

令和 2 年 5 月 1 1 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15976

研究課題名（和文）糖尿病性腎症進展におけるFetuin-Aの役割

研究課題名（英文）The role of Fetuin-A on the progression of diabetic nephropathy

研究代表者

三瀬 広記（Mise, Koki）

岡山大学・医学部・客員研究員

研究者番号：80807602

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000 円

研究成果の概要（和文）：Fetuin-A産生の主である肝臓における特異的Fetuin-Aノックアウトマウス(KO)を用いて肥満2型糖尿病モデルを誘導し観察したところ、コントロールマウスと比べて、体重増加や血糖に差はなかったが、KOではアルブミン尿及び糸球体肥大が有意に軽減されていた。肥満2型糖尿病において、循環するFetuin-Aは糸球体肥大を介してアルブミン尿増加に寄与する一方で、腎臓での尿中への排泄亢進や脂肪や筋肉などの他の組織での蓄積により、血清中のFetuin-A濃度は保たれると推察された。また、尿中Fetuin-Aは糖尿病腎症における糸球体肥大を反映し、腎予後にも関連するバイオマーカーであることも示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Fetuin-Aと腎臓病、特に糖尿病腎症との関連を示した基礎的研究報告は過去になく、本研究課題を通じて発見された糖尿病腎症進展の新たなメカニズムは学術的意義が高いと考えられる。またヒト腎生検コホートや糖尿病患者コホートのデータを用いてヒト糖尿病腎症においても同様の結果を示し、尿中Fetuin-Aの新規バイオマーカーとしての意義を示したことは臨床的意義が高いと思われる。

研究成果の概要（英文）：Mice with genetically deletion of liver specific Fetuin-A (AHSG) which is predominantly produced in liver was generated and used for the experiment under the obese diabetic condition. Body weight and blood glucose level were not significantly different between KO and WT mice, while urinary albumin excretion rate and glomerulomegaly was significantly attenuated in KO mice compared with WT mice. In obese diabetic condition, circulating Fetuin-A might contribute albuminuria via glomerulomegaly, whereas serum Fetuin-A levels will be maintained due to increased urinary excretion of Fetuin-A and accumulation of Fetuin-A in other organs including fat and muscle. On the other hand, it was demonstrated that urinary Fetuin-A reflects glomerulomegaly in diabetic nephropathy, and it can be a useful biomarker of renal prognosis of diabetic nephropathy.

研究分野：腎臓内科

キーワード：糖尿病腎症 Fetuin-A 糸球体肥大 腎予後 バイオマーカー 糖尿病性腎臓病 糖尿病性腎症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 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中、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。我々は糖尿病患者における尿の糖鎖プロファイリングを45種類のレクチンを用いて網羅的に解析した。これらのうち、2型糖尿病患者における腎予後(Rapid eGFR decliner: $\geq 3\text{ml/min/1.73m}^2/\text{year}$)を予測する上で、 $\alpha 2$ -6 シアル酸関連レクチンへの結合性が、ベースラインのアルブミン尿や eGFR とは独立して腎予後に有意に関連する有用な腎予後因子であることが分かった (特開 2018-173371, WO 2018/181292)。また、この $\alpha 2$ -6 シアル酸関連レクチンに結合する糖蛋白質を精製し質量解析を進めることで、fetuon-A、 $\alpha 1$ -microglobulin、orosomucoid といったシアル酸蛋白質を同定し、かつこれらの尿中濃度が安定して ELISA で測定できることが分かった。そして、尿中 fetuin-A 排泄量が糖尿病患者における横断研究で腎機能(eGFR)と関連する有用なバイオマーカーであることを確認した。

(2) Fetuin-A は 64kDa の糖蛋白質であり、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、Fetuin-A は肥満状態で肝臓での発現が亢進し、血中濃度上昇に伴い脂肪細胞におけるアディポネクチン mRNA の発現抑制を介して血清アディポネクチン濃度を低下させる。そして、低下した血清アディポネクチンが AMP-activated protein kinase 活性低下を介して糖尿病性腎症進展に寄与することが報告されている。更に、Fetuin-A は遊離脂肪酸(FFA)の担体であり、Toll-like receptor 4(TLR4)に結合することも示されており、FFA-fetuin-A 複合体は TLR4 受容体を刺激して FFA による炎症を惹起することで糖尿病状態における慢性炎症とそれによるインスリン抵抗性が引き起こされることが報告されている。しかし、これらの研究では臓器特異的な Fetuin-A のトランスジェニックマウスやノックアウトマウスを用いた機能解析は行っておらず、また糖尿病腎症モデルマウスにおける検討もなされていないため、Fetuin-A が糖尿病腎症進展においてどのような役割を担っているか、十分明らかにされていなかった。

