakatsuka A, Wada J, Tamaki N, Yasunaka T, Koike K, Tsuzaki R, Matsumoto K, Miyake Y, Shiraha H, Morita M, Makino H, Yamamoto K. Hydrogen-rich water prevents progression of non-alcoholic steatohepatitis and accompanying hepatocarcinogenesis in mice. *Hepatology* 56(3), 912-921, 2012
4. Kanzaki M, Wada J, Kikumoto Y, Akagi S, Nakao K, Sugiyama H, Makino H. The therapeutic potential of synthetic human atrial natriuretic peptide in nephrotic syndrome: a randomized controlled trial. *Int J Nephrol Renovasc Dis* 5, 91-96, 2012

5. Nakatsuka A, Wada J, Iseda I, Teshigawara S, Higashio K, Murakami K, Kanzaki M, Inoue K, Terami T, Katayama A, Hida K, Eguchi J, Horiguchi CS, Ogawa D, Matsuki Y, Hiramatsu R, Yagita H, Kakuta S, Iwakura Y, Makino H. Vaspin is an adipokine ameliorating ER stress in obesity as a ligand for cell-surface GRP78/MTJ-1 complex. *Diabetes* 61(11), 2823-2832, 2012
6. Tachibana H, Ogawa D, Matsushita Y, Bruemmer D, Wada J, Teshigawara S, Eguchi J, Sato-Horiguchi C, Uchida HA, Shikata K, Makino H. Activation of liver x receptor inhibits osteopontin and ameliorates diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 23(11), 1835-1846, 2012
7. Inoue J, Wada J, Teshigawara S, Hida K, Nakatsuka A, Takatori U, Kojo S, Akagi S, Nakao K, Miyatake N, McDonald JF, Makino H. The serum vaspin levels are reduced in Japanese chronic hemodialysis patients. *BMC Nephrol* 13(1), 163, 2012
8. Wada J and Makino H. Inflammation and the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Clin Sci* 124(3), 139-152, 2013
9. Sugiyama K, Sada KE, Kurosawa M, Wada J, Makino H. Current status of the treatment of microscopic polyangiitis and granulomatosis with polyangiitis in Japan. *Clin Exp Nephrol* 17(1), 51-58, 2013
10. Murakami K, Wada J, Ogawa D, Horiguchi CS, Miyoshi T, Sasaki M, Uchida HA, Nakamura Y, Makino H. The effects of telmisartan treatment on the abdominal fat depot in patients with metabolic syndrome and essential hypertension: Abdominal fat Depot Intervention Program of Okayama (ADIPO). *Diab Vasc Dis Res* 10(1), 93-96, 2013
11. Sato-Horiguchi C, Ogawa D, Wada J, Tachibana H, Kodera R, Eguchi J, Nakatsuka A, Terami N, Shikata K, Makino H. Telmisartan attenuates diabetic nephropathy by suppressing oxidative stress in db/db mice. *Nephron Exp Nephrol* 121(3-4), e97-e108, 2013
12. Nakatsuka A, Wada J, Iseda I, Teshigawara S, Higashio K, Murakami K, Kanzaki M, Inoue K, Terami T, Katayama A, Hida K, Eguchi J, Ogawa D, Matsuki Y, Hiramatsu R, Tagita H, Kakuta S, Iwakura Y, Makino H. Vaspin inhibits apoptosis of endothelial cells as a ligand for cell-surface GRP78/VDAC complex. *Circ Res* 112(5), 771-780, 2013
13. Kurose Y, Wada J, Kanzaki M, Teshigawara S, Nakatsuka A, Murakami K, Inoue K, Terami T, Katayama A, Watanabe M, Higushi C, Eguchi J, Miyatake N, Makino H. Serum galectin-9 levels are elevated in the patients with type 2 diabetes and chronic kidney disease. *BMC Nephrol* 14, 23, 2013
14. 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
15. 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
16. 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
17. 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
18. 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
19. 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
20. 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.
21. 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
22. 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. PEMT deficiency protects from obesity and insulin resistance, but induces severe steathepatitis. シンポジウム3:慢性炎症とインスリン抵抗性 和田淳、中司敦子、楳野博史 第55回日本糖尿病学会年次学術集会パシフィコ横浜(横浜市)平成24年5月17日
2. Identification of transmembrane proteins expressed in adipocytes under obese-state and the roles soluble forms in fat accumulation. Jun Wada, International Symposium for the Study of Obesity “Translational Science and Epidemiology on Adipomedicine; From Lipodystrophy to Obesity”, Oct 13-14, 2012, Shiran Kaikan of Kyoto University, Kyoto
3. ガレクチノミクス解析からグライコミクス解析へ 和田淳 平成24年度金沢大学戦略的研究推進プログラム - 次世代重点研究プログラム - 第2回シンポジウム 金沢市文化ホール(金沢市) 平成24年9月14日
4. Phosphatidylethanolamine N-methyltransferase (PEMT) deficiency protects from obesity and insulin resistance but promote non-alcoholic steatohepatitis with tumorigenesis. Atsuko Nakatsuka, Jun Wada, Kazutoshi Murakami, Takahiro Terami, Akihiro Katayama, Jun Eguchi, Hirofumi Makino, Keystone Symposia, Diabetes — New Insights into Mechanism of Disease and its Treatment (J6), Keystone Resort, Keystone, Colorado, January 29, 2013
5. The pathological role of galectin-9 in metabolic syndrome. Sanae Teshigawara, Jun Wada, Motoko Kanzaki, Kazutoshi Murakami, Akihiro Katayama, Takahiro Terami, Kentaro Inoue, Jun Eguchi, Hirofumi Makino, Keystone Symposia, Diabetes — New Insights into Mechanism of Disease and its Treatment (J6), Keystone Resort, Keystone, Colorado, January 30, 2013
6. Soluble form of transmembrane protein, Gpnmb, is a novel adipokine with a protective role in fatty liver disease in obesity. Akihiro Katayama, Jun Wada, Atsuko Nakatsuka, Jun Eguchi, Kazutoshi Murakami, Motoko Kanzaki, Sanae Teshigawara, Takahiro Terami, Kentaro Inoue, Kazuyuki Hida, Hirofumi Makino, Keystone Symposia, Diabetes — New Insights into Mechanism of Disease and its Treatment (J6), Keystone Resort, Keystone, Colorado, January 19, 2013
7. メタボリックシンドロームにおける Galectin-9 の機能解析 神崎資子、和田淳、中司敦子、村上和敏、勅使川原早苗、寺見隆宏、井上謙太郎、片山晶博、四方賢一、秋葉久弥、八木田秀雄、楳野博史 第55回日本糖尿病学会年次学術集会 パシフィコ横浜(横浜市) 平成24年5月17日
8. メタボリックシンドロームにおける Gpnmb の意義 片山晶博、和田淳、中司敦子、村上和敏、神崎資子、勅使川原早苗、井上謙太郎、寺見隆宏、肥田和之、四方賢一、楳野博史 第55回日本糖尿病学会年次学術集会 パシフィコ横浜(横浜市) 平成24年5月17日
9. 糖尿病性腎症発症および病態進展における miR-34a の発現変化とその機能解析 高塚哲全、四方賢一、小寺亮、宮本聰、廣田大昌、梶谷展生、佐藤千景、小川大輔、和田淳、片岡仁美、楳野博史 第55回日本糖尿病学会年次学術集会 パシフィコ横浜(横浜市) 平成24年5月17日
10. 早期糖尿病性腎症における Telmsartan の抗酸化作用の検討 佐藤千景、小川大輔、松下裕一、橋洋美、小寺亮、廣田大昌、宮本聰、梶谷展生、和田淳、四方賢一、楳野博史 第55回日本糖尿病学会年次学術集会 パシフィコ横浜(横浜市) 平成24年5月17日
11. ACAM (adipocyte adhesion molecule)の脂肪分化とメタボリックシンドロームにおける意義 村上和敏、和田淳、江口潤、中司敦子、神崎資子、寺見隆宏、井上謙太郎、片山晶博、勅使川原早苗、楳野博史 第55回日本糖尿病学会年次学術集会 パシフィコ横浜(横浜市) 平成24年5月18日
12. 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、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、黒瀬祐子、片山晶博、樋口千草、渡邊真由、小川智優央、山田雅雄、四方賢一、楳野博史 第55回日本糖尿病学会年次学術集会 パシフィコ横浜(横浜市) 平成24年5月19日
13. 2型糖尿病患者の腎症に関連する因子の横断的解析 小比賀美香子、四方賢一、小野哲一郎、梶谷展生、小寺亮、宮本聰、廣田大昌、村上和敏、佐藤千景、小川大輔、和田淳、片岡仁美、楳野博史 第55回日本糖尿病学会年次学術集会 パシフィコ横浜(横浜市) 平成24年5月19日
14. メタボリック症候群におけるマクロファージ IRF4 (Interferon Regulatory Factor 4)の病態生理学的意義 江口潤、和田淳、楳野博史、Evan Rosen 第55回日本糖尿病学会年次学術集会 パシフィコ横浜(横浜市) 平成24年5月19日
15. メタボリックシンドロームにおける phosphatidylethanolamine N-methyl transferase

- (PEMT)の意義 中司敦子、和田淳、村上和敏、神崎資子、勅使川原早苗、寺見隆宏、井上謙太郎、片山晶博、四方賢一、楳野博史 第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会 パシフィコ横浜(横浜市)平成 24 年 5 月 19 日
16. PSLG-1 を阻害することにより、肥満マウスにおける内臓脂肪と肝臓の炎症とインスリン抵抗性が改善される 廣田大昌、四方賢一、佐藤千景、高塚哲全、宮本聰、小寺亮、梶谷展生、小川大輔、和田淳、片岡仁美、和田淳、楳野博史 第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会 パシフィコ横浜(横浜市)平成 24 年 5 月 19 日
17. 糖尿病性腎症モデルラットにおけるメタロチオネイン(metallothionein)の発現の検討 橘洋美、小川大輔、松下裕一、佐藤千景、和田淳、喜多村真治、前島洋平、四方賢一、楳野博史 第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会 パシフィコ横浜(横浜市)平成 24 年 5 月 19 日
18. 2 型糖尿病における腎症の発症および進展に関する因子の解析 小野哲一郎、四方賢一、小比賀美香子、梶谷展生、小寺亮、宮本聰、廣田大昌、村上和敏、佐藤千景、小川大輔、和田淳、片岡仁美、楳野博史 第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会 パシフィコ横浜(横浜市)平成 24 年 5 月 19 日
19. グライコーム解析による糖尿病性腎症バイオマーカーの探索 井上謙太郎、和田淳、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、勅使川原早苗、樋口千草、渡邊真由、小川智優央、山田雅雄、四方賢一、楳野博史 第 55 回日本腎臓学会年次学術集会 パシフィコ横浜(横浜市)平成 24 年 6 月 3 日
20. メタボリックシンドロームにおける phosphatidylethanolamine N-methyl transferase (PEMT)の意義 中司敦子、和田淳、村上和敏、神崎資子、勅使川原早苗、井上謙太郎、寺見隆宏、片山晶博、楳野博史 第 33 回日本肥満学会 ホテルグランピア京都(京都市)平成 24 年 10 月 11 日
21. ACAM (adipocyte adhesion molecule)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、神崎資子、寺見隆宏、井上謙太郎、片山晶博、勅使川原早苗、楳野博史 ホテルグランピア京都(京都市)平成 24 年 10 月 12 日
22. メタボリックシンドロームにおける Gpnmb の意義 片山晶博、和田淳、中司敦子、江口潤、村上和敏、神崎資子、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、楳野博史 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
23. GWAS で同定されたウエスト：ヒップ比関連 SNP と CT で測定した内臓脂肪面積との関係 堀田紀久子、中田由夫、松尾友明、和田淳、小谷一晃、嶺尾郁夫、浜口和之、益崎裕章、船橋徹、宮崎滋、徳永勝人、山田研太郎、田中喜代次、花房俊昭、及川眞一、坂田利家、松澤佑次、中尾一和 第 33 回日本肥満学会 ホテルグランピア京都(京都市)平成 24 年 10 月 12 日
24. 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、楳野博史 第 56 回日本腎臓学会学術総会(東京)平成 25 年 5 月 10 日
25. 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、楳野博史 第 56 回日本腎臓学会学術総会(東京)平成 25 年 5 月 10 日
26. 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、楳野博史 第 56 回日本腎臓学会学術総会(東京)平成 25 年 5 月 11 日
27. 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、楳野博史 第 56 回日本腎臓学会学術総会(東京)平成 25 年 5 月 11 日
28. 囊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、楳野博史 第 56 回日本腎臓学会学術総会(東京)平成 25 年 5 月 12 日
29. 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、楳野博史 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

日

30. Vaspin inhibits apoptosis of endothelial cells as ligand for cell-surfce 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
31. 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、横野博史 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
32. 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、横野博史 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
33. 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、横野博史 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
34. 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
35. 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
36. 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、横野博史 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
37. 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 横口千草、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、横野博史 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
38. 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、横口千草、江口潤、横野博史 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
39. 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、横野博史 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
40. 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
41. 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
42. 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
43. 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
44. 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
45. 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、横口千草、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、横野博史 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
46. 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、寺見隆宏、横口千草、布上朋和、天田雅文、四方賢一、肥田和之、横野博史 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

47. 関連についての検討 寺見直人、小川大輔、山成俊夫、杉山斎、畠中崇志、和田淳、四方賢一、西井尚子、楳野博史 第 57 回日本腎臓学会総会（横浜）平成 26 年 7 月 4 日
48. 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、楳野博史 第 57 回本糖尿病学会総会（大阪）平成 26 年 5 月 22 日
49. 2 型糖尿病マウスにおける SGLT2 阻害薬ダバグリフロジンの腎保護効果の検討 小川大輔、寺見直人、畠中崇志、橋洋美、江口潤、中司敦子、和田淳、楳野博史 第 57 回本糖尿病学会総会（大阪）平成 26 年 5 月 22 日
50. 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、楳野博史 第 57 回本糖尿病学会総会（大阪）平成 26 年 5 月 23 日
51. 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、楳野博史 第 57 回本糖尿病学会総会（大阪）平成 26 年 5 月 24 日
52. ACAM (adipocyte adhesion molecule) /CLMP の一次纖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、楳野博史 第 57 回本糖尿病学会総会（大阪）平成 26 年 5 月 24 日
53. 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、楳野博史 第 57 回本糖尿病学会総会（大阪）平成 26 年 5 月 24 日
54. 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、楳野博史、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
55. 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
56. 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、楳野博史、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
57. 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
58. 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、畠中崇志、山成俊夫、杉山斎、四方賢一、楳野博史、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
59. 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
60. 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
61. 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
62. 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. 實用新案登録
なし

