

平成 22 年 5 月 1 日現在

研究種目： 若手研究(B)  
 研究期間： 2008 ～ 2009  
 課題番号： 20790592  
 研究課題名（和文） DM腎症の網羅的遺伝子発現解析：NF- $\kappa$ B、IRBに対する治療法開発  
 研究課題名（英文） Comprehensive gene expression profiling analysis on diabetic nephropathy  
 研究代表者  
 安田 直成 (Yoshinari Yasuda)  
 名古屋大学・大学院医学系研究科・寄附講座准教授  
 研究者番号：60432259

## 研究成果の概要（和文）：

ヒト腎生検組織を micro dissection し、mRNA を抽出して DNA マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を行ったが、十分な感度は得られていない。急性腎障害動物モデルに関する DNA アレイ研究につきバイオ・インフォマティクス・ツールで解析を行い、共通した発現変化を示す遺伝子群を同定した。これらの遺伝子群を糖尿病性腎症（DN）における DNA アレイ結果と比較し、進行性 DN を clustering 解析で予測できた。さらに転写調節機構の解析方法の確立に努めた

## 研究成果の概要（英文）：

A comprehensive gene expression analysis was performed by using mRNA extracted from human renal biopsy specimens after micro-dissection, however signal sensitivity has still remained at the level of detection limit. In parallel, a bio-informatics analysis was conducted by using animal models of acute kidney injury. Comparison of the gene expression signatures of murine renal failure identified a shared transcriptome of 45 differentially regulated genes. 67% of these mRNAs were regulated in human renal disease and successfully segregated progressive DN from controls by clustering analysis.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

## 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：糖尿病性腎症、DNA アレイ、バイオ・インフォマティクス、

1. 研究開始当初の背景  
 わが国における維持透析患者数は、2006 年 12 月末現在では 26.4 万人を超えて増加の一

途をたどり、医学的のみならず医療経済的にも大きな問題となっている。透析導入患者の原疾患第 1 位は糖尿病性腎症であるが、糖尿

病患者数の急激な増加に伴い、今後も糖尿病性腎症による末期腎不全患者数は大幅に増加することが確実であり、その対策が緊急の課題である。

しかし現在の糖尿病性腎症に対する治療は、ACE-I、ARBなどによる腎保護を中心とした保存的治療の段階に止まっており、真に有効な治療法や対策は確立されていない。これは、糖尿病性腎症の病態、殊にヒトにおける糖尿病性腎症の病態が充分には解明されておらず、独創的な創薬のターゲットとなる pathway や転写調節機構が明らかになっていないためである。これまでにも、糖尿病性腎症の病態を解明すべく精力的な研究が行われてきたが、それらの成果が有効にヒト糖尿病性腎症に応用できない原因として、主に4つの問題点が考えられ、本研究ではそれぞれについて対策を施したので、☞に示す。

<従来の研究の問題と本研究での改善点>

- (1) ヒトと異なる病態・臨床経過を呈する I 型糖尿病などの動物実験モデルを用いた研究であった。  
☞ヒト II 型糖尿病性腎症の腎生検組織における遺伝子発現を解析する。
- (2) 特定の遺伝子・タンパク群に注目した研究であったが、新規性を重んじるあまり、腫瘍学、血液学などの先進的研究の成果に依存し、必ずしも糖尿病性腎症の病態に即した研究ではなかった。  
☞cDNA アレイ法により、genome-wide な網羅的遺伝子発現解析を行う。
- (3) 特定の遺伝子・タンパク群の発現変化を whole kidney で研究していた。  
☞腎臓の複雑な解剖・生理を考慮し、糸球体と尿細管・間質部に microdissection し解析する。
- (4) 緩徐進行性の糖尿病性腎症の複雑な病態を十分に考慮することなく、単一あるいは少数の遺伝子・タンパクの発現変化や機能異常で理解しようとした。  
☞糖尿病性腎症進展に絞り、得られた遺伝子発現に関する結果を、腎生検時の腎機能、蛋白尿や、前向きでの腎機能、蛋白尿の変化などの臨床データと組み合わせ検討する

創薬ターゲット探索のため、本研究では cDNA アレイ法を用いる。従来の cDNA アレイ法による研究の多くは、統計学的に有意な発現変化をする非常に多数の遺伝子のうち、既知の情報から判断して、興味深いごく少数の遺伝子を恣意的に抽出し、その発現変化を RT-PCR 法により確認するに止まっており、cDNA アレイ法の有する網羅的解析という特長を十分に生かし、総合的に解析できていなかった。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、糸球体と尿細管・間質部に microdissection したヒト II 型糖尿病性腎症腎生検組織において、cDNA アレイ法により genome-wide に網羅的遺伝子発現解析を行い、糖尿病性腎症進展に関わる pathway 並びに転写調節機構を解析し、新規創薬ターゲットを同定することである。本研究の成果は、新規創薬ターゲットを解明することで、糖尿病性腎症進展に対する特異的な治療法の開発に繋がり、わが国のみならず世界的に糖尿病性腎症による腎不全患者数を減少させ得ると期待される。