引用文献

Mise K, Imamura M, Yamaguchi S, Teshigawara S, Tone A, Uchida HA, Eguchi J, Nakatsuka A, Ogawa D, Yoshida M, Yamada M, Shikata K, Wada J: Identification of Novel Urinary Biomarkers for Predicting Renal Prognosis in Patients With Type 2 Diabetes by Glycan Profiling in a Multicenter Prospective Cohort Study: U-CARE Study 1. *Diabetes Care* 41: 1765-1775, 2018

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: e77118, 2013

Ix JH, Sharma K: Mechanisms linking obesity, chronic kidney disease, and fatty liver disease: the roles of fetuin-A, adiponectin, and AMPK. *J Am Soc Nephrol* 21: 406-412, 2010

Pal D, Dasgupta S, Kundu R, Maitra S, Das G, Mukhopadhyay S, Ray S, Majumdar SS, Bhattacharya S: Fetuin-A acts as an endogenous ligand of TLR4 to promote lipid-induced insulin resistance. *Nat Med* 18: 1279-1285, 2012

2. 研究の目的

本研究では、Fetuin-A が糖尿病性腎症進展にどのように関わっているかを基礎的実験により明らかにすることを目的とした。また、糖尿病腎症モデルマウスではヒト糖尿病腎症より病理所見が軽微であるため、基礎的実験によって得られた結果の臨床的妥当性を検証することを目的に、腎生検で得られた糖尿病腎症コホートデータや糖尿病患者コホートデータを用いた解析を行った。

3. 研究の方法

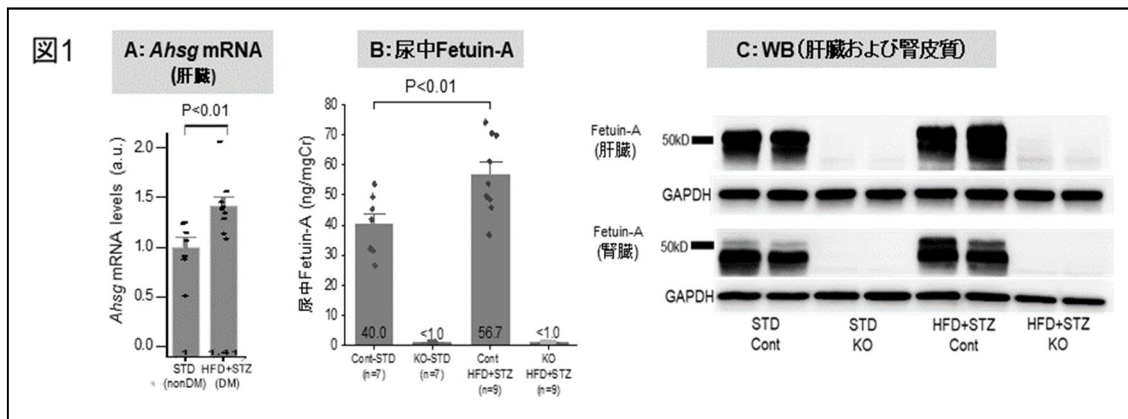
マウスにおける臓器別の Fetuin-A(*Ahsg*)mRNA 発現量を確認したところ、肝臓では、腎臓を含めた他の臓器に比して著明に発現していた。従って、肝臓特異的 Fetuin-A ノックアウトマウス(Fetuin-A^{fl/fl}; Tg[Alb-Cre]: KO)を作成し KO とコントロールマウス(Fetuin-A^{fl/fl}; Cont)を実験に用いた。検討モデル1として、高脂肪食(HFD: 60kcal%, 4週齢~)による肥満2型糖尿病マウスまたは通常食(STD, 4週齢~)投与による非糖尿病マウス群を検討した他、肥満に加えてインスリン分泌を強制的に低下させた、高脂肪食(HFD: 60kcal%, 4週齢~)+ストレプトゾトシン(STZ: 8週齢 100mg/kg i.p.単回)投与による肥満2型糖尿病モデルマウスと通常食(STD, 4週齢~)+vehicle(8週齢)投与による非糖尿病群による検討モデル2により Fetuin-A が糖尿病腎症進展においてどのように寄与しているか検証した。22週齢まで観察し、安楽死後、各臓器及び組織を採取し、病理学的評価を行った。また、ヒト糖尿病腎症コホート(試験 ID: UMIN000024530)