図 1 糖尿病性腎症

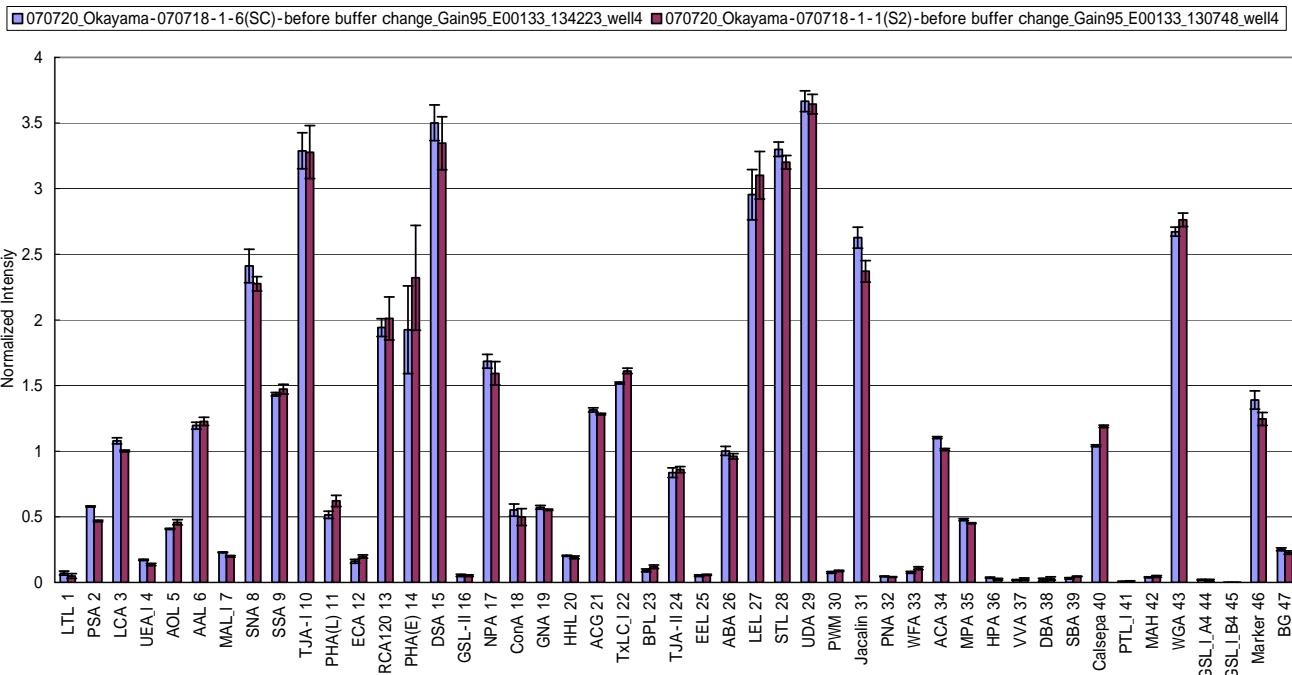


図 2 膜性腎症

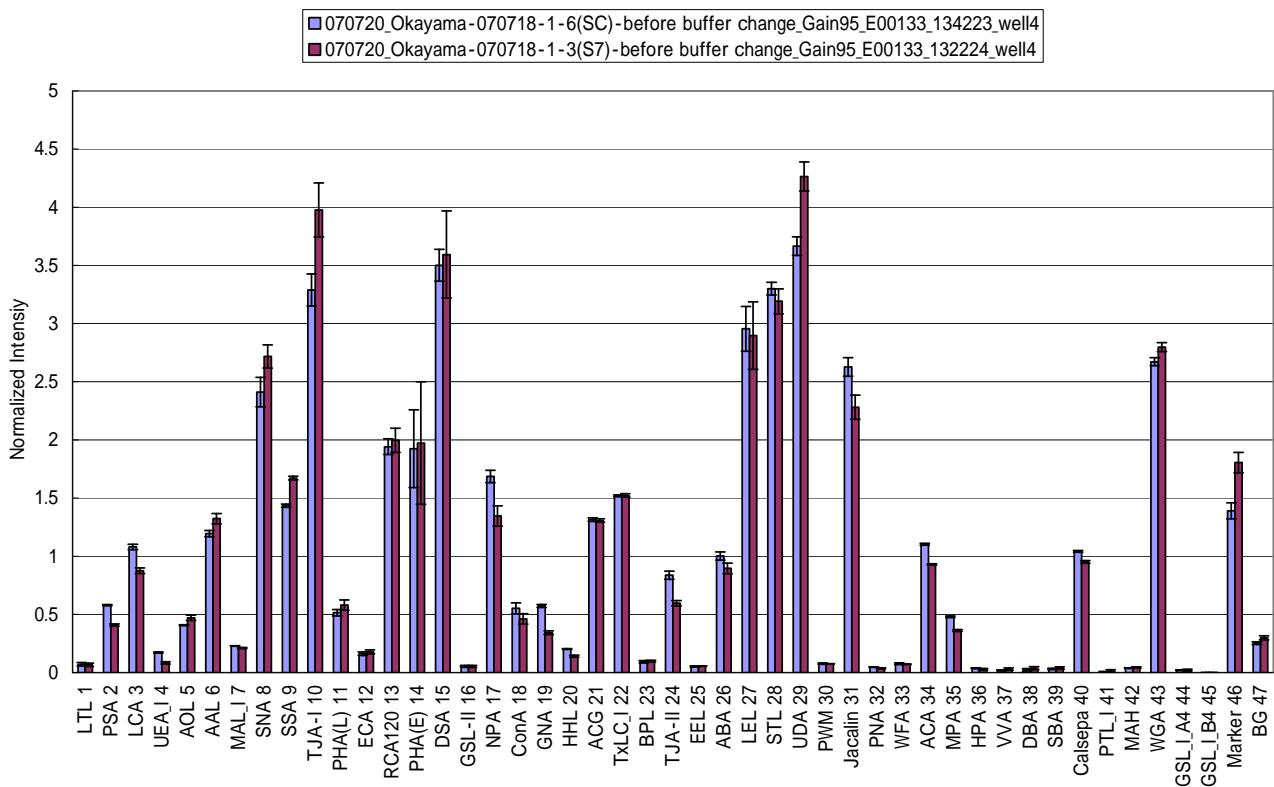


図3 IgA腎症

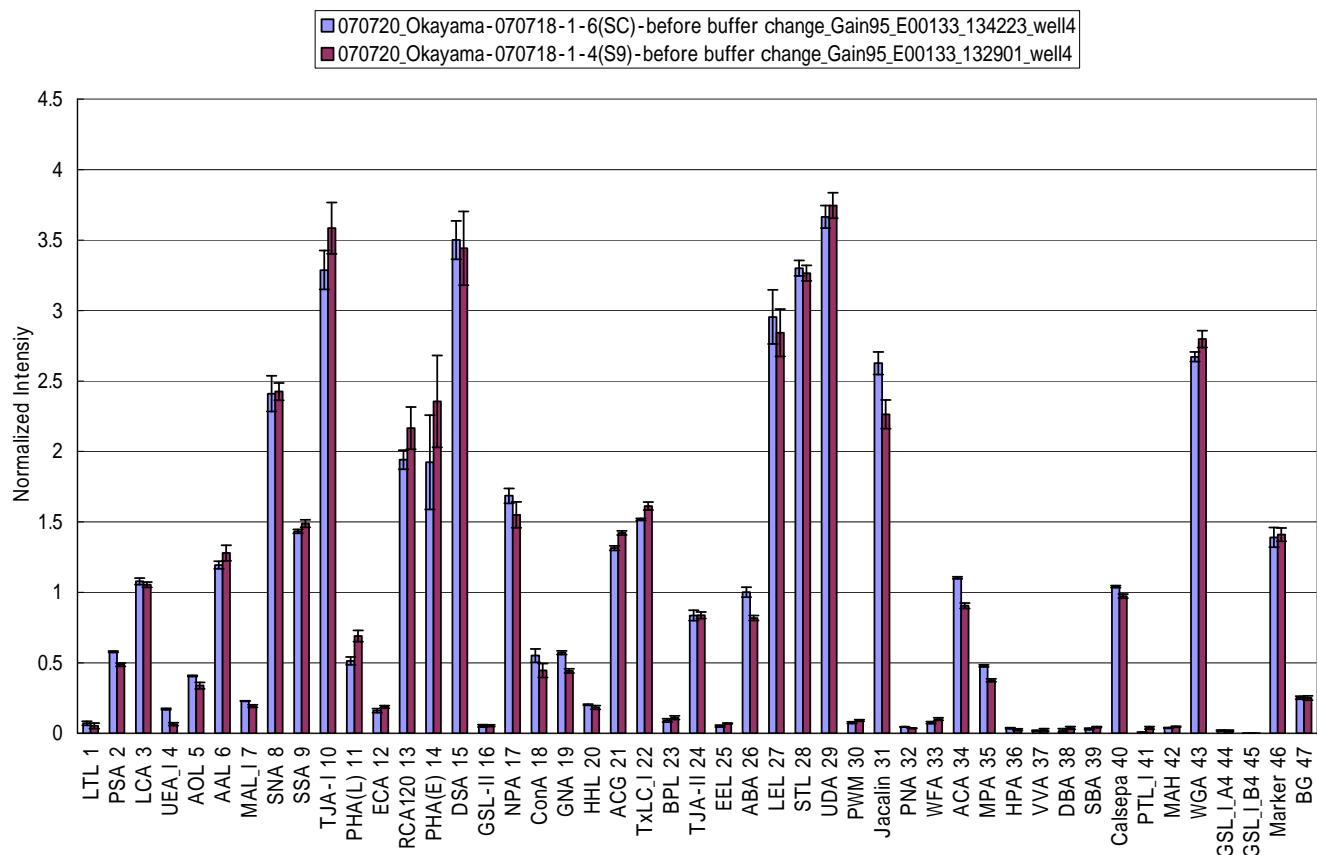


図4 血清レクチナレイ解析 (赤:腎硬化症、青:糖尿病性腎症、緑:膜性腎症)

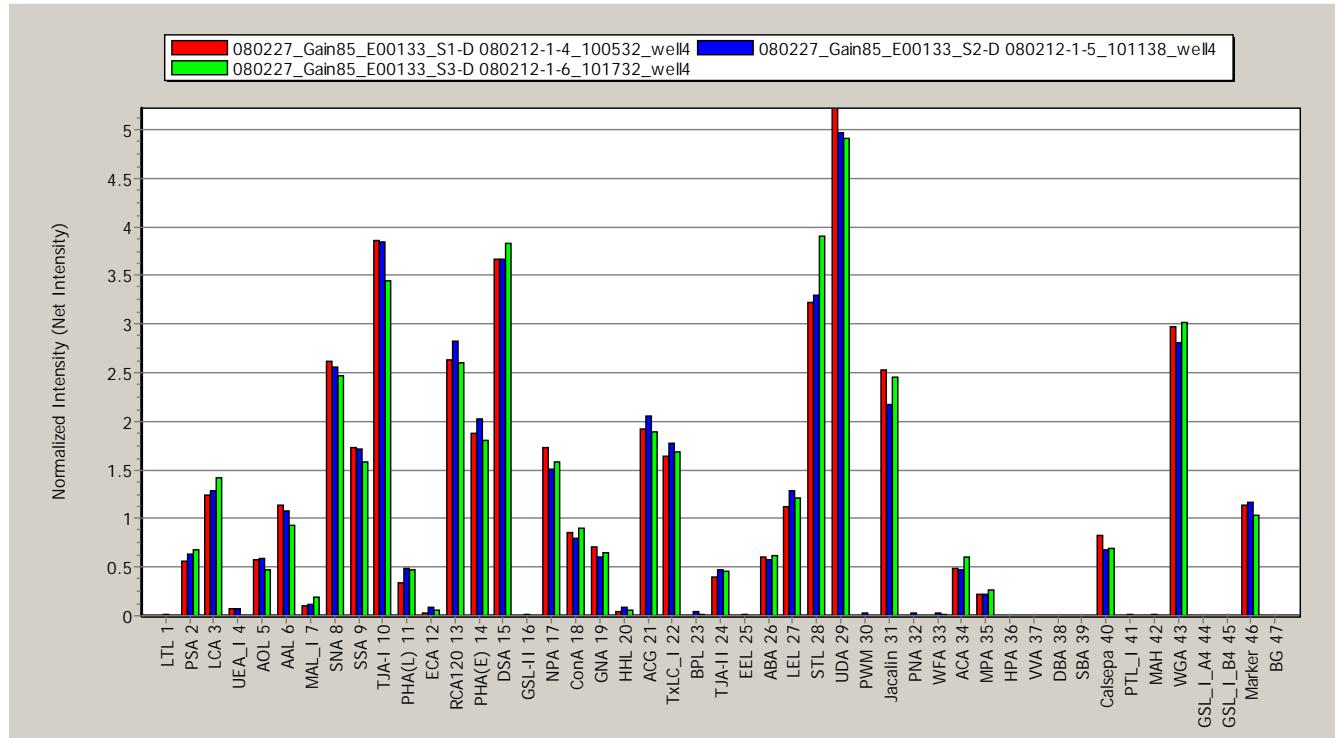
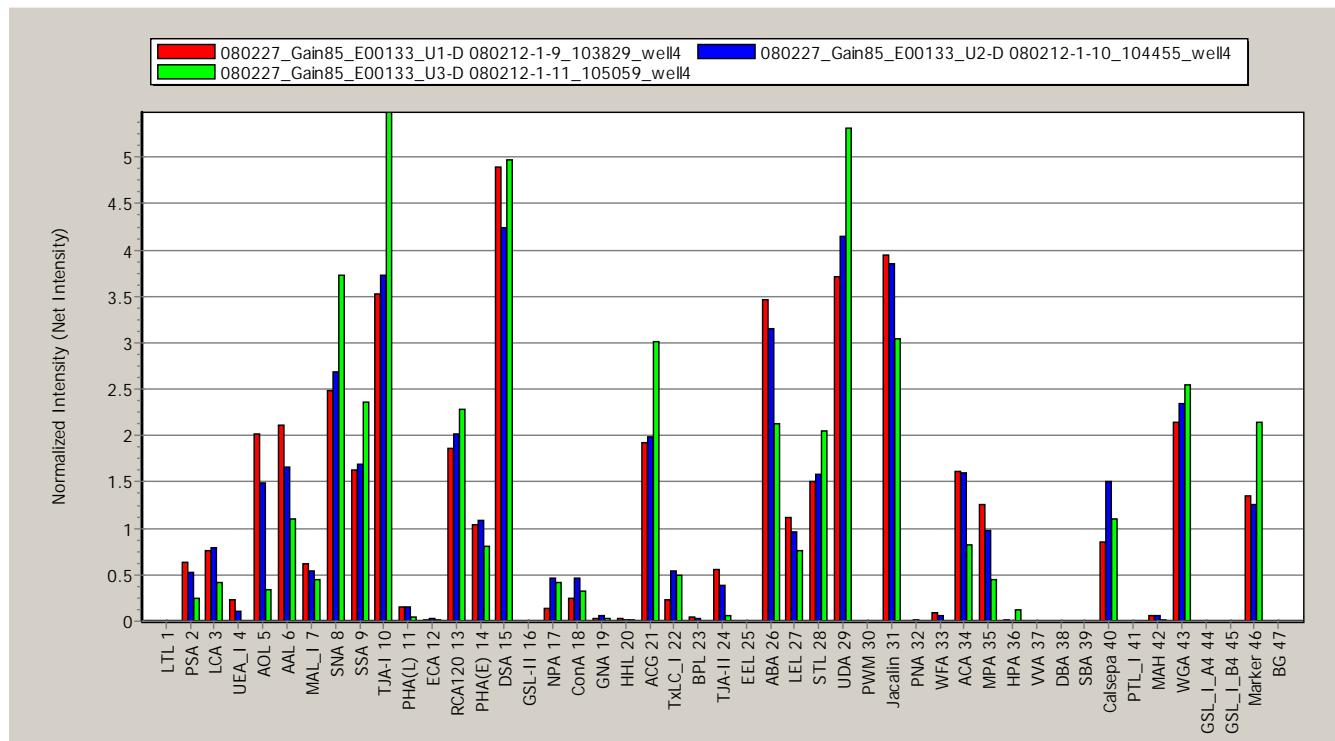


図5 尿レクチナレイ解析 (赤:腎硬化症、青:糖尿病性腎症、緑:膜性腎症)



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)総合分担研究報告書

2. 尿サンプルのレクチンアレイ解析による新規バイオマーカーの同定
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

