

研究種目： 基盤研究 (C)
 研究期間： 2007-2008
 課題番号： 19590949
 研究課題名 (和文) 糖尿病性腎症における新規バイオマーカー及び治療標的の探索
 研究課題名 (英文) Screening of novel biomarkers and therapeutic targets in diabetic nephropathy
 研究代表者
 菅原 照 (SUGAHARA AKIRA)
 京都大学・医学研究科・臨床教授
 研究者番号： 00312223

研究成果の概要： 1型および2型糖尿病のマウスモデルを用いて、糖尿病性腎症の早期に発現増加が改善する遺伝子として *gremlin 1*、*growth arrest-specific 6*、*Wt-1*、*Rab3b*などを同定し、これらの因子の糖尿病性腎症への関与が示唆された。さらに糖尿病性腎症においては尿中 *Ngal*が増加し、アンジオテンシン受容体阻害薬の投与により減少することを明らかにし、尿中 *Ngal*の新規バイオマーカーとしての有用性を報告した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野： 医歯薬学

科研費の分科・細目： 内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード： 腎臓学

1. 研究開始当初の背景

糖尿病性腎症は高血糖が持続した後、糸球体過剰濾過、微量アルブミン尿、顕性蛋白尿、糸球体濾過量(GFR)の低下へと進行する一本道の病態推移がセントラルドグマとなっている。一方、実際の臨床においては血糖コントロール不良にも関わらず腎症が進行しにくい患者、高血圧や慢性糸球体腎炎、腎尿細管間質性腎炎を合併する患者なども多く、病態は非常に複雑である。現行の血清クレアチニンとGFRを用いた糖尿病性腎症の病期分類は、広く受け入れられ、臨床的意義も高いが、今現在の腎障害の進行速度を予測したり、治療的介入の効果を鋭敏に検出することは必

ずしも容易ではない。そこで、本研究では、糖尿病性腎症の進行をreal timeに評価できる新しいバイオマーカーの探索を目指した。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、ストレプトゾトシン(STZ)誘発インスリン依存性糖尿病、db/dbインスリン非依存性糖尿病、脂肪萎縮性糖尿病という3種類のマウス糖尿病性腎症モデルを用いて、腎臓から糸球体を単離し正常腎臓と比較することにより、共通に発現増加あるいは減少する遺伝子をまず第一にスクリーニングした。

(2) それぞれをインスリン、ピオグリタゾ

ン(PPAR-gamma agonist)、レプチンにより治療したのち早期に糸球体を回収し、組織学的変化に先行して発現変動する遺伝子を探索した。

(3) 候補分子のスクリーニングに留まることなく、申請者らがこれまでの研究により糖尿病性腎症で増加することを見出している neutrophil gelatinase-associated lipocalin (Ngal) について、腎組織、尿中、血液中での発現量を検討し、その発現量と腎組織像、血糖値、血圧、体重、治療薬への反応性との相関について検討した。

3. 研究の方法

(1) 糖尿病性腎症モデル動物及びその治療モデルの樹立。①STZ 誘発インスリン依存性糖尿病については、9 週齢雄 C57BL/6J マウスに 180 mg/kgBW の STZ を 1 回腹腔内(ip) 投与した。8 週後に尿中アルブミン排泄を計測すると、vehicle 投与非糖尿病マウスに比して約 3 倍に増加していた。この時点で、osmotic minipump による即効型インスリンの ip 持続投与を開始したところ、1 週間後に随時血糖は 150 mg/dl 程度となり、アルブミン尿は非治療マウスの約 1/2 に減少した。この時点でマウスを解剖、腎臓から differential sieving により糸球体を単離し、Microarray により解析した。②雄 db/db マウスは、コントロール(db/m ヘテロマウス)に比して、5 週齢から著しい高血糖、7 週齢で有意な尿アルブミン排泄増加を示す。5 週齢から食餌を介してピオグリタゾン を 2 週間投与し、マウスを解剖した。③40 週齢の、ネフローゼ状態の糖尿病性腎症を呈する A-ZIP/F-1 マウスに対して、生理的補償量のマウスレプチンを osmotic minipump により ip 持続投与すると、10 日間の投与で尿中アルブミン排泄が 1/3 にまで激減し、糸球体サイズの縮小を認めた。