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

において、血清および尿中の Fetuin-A 濃度を測定し、腎病理組織所見との関連について検討した。更に、糖尿病患者の前向きコホート研究(U-CARE Study, 試験 ID: UMIN000011525)において、研究開始 3 年目に採取し保管していた血清及び尿中の Fetuin-A 濃度を測定し、糖尿病患者における長期腎予後との関連について検討した。アウトカムは eGFR 低下速度 $>4\text{ml/min/1.73m}^2/\text{年}$ 、3 年以内のベースラインからの 30%eGFR 低下、3 年以内の末期腎不全による腎代替療法開始のいずれかと定義し、ロジスティック回帰分析によって血清および尿中 Fetuin-A とアウトカムとの関連を検討した。

4. 研究成果

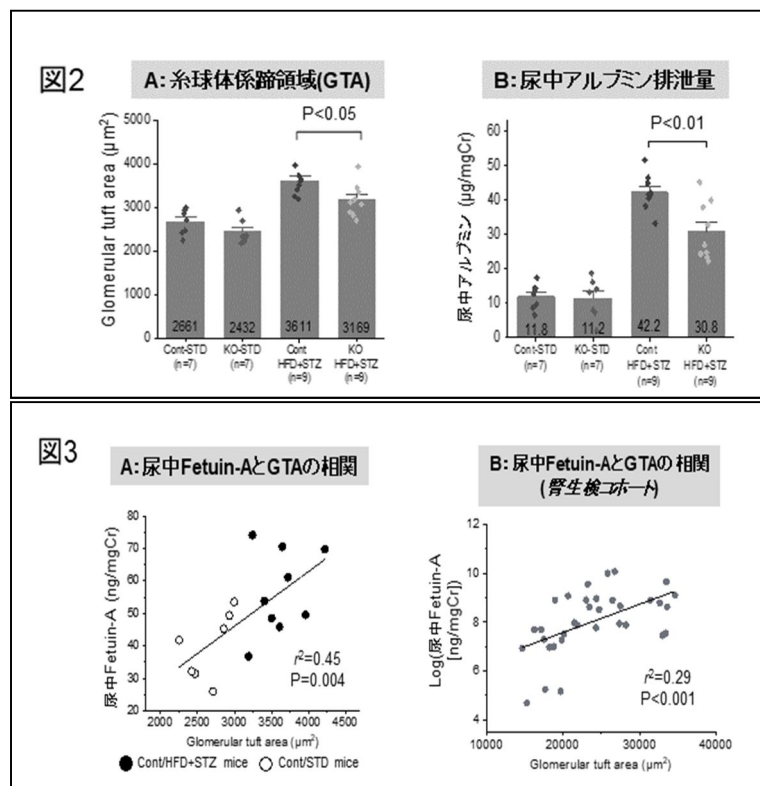
まず、22 週齢のマウスにおいて、KO ではコントロールに比して肝臓での mRNA レベルは 1/100 程度にまで抑制されており、WB による蛋白発現がみられないことが確認できた。また、非糖尿病群に比して、糖尿病群では肝臓での Fetuin-A の mRNA および蛋白発現量は有意に上昇しており、尿中 Fetuin-A 排泄量も有意に高値であったが、血清 Fetuin-A 濃度は両群で有意な差はなかった (図 1A-C)。



次に、モデル 1 における経時的な観察及び病理学的な評価により、糖尿病群において、KO ではコントロールに比して有意に体重増加、インスリン抵抗性、脂肪肝が抑制されていることが確認された。更に腎臓においては、糖尿病コントロール群に比して、糖尿病 KO 群で糸球体肥大が有意に抑制されていた (コントロール: $3496 \mu\text{m}^2$ vs KO: $2993 \mu\text{m}^2$, $P<0.05$) ほか、アルブミン尿も有意に低値であった (コントロール: $51.1 \mu\text{g/mgCr}$ vs KO: $34.0 \mu\text{g/mgCr}$, $P<0.05$)。以上の結果より、このモデル 1 において、Fetuin-A が肥満やインスリン抵抗性を介してアルブミン尿抑制に寄与しているか、それらと独立して寄与しているかは明らかにならなかったため、次に、インスリン分泌を強制的に抑制したモデル 2 において同様の検討を行った。

このモデルの糖尿病群において、体重増加、空腹時血糖、HbA1c、インスリン抵抗性、収縮期及び拡張期血圧、脂肪肝、いずれも KO とコントロール群間で有意な差は認めなかった。一方で、モデル 1 同様、糖尿病コントロール群に比して、糖尿病 KO 群では、糸球体肥大が有意に抑制されており (図 2A, コントロール: $3611 \mu\text{m}^2$ vs KO: $3169 \mu\text{m}^2$, $P<0.05$)、アルブミン尿も有意に低値であった (図 2B, コントロール: $42.2 \mu\text{g/mgCr}$ vs KO: $30.8 \mu\text{g/mgCr}$, $P<0.01$)。糸球体基底膜の肥厚やメサンギウム基質増加の程度を反映する PAS staining score、ポドサイト foot process effusion の程度に関しては両群間で有意な差は認めなかった。