江口潤・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

利根淳仁(岡山大学病院・糖尿病センター・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

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

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

尿サンプルを用いたレクチンマイクロアレイ (GlycoStationTM, LecChipTM) を、健常者(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)の患者において施行し、糖鎖プロファイルについて比較検討を行った。フコース関連レクチン、ハイマンノース関連レクチンなど多くのレクチンで腎症の進展とともにシグナルが低下する傾向が認められた。N型糖鎖関連レクチン (RCA120, PHA(E), DSA)では、2期にシグナルが増加し、さらに進行すると低下する傾向が認められた。 α 2-3シアル酸 (MAL-1) および α 2-6シアル酸関連レクチン (SNA, SSA, TJA-1) では、腎症の進展とともにシグナルが増加する傾向が認められた。SSAレクチンカラムによるアフィニティクロマトグラフィーによって得られた糖蛋白質を同定したところ、haptoglobin, α 2-macroglobulin, apolipoprotein A-I, protein AMBP (α 1-microglobulin), ceruloplasmin, α 1-acid glycoprotein (orosomucoid), α 2-HS-glycoprotein (fetuin-A), angiotensinogenなどが得られた。これらの糖蛋白質にはシアル酸を糖鎖として有するもの同定されており、これらは糖尿病性腎症の新規尿中バイオマーカーであることが想定される。

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(岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・糖尿病性腎症治療学講座・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)

A. 研究目的

尿サンプルを用いたレクチンマイクロアレイ (GlycoStationTM, LecChipTM) を、健常者(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)の患者において施行し、糖鎖プロファイルについて比較検討を行った。さらに腎症の進行によって結合性の増加が認められたレクチンである SSA レクチンを用いたカラムによって糖蛋白質を精製し、さらに質量解析によって新規バイオマーカーの候補を同定する。

B. 研究方法

尿の前処置

尿は50 mLをセントリコンで5000g・40分、さら

にMicroconで14,000g・70分遠心して約100倍に濃縮した。濃縮した尿10 μ Lをそれぞれヒト血清用アフィニティ除去スピンカートリッジ (Agilent Technologies) にアプライして処理を行い、albumin, IgG, α 1-antitrypsin, IgA, transferrin, haptoglobinの6種類の主要蛋白質を除去した。この6種類で総蛋白質の85-90%を占めている。

バッファー交換と濃縮

ヒト血清用アフィニティ除去スピンカートリッジで最終的に用いる溶出バッファーからPBSへとバッファー交換を行った。溶出バッファーには第1級アミンが含まれており、Cy3標識の際に標識効率が低下してしまうためである。また凍結後サンプルに凝集(沈殿)が生じることが判明し、バッファー交換によって沈殿が回避できることが判明した。ULTRAFREE0.5 BIOMAX-5k (Millipore) にサンプル500 μ Lをアプライして、10倍濃縮を2回行い、最終的には50 μ Lに調整した。調整した最終サンプルは20倍希釈してMicroBCA Protein Assay Kit (PIERCE) を用いて蛋白定量を行った。

Cy3標識およびレクチニアレイ解析

蛋白定量の結果をもとに、すべてのサンプルを50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に調整し、うち20 μg をCy3 (100 μg 蛋白標識用)と混合して室温、暗所にて1時間反応させた。Cy3標識したサンプルをゲル濾過 (Zeba Desalt Spin Columns 0.5 mL, PIRECE)して未反応のCy3を除き、回収された蛋白量を1 μg として、Probing Bufferにて2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.063, 0.031 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の溶液を調整した。それぞれのサンプル各100 μL (1ウエルあたり)をレクチニアレイ(LecChip)にアプライして、20 °C、暗所にて15時間反応させた。レクチニアレイ上のレクチンのリストは表1に提示した。

LecChipの測定はGlycoStation™ Reader1200によって行った。測定条件は露光時間133 msec, Gain 85, 95, 105, 115とした。測定して得られたスキャン画像(16 bit TIFF)をArray-Pto™ Analyzerによって数値化して専用解析ソフトGlycoStation Toolsを用いて解析を施行した。

SSAレクチンカラムクロマトグラフィー

尿サンプルは100 mLをCentriconで5000g・40分、さらにMicroconで14,000g・70分遠心して約100倍に濃縮した。SSAカラムを用いたアフィニティークロマトグラフィー (Lectin-Agarose Set-III, SSA-Agarose) を BioLogic LP システム II (#731-8300X2, BIO-RAD)を用いて施行した。まず 6.0 mLのPBSを0.2 mL/minの速度で30分間平衡化を行った。次に尿サンプル1.0 mLをサンプルループにアプライして0.1 mL/minの速度で10分間かけてPBSによってサンプルをロードした。さらにPBSを0.1 mL/minの速度でPBS 7.0 mLを70分間かけて洗浄を行った。さらにサンプルループに溶出バッファー5.0 mL (0.2M lactose)をアプライしてPBSを0.1 mL/minの流量で60分間かけて溶出した。さらに0.5 mL/minの速度で10.0 mLのPBSを用いて洗浄を行った。溶出の過程で溶出サンプルを5分毎にフラクションコレクターで0.5 mL毎に分注し、洗浄過程では10分毎にフラクションコレクターで1.0 mL毎に分注した。さらに溶出サンプルをSDS-PAGEで展開して解析した。

酵素消化および質量分析

SSAレクチンカラムによるアフィニティークロマトグラフィーによって得られた蛋白質をジオオスレイトール(DTT)およびヨードアセトアミド(IAA)によって還元処理した後に、0.1 μg のシーケンシンググレードのトリプシンで酵素消化 (30 °C、一晩)を実施した。消化後に50%アセトニトリル5%蟻酸溶液でペプチドを抽出した。抽出されたペプチドを nanoUPLC

(nanoACQUITY UPLC, ウォーターズ社)、Q-ToF micro (ウォーターズ社)を用いて解析した。UPLC条件としてはトラップカラム(5.0 μm Symmetry C18, 180 μm ID × 2 cm, S/N 0258110472D108)、カラム (1.7 μm BEH 130 C18, 100 μm ID × 10 cm, S/N 0193110811A119)を用いてカラム温度は30 °Cとした。移動相としてはA液：水0.1%蟻酸、B液：アセトニトリル0.1%蟻酸を用いた。流速は400 nL/minで施行した。質量分析はMasslynx ソフトウェア(マイクロマス社)のサーベイモードで行った。

データベース検索

MS/MS 解析により得られたデータは、MassLynx (マイクロマス社)によりデコンボリューション処理を行った。得られたピークリストファイル (pklファイル) に対して、Mascot (マトリックスサイエンス社)を用いて、NCBInrおよびSwiss-Protの最新のデータベース内で一致する蛋白質の検索を行った。修飾に関する検索条件は、システイン残基のカルバミドメチル化とメチオニンの酸化を標準とした。

C . 研究結果

糖尿病性腎症の各病期におけるレクチニアレイ解析の結果を図1に示した。蛋白濃度250 ng/mLをGain 95で測定したシグナルで比較を行った。青が健常者コントロールシグナルを表している。健常者と患者のサンプルのシグナルの平均値が1となるように規格化を施行してグラフ化している。病期の進行によってシグナルが増加しているレクチンと、シグナルがほぼ同じかまたは低下しているレクチンに分類できた。フコース関連レクチン、ハイマンノース関連レクチンなど多くのレクチンで腎症の進展にともないシグナルが低下する傾向が認められた。N型糖鎖関連レクチン(RCA120, PHA(E), DSA)では、2期にシグナルが増加し、さらに進行すると低下する傾向が認められた。α2-3シアル酸 (MAL-1) およびα2-6シアル酸関連レクチン (SNA, SSA, TJA-1) では、腎症の進展とともにシグナルが増加する傾向が認められた。

SSAレクチンカラムによるアフィニティークロマトグラフィーによって得られた蛋白質を SDS-PAGEに展開したところ、α2-6シアル酸を認識するSSAカラムで精製された複数の糖蛋白質が、糖尿病性腎症の進行に伴って増加しており、病期による変化が認められた (図2)。

質量解析の結果表2・表3に示すような糖蛋白質

が同定された。トップにランクされるアルブミンは糖鎖を有さないことと、尿中に最も多く存在する蛋白質であることからコンタミネーションと考えられた。その他には免疫グロブリン(Ig gamma-1 chain C region, Ig gamma-2 chain C region, Ig alpha-1 chain C region, Ig lambda-2 chain C regions)・補体コンポーネント(Complement C4-A, Plasma protease C1 inhibitor, Complement C3)・凝固系因子(Antithrombin-III, Prothrombin)などのフラグメントが得られた。その他同定されたものとしては、haptoglobin, α 2-macroglobulin, apolipoprotein A-I, protein AMBP (α 1-microglobulin), ceruloplasmin, α 1-acid glycoprotein (orosomucoid), α 2-HS-glycoprotein (fetuin-A), angiotensinogenなどがある。これらの糖蛋白質にはシアル酸を糖鎖として有する糖蛋白質が同定されており、これらは糖尿病性腎症の新規尿中バイオマーカーであることが想定される。

D. 考察

尿サンプルを用いたレクチンマイクロアレイを施行したところ、糖尿病性腎症の病期の進行に伴って特徴的な糖鎖プロファイルの変化が同定できた。フコース関連レクチン、ハイマンノース関連レクチンのシグナルは病期の進行に伴い低下し、 α 2-3シアル酸(MAL-1)および α 2-6シアル酸関連レクチン(SNA, SSA, TJA-1)では、腎症の進展とともにシグナルが増加する傾向が認められた。またN型糖鎖関連レクチン(RCA120, PHA(E), DSA)では、2期にシグナルが増加し特徴的な経過を示した。

糖尿病性腎症の尿サンプルのレクチンアレイ解析では、 α 2-6シアル酸関連レクチンへの結合性が、腎症の進展に従って上昇した。そこでSSAカラムを用いたアフィニティークロマトグラフィーを用いて、糖蛋白質を精製したところ、複数の糖蛋白質が病期の進展に従って増加していることが判明した。これらの糖蛋白質は糖尿病性腎症の新しい尿中バイオマーカーの候補であると考えられる。

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においては、血清サンプルより尿サンプルの解析の方が、疾患特異的な変化が見出される可能性が高い。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 (orosomucoid), α 2-HS-glycoprotein (fetuin-A), angiotensinogenが、その候補として今

後検討すべき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, Hida K, Hida A, Eguchi J, Teshigawara S, Murakami K, Kanzaki M, Inoue K, Terami T, Katayama A, Ogawa D, Kagechika H, Makino H. RXR antagonism induces G0/G1 cell cycle arrest and ameliorates obesity by up-regulating the p53-p21^{Cip1} pathway in adipocytes. *J Pathol* 226(5), 784-795, 2012
2. Teshigawara S, Wada J, Hida K, Nakatsuka A, Eguchi J, Murakami K, Kanzaki M, Inoue K, Terami T, Katayama A, Iseda I, Matsushita Y, Miyatake N, McDonald JF, Hotta K, Makino H. Serum vaspin concentrations are closely related to insulin resistance and rs77060950 at SERPINA12 genetically defines distinct group with higher serum levels in Japanese population. *J Clin Endocrinol Metab* 97(7), E1202-1207, 2012
3. Kawai D, Takaki A, Nakatsuka A, Wada J, Tamaki N, Yasunaka T, Koike K, Tsuzaki R, Matsumoto K, Miyake Y, Shiraha H, Morita M, Makino H, Yamamoto K. Hydrogen-rich water prevents progression of non-alcoholic steatohepatitis and accompanying hepatocarcinogenesis in mice. *Hepatology* 56(3), 912-921, 2012
4. Kanzaki M, Wada J, Kikumoto Y, Akagi S, Nakao K, Sugiyama H, Makino H. The therapeutic potential of synthetic human atrial natriuretic peptide in nephrotic syndrome: a randomized controlled trial. *Int J Nephrol Renovasc Dis* 5, 91-96, 2012
5. Nakatsuka A, Wada J, Iseda I, Teshigawara S, Higashio K, Murakami K, Kanzaki M, Inoue K, Terami T, Katayama A, Hida K, Eguchi J, Horiguchi CS, Ogawa D, Matsuki Y, Hiramatsu R, Yagita H, Kakuta S, Iwakura Y, Makino H. Vaspin is an adipokine ameliorating ER stress in obesity as a ligand for cell-surface GRP78/MTJ-1 complex. *Diabetes* 61(11), 2823-2832, 2012
6. Tachibana H, Ogawa D, Matsushita Y, Bruemmer D, Wada J, Teshigawara S, Eguchi J, Sato-Horiguchi C, Uchida HA, Shikata K, Makino H. Activation of liver x receptor inhibits osteopontin and ameliorates diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 23(11), 1835-1846, 2012
7. Inoue J, Wada J, Teshigawara S, Hida K, Nakatsuka A, Takatori U, Kojo S, Akagi S,

- Nakao K, Miyatake N, McDonald JF, Makino H. The serum vaspin levels are reduced in Japanese chronic hemodialysis patients. *BMC Nephrol* 13(1), 163, 2012
8. Wada J and Makino H. Inflammation and the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Clin Sci* 124(3), 139-152, 2013
 9. Sugiyama K, Sada KE, Kurosawa M, Wada J, Makino H. Current status of the treatment of microscopic polyangiitis and granulomatosis with polyangiitis in Japan. *Clin Exp Nephrol* 17(1), 51-58, 2013
 10. Murakami K, Wada J, Ogawa D, Horiguchi CS, Miyoshi T, Sasaki M, Uchida HA, Nakamura Y, Makino H. The effects of telmisartan treatment on the abdominal fat depot in patients with metabolic syndrome and essential hypertension: Abdominal fat Depot Intervention Program of Okayama (ADIPO). *Diab Vasc Dis Res* 10(1), 93-96, 2013
 11. Sato-Horiguchi C, Ogawa D, Wada J, Tachibana H, Kodera R, Eguchi J, Nakatsuka A, Terami N, Shikata K, Makino H. Telmisartan attenuates diabetic nephropathy by suppressing oxidative stress in db/db mice. *Nephron Exp Nephrol* 121(3-4), e97-e108, 2013
 12. Nakatsuka A, Wada J, Iseda I, Teshigawara S, Higashio K, Murakami K, Kanzaki M, Inoue K, Terami T, Katayama A, Hida K, Eguchi J, Ogawa D, Matsuki Y, Hiramatsu R, Tagita H, Kakuta S, Iwakura Y, Makino H. Vaspin inhibits apoptosis of endothelial cells as a ligand for cell-surface GRP78/VDAC complex. *Circ Res* 112(5), 771-780, 2013
 13. Kurose Y, Wada J, Kanzaki M, Teshigawara S, Nakatsuka A, Murakami K, Inoue K, Terami T, Katayama A, Watanabe M, Higushi C, Eguchi J, Miyatake N, Makino H. Serum galectin-9 levels are elevated in the patients with type 2 diabetes and chronic kidney disease. *BMC Nephrol* 14, 23, 2013
 14. 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
 15. 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
 16. 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
 17. 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
 18. 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
 19. 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
 20. 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.
 21. 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
 22. 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. PEMT deficiency protects from obesity and insulin resistance, but induces severe steathepatitis. シンポジウム3:慢性炎症とインスリン抵抗性 和田淳、中司敦子、横野博史 第55回日本糖尿病学会年次学術集会 パシフィコ横浜(横浜市)平成24年5月17日
2. Identification of transmembrane proteins expressed in adipocytes under obese-state and the roles soluble forms in fat accumulation. Jun Wada, International Symposium for the Study of Obesity “Translational Science and Epidemiology on Adipomedicine; From Lipodystrophy to Obesity”, Oct 13-14, 2012, Shiran Kaikan of Kyoto University, Kyoto
3. ガレクチノミクス解析からグライコミクス