## 3. 研究の方法

- (1) ヒト糖尿病性腎症腎生検組織より microdissect した糸球体部より mRNA を抽出し、Agilent technology 社の Whole Human Genome オリゴ DNA マイクロアレイを一色分析法により感度を改善して、cDNA アレイ法によるヒト糖尿病性腎症糸球体部の網羅的遺伝子発現解析を行う。
- (2) cDNA アレイにおける遺伝子発現結果をバイオ・インフォマティクス手法により創薬ターゲットとなる候補分子を決定する。DNA アレイ解析より得られた網羅的遺伝子発現データは、dChip、SAM で統計学的に解析し、公的な Gene Ontology、DAVID ソフトウェアならびに、Ingenuity 社の Pathway 解析ソフトウェア、Genomatix 社の Eldorado、Gene2 Promoter、MatInspector、BiblioSphere などの各種解析ソフトウェアにより、pathway レベル、転写調節機構のレベルでの解析を行う。
- (3) 代表的な急性腎障害モデルである虚血再灌流モデル、片側尿細管結紮モデル、アドリアマイシン腎症モデルにおける DNA アレイでの網羅的遺伝子発現解析結果を用いて上記のバイオ・インフォマティクス解析の有効性を検証する。DNA アレイ解析で共通した発現変動をきたす遺伝子群を同定し、その結果をヒト腎生検結果を比較検討する。さらに clustering 解析により、DN 腎症の進行度を予測可能か検討する。

## 4. 研究成果

- (1) ヒト腎生検組織より microdissection により糸球体を単離し、mRNA を抽出する技術を確立した。
- (2) 腎生検組織 mRNA にて DNA アレイ解析を行った。mRNA 量が少なく、これまでのところ十分な感度が得られていない。DNA アレイ結果例を図 1 に示す。

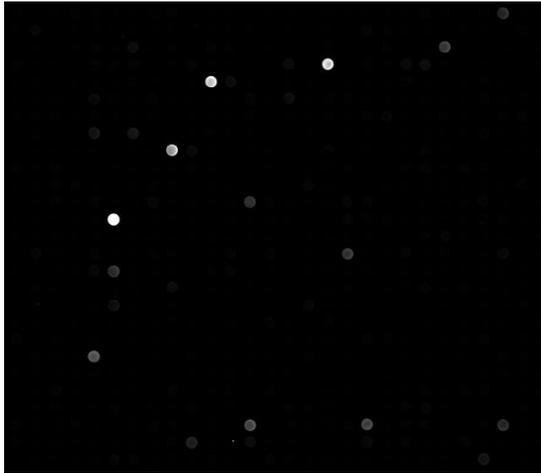


図 1 : DNA アレイ結果 (拡大)

(3) DNA アレイ結果より、発現変動する遺伝子群を同定したが、ヒト腎生検組織より抽出した糸球体では十分なシグナルを得ることが困難であった。コントロールとして解析した微小変化型ネフローゼの血球における遺伝子発現変化解析結果例を示す。

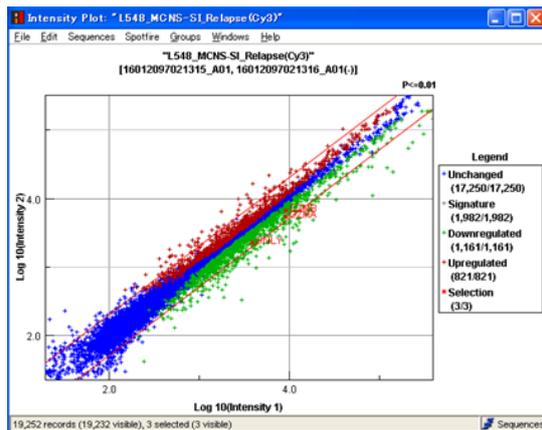


図 2 : 微小変化型ネフローゼにおける網羅的な遺伝子発現変動解析結果

(4) 得られた遺伝子発現変化より Ingenuity ソフトによる pathway 解析を行い、さらに Genomatix による promotor module 解析を行った。また Genomatix Bibliosphere 解析で、これまでに報告された 120 万件以上の研究 abstract を自動抽出したデータベースより、関連分子検索を行った。

(5) 急性腎障害 (AKI) 動物モデルでの DNA アレイ解析結果を活用し、バイオ・インフォマティクス解析の有効性を示した。3 種の AKI モデル動物における 4DNA アレイ研究での発現変動を比較して、共通して発現変動する遺伝子群を同定した。発現亢進する 39 遺伝子、減弱する 6 遺伝子のうち、特に 4 つの DNA アレイ解析のうち 3 つ以上で同一の発現変動を示した遺伝子群を表 1 に示す。