(2) 糖尿病性腎症糸球体における遺伝子発現の解析。Microarray での解析については、糸球体から TRIzol により total RNA を抽出、ビオチン標識 cRNA プローブを作成、Mouse Genome 430 2.0 Array に対してハイブリダイズ、GeneChip Scanner 3000 にてスキャン、Operating Software ver 1.4 により解析した。real-time quantitative RT-PCR には Prism 7700 Sequence Detector を使用した。

(3) 糖尿病性腎症における Ngal の代謝排泄動態、治療による変化の検討。Alexa546 あるいはポリ・ヒスチジンにより標識した Ngal を糖尿病マウスに投与し、近位尿細管における再吸収、尿中排泄を評価した。糖尿病あるいは肥満を有する高血圧患者にアンジオテンシン受容体阻害薬を投与し、3 ヶ月後の血圧、尿中 Ngal、アルブミン排泄の変化を検討した。

4. 研究成果

糖尿病性腎症の回復に積極的な役割を果たす遺伝子を探索するために、2つのモデルマウスすなわち A-ZIP/F-1 脂肪萎縮性糖尿病マウスのレプチン治療、あるいはストレプトゾトシン誘発 1 型糖尿病マウスのインスリン治療において腎糸球体から mRNA を抽出し、遺伝子発現のプロファイルを網羅的に解析した。糖尿病の糸球体で発現亢進し、早期に回復する分子としては、gremlin 1 (繊維化した組織で発現する BMP antagonist) や growth arrest-specific 6 (糸球体腫大を起こす増殖因子)、Wt-1 (腎臓発生に重要で adult kidney では podocyte に特異的に発現する転写因子) 及び Rab3b (分泌顆粒のエキソサイトシスを調節する ras-oncogene family 分子) などが含まれていた。また、マウス糖尿病性腎症の糸球体・メサンギウム細胞において 1 回膜貫通型の免疫系シグナル受容体 HE-R の発現が亢進すること、HE-R 変異マウスでは糖尿病惹起後の蛋白尿が有意に減少することを見出した。さらに尿中 Ngal が糖尿病性腎症の進展に伴って、近位尿細管での再吸収不全によって増加し、アンジオテンシン受容体拮抗薬により減少することを示し、尿中 Ngal のバイオマーカーとしての有用性を明らかにした (Kuwabara, Sugawara et al. *Kidney Int* 2009, Kasahara, Sugawara et al. *Nephrol Dial Transplant* 2009)。また糖尿病性腎症の増悪因子として podocyte に発現する connective tissue growth factor の重要性を解明し、治療標的の候補となることを明らかにした (Yokoi, Sugawara et al. *Kidney Int* 2008)。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 10 件、すべて査読あり)

① Reduction of urinary excretion of neutrophil gelatinase-associated lipocalin by angiotensin receptor blocker in hypertensive patients. Kasahara M, Mori K, Satoh N, Kuwabara T, Yokoi H, Shimatsu A, Sugawara A, Mukoyama M, Nakao K. *Nephrol Dial Transpl.* 2009, in press.

② Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin levels reflect damage to glomeruli, proximal tubules, and distal nephrons. Kuwabara T, Mori K, Mukoyama M, Kasahara M, Yokoi H, Saito Y, Yoshioka T, Ogawa Y, Imamaki H, Kusakabe T, Ebihara K, Omata M, Satoh N, Sugawara A, Barasch J, Nakao K. *Kidney Int.* 2009 Feb;75(3):285-94.

③ Sensitivity and specificity of a single emergency department measurement of urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin for diagnosing acute kidney injury. Nickolas TL, O'Rourke MJ, Yang J, Sise ME, Canetta PA, Barasch N, Buchen C, Khan F, Mori K, Giglio J, Devarajan P, Barasch J. *Ann Intern Med*. 2008 Jun 3;148(11):810-9.

④ Adrenomedullin inhibits connective tissue growth factor expression, extracellular signal-regulated kinase activation and renal fibrosis. Nagae T, Mori K, Mukoyama M, Kasahara M, Yokoi H, Suganami T, Sawai K, Yoshioka T, Koshikawa M, Saito Y, Ogawa Y, Kuwabara T, Tanaka I, Sugawara A, Kuwahara T, Nakao K. *Kidney Int*. 2008 Jul;74(1):70-80.

⑤ Overexpression of connective tissue growth factor in podocytes worsens diabetic nephropathy in mice. Yokoi H, Mukoyama M, Mori K, Kasahara M, Suganami T, Sawai K, Yoshioka T, Saito Y, Ogawa Y, Kuwabara T, Sugawara A, Nakao K. *Kidney Int*. 2008 Feb;73(4):446-55.