- 解析へ 和田淳 平成 24 年度金沢大学戦略的研究推進プログラム - 次世代重点研究プログラム - 第 2 回シンポジウム 金沢市文化ホール(金沢市) 平成 24 年 9 月 14 日
4. Phosphatidylethanolamine N-methyltransferase (PEMT) deficiency protects from obesity and insulin resistance but promote non-alcoholic steatohepatitis with tumorigenesis. Atsuko Nakatsuka, Jun Wada, Kazutoshi Murakami, Takahiro Terami, Akihiro Katayama, Jun Eguchi, Hiroyuki Makino, Keystone Symposia, Diabetes — New Insights into Mechanism of Disease and its Treatment (J6), Keystone Resort, Keystone, Colorado, January 29, 2013
 5. The pathological role of galectin-9 in metabolic syndrome. Sanae Teshigawara, Jun Wada, Motoko Kanzaki, Kazutoshi Murakami, Akihiro Katayama, Takahiro Terami, Kentaro Inoue, Jun Eguchi, Hiroyuki Makino, Keystone Symposia, Diabetes — New Insights into Mechanism of Disease and its Treatment (J6), Keystone Resort, Keystone, Colorado, January 30, 2013
 6. Soluble form of transmembrane protein, Gpnmb, is a novel adipokine with a protective role in fatty liver disease in obesity. Akihiro Katayama, Jun Wada, Atsuko Nakatsuka, Jun Eguchi, Kazutoshi Murakami, Motoko Kanzaki, Sanae Teshigawara, Takahiro Terami, Kentaro Inoue, Kazuyuki Hida, Hiroyuki Makino, Keystone Symposia, Diabetes — New Insights into Mechanism of Disease and its Treatment (J6), Keystone Resort, Keystone, Colorado, January 19, 2013
 7. メタボリックシンドロームにおける Galectin-9 の機能解析 神崎資子、和田淳、中司敦子、村上和敏、勅使川原早苗、寺見隆宏、井上謙太郎、片山晶博、四方賢一、秋葉久弥、八木田秀雄、楳野博史 第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会 パシフィコ横浜(横浜市) 平成 24 年 5 月 17 日
 8. メタボリックシンドロームにおける Gpnmb の意義 片山晶博、和田淳、中司敦子、村上和敏、神崎資子、勅使川原早苗、井上謙太郎、寺見隆宏、肥田和之、四方賢一、楳野博史 第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会 パシフィコ横浜(横浜市) 平成 24 年 5 月 17 日
 9. 糖尿病性腎症発症および病態進展における miR-34a の発現変化とその機能解析 高塚哲全、四方賢一、小寺亮、宮本聰、廣田大昌、梶谷展生、佐藤千景、小川大輔、和田淳、片岡仁美、楳野博史 第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会 パシフィコ横浜(横浜市) 平成 24 年 5 月 17 日
 10. 早期糖尿病性腎症における Telmsartan の抗酸化作用の検討 佐藤千景、小川大輔、松下裕一、橘洋美、小寺亮、廣田大昌、宮本聰、梶谷展生、和田淳、四方賢一、楳野博史 第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会 パシフィコ横浜(横浜市) 平成 24 年 5 月 17 日
 11. ACAM (adipocyte adhesion molecule) の脂肪分化とメタボリックシンドロームにおける意義 村上和敏、和田淳、江口潤、中司敦子、神崎資子、寺見隆宏、井上謙太郎、片山晶博、勅使川原早苗、楳野博史 第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会 パシフィコ横浜(横浜市) 平成 24 年 5 月 18 日
 12. 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、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、黒瀬祐子、片山晶博、樋口千草、渡邊真由、小川智優央、山田雅雄、四方賢一、楳野博史 第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会 パシフィコ横浜(横浜市) 平成 24 年 5 月 19 日
 13. 2 型糖尿病患者の腎症に関する因子の横断的解析 小比賀美香子、四方賢一、小野哲一郎、梶谷展生、小寺亮、宮本聰、廣田大昌、村上和敏、佐藤千景、小川大輔、和田淳、片岡仁美、楳野博史 第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会 パシフィコ横浜(横浜市) 平成 24 年 5 月 19 日
 14. メタボリック症候群におけるマクロファージ IRF4 (Interferon Regulatory Factor 4) の病態生理学的意義 江口潤、和田淳、楳野博史、Evan Rosen 第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会 パシフィコ横浜(横浜市) 平成 24 年 5 月 19 日
 15. メタボリックシンドロームにおける phosphatidylethanolamine N-methyl transferase (PEMT) の意義 中司敦子、和田淳、村上和敏、神崎資子、勅使川原早苗、寺見隆宏、井上謙太郎、片山晶博、四方賢一、楳野博史 第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会 パシフィコ横浜(横浜市) 平成 24 年 5 月 19 日
 16. PSGL-1 を阻害することにより、肥満マウスにおける内臓脂肪と肝臓の炎症とインスリン抵抗性が改善される 廣田大昌、四方賢一、佐藤千景、高塚哲全、宮本聰、小寺亮、梶谷展生、小川大輔、和田淳、片岡仁美、和田淳、楳野博史 第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会 パシフィコ横浜(横浜市) 平成 24 年 5 月 19 日
 17. 糖尿病性腎症モデルラットにおけるメタロチオネイン(metallothionein) の発現の検討 橘洋美、小川大輔、松下裕一、佐藤千景、和

- 田淳、喜多村真治、前島洋平、四方賢一、楳野博史 第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会 パシフィコ横浜(横浜市)平成 24 年 5 月 19 日
18. 2 型糖尿病における腎症の発症および進展に関する因子の解析 小野哲一郎、四方賢一、小比賀美香子、梶谷展生、小寺亮、宮本聰、廣田大昌、村上和敏、佐藤千景、小川大輔、和田淳、片岡仁美、楳野博史 第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会 パシフィコ横浜(横浜市)平成 24 年 5 月 19 日
 19. グライコーム解析による糖尿病性腎症バイオマーカーの探索 井上謙太郎、和田淳、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、勅使川原早苗、樋口千草、渡邊真由、小川智優央、山田雅雄、四方賢一、楳野博史 第 55 回日本腎臓学会年次学術集会 パシフィコ横浜(横浜市)平成 24 年 6 月 3 日
 20. メタボリックシンドロームにおける phosphatidylethanolamine N-methyl transferase (PEMT)の意義 中司敦子、和田淳、村上和敏、神崎資子、勅使川原早苗、井上謙太郎、寺見隆宏、片山晶博、楳野博史 第 33 回日本肥満学会 ホテルグランピア京都(京都市)平成 24 年 10 月 11 日
 21. ACAM (adipocyte adhesion molecule)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、神崎資子、寺見隆宏、井上謙太郎、片山晶博、勅使川原早苗、楳野博史 ホテルグランピア京都(京都市)平成 24 年 10 月 12 日
 22. メタボリックシンドロームにおける Gpnmb の意義 片山晶博、和田淳、中司敦子、江口潤、村上和敏、神崎資子、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、楳野博史 ホテルグランピア京都(京都市)平成 24 年 10 月 12 日
 23. GWAS で同定されたウエスト:ヒップ比関連 SNP と CT で測定した内臓脂肪面積との関係 堀田紀久子、中田由夫、松尾友明、和田淳、小谷一晃、嶺尾郁夫、浜口和之、益崎裕章、船橋徹、宮崎滋、徳永勝人、山田研太郎、田中喜代次、花房俊昭、及川眞一、坂田利家、松澤佑次、中尾一和 第 33 回日本肥満学会 ホテルグランピア京都(京都市)平成 24 年 10 月 12 日
 24. 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、楳野博史 第 56 回日本腎臓学会学術総会(東京)平成 25 年 5 月 10 日
 25. 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、楳野博史 第 56 回日本腎臓学会学術総会(東京)平成 25 年 5 月 10 日
 26. 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、楳野博史 第 56 回日本腎臓学会学術総会(東京)平成 25 年 5 月 11 日
 27. 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、楳野博史 第 56 回日本腎臓学会学術総会(東京)平成 25 年 5 月 11 日
 28. 囊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、楳野博史 第 56 回日本腎臓学会学術総会(東京)平成 25 年 5 月 12 日
 29. 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、楳野博史 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
 30. Vaspin inhibits apoptosis of endothelial cells as ligand for cell-surfce 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
 31. 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、楳野博史 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
 32. 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、楳野博史 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
33. 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、楳野博史 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
34. 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
35. 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
36. 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、楳野博史 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
37. 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、楳野博史 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
38. 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、楳野博史 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
39. 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、楳野博史 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
40. 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
- 会年次学術集会 (熊本) 平成 25 年 5 月 18 日
41. 高齢糖尿病患者におけるグリメビ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
42. 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
43. 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
44. 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
45. 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、楳野博史 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
46. 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、寺見隆宏、樋口千草、布上朋和、天田雅文、四方賢一、肥田和之、楳野博史 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
47. 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、楳野博史 第 57 回日本糖尿病学会総会 (大阪) 平成 26 年 5 月 22 日
48. 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、畠中崇志、橋洋美、江口潤、中司敦子、和田淳、楳野博史 第 57 回日本糖尿病学会総会 (大阪) 平成 26 年 5 月 22 日

49. 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、楳野博史 第57回日本糖尿病学会総会(大阪)平成26年5月23日
50. 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、楳野博史 第57回日本糖尿病学会総会(大阪)平成26年5月24日
51. ACAM (adipocyte adhesion molecule) /CLMPの一次纖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、楳野博史 第57回日本糖尿病学会総会(大阪)平成26年5月24日
52. 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、楳野博史 第57回日本糖尿病学会総会(大阪)平成26年5月24日
53. 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、楳野博史、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
54. 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、畠中崇志、和田淳、四方賢一、西井尚子、楳野博史 第57回日本腎臓学会総会(横浜)平成26年7月4日
55. 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、楳野博史、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
56. 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、勅使川原早苗、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
57. 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、畠中崇志、山成俊夫、杉山斉、四方賢一、楳野博史、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
58. 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、勅使川原早苗、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
59. 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、勅使川原早苗、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
60. 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、勅使川原早苗、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
61. 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

表1 LecChip™Ver.1 におけるレクチンのリストとその特異性

Lectin No.	Lectin	Origin	Reported specificity
1	LTL	<i>Lotus tetragonolobus</i>	Fuc α 1-3(Gal β 1-4)GlcNAc, Fuc α 1-2Gal β 1-4GlcNAc
2	PSA	<i>Pisum sativum</i>	Fuc α 1-6GlcNAc, α -D-Glc, α -D-Man
3	LCA	<i>Lens culinaris</i>	Fuc α 1-6GlcNAc, α -D-Glc, α -D-Man
4	UEA-I	<i>Ulex europaeus</i>	Fuc α 1-2Gal β 1-4GlcNAc
5	AOL	<i>Aspergillus oryzae</i> <i>I-fucose-specific lectin</i>	Fuc α 1-6GlcNAc (core fucose)
6	AAL	<i>Aleuria aurantia</i>	Fuc α 1-6GlcNAc, Fuc α 1-3(Gal β 1-4)GlcNAc
7	MAL	<i>Maackia amurensis</i>	Sia α 2-3Gal β 1-4GlcNAc
8	SNA	<i>Sambucus nigra</i>	Sia α 2-6Gal/GalNAc
9	SSA	<i>Sambucus sieboldiana</i>	Sia α 2-6Gal/GalNAc
10	TJA-I	<i>Trichosanthes japonica</i>	Sia α 2-6Gal/GalNAc
11	PHAL	<i>Phaseolus vulgaris</i>	tri/tetra-antennary complex-type N-glycan
12	ECA	<i>Erythrina cristagalli</i>	Gal β 1-4GlcNAc
13	RCA120	<i>Ricinus communis</i>	Gal β 1-4GlcNAc
14	PHAE	<i>Phaseolus vulgaris</i>	bi-antennary complex-type N-glycan with outer Gal and bisecting GlcNAc
15	DSA	<i>Datura stramonium</i>	(GlcNAc β 1-4)n, Gal β 1-4GlcNAc
16	GSL-II	<i>Griffonia simplicifolia</i>	agalactosylated tri/tetra antennary glycans, GlcNAc
17	NPA	<i>Narcissus pseudonarcissus</i>	High-Mannose, Man α 1-6Man
18	ConA	<i>Canavalia ensiformis</i>	High-Mannose, Man α 1-6(Man α 1-3)Man
19	GNA	<i>Galanthus nivalis</i>	High-Mannose, Man α 1-3Man
20	HHL	<i>Hippeastrum hybrid</i>	High-Mannose, Man α 1-3Man, Man α 1-6Man
21	ACG	<i>Agrocybe cylindracea</i>	Sia α 2-3Gal β 1-4GlcNAc
22	TxLCI	<i>Tulipa gesneriana</i>	Man α 1-3(Man α 1-6)Man, bi- and tri-antennary complex-type N-glycan, GalNAc
23	BPL	<i>Bauhinia purpurea alba</i>	Gal β 1-3GalNAc, GalNAc
24	TJA-II	<i>Trichosanthes japonica</i>	Fuc α 1-2Gal β 1-> or GalNAc β 1-> groups at their nonreducing terminals
25	EEL	<i>Euonymus europaeus</i>	blood group B antigen, Gal α 1-3Gal
26	ABA	<i>Agaricus bisporus</i>	Gal β 1-3GalNAc
27	LEL	<i>Lycopersicon esculentum</i>	GlcNAc trimers/tetramers
28	STL	<i>Solanum tuberosum</i>	GlcNAc oligomers, oligosaccharide containing GlcNAc and MurNAc
29	UDA	<i>Urtica dioica</i>	GlcNAc β 1-4GlcNAc, Mixture of Man5 to Man9
30	PWM	<i>Phytolacca americana</i>	(GlcNAc β 1-4)n
31	Jacalin	<i>Artocarpus integrifolia</i>	Gal β 1-3GalNAc, GalNAc

32	PNA	<i>Arachis hypogaea</i>	Gal β 1-3GalNAc
33	WFA	<i>Wisteria floribunda</i>	GalNAc β 1-4GlcNAc, Gal β 1-3(-6)GalNAc
34	ACA	<i>Amaranthus caudatus</i>	Gal β 1-3GalNAc
35	MPA	<i>Maclura pomifera</i>	Gal β 1-3GalNAc, GalNAc
36	HPA	<i>Helix pomatia agglutinin</i>	α -linked terminal GalNAc
37	VVA	<i>Vicia villosa</i>	α -linked terminal GalNAc, GalNAc α 1-3Gal
38	DBA	<i>Dolichos biflorus</i>	blood group A antigen, GalNAc α 1-3GalNAc
39	SBA	<i>Glycine max</i>	α - or β -linked terminal GalNAc, GalNAc α 1-3Gal
40	Calsepa	<i>Calystegia sepium</i>	Mannose, Maltose
41	PTL-I	<i>Psophocarpus tetragonolobus</i>	α -linked terminal GalNAc
42	MAH	<i>Maackia amurensis</i>	Sia α 2-3Gal β 1-3(Sia α 2-6)GalNAc
43	WGA	<i>Triticum unlgaris</i>	chitin oligomers, Sia
44	GSL-I A4	<i>Griffonia simplicifolia Lectin I</i> <i>Isolectin A4</i>	α -linked GalNAc
45	GSL-I B4	<i>Griffonia simplicifolia Lectin I</i> <i>Isolectin B4</i>	α -linked Gal

These data were collected from lectin vendors and reports found by internet searches.

表2 糖尿病性腎症 A3G3 期の患者から得られた尿サンプルの liquid chromatography-tandem mass spectrometer (LC/MS-MS) の結果

Pos.	Ac.No.	Protein Name	Sequences	emPAI*1	Score*2
1	ALBU_HUMAN	Serum albumin	36	11.04	3985
2	TRFE_HUMAN	Serotransferrin	15	1.08	965
3	AMBP_HUMAN	Protein AMBP (alpha 1-microglobulin)	5	0.57	224
4	VTDB_HUMAN	Vitamin D-binding protein	3	0.14	130
5	HEMO_HUMAN	Hemopexin	3	0.23	112
6	PTGDS_HUMAN	Prostaglandin-H2 D-isomerase	1	0.18	75
7	IGKC_HUMAN	Ig kappa chain C region	1	0.34	70
8	HPT_HUMAN	Haptoglobin	3	0.17	63
9	DTX3L_HUMAN	E3 ubiquitin-protein ligase DTX3L	1	0.04	49
10	CLUS_HUMAN	Clusterin	1	0.07	39
11	SAP_HUMAN	Proactivator polypeptide	1	0.06	34
12	A1AT_HUMAN	Alpha-1-antitrypsin	2	0.08	33
13	AFAM_HUMAN	Afamin	2	0.05	32
14	FETUA_HUMAN	Alpha-2-HS-glycoprotein (Fetuin-A)	1	0.09	29
15	THRIB_HUMAN	Prothrombin	1	0.05	25
16	TRPC4_HUMAN	Short transient receptor potential channel 4	1	0.03	20
17	RABE1_HUMAN	Q15276	2	0.04	19
18	MARK1_HUMAN	Serine/threonine-protein kinase MARK1	1	0.04	16

*1: emPAI (Exponentially Modified Protein Abundance Index) is calculated for the estimation of absolute protein amol

$$emPAI = 10^{\frac{N_{observed}}{N_{observable}}} - 1$$

*2: Probability Based Mowse Score. Ions score is $-10 \times \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event. Individual ions scores > 16 indicate identity or extensive homology ($p < 0.05$).