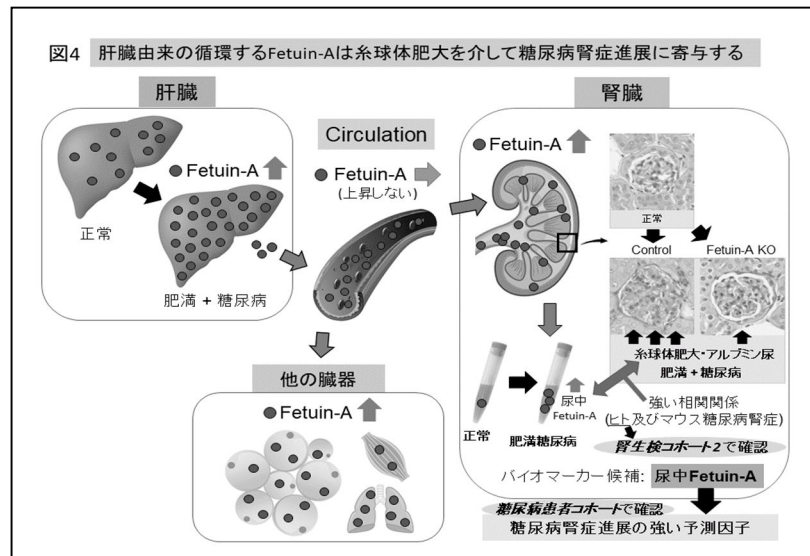
興味深いことに、モデル 2 のコ



ントロール群における糸球体係蹄面積は尿中 Fetuin-A 排泄量と強い相関が認められた (図 3A, $r^2=0.45$, $P=0.004$) が血清 Fetuin-A とは有意な相関は認められなかった。その他の腎病理所見と尿中 Fetuin-A の有意な相関は認められなかった。また、腎生検で診断されたヒト糖尿病腎症コホート(34 例)においても、糸球体係蹄面積は尿中 Fetuin-A と強い相関 (図 3B, $r^2=0.29$, $P<0.001$) がみられ、尿中 Fetuin-A は糸球体肥大を反映する腎症進展のバイオマーカーであると考えられた。

更に、Fetuin-A の腎予後予測バイオマーカーとしての意義を検討するため、U-CARE 研究に参加した 533 人の糖尿病患者における 2014 年度に採取保管していた血清および尿中の Fetuin-A を測定し、腎予後における影響を調べた。腎予後アウトカムの発生頻度は 9%(50 人)であった。単変量ロジスティック回帰分析の結果、血清 Fetuin-A のオッズ比(1SD 上昇毎)は 1.08(95%信頼区間 0.80-1.47)であったのに対して、尿中 Fetuin-A のオッズ比(1SD 上昇毎)は 2.78(2.01-3.85)であった。ベースラインの年齢、性別、収縮期血圧、eGFR、対数変換後のアルブミン尿で調整した多変量ロジスティック回帰分析では、血清 Fetuin-A のオッズ比(1SD 上昇毎)は 1.04(95%信頼区間 0.75-1.46)であり、尿中 Fetuin-A のオッズ比(1SD 上昇毎)は 1.74(1.12-2.71)であった。従って、尿中 Fetuin-A は eGFR やアルブミン尿といった既存のバイオマーカーとは独立して腎予後に関連することが示され、有用なバイオマーカーであると考えられた。

以上の結果より、肝臓由来の循環する Fetuin-A は、糸球体肥大を介して糖尿病腎症進展に寄与し、尿中 Fetuin-A はこの病態を反映する新たな腎予後予測因子であることを示すことができた。糖尿病マウスモデルにおいて、尿中への Fetuin-A 排泄亢進や、脂肪、筋肉などでの Fetuin-A 蛋白発現量上昇が確認されたことから、腎臓での排泄亢進や他臓器での Fetuin-A 蛋白の蓄積により血清中の濃度は維持されると推察している。(図 4)



5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1 . 発表者名 三瀬広記
2 . 発表標題 Fetuin-Aの糖尿病腎症進展における役割
3 . 学会等名 第62回 糖尿病学会年次学術総会
4 . 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6 . 研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
--	---------------------------	-----------------------	----