⑥ Myasthenia-like syndrome induced by cibenzoline overdose in a patient with chronic kidney disease. Kawasaki H, Yahata K, Okamoto C, Imamaki H, Seta K, Sugawara A. *Nippon Jinzo Gakkai Shi*. 2008;50(7):942-7.

⑦ Systemic AA amyloidosis caused by familial Mediterranean fever and response to colchicines. Fukui N, Mukoyama M, Saito Y, Mori K, Kasahara M, Yokoi H, Ogawa Y, Kuwabara T, Sugawara A, Nakao K. *Nippon Naika Gakkai Zasshi*. 2008 Dec 10;97(12):3046-8.

⑧ Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as the real-time indicator of active kidney damage. Mori K, Nakao K. *Kidney Int*. 2007 May;71(10):967-70.

⑨ Expression of Ccn1 (Cyr61) in developing, normal, and diseased human kidney. Sawai K, Mukoyama M, Mori K, Kasahara M, Koshikawa M, Yokoi H, Yoshioka T, Ogawa Y, Sugawara A, Nishiyama H, Yamada S, Kuwahara T, Saleem MA, Shiota K, Ogawa O, Miyazato M, Kangawa K, Nakao K. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2007 Oct;293(4):F1363-72.

⑩ Altered gene expression related to glomerulogenesis and podocyte structure in early diabetic nephropathy of db/db mice and its restoration by pioglitazone. Makino H, Miyamoto Y, Sawai K, Mori K,

Mukoyama M, Nakao K, Yoshimasa Y, Suga S. *Diabetes*. 2006 Oct;55(10):2747-56.

[学会発表] (計 20 件)

① Mori K, Kuwabara T, Mukoyama M, Kasahara M, Yokoi H, Ogawa Y, Saito Y, Imamaki H, Sugawara A, Barasch J, Nakao. Urinary Ngal is a kidney injury biomarker which integrates information of damage in glomeruli, proximal tubules and distal nephrons. International Society of Hypertension (ISH) meeting, June 2008, Berlin.

② Nagae T, Mori K, Mukoyama M, Kasahara M, Yokoi H, Suganami T, Sawai K, Yoshioka T, Koshikawa M, Saito Y, Ogawa Y, Kuwabara T, Tanaka I, Sugawara A, Kuwahara T, Nakao K. Adrenomedullin gene transfer into rat kidney ameliorates obstructive renal fibrosis through inhibition of connective tissue growth factor and extracellular signal-regulated kinase. International Society of Hypertension (ISH) meeting, June 2008, Berlin.

③ Mori K, Kuwabara T, Mukoyama M, Saito Y, Kasahara M, Yokoi H, Ogawa Y, Imamaki H, Nakao K. Urinary Ngal as an early biomarker for diabetic nephropathy in mice. The Shiga International Symposium on Diabetic Nephropathy meeting, March 2008, Otsu.

④ Kuwabara T, Mori K, Satoh N, Kasahara M, Yokoi H, Saito Y, Imamaki H, Nagae T, Ogawa Y, Barasch J, Sugawara A, Mukoyama M, Nakao K. Reduction of urinary excretion of neutrophil gelatinase-associated lipocalin (Ngal) by angiotensin receptor blockers (ARBs) in diabetic or obese subjects. American Society of Nephrology (ASN) meeting. November 2008, Philadelphia.

⑤ Mori K, Mukoyama M, Nickolas TL, Barasch J, Nakao K. Forest Fire Theory for Renal Failure and Clinical Impact of Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin. International Society of Nephrology (ISN) meeting. April 2007, Brazil.

⑥ Kuwabara T, Mori K, Mukoyama M, Saito Y, Kasahara M, Yokoi H, Yoshioka T, Ogawa Y, Imamaki H, Sugawara A, Barasch J, Nakao K. Distinct Urinary Excretion of Albumin, Beta-2 microglobulin and Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin in Mouse Models of Diabetic Nephropathy. American Society of Nephrology (ASN) meeting,

November 2007, San Francisco.

⑦ Mori K, Kuwabara T, Mukoyama T, Kasahara M, Yokoi H, Yoshioka T, Ogawa Y, Saito Y, Imamaki H, Sugawara A, Barasch J, Nakao K. Blood and Urinary Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (Ngal) Levels in the Treatment Courses of Proteinuric Glomerular Diseases. American Society of Nephrology (ASN) meeting, November 2007, San Francisco.