表3 糖尿病性腎症A3G4期の患者から得られた尿サンプルのliquid chromatography-tandem mass spectrometer (LC/MS-MS) の結果

Pos.	Ac.No.	Protein Name	Sequences	emPAI	Score*1
1	ALBU_HUMAN	Serum albumin	52	21.13	3829
2	TRFE_HUMAN	Serotransferrin	23	1.61	800
3	HPT_HUMAN	Haptoglobin	17	3.1	683
4	IGHG1_HUMAN	Ig gamma-1 chain C region	10	2.56	601
5	IGHG2_HUMAN	Ig gamma-2 chain C region	8	0.99	227
6	IGKC_HUMAN	Ig kappa chain C region	6	4.73	516
7	IGHA1_HUMAN	Ig alpha-1 chain C region	10	1.54	422
8	A2MG_HUMAN	Alpha-2-macroglobulin	18	0.46	417
9	A1AT_HUMAN	Alpha-1-antitrypsin	10	1.16	392
10	APOA1_HUMAN	Apolipoprotein A-I	8	1.53	251
		Protein AMBP (alpha 1-microglobulin)	7	0.88	226
11	AMBP_HUMAN				
12	HEMO_HUMAN	Hemopexin	7	0.62	214
13	LAC2_HUMAN	Ig lambda-2 chain C regions	4	1.45	204
14	CO4A_HUMAN	Complement C4-A	2	0.04	147
15	CERU_HUMAN	Ceruloplasmin	2	0.06	127
16	IC1_HUMAN	Plasma protease C1 inhibitor	4	0.22	94
17	A1BG_HUMAN	Alpha-1B-glycoprotein	1	0.07	94
18	PTGDS_HUMAN	Prostaglandin-H2 D-isomerase	1	0.18	94
		Alpha-1-acid glycoprotein 1 (orosomucoid)	3	0.56	82
19	A1AG1_HUMAN				
20	ANGT_HUMAN	Angiotensinogen	1	0.07	74
21	ANT3_HUMAN	Antithrombin-III	2	0.07	72
22	KNG1_HUMAN	Kininogen-1	2	0.05	71
23	FETUA_HUMAN	Alpha-2-HS-glycoprotein (Fetuin-A)	1	0.09	70
		N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase	1	0.06	62
24	PGRP2_HUMAN				
25	CO3_HUMAN	Complement C3	5	0.02	55
26	THR2_HUMAN	Prothrombin	1	0.05	31
27	VTDB_HUMAN	Vitamin D-binding protein	1	0.07	30
		Microtubule-associated tumor suppressor 1	1	0.03	26
28	MTUS1_HUMAN				

*1: emPAI (Exponentially Modified Protein Abundance Index) is calculated for the estimation of absolute protein amount

$$emPAI = 10^{\frac{N_{observed}}{N_{observable}}} - 1$$

*2: Probability Based Mowse Score. Ions score is $-10 \times \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event. Individual ions scores > 16 indicate identity or extensive homology ($p < 0.05$).

図1 糖尿病性腎症の各病期におけるレクチニアレイ解析

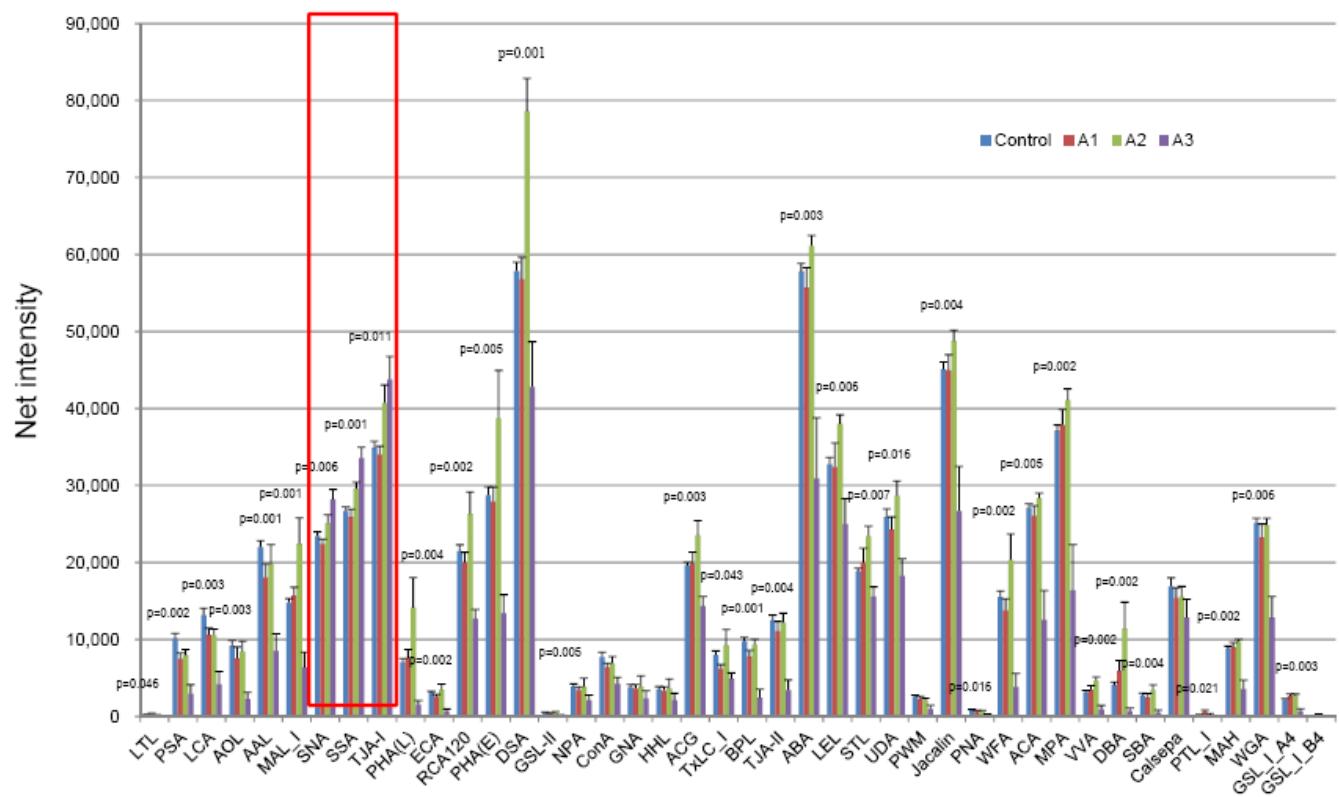
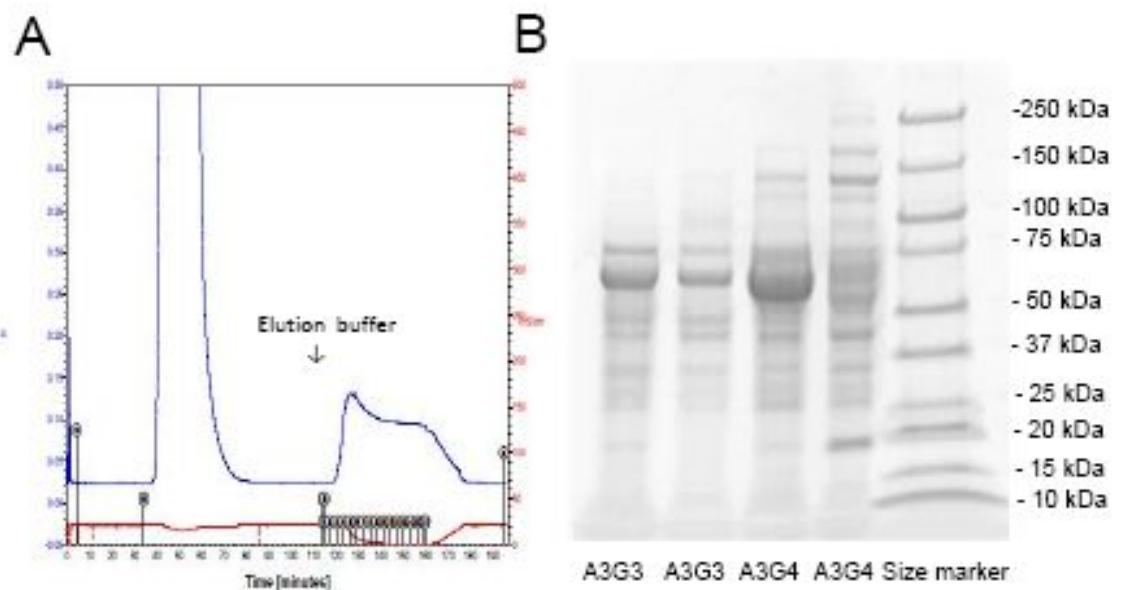


図2 SSAレクチンカラムによるアフィニティクロマトグラフィー (A) と、精製された蛋白質の SDS-PAGE (B)



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)総合分担研究報告書

3. 尿中バイオマーカーのELISAによる測定

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

江口潤・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

利根淳仁(岡山大学病院・糖尿病センター・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

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

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

糖尿病性腎症の新規バイオマーカー候補として同定されたhaptoglobin, α 2-macroglobulin, apolipoprotein A-I, protein AMBP (α 1-microglobulin), ceruloplasmin, α 1-acid glycoprotein (orosomucoid), α 2-HS-glycoprotein (fetuin-A), angiotensinogenを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)の尿サンプルで測定した。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。 α 1-microglobulin, orosomucoid, 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な比較検討を行った。 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orosomucoid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。 α 1-microglobulin, orosomucoid, 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。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, orosomucoid, 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。さらに尿中orosomucoid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。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, orosomucoid, fetuin-A排泄量を比較した。ステップワイズ多項ロジスティック解析を施行した結果、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。

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(岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・糖尿病性腎症治療学講座・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)

A. 研究目的

糖尿病性腎症の新規バイオマーカー候補として同定された haptoglobin, α 2-macroglobulin, apolipoprotein A-I, protein AMBP (α 1-microglobulin), ceruloplasmin, α 1-acid glycoprotein (orosomucoid), 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。尿サンプル

は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。

B. 研究方法

尿サンプルを用いたELISA測定

N-抗血清ハプトグロビン、N-抗血清 α 2-マクログロブリン、N-抗血清セルロプラスミン、N-抗血清 α 2-アシッドグリコプロテイン(シーメンスヘルスケア・ダイアグノスティクス)、アポA-Iオート・N「第一」(積水メディカル)、LZテスト栄研 α 1-M(栄研化学)、Human Fetuin-A ELISA(BioVender)、Human Total Angiotensinogen Assay Kit-IBL(IBL)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。

C. 研究結果

Haptoglobin, α 2-macroglobulin, apolipoprotein A-I, protein AMBP (α 1-microglobulin), ceruloplasmin, α 1-acid glycoprotein (orosomucoid), α 2-HS-glycoprotein (fetuin-A), angiotensinogen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, angiotensinogen であった。 α 1-microglobulin, orosomucoid, 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orosomucoid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, orosomucoid, 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, orosomucoid, 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, orosomucoid, 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, orosomucoid, 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orosomucoid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, orosomucoid, 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產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 (orosomucoid),

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, orosomucoid, 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, Hida K, Hida A, Eguchi J, Teshigawara S, Murakami K, Kanzaki M, Inoue K, Terami T, Katayama A, Ogawa D, Kagechika H, Makino H. RXR antagonism induces G0/G1 cell cycle arrest and ameliorates obesity by up-regulating the p53-p21^{Cip1} pathway in adipocytes. *J Pathol* 226(5), 784-795, 2012
2. Teshigawara S, Wada J, Hida K, Nakatsuka A, Eguchi J, Murakami K, Kanzaki M, Inoue K, Terami T, Katayama A, Iseda I, Matsushita Y, Miyatake N, McDonald JF, Hotta K, Makino H. Serum vaspin concentrations are closely related to insulin resistance and rs77060950 at SERPINA12 genetically defines distinct group with higher serum levels in Japanese population. *J Clin Endocrinol Metab* 97(7), E1202-1207, 2012
3. Kawai D, Takaki A, Nakatsuka A, Wada J, Tamaki N, Yasunaka T, Koike K, Tsuzaki R, Matsumoto K, Miyake Y, Shiraha H, Morita M, Makino H, Yamamoto K. Hydrogen-rich water prevents progression of non-alcoholic steatohepatitis and accompanying hepatocarcinogenesis in mice. *Hepatology* 56(3), 912-921, 2012
4. Kanzaki M, Wada J, Kikumoto Y, Akagi S, Nakao K, Sugiyama H, Makino H. The therapeutic potential of synthetic human atrial natriuretic peptide in nephrotic syndrome: a randomized controlled trial. *Int J Nephrol Renovasc Dis* 5, 91-96, 2012
5. Nakatsuka A, Wada J, Iseda I, Teshigawara S, Higashio K, Murakami K, Kanzaki M, Inoue K, Terami T, Katayama A, Hida K, Eguchi J, Horiguchi CS, Ogawa D, Matsuki Y, Hiramatsu R, Yagita H, Kakuta S, Iwakura Y, Makino H. Vaspin is an adipokine ameliorating ER stress in obesity as a ligand for cell-surface GRP78/MTJ-1 complex. *Diabetes* 61(11), 2823-2832, 2012
6. Tachibana H, Ogawa D, Matsushita Y, Bruemmer D, Wada J, Teshigawara S, Eguchi J, Sato-Horiguchi C, Uchida HA, Shikata K, Makino H. Activation of liver x receptor inhibits osteopontin and ameliorates diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 23(11), 1835-1846, 2012
7. Inoue J, Wada J, Teshigawara S, Hida K, Nakatsuka A, Takatori U, Kojo S, Akagi S, Nakao K, Miyatake N, McDonald JF, Makino H. The serum vaspin levels are reduced in Japanese chronic hemodialysis patients. *BMC Nephrol* 13(1), 163, 2012
8. Wada J and Makino H. Inflammation and the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Clin Sci* 124(3), 139-152, 2013
9. Sugiyama K, Sada KE, Kurosawa M, Wada J, Makino H. Current status of the treatment of microscopic polyangiitis and granulomatosis with polyangiitis in Japan. *Clin Exp Nephrol* 17(1), 51-58, 2013
10. Murakami K, Wada J, Ogawa D, Horiguchi CS, Miyoshi T, Sasaki M, Uchida HA, Nakamura Y, Makino H. The effects of telmisartan treatment on the abdominal fat depot in patients with metabolic syndrome and essential hypertension: Abdominal fat Depot Intervention Program of Okayama (ADIPO). *Diab Vasc Dis Res* 10(1), 93-96, 2013
11. Sato-Horiguchi C, Ogawa D, Wada J, Tachibana H, Kodera R, Eguchi J, Nakatsuka A, Terami N, Shikata K, Makino H. Telmisartan attenuates diabetic nephropathy by suppressing oxidative stress in db/db mice. *Nephron Exp Nephrol* 121(3-4), e97-e108, 2013
12. Nakatsuka A, Wada J, Iseda I, Teshigawara S, Higashio K, Murakami K, Kanzaki M, Inoue K, Terami T, Katayama A, Hida K, Eguchi J, Ogawa D, Matsuki Y, Hiramatsu R, Tagita H, Kakuta S, Iwakura Y, Makino H. Vaspin inhibits apoptosis of endothelial cells as a ligand for cell-surface GRP78/VDAC complex. *Circ Res* 112(5), 771-780, 2013
13. Kurose Y, Wada J, Kanzaki M, Teshigawara S, Nakatsuka A, Murakami K, Inoue K, Terami T, Katayama A, Watanabe M, Higushi C, Eguchi J, Miyatake N, Makino H. Serum galectin-9 levels are elevated in the patients with type 2 diabetes and chronic kidney disease. *BMC Nephrol* 14, 23, 2013
14. 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
15. 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. *PLoS ONE* 8(10): e77118, 2013
16. 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
 17. 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
 18. 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
 19. 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
 20. 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.
 21. Ono T, Shikata K, Obika M, Miyatake N, Kadera 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
 22. 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. PEMT deficiency protects from obesity and insulin resistance, but induces severe steathepatitis. シンポジウム3:慢性炎症とインスリン抵抗性 和田淳、中司敦子、横野博史 第55回日本糖尿病学会年次学術集会パシフィコ横浜(横浜市)平成24年5月17日
2. Identification of transmembrane proteins expressed in adipocytes under obese-state and