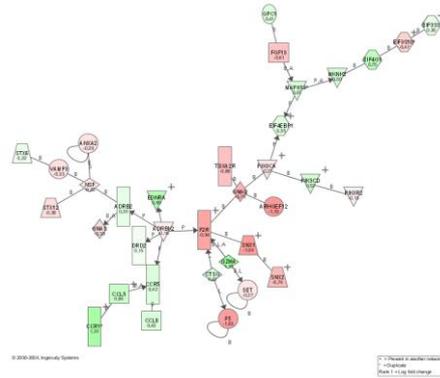


図 3 : Ingenuity 解析結果例

**Up-regulated mRNA found in  $\geq 3$  studies**

Gene Name	Gene Accession#
procollagen, type XVIII, alpha 1	L22545, U03715
GRO1 oncogene	J04596
neutrophil gelatinase-associated lipocalin	X81627
pMAT1	L31958
procollagen, type I, alpha 2	X58251
procollagen, type III, alpha 1	X52046
procollagen, type XV	AF011450, D17546
SSeCKS	AB020886
tenascin C	X56304
thrombospondin 1	M62470
transgelin	Z68618
tubulin beta 5	X04663
vascular smooth muscle alpha-actin	X13297

**Down-regulated mRNA found in  $\geq 3$  studies**

Gene Name	Gene Accession#
epidermal growth factor	V00741
growth arrest specific 2	M21828

表 1 : AKI モデルで共通する遺伝子発現変化

(6) 腎障害群として糖尿病性腎症 (DN) 13 例、腎硬化症 15 例、また対照群として糸球体基底膜菲薄症 6 例、微小変化型ネフローゼ 4 例、生体腎移植 7 例、腎摘除術における摘出腎組織 4 例、合計 49 例のヒト腎生検組織での DNA アレイ結果で、上記の 49 遺伝子発現変動を検証した。ヒト腎生検組織においても、腎障害群では発現亢進する 39 遺伝子中 24 遺伝子 (61.5%)、また減弱する 6 遺伝子中 2 遺伝子 (33.3%) において同様な発現変動を確認し、これらの遺伝子発現レベルは Cr 値や腎生検での腎障害度と相関を認めた。

(7) 45 遺伝子による clustering 解析により、DN のうち進行性腎障害群を軽度の腎障害やコントロール群と鑑別可能であった (図 3)。

得られた成果の国内外における位置づけとインパクトならびに今後の展望 : 本研究の成果により、ヒト腎生検組織を用いた網羅的な遺伝子発現解析の有効性が示された。とくにバイオ・インフォマティクスを駆逐することで、AKI 動物モデルとヒト腎障害で共通する

遺伝子群が明らかとなっており、新たな層葉のターゲットとして注目される。一方で現段階ではヒト腎生検組織より単離した糸球体におけるDNAアレイ研究は困難であり、更なる研究手法の改善を要する。

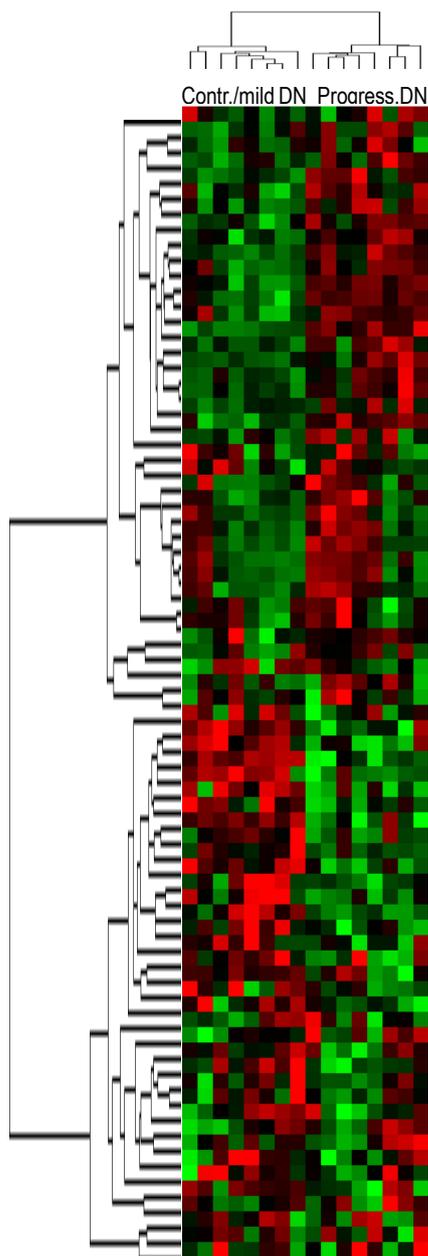


図3 : Clustering 解析結果

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 12 件) 全て査読あり

1. Horio M, Imai E, Yasuda Y, Watanabe T, Matsuo S. Modification of a new estimating equation for GFR,

CKD-EPI equation for Japanese. Am J Kid Dis. *in press*, 2010.