⑧ Kuwabara T, Mori K, Mukoyama M, Sugawara A, Nakao K. Urinary Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (Ngal) is a Powerful Biomarker of Disease Activity and Treatment Efficacy in Chronic Kidney Disease (CKD). 日本循環器学会学術集. 2009年3月.大阪.

⑨ 森潔, 栗原孝成, 向山政志, 齋藤陽子, 笠原正登, 横井秀基, 吉岡徹朗, 小川喜久, 今牧博貴, 菅原照, 中尾一和. 1型及び2型糖尿病に伴う糖尿病性腎症モデルマウスの糸球体における遺伝子発現変動パターンの網羅的解析. 日本糖尿病学会年次学術集会. 2008年5月東京.

⑩ 栗原孝成, 森潔, 向山政志, 笠原正登, 横井秀基, 小川喜久, 齋藤陽子, 今牧博貴, 菅原照, 中尾一和. ネフローゼ治療中の血中・尿中 Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (Ngal)濃度の推移. 日本内科学会講演会. 2008年4月東京.

⑪ 森潔, 向山政志, 笠原正登, 横井秀基, 栗原孝成, 中尾一和. 尿中 Ngal 濃度の解析から考えられる理想の腎障害マーカー像 (Kidney Biomarkerology 2008). 日本腎臓学会学術総会. 2008年5月福岡.

⑫ 森潔, 栗原孝成, 向山政志, 齋藤陽子, 笠原正登, 横井秀基, 小川喜久, 今牧博貴, 菅原照, 中尾一和. 糖尿病性腎症モデルマウスの回復早期に発現変動する遺伝子群の同定. 日本内分泌学会学術総会. 2008年5月青森.

⑬ 向山政志, 森潔, 笠原正登, 原田昌樹, 中尾一和. 内分泌因子・液性因子と腎予後予測—NgalとBNPを中心に—. 日本腎臓学会西部学術大会. 2008年9月名古屋.

⑭ 森潔, 栗原孝成, 向山政志, 笠原正登, 横井秀基, 齋藤陽子, 小川喜久, 今牧博貴, 菅原照, 中尾一和. 2種の糖尿病性腎症モデルマウスの糸球体において共通に発現増加する遺伝子の網羅的解析. 日本糖尿病合併症学会. 2008年10月東京.

⑮ 岡本千夏, 小泉三輝, 菊地祐子, 瀬田公一, 八幡兼成, 菅原照. 高血圧・高脂血症を伴うCKD(慢性腎臓病)患者における血圧コントロール後のスタチンによる蛋白尿減少, 腎保護効果について. 日本高血圧学会総会. 2008年10月札幌.

⑯ 岡本千夏, 小泉三輝, 菊地祐子, 瀬田公一,

八幡兼成, 菅原照. 夜間血圧コントロールによる蛋白尿減少と腎保護効果. 日本腎臓学会学術総会. 2007年5月浜松.

⑰ 森潔, 向山政志, 笠原正登, 横井秀基, 栗原孝成, 吉岡徹朗, 小川喜久, 齋藤陽子, 菅原照, 中尾一和. 腎不全の「山火事」理論と Neutrophil gelatinase-associated lipocalin 日本腎臓学会学術総会. 2007年5月浜松.

⑱ 栗原孝成, 森潔, 向山政志, 齋藤陽子, 笠原正登, 横井秀基, 吉岡徹朗, 小川喜久, 菅原照, 中尾一和. I型及びII型糖尿病に伴う糖尿病性腎症モデルマウスの糸球体における遺伝子発現変動パターンの網羅的解析. 日本腎臓学会学術総会. 2007年5月浜松.

⑲ 森潔, 向山政志, 笠原正登, 横井秀基, 栗原孝成, 吉岡徹朗, 小川喜久, 齋藤陽子, 菅原照, 中尾一和. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin の臨床的意義及び腎不全の「山火事」理論. 日本透析医学会学術集会. 2007年6月大阪

⑳ 森潔, 向山政志, 笠原正登, 中尾一和. 腎不全における Ngal:siderophore:Fe 複合体の意義. 日本透析医学会学術集会. 2007年6月大阪

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菅原 照 (SUGAHARA AKIRA)
京都大学・医学研究科・臨床教授
研究者番号： 00312223

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

森 潔 (MORI KIYOSHI)
京都大学・医学研究科・講師
研究者番号： 60343232

佐藤 哲子 (SATOU NORIKO)
京都医療センター臨床研究センター
・研究員
研究者番号： 80373512