- the roles soluble forms in fat accumulation. Jun Wada, International Symposium for the Study of Obesity “Translational Science and Epidemiology on Adipomedicine; From Lipodystrophy to Obesity”, Oct 13-14, 2012, Shiran Kaikan of Kyoto University, Kyoto
3. ガレクチノミクス解析からグライコミクス解析へ 和田淳 平成24年度金沢大学戦略的研究推進プログラム - 次世代重点研究プログラム - 第2回シンポジウム 金沢市文化ホール(金沢市)平成24年9月14日
 4. Phosphatidylethanolamine N-methyltransferase (PEMT) deficiency protects from obesity and insulin resistance but promote non-alcoholic steatohepatitis with tumorigenesis. Atsuko Nakatsuka, Jun Wada, Kazutoshi Murakami, Takahiro Terami, Akihiro Katayama, Jun Eguchi, Hirofumi Makino, Keystone Symposia, Diabetes — New Insights into Mechanism of Disease and its Treatment (J6), Keystone Resort, Keystone, Colorado, January 29, 2013
 5. The pathological role of galectin-9 in metabolic syndrome. Sanae Teshigawara, Jun Wada, Motoko Kanzaki, Kazutoshi Murakami, Akihiro Katayama, Takahiro Terami, Kentaro Inoue, Jun Eguchi, Hirofumi Makino, Keystone Symposia, Diabetes — New Insights into Mechanism of Disease and its Treatment (J6), Keystone Resort, Keystone, Colorado, January 30, 2013
 6. Soluble form of transmembrane protein, Gpnmb, is a novel adipokine with a protective role in fatty liver disease in obesity. Akihiro Katayama, Jun Wada, Atsuko Nakatsuka, Jun Eguchi, Kazutoshi Murakami, Motoko Kanzaki, Sanae Teshigawara, Takahiro Terami, Kentaro Inoue, Kazuyuki Hida, Hirofumi Makino, Keystone Symposia, Diabetes — New Insights into Mechanism of Disease and its Treatment (J6), Keystone Resort, Keystone, Colorado, January 19, 2013
 7. メタボリックシンドromeにおける Galectin-9 の機能解析神崎資子、和田淳、中司敦子、村上和敏、勅使川原早苗、寺見隆宏、井上謙太郎、片山晶博、四方賢一、秋葉久弥、八木田秀雄、横野博史 第55回日本糖尿病学会年次学術集会 パシフィコ横浜(横浜市)平成24年5月17日
 8. メタボリックシンドromeにおける Gpnmb の意義 片山晶博、和田淳、中司敦子、村上和敏、神崎資子、勅使川原早苗、井上謙太郎、寺見隆宏、肥田和之、四方賢一、横野博史 第55回日本糖尿病学会年次学術集会パシフィコ横浜(横浜市)平成24年5月17日
 9. 糖尿病性腎症発症および病態進展における miR-34a の発現変化とその機能解析高塚哲

- 満学会 ホテルグランビア京都(京都市)平成24年10月12日
24. 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、楳野博史 第56回日本腎臓学会学術総会(東京)平成25年5月10日
 25. 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、楳野博史 第56回日本腎臓学会学術総会(東京)平成25年5月10日
 26. 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、楳野博史 第56回日本腎臓学会学術総会(東京)平成25年5月11日
 27. 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、楳野博史 第56回日本腎臓学会学術総会(東京)平成25年5月11日
 28. 囊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、楳野博史 第56回日本腎臓学会学術総会(東京)平成25年5月12日
 29. 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、楳野博史 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
 30. Vaspin inhibits apoptosis of endothelial cells as ligand for cell-surfce 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
 31. 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、渡邊真由、樋口千草、江口潤、楳野博史 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
 32. 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、楳野博史 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
 33. 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、橘洋美、堀口千景、小寺亮、江口潤、中司敦子、和田淳、四方賢一、楳野博史 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
 34. 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
 35. 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
 36. 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、楳野博史 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
 37. 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、楳野博史 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
 38. 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、楳野博史 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
 39. 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、平田和敏、井上謙太郎、寺見隆宏、片山晶博、楳野博史 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

- 教至、小寺亮、廣田大昌、和田淳、楳野博史
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
40. 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
41. 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
42. 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
43. 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
44. 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
45. 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、楳野博史 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
46. 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、寺見隆宏、樋口千草、布上朋和、天田雅文、四方賢一、肥田和之、楳野博史 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
- 47.
48. 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、楳野博史 第 57 回本糖尿病学会総会（大阪）平成 26 年 5 月 22 日
49. 2 型糖尿病マウスにおける SGLT2 阻害薬ダバグリフロジンの腎保護効果の検討 小川大輔、寺見直人、畠中崇志、橘洋美、江口潤、中司敦子、和田淳、楳野博史 第 57 回本糖尿病学会総会（大阪）平成 26 年 5 月 22 日
50. 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、楳野博史 第 57 回本糖尿病学会総会（大阪）平成 26 年 5 月 23 日
51. 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、楳野博史 第 57 回本糖尿病学会総会（大阪）平成 26 年 5 月 24 日
52. ACAM (adipocyte adhesion molecule) / CLMP の一次纖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、楳野博史 第 57 回本糖尿病学会総会（大阪）平成 26 年 5 月 24 日
53. メタボリックシンドrome 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、楳野博史 第 57 回本糖尿病学会総会（大阪）平成 26 年 5 月 24 日
54. 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、楳野博史、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
55. 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、杉山斎、畠中崇志、和田淳、四方賢一、西井尚子、楳野博史 第 57 回日本腎臓学会総会（横浜）平成 26 年 7 月 4 日
56. 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、楳野博史、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
57. 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
58. 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、畠中崇志、山成俊夫、杉山斎、四方賢一、楳野博史、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
59. 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
60. 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
61. 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

62. 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。)

- 特許取得**
なし
- 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 (mmol/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 **
Orosomucoid (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 (mmol/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-Cho (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 **
Orosomucoid (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-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 (μg/gCr)	Orosomucoid (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 (μmol/L)	R=0.368, p=5.23x10 ⁻⁴ **	R=0.388, p=2.40x10 ⁻⁴ **	R=0.399, p=1.53x10 ⁻⁴ **
UN (mmol/L)	R=0.405, p=1.31x10 ⁻⁴ **	R=0.439, p=2.96x10 ⁻⁵ **	R=0.363, p=6.85x10 ⁻⁴ **
Uric acid (μmol/L)	R=0.079, p=0.474	R=0.073, p=0.509	R=0.295, p=0.006**
T-Cho (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-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		Standardized		P value	Adjusted R ²
		coefficient B	Standard error	coefficient β	t value		
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	$4.71 \times 10^{-4}**$	
	HDL-C (mmol/L)	-4.048	2.035	-0.182	-1.989	0.050	
$\alpha 1$ -microglobulin (μ g/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	4.71×10^{-5}	
	HDL-C (mmol/L)	-1.443	2.548	-0.048	-0.566	0.573	
Orosomucoid (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	$1.19 \times 10^{-12}**$	
	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	$9.424 \times 10^{-4}**$	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	$4.755 \times 10^{-4}**$	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)

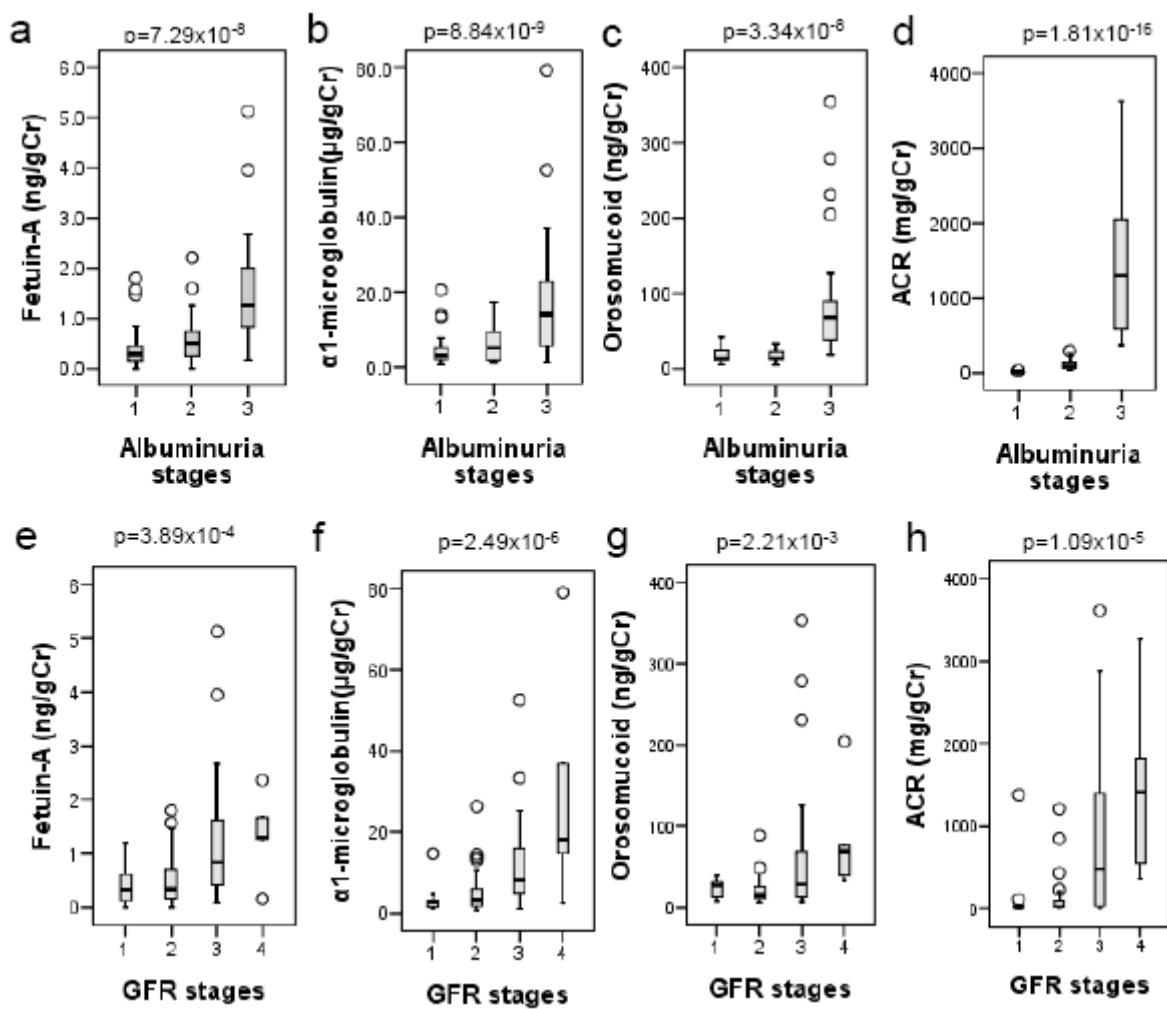
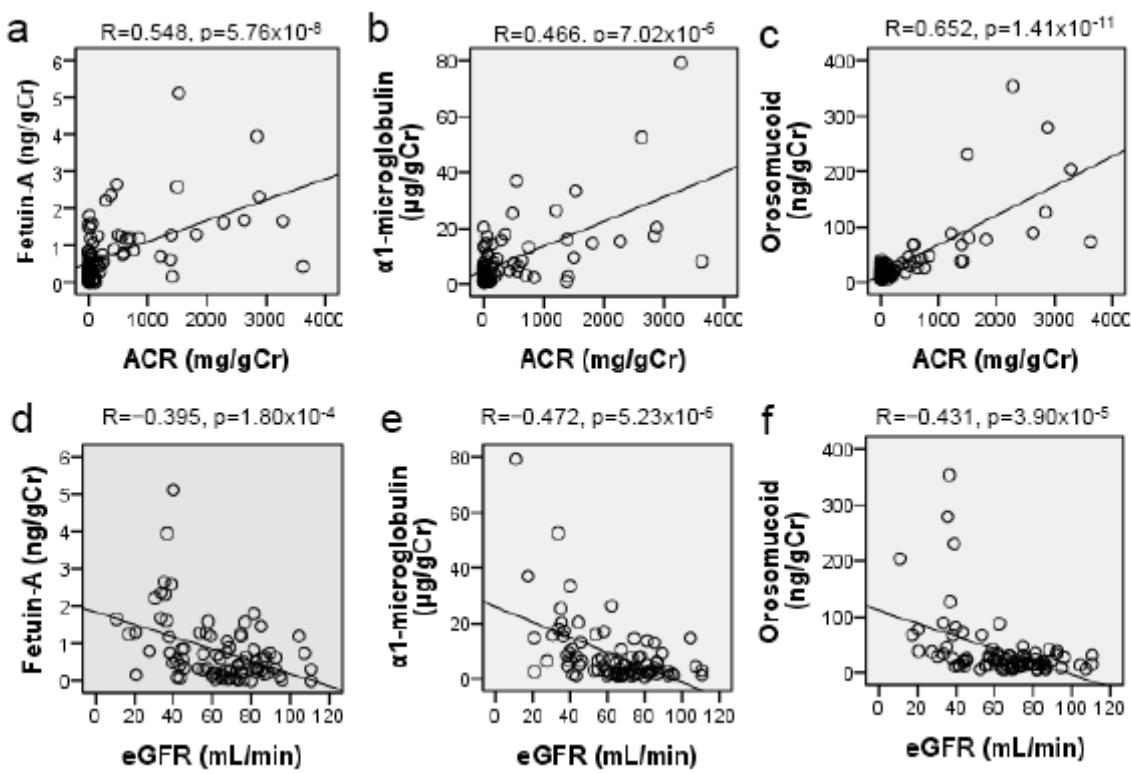


図2 アルブミン尿のステージ (A1, A2, A3) およびGFRステージ (G1, G2, G3, G4) における尿中アルブミンおよびeGFRとシアル酸糖蛋白質排泄量の単相関 (2型糖尿病患者n=85)



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)総合分担研究報告書

4. 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ニ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ニ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

図1のようにエクソン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。図2および図3には野生型とノックアウトマウスのシークエンスを示した。

