

令和 4 年 6 月 22 日現在

機関番号：82610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08717

研究課題名(和文)尿中afaminレベルにもとづく糖尿病性腎症予後診断法の開発

研究課題名(英文)Development of Diagnostic Methods for detecting Diabetic Nephropathy

研究代表者

久保田 浩之(卯木浩之)(HIROYUKI, KUBOTA)

国立研究開発法人国立国際医療研究センター・その他部局等・室長

研究者番号：40323290

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文):本研究では腎機能が正常な2型糖尿病患者を対象にeGFR低下に先行して変動する尿中因子の探索を行い、腎機能低下群と対照群との比較により有意差を示す尿中タンパク質11種を同定した。さらに腎機能低下を目的変数としたロジスティック回帰分析において、このうち9タンパク質が独立危険因子となった。一方、先行研究において尿アルブミン・クレアチニン比の変動との関連を認めた尿中afamin濃度は、有意水準には至らなかったものの対照群に比べ腎機能低下群で上昇していた。尿中afaminタンパク質濃度に加え本研究で同定したタンパク質の尿中濃度は腎機能予後予測マーカーとして活用できる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病性腎臓病患者における腎機能低下の危険因子である尿アルブミン・クレアチニン比やeGFRは、本研究で解析対象とする糖尿病性腎臓病を発症していない2型糖尿病患者における腎機能低下と明らかな関連を示さなかった。したがって本研究で新たに同定された尿中タンパク質の尿中濃度を用いた腎機能予後予測法を構築し、その有用性が示されれば、早期腎症期を的確に診断し、適切な治療介入により糖尿病性腎臓病の進展を阻止できる可能性がある。また、腎機能予後予測プログラムにて腎機能低下ハイリスク群と判定された2型糖尿病患者を対象として、腎機能低下をより効率的に予防する新たな治療法開発を進めることも可能となる。

研究成果の概要(英文):We have previously performed a urinary proteomic analysis of patients with diabetic kidney disease (DKD) and identified the differentially excreted proteins in the patients with DKD. In this study, we evaluated the association of the differentially excreted proteins with an annual decline in estimated glomerular filtration (eGFR) in patients with type 2 diabetes (T2D) and preserved kidney function. We found that 9 proteins among them were significant independent predictors of annual decline in eGFR. In addition, urinary afamin levels, which have previously been found to be associated with changes in the urinary albumin-to-creatinine ratio, were increased in rapid decliner compared to that of slow decliner although the difference was not statistically significant. Our findings highlight the important effect of the identified urinary proteins including afamin as prognostic markers of early progressive renal decline in patients with T2D and preserved kidney function.

研究分野：糖尿病学

キーワード：糖尿病性腎臓病 腎機能低下 尿プロテオーム

1. 研究開始当初の背景

糖尿病患者数は全世界的に増加の一途を辿っており、2015年の国際糖尿病連合の報告では世界の糖尿病有病者数は4億1500万人に至っている。我が国の成人糖尿病人口も世界大9位の多さであり、「2016年国民健康・栄養調査」においても糖尿病が強く疑われる糖尿病有病者は約1000万人に達している。糖尿病の合併症のひとつである糖尿病性腎症は、1998年より我が国の透析導入主要原疾患の第一位であり、割合にして4割にも及んでいる。血糖、脂質や血圧の管理、低蛋白食などといった集約的治療法は腎不全への進行を遅らせるのに一定の成果はあげられているが、根治的な治療法確立にはいまだ至っていない。また、糖尿病性腎症の発症・進展には必ずしも血糖コントロールだけで予測しきれない部分がある。さらに糖尿病患者において腎症重症度の指標とされる尿中微量アルブミンは糖尿病性腎症のサロゲートエンドポイントとはなりえないことや()、近年では尿中アルブミンの増加を伴わずに腎機能の急速な低下を示す症例の存在も報告されている()。

一方、糖尿病性腎症の病理組織学的所見では、メサンギウム領域拡大や糸球体基底膜肥厚をはじめとした糸球体病変が目撃されることが多い一方、fibrin capを例とした滲出性病変、尿細管基底膜肥厚、輸出入細動脈の硝子化、広範な間質線維化など病理像が多岐にわたることが報告されつつある。Wongらは糖尿病性腎症の病理組織学的所見と腎機能予後との関連について検討し、2型糖尿病で蛋白尿を呈する患者であっても腎組織の病理像には多様性があり、その病理像により腎機能予後が異なることを報告した()。一般に糖尿病性腎症ではKimmelstiel-Wilson病変が特徴的であるとされるが、糖尿病性腎症と関連がないとされている巣状糸球体硬化病変や微小変化型ネフローゼ症候群などの病変も合併している症例も散見され、これらの病変を有する患者の腎機能低下速度は合併していない患者の腎機能低下速度と異なることが示された()。このような背景から糖尿病性腎症は近年、単一の疾患・病態ではないと考えられるようになり、腎病理診断の重要性が取り沙汰されるようになったものの、糖尿病性腎症と診断されて腎生検が実施されることは稀である。これは、腎生検の侵襲性の高さや合併症のリスク等ゆえ適応には慎重にならざるを得ず、広く実施するには困難な面が多いからである。したがって、非侵襲である尿検査によって糖尿病性腎症を早期に診断可能な新しい尿中因子を開発すること、あるいは現在の診断指標である尿アルブミンを補い、検出力を向上させる尿中因子を開発することの意義は大きい。

2. 研究の目的

先行研究において申請者らは低濃度のタンパク質探索を可能とする非標識定量プロテオーム解析法を用いて糖尿病性腎臓病に関連する尿タンパク質を探索し、afaminをはじめとする104種のタンパク質を同定した()。本研究では、これらの糖尿病性腎臓病関連タンパク質と腎機能予後との関連をより大規模な後ろ向き観察研究集団にて検討することにより糖尿病性腎臓病の予後診断法を開発することを目的とする。

3. 研究の方法

2010~2014年度に国立国際医療研究センター病院 糖尿病内分泌代謝科、JR東京