2. Matsuo S, Yasuda Y, Imai E, Horio M. Current status of estimated GFR (eGFR) equations for Asians and an approach to create a common eGFR equation. Nephrol. *in press*, 2010.

3. Ishii H, Kumada Y, Toriyama T, Aoyama T, Takahashi H, Tanaka M, Kamoi D, Kawamura Y, Yamada S, Hayashi M, Yasuda Y, Yuzawa Y, Maruyama S, Matsuo S, Matsubara T, Murohara T. Effects of oral cilostazol 100 mg BID on long-term patency after percutaneous transluminal angioplasty in patients with femoropopliteal disease undergoing hemodialysis: a retrospective chart review in Japanese patients. Clin Ther. 2010 Jan;32(1):24-33.

4. Ishii H, Toriyama T, Aoyama T, Takahashi H, Amano T, Hayashi M, Tanaka M, Kawamura Y, Yasuda Y, Yuzawa Y, Maruyama S, Matsuo S, Matsubara T, Murohara T. Prognostic values of C-reactive protein levels on clinical outcome after implantation of sirolimus-eluting stents in patients on hemodialysis. Circ Cardiovasc Interv. 2009 Dec;2(6):513-8. Epub 2009 Oct 13.

5. Miyagi M, Ishii H, Murakami R, Isobe S, Hayashi M, Amano T, Arai K, Yoshikawa D, Ohashi T, Uetani T,

- Yasuda Y, Matsuo S, Matsubara T, Murohara T. Impact of renal function on coronary plaque composition. *Nephrol Dial Transplant*. 2010 Jan;25(1):175-81. Epub 2009 Aug 23.
6. Sukegawa M, Noda A, Yasuda Y, Nakata S, Sugiura T, Miyata S, Honda K, Hasegawa Y, Nakashima T, Koike Y. Impact of microarousal associated with increased negative esophageal pressure in sleep-disordered breathing. *Sleep Breath*. 2009 May 15. [Epub ahead of print]
  7. Matsuo S, Imai E, Horio M, Yasuda Y, Tomita K, Nitta K, Yamagata K, Tomino Y, Yokoyama H, Hishida A; Collaborators developing the Japanese equation for estimated GFR. Revised equations for estimated GFR from serum creatinine in Japan. *Am J Kidney Dis*. 2009 Jun;53(6):982-92.
  8. Ishii H, Kumada Y, Toriyama T, Aoyama T, Takahashi H, Amano T, Yasuda Y, Yuzawa Y, Maruyama S, Matsuo S, Matsubara T, Murohara T. Aortic valvular calcification predicts restenosis after implantation of drug-eluting stents in patients on chronic haemodialysis. *Nephrol Dial Transplant*. 2009 May;24(5):1562-7.
  9. Noda A, Nakata S, Fukatsu H, Yasuda Y, Miyao E, Miyata S, Yasuma F, Murohara T, Yokota M, Koike Y. Aortic pressure augmentation as a marker of cardiovascular risk in obstructive sleep apnea syndrome. *Hypertens Res*. 2008 Jun;31(6):1109-14.
  10. Ishii H, Kumada Y, Toriyama T, Aoyama T, Takahashi H, Yamada S, Yasuda Y, Yuzawa Y, Maruyama S, Matsuo S, Matsubara T, Murohara T. Cilostazol improves long-term patency after percutaneous transluminal angioplasty in hemodialysis patients with peripheral artery disease. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2008 Jul;3(4):1034-40.
  11. Aoyama T, Ishii H, Toriyama T, Takahashi H, Kasuga H, Murakami R, Amano T, Uetani T, Yasuda Y, Yuzawa Y, Maruyama S, Matsuo S, Matsubara T, Murohara T. Sirolimus-eluting stents vs bare metal stents for coronary intervention in Japanese patients with renal failure on hemodialysis. *Circ J*. 2008 Jan;72(1):56-60.
  12. Horio M, Imai E, Yasuda Y, Hishida A, Matsuo S; on behalf of the collaborators for developing the Japanese equation for estimating GFR. Simple sampling strategy for measuring inulin renal clearance. *Clin Exp Nephrol*. 2009 Feb;13(1):50-4. Epub 2008 Oct 1.

6. 研究組織  
 (1) 研究代表者  
 安田 宜成 (Yoshinari Yasuda)

名古屋大学・大学院医学系研究科・寄附講  
座准教授 研究者番号：60432259