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. Nakatsuka A, Wada J, Hida K, Hida A, Eguchi J, Teshigawara S, Murakami K, Kanzaki M, Inoue K, Terami T, Katayama A, Ogawa D, Kagechika H, Makino H. RXR antagonism induces G0/G1 cell cycle arrest and ameliorates obesity by up-regulating the p53-p21^{Cip1} pathway in adipocytes. *J Pathol* 226(5), 784-795, 2012
2. Teshigawara S, Wada J, Hida K, Nakatsuka A, Eguchi J, Murakami K, Kanzaki M, Inoe K, Terami T, Katayama A, Iseda I, Matsushita Y, Miyatake N, McDonald JF, Hotta K, Makino H. Serum vaspin concentrations are closely related to insulin resistance and rs77060950 at SERPINA12 genetically defines distinct group with higher serum levels in Japanese population. *J Clin Endocrinol Metab* 97(7), E1202-1207, 2012
3. Kawai D, Takaki A, Nakatsuka A, Wada J, Tamaki N, Yasunaka T, Koike K, Tsuzaki R, Matsumoto K, Miyake Y, Shiraha H, Morita M, Makino H, Yamamoto K. Hydrogen-rich water prevents progression of non-alcoholic steatohepatitis and accompanying hepatocarcinogenesis in mice. *Hepatology* 56(3), 912-921, 2012
4. Kanzaki M, Wada J, Kikumoto Y, Akagi S, Nakao K, Sugiyama H, Makino H. The therapeutic potential of synthetic human atrial natriuretic peptide in nephrotic syndrome: a randomized controlled trial. *Int J Nephrol Renovasc Dis* 5, 91-96, 2012
5. Nakatsuka A, Wada J, Iseda I, Teshigawara S, Higashio K, Murakami K, Kanzaki M, Inoue K, Terami T, Katayama A, Hida K, Eguchi J, Horiguchi CS, Ogawa D, Matsuki Y, Hiramatsu R, Tagita H, Kakuta S, Iwakura Y, Makino H. Vaspin inhibits apoptosis of endothelial cells as a ligand for cell-surface GRP78/VDAC complex. *Circ Res* 112(5), 771-780, 2013
6. Tachibana H, Ogawa D, Matsushita Y, Bruemmer D, Wada J, Teshigawara S, Eguchi J, Sato-Horiguchi C, Uchida HA, Shikata K, Makino H. Activation of liver x receptor inhibits osteopontin and ameliorates diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 23(11), 1835-1846, 2012
7. Inoue J, Wada J, Teshigawara S, Hida K, Nakatsuka A, Takatori U, Kojo S, Akagi S, Nakao K, Miyatake N, McDonald JF, Makino H. The serum vaspin levels are reduced in Japanese chronic hemodialysis patients. *BMC Nephrol* 13(1), 163, 2012
8. Wada J and Makino H. Inflammation and the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Clin Sci* 124(3), 139-152, 2013
9. Sugiyama K, Sada KE, Kurosawa M, Wada J, Makino H. Current status of the treatment of microscopic polyangiitis and granulomatosis with polyangiitis in Japan. *Clin Exp Nephrol* 17(1), 51-58, 2013
10. Murakami K, Wada J, Ogawa D, Horiguchi CS, Miyoshi T, Sasaki M, Uchida HA, Nakamura Y, Makino H. The effects of telmisartan treatment on the abdominal fat depot in patients with metabolic syndrome and essential hypertension: Abdominal fat Depot Intervention Program of Okayama (ADIPO). *Diab Vasc Dis Res* 10(1), 93-96, 2013
11. Sato-Horiguchi C, Ogawa D, Wada J, Tachibana H, Kodera R, Eguchi J, Nakatsuka A, Terami N, Shikata K, Makino H. Telmisartan attenuates diabetic nephropathy by suppressing oxidative stress in db/db mice. *Nephron Exp Nephrol* 121(3-4), e97-e108, 2013
12. Nakatsuka A, Wada J, Iseda I, Teshigawara S, Higashio K, Murakami K, Kanzaki M, Inoue K, Terami T, Katayama A, Hida K, Eguchi J, Ogawa D, Matsuki Y, Hiramatsu R, Tagita H, Kakuta S, Iwakura Y, Makino H. Vaspin inhibits apoptosis of endothelial cells as a ligand for cell-surface GRP78/VDAC complex. *Circ Res* 112(5), 771-780, 2013
13. Kurose Y, Wada J, Kanzaki M, Teshigawara S, Nakatsuka A, Murakami K, Inoue K, Terami T, Katayama A, Watanabe M, Higushi C, Eguchi J, Miyatake N, Makino H. Serum galectin-9 levels are elevated in the patients with type 2 diabetes and chronic kidney disease. *BMC Nephrol* 14, 23, 2013
14. 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
15. 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 neuropathy in type 2 diabetes identified by lectin microarray. *PLoS ONE* 8(10): e77118, 2013
 16. 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
 17. 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
 18. 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
 19. 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
 20. 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.
 21. Ono T, Shikata K, Obika M, Miyatake N, Kadera 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
 22. Hishikawa N, Yamashita T, Deguchi K, Wada J, Shikata K, Makino H, Abe K. *Eur J Neurol* 2014 Sep 15. [Epub ahead of print]
- ンスリン抵抗性 和田淳、中司敦子、横野博史 第55回日本糖尿病学会年次学術集会 パシフィコ横浜(横浜市)平成24年5月17日
2. Identification of transmembrane proteins expressed in adipocytes under obese-state and the roles soluble forms in fat accumulation. Jun Wada, International Symposium for the Study of Obesity “Translational Science and Epidemiology on Adipomedicine; From Lipodystrophy to Obesity”, Oct 13-14, 2012, Shiran Kaikan of Kyoto University, Kyoto
 3. ガレクトノミクス解析からグライコミクス解析へ 和田淳 平成24年度金沢大学戦略的研究推進プログラム - 次世代重点研究プログラム - 第2回シンポジウム 金沢市文化ホール(金沢市) 平成24年9月14日
 4. Phosphatidylethanolamine N-methyltransferase (PEMT) deficiency protects from obesity and insulin resistance but promote non-alcoholic steatohepatitis with tumorigenesis. Atsuko Nakatsuka, Jun Wada, Kazutoshi Murakami, Takahiro Terami, Akihiro Katayama, Jun Eguchi, Hirofumi Makino, Keystone Symposia, Diabetes — New Insights into Mechanism of Disease and its Treatment (J6), Keystone Resort, Keystone, Colorado, January 29, 2013
 5. The pathological role of galectin-9 in metabolic syndrome. Sanae Teshigawara, Jun Wada, Motoko Kanzaki, Kazutoshi Murakami, Akihiro Katayama, Takahiro Terami, Kentaro Inoue, Jun Eguchi, Hirofumi Makino, Keystone Symposia, Diabetes — New Insights into Mechanism of Disease and its Treatment (J6), Keystone Resort, Keystone, Colorado, January 30, 2013
 6. Soluble form of transmembrane protein, Gpnmb, is a novel adipokine with a protective role in fatty liver disease in obesity. Akihiro Katayama, Jun Wada, Atsuko Nakatsuka, Jun Eguchi, Kazutoshi Murakami, Motoko Kanzaki, Sanae Teshigawara, Takahiro Terami, Kentaro Inoue, Kazuyuki Hida, Hirofumi Makino, Keystone Symposia, Diabetes — New Insights into Mechanism of Disease and its Treatment (J6), Keystone Resort, Keystone, Colorado, January 19, 2013
 7. メタボリックシンドromeにおける Galectin-9 の機能解析 神崎資子、和田淳、中司敦子、村上和敏、勅使川原早苗、寺見隆宏、井上謙太郎、片山晶博、四方賢一、秋葉久弥、八木田秀雄、横野博史 第55回日本糖尿病学会年次学術集会 パシフィコ横浜(横浜市) 平成24年5月17日
 8. メタボリックシンドromeにおける Gpnmb の意義 片山晶博、和田淳、中司敦子、村上

2. 学会発表

1. PEMT deficiency protects from obesity and insulin resistance, but induces severe steathepatitis. シンポジウム3:慢性炎症とイ

9. 和敏、神崎資子、勅使川原早苗、井上謙太郎、寺見隆宏、肥田和之、四方賢一、楳野博史 第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会パシフィコ横浜（横浜市）平成 24 年 5 月 17 日

10. 糖尿病性腎症発症および病態進展における miR-34a の発現変化とその機能解析高塚哲全、四方賢一、小寺亮、宮本聰、廣田大昌、梶谷展生、佐藤千景、小川大輔、和田淳、片岡仁美、楳野博史 第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会 パシフィコ横浜（横浜市）平成 24 年 5 月 17 日

11. 早期糖尿病性腎症における Telmsartan の抗酸化作用の検討佐藤千景、小川大輔、松下裕一、橘洋美、小寺亮、廣田大昌、宮本聰、梶谷展生、和田淳、四方賢一、楳野博史 第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会 パシフィコ横浜（横浜市）平成 24 年 5 月 17 日

12. ACAM (adipocyte adhesion molecule)の脂肪分化とメタボリックシンドロームにおける意義 村上和敏、和田淳、江口潤、中司敦子、神崎資子、寺見隆宏、井上謙太郎、片山晶博、勅使川原早苗、楳野博史 第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会 パシフィコ横浜（横浜市）平成 24 年 5 月 18 日

13. 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、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、黒瀬祐子、片山晶博、樋口千草、渡邊真由、小川智優央、山田雅雄、四方賢一、楳野博史 第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会 パシフィコ横浜（横浜市）平成 24 年 5 月 19 日

14. 2 型糖尿病患者の腎症に関連する因子の横断的解析 小比賀美香子、四方賢一、小野哲一郎、梶谷展生、小寺亮、宮本聰、廣田大昌、村上和敏、佐藤千景、小川大輔、和田淳、片岡仁美、楳野博史 第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会 パシフィコ横浜（横浜市）平成 24 年 5 月 19 日

15. メタボリック症候群におけるマクロファージ IRF4 (Interferon Regulatory Factor 4) の病態生理学的意義 江口潤、和田淳、楳野博史、Evan Rosen 第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会 パシフィコ横浜（横浜市）平成 24 年 5 月 19 日

16. メタボリックシンドロームにおける phosphatidylethanolamine N-methyl transferase (PEMT) の意義 中司敦子、和田淳、村上和敏、神崎資子、勅使川原早苗、寺見隆宏、井上謙太郎、片山晶博、楳野博史 ホテルグランビア京都（京都市）平成 24 年 10 月 11 日

17. ACAM (adipocyte adhesion molecule)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、神崎資子、寺見隆宏、井上謙太郎、片山晶博、勅使川原早苗、楳野博史 ホテルグランビア京都（京都市）平成 24 年 10 月 12 日

18. メタボリックシンドロームにおける phosphatidylethanolamine N-methyl transferase (PEMT) の意義 中司敦子、和田淳、村上和敏、神崎資子、勅使川原早苗、井上謙太郎、寺見隆宏、片山晶博、楳野博史 第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会 パシフィコ横浜（横浜市）平成 24 年 5 月 19 日

19. グライコーム解析による糖尿病性腎症バイオマーカーの探索 井上謙太郎、和田淳、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、勅使川原早苗、樋口千草、渡邊真由、小川智優央、山田雅雄、四方賢一、楳野博史 第 55 回日本腎臓学会年次学術集会 パシフィコ横浜（横浜市）平成 24 年 6 月 3 日

20. メタボリックシンドロームにおける phosphatidylethanolamine N-methyl transferase (PEMT) の意義 中司敦子、和田淳、村上和敏、神崎資子、勅使川原早苗、井上謙太郎、寺見隆宏、片山晶博、楳野博史 第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会 パシフィコ横浜（横浜市）平成 24 年 5 月 19 日

21. メタボリックシンドロームにおける phosphatidylethanolamine N-methyl transferase (PEMT) の意義 中司敦子、和田淳、村上和敏、神崎資子、寺見隆宏、井上謙太郎、片山晶博、勅使川原早苗、楳野博史 ホテルグランビア京都（京都市）平成 24 年 10 月 11 日

22. メタボリックシンドロームにおける phosphatidylethanolamine N-methyl transferase (PEMT) の意義 中司敦子、和田淳、村上和敏、神崎資子、寺見隆宏、井上謙太郎、片山晶博、勅使川原早苗、楳野博史 ホテルグランビア京都（京都市）平成 24 年 10 月 12 日

23. GWAS で同定されたウエスト：ヒップ比関

- 連 SNP と CT で測定した内臓脂肪面積との関係 堀田紀久子、中田由夫、松尾友明、和田淳、小谷一晃、嶺尾郁夫、浜口和之、益崎裕章、船橋徹、宮崎滋、徳永勝人、山田研太郎、田中喜代次、花房俊昭、及川眞一、坂田利家、松澤佑次、中尾一和 第 33 回日本肥満学会 ホテルグランビア京都(京都市)平成 24 年 10 月 12 日
24. 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、楳野博史 第 56 回日本腎臓学会学術総会(東京)平成 25 年 5 月 10 日
25. 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、楳野博史 第 56 回日本腎臓学会学術総会(東京)平成 25 年 5 月 10 日
26. 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、楳野博史 第 56 回日本腎臓学会学術総会(東京)平成 25 年 5 月 11 日
27. 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、楳野博史 第 56 回日本腎臓学会学術総会(東京)平成 25 年 5 月 11 日
28. 囊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、楳野博史 第 56 回日本腎臓学会学術総会(東京)平成 25 年 5 月 12 日
29. 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、楳野博史 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
30. Vaspin inhibits apoptosis of endothelial cells as ligand for cell-surfce 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
31. メタボリックシンドrome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、楳野博史 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
32. 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、楳野博史 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
33. 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、橘洋美、堀口千景、小寺亮、江口潤、中司敦子、和田淳、四方賢一、楳野博史 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
34. 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
35. 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
36. 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、楳野博史 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
37. メタボリックシンドrome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、楳野博史 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
38. メタボリックシンドrome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、楳野博史 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
39. 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、楳野博史 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
40. 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
41. 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
42. 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
43. 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
44. 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
45. 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、楳野博史 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
46. 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、寺見隆宏、樋口千草、布上朋和、天田雅文、四方賢一、肥田和之、楳野博史 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
- 47.
48. 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、楳野博史 第 57 回日本糖尿病学会総会（大阪）平成 26 年 5 月 22 日
49. 2 型糖尿病マウスにおける SGLT2 阻害薬ダバグリフロジンの腎保護効果の検討 小川大輔、寺見直人、畠中崇志、橘洋美、江口潤、中司敦子、和田淳、楳野博史 第 57 回日本糖尿病学会総会（大阪）平成 26 年 5 月 22 日
50. 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、楳野博史 第 57 回日本糖尿病学会総会（大阪）平成 26 年 5 月 23 日
51. 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、楳野博史 第 57 回日本糖尿病学会総会（大阪）平成 26 年 5 月 24 日
52. ACAM (adipocyte adhesion molecule) / CLMP の一次纖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、楳野博史 第 57 回日本糖尿病学会総会（大阪）平成 26 年 5 月 24 日
53. メタボリックシンドrome 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、楳野博史 第 57 回日本糖尿病学会総会（大阪）平成 26 年 5 月 24 日
54. 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、楳野博史、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
55. 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、畠中崇志、和田淳、四方賢一、西井尚子、楳野博史 第 57 回日本腎臓学会総会（横浜）平成 26 年 7 月 4 日
56. 顯性蛋白尿期の 2 型糖尿病患者におけるア

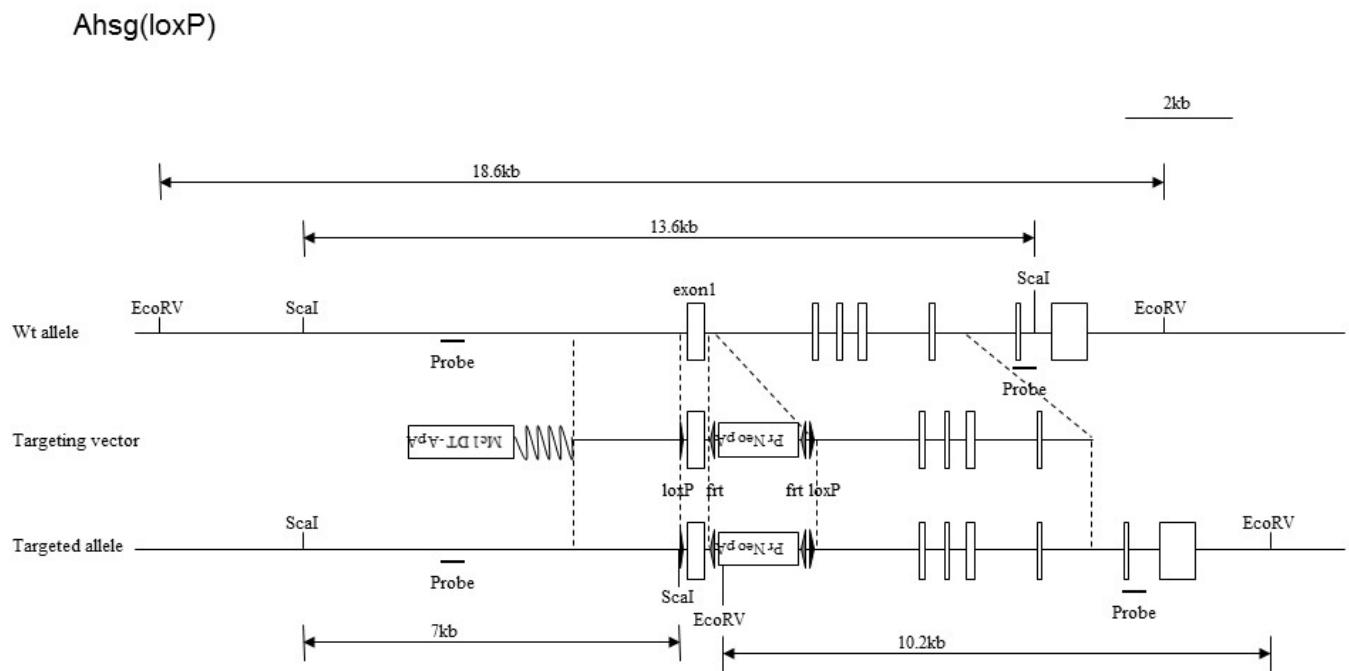
- ルダクトンの蛋白尿減少効果 加藤佐和子、丸山彰一、榎野博史、和田淳、宇津貴、荒木久澄、古家大祐、金崎啓造、西山成、今井圓裕、安藤昌彦 第 57 回日本腎臓学会総会(横浜) 平成 26 年 7 月 5 日
57. ワークショップ 2 ネフローゼ症候群を呈する疾患の最新の診断・治療 レクチンマイクロアレイによる糖尿病性腎症の新規バイオマーカーの同定 和田淳、勅使河原早苗、中司敦子、江口潤 第 44 回日本腎臓学会西部学術集会(神戸) 平成 26 年 10 月 3 日
58. 早期糖尿病性腎症におけるバイオマーカーとしての尿中 TFF (Trefoil factor) の検討 寺見直人、小川大輔、畠中崇志、山成俊夫、杉山斎、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
59. 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

- 崎) 平成 26 年 10 月 25 日
60. 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
61. 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
62. 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.



■ 2 Sequence of target construct of Ahsg knockout mice.

5arm

agtactcaactttattatacaaagttgattaaatgctagc

loxP

ATAACTTCGTATAGCATACATTATACGAAGTTAT

cacatc

Flox arm

ccccacagcagcattgacttggcagatctgtggggagagatgtcttcaacttattgtttccagagatgtctgttgcaggatttttgcaggaaacacagaaatcgccacgcctttacgcaatttcgtggggctgtcagatAAATTAGGCCCTCTGCCCTCTATTGGCTAGCTCTCCAAGCTGATTATCCGGGCTGCTCCTGACATTGCCATTTCAGGGCCTCTGGAGCAACCATGAAGTCCCTGGTCTGCTCCTTTGTTTGCTCAGCTCTGGGCTGCCAATCCGCTCCACAAGGTACAGGACTGGGTTAGAGAATTGGCTTGATGATCCAGAAGCAGAGCAAGTAGCTTGTGGCGTGGACTACCTCAATAATCATCTCTCAGGGATTCAAACAGGTCTGAATCAGATCGACAAAGTCAGGTGTGGCTCGGtaagtgagctaccaggaaatgagctgaatgaatctgggtagggatctaaccaggctgcctcaaaggctagcatctccag

gtcgagcccagcgccccctagaatcgccgcgttagaactagaattct

frt

GAAGTTCCCTATACTTTCTAGAGAATAGGAACCTC

ggaataggaacttcaagcttgcggatctatagatcatgagtggaggaatgagctggccctaattgggttgctgt

PGK pA

TTAAATTATGATATCCAACATGAAACATTATCATAAAGCAATAGTAAAGAGCCTCAGTAAAGAGCAGGCAT
TTATCTAATCCCACCCCCACCCCCGTAGCTCCAATCCTCCATTCAAATGTAGGTACTCTGTTCTCA
CCCTTCTTAACAAAGTATGACAGGAAAAACTCCATTAGTGGACATCTTATTGTTAACAGATCATCAATT
TCTGCAG

acttacagcggatcgatcccc

Neo

TCAGAAGAACTCGTCAAGAAGGGATAGAAGGCATGCCTGCGAATCGGAGCGCGATACCGTAAAGC
ACGAGGAAGCGGTAGCCATTGCCGCAAGCTTCAGCAATATCAGGGTAGCCAACGCTATGCTCTG
ATAGCGGTCCGCCACACCCAGCCGCCACAGTCGATGAATCCAGAAAAGCGGCCATTTCCACCATGATATT
CGGCAAGCAGGCATGCCATGGTCACGACGAGATCCTCGCCGTCGGCATGCGCGCCTGAGCCTGGCG
AACAGTTGGCTGGCGAGCCCTGATGCTCTCGTCCAGATCATCTGATCGACAAGACGGCTCCATC
CGAGTACGTGCTCGCTCGATGCGATGTTCGCTGGTGAATGGCAGGTAGCCGGATCAAGCGTATGC
AGCCGCCGATTGATGCCATGAGGATACTTCTGGCAGGAGCAAGGTAGATGACAGGAGATCCTG
CCCCGGCACTCGCCAATAGCAGCCAGTCCCTCCGCTCAGTGACAACGTCGAGCACAGCTGCGCAAG
GAACGCCGTGGCAGCCACGATAGCCGCTGCCTGCTGAGTTCAAGGGCACCGGACAGG
TCGGTCTTGACAAAAAGAACCGGGGCCAGTCAGCGAATAGCCTCTCCACCCAGCGGCCGAGAACCTGCGTGAATCCAT
CTTGGTCAATGGCCGATCCCAT

attggctgca

PGK promoter

1.5K promoter
GGTCGAAAGGCCGGAGATGAGGAAGAGGAACAGCGCCGAGACGTGCGCTTGAGCGTGCAGAA
TGCCGGGCTCCGGAGGACCTTCGGGCGCCGCCGCCCCGCCCCTGAGCCCAGCCCTGAGCCCAGCCGGAC
CCACCCCTCCCAGCCTGTAGCCCAGAAAGCGAAGGAGCAAAGCTGCTATTGGCCGCTGCCCCAAAGGC

図3 Sequence of Ahsg gene in wild type mice.

5arm

Flox arm

ccccacagcagcattgacttggcagatctgtggggagagatgtcttcaacttattgtttccagagatgtctgttgcaggatttttgcaggaaacacagaatcgccacgcctttacgcaatttcgcggggctgtcagatAAATTAGGCCCTCTGCCCTCTATTGGCTAGCTCTCCAAGCTGATTATCCGGGCTGCTCCTGACATTGCCATTTCAGGGCCTCTGGAGCAACCATGAAGTCCCTGGTCTGCTCCTTTGTTTGCTCAGCTCTGGGCTGCCAATCCGCTCCACAAGGTACAGGACTGGGTTAGAGAATTGGCTTGATGATCCAGAAGCAGAGCAAGTAGCTTGTGGCGTGGACTACCTCAATAATCATCTCTCAGGGATTCAAACAGGTCTGAATCAGATCAGACAAAGTCAGGTGTGGCTCGGtaagtgagctaccaggaaatgagctgaatgaatctgggtagggatctaaccaggctgcctcaaaggctagcatctccag

3arm

caatagacttgagatgttaaggaagctggcaatggaaataagtcaagacatactgcaaatcattagtgtaggtggattctgttaattccatcccatactg
caccaggcgctgtgcgtcaaggcgtcccgacgcgtcaggggaaggaagcacagtgacttccatttgatccctgtggaaactggggggcatttacttccgcgtt
cgagctgggatgactgaaatgtgaagggtgaggccaggagatgtgggttccatccgtccgactaaagttagccttggcttcctgttccatctgtaaaact
taacctctgccccatgcgtacggacaacatctgtcaacttgcagaccatgtccatccctccatccctcccttaccttccttccttccttgcctccctccct
gtactccgtgtggatttgtctctcaactgtccagaccatgcgtccatccctcccttccttccttgcctccatccctcccttgcctccctccct
ccttccttcctgtcaacttcctccctatccaccttcctccctcccttccttccttccttccttccttccttccttccttccttccttccttccttcct
gCCTCTCCCAGTGTCTACTCTGGTGGAGTTGTAATAGCTGCCACTGACTGTACTGCAAAAGAACAGA
TCCAGCCAAATGCAACCTGCTGGCAGAGAAAGgtgagtggccagaccctgggtccatctgttgcggaaacaaagtatctttgcagttata
tcttgggctgaagaaagaaagtaaaaaacaacaaaaggtaactgtccctgtgaagctggcatgttgcggaaatgttgcacacacttcttgc
geaaagggaccaaggcgtccgggtgcgtccaggtggctactttaactccagctgtaccccttccttccttccttccttccttccttccttcct
gaaagagagacagacagacagacagacagagagacccataacataattaagaataataaaatcaaatctttttaaaatgtccacttgc
aggccttcctgtgtcctcacccctttaagcatagacacccaaactcttcaccccttccttccttccttccttccttccttccttccttcct
tgggaacgggaagagacagacttcttagtgttgcataccgggataccggactttgaggccagatataccatgttgc
tttgcaccaattttacctgttaagatgaggatccatgacccatgttgcacacagagagaaaggatccctgttgc
caggataatgacagatgtgagaaaatctccagaataagggatgtacccatgttgcacccatattcacaacgcacatcaattcatgttgc
ctctcccggttaccaccatctcaggattcccaggacatgttgc
tgc

・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
楳野博史	糖尿病とCKDの関係	楳野博史	糖尿病×CKD診療ガイド	南山堂	東京	2012	1-4
和田淳	尿検査の意義 - 蛋白尿 -	楳野博史	糖尿病×CKD診療ガイド	南山堂	東京	2012	10-11
江口潤	HbA1cを血糖コントロール指標としてみる場合の注意点	楳野博史	糖尿病×CKD診療ガイド	南山堂	東京	2012	19-22
中司敦子	血糖コントロールの指標としてみる場合の注意点	楳野博史	糖尿病×CKD診療ガイド	南山堂	東京	2012	29-31
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 - 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	冠動脈疾患のパーカクトマネジメント	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 遮断薬の選択	伊藤浩	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 遮断薬は？	伊藤浩	遮断薬を臨床で生かす！	南江堂	東京	2013	102-104
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
Wada J and Makino H	Inflammation and the pathogenesis of diabetic nephropathy.	<i>Clin Sci</i>	124(3)	139-152	2013
Nakatsuka A, Wada J, Hida K, Hida A, Eguchi J, Teshigawara S, Murakami K, Kanzaki M, Inoue K, Terami T, Katayama A, Ogawa D, Kagechika H, Makino H.	RXR antagonism induces G0/G1 cell cycle arrest and ameliorates obesity by up-regulating the p53-p21 ^{Cip1} pathway in adipocytes.	<i>J Pathol</i>	226(5)	784-795	2012
Murakami K, Wada J, Ogawa D, Horiguchi CS, Miyoshi T, Sasaki M, Uchida HA, Nakamura Y, Makino H.	The effects of telmisartan treatment on the abdominal fat depot in patients with metabolic syndrome and essential hypertension: Abdominal fat Depot Intervention Program of Okayama (ADIPO).	<i>Diab Vasc Dis Res</i>	10(1)	93-96	2013
Teshigawara S, Wada J, Hida K, Nakatsuka A, Eguchi J, Murakami K, Kanzaki M, Inoue K, Terami T, Katayama A, Iseda I, Matsushita Y, Miyatake N, McDonald JF, Hotta K, Makino H.	Serum vaspin concentrations are closely related to insulin resistance and rs77060950 at SERPINA12 genetically defines distinct group with higher serum levels in Japanese population.	<i>J Clin Endocrinol Metab</i>	97(7)	E1202-12 07	2012
Kawai D, Takaki A, Nakatsuka A, Wada J, Tamaki N, Yasunaka T, Koike K, Tsuzaki R, Matsumoto K, Miyake Y, Shiraha H, Morita M, Makino H, Yamamoto K.	Hydrogen-rich water prevents progression of non-alcoholic steatohepatitis and accompanying hepatocarcinogenesis in mice.	<i>Hepatology</i>	56(3)	912-921	2012
Kanzaki M, Wada J, Kikumoto Y, Akagi S, Nakao K, Sugiyama H, Makino H.	The therapeutic potential of synthetic human atrial natriuretic peptide in nephrotic syndrome: a randomized controlled trial.	<i>Int J Nephrol Renovasc Dis</i>	5	91-96	2012

Sugiyama K, Sada KE, Kurosawa M, Wada J, Makino H.	Current status of the treatment of microscopic polyangiitis and granulomatosis with polyangiitis in Japan.	<i>Clin Exp Nephrol</i>	17(1)	51-58	2013
Nakatsuka A, Wada J, Iseda I, Teshigawara S, Higashio K, Murakami K, Kanzaki M, Inoue K, Terami T, Katayama A, Hida K, Eguchi J, Horiguchi CS, Ogawa D, Matsuki Y, Hiramatsu R, Yagita H, Kakuta S, Iwakura Y, Makino H.	Vaspin is an adipokine ameliorating ER stress in obesity as a ligand for cell-surface GRP78/MTJ-1 complex.	<i>Diabetes</i>	61(11)	2823-2832	2012
Tachibana H, Ogawa D, Matsushita Y, Bruemmer D, Wada J, Teshigawara S, Eguchi J, Sato-Horiguchi C, Uchida HA, Shikata K, Makino H.	Activation of liver x receptor inhibits osteopontin and ameliorates diabetic nephropathy.	<i>J Am Soc Nephrol</i>	23(11)	1835-1846	2012
Inoue J, Wada J, Teshigawara S, Hida K, Nakatsuka A, Takatori U, Kojo S, Akagi S, Nakao K, Miyatake N, McDonald JF, Makino H.	The serum vaspin levels are reduced in Japanese chronic hemodialysis patients.	<i>BMC Nephrol</i>	13(1)	163	2012
Sato-Horiguchi C, Ogawa D, Wada J, Tachibana H, Kodera R, Eguchi J, Nakatsuka A, Terami N, Shikata K, Makino H.	Telmisartan attenuates diabetic nephropathy by suppressing oxidative stress in db/db mice.	<i>Nephron Exp Nephrol</i>	121(3-4)	e97-e108	2013

Nakatsuka A, Wada J, Iseda I, Teshigawara S, Higashio K, Murakami K, Kanzaki M, Inoue K, Terami T, Katayama A, Hida K, Eguchi J, Ogawa D, Matsuki Y, Hiramatsu R, Tagita H, Kakuta S, Iwakura Y, Makino H.	Vaspin inhibits apoptosis of endothelial cells as a ligand for cell-surface GRP78/VDAC complex.	<i>Circ Res</i>	112(5)	771-778	2013
Kurose Y, Wada J, Kanzaki M, Teshigawara S, Nakatsuka A, Murakami K, Inoue K, Terami T, Katayama A, Watanabe M, Higushi C, Eguchi J, Miyatake N, Makino H.	Serum galectin-9 levels are elevated in the patients with type 2 diabetes and chronic kidney disease.	<i>BMC Nephrol</i>	14	23	2013
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 neuropathy 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
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, 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.	<i>Acta Med Okayama</i>	68(4)	235-241	2014

Hishikawa N, Yamashita T, Deguchi K, Wada J, Shikata K, MakinoH, 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
---	---	---------------------	--------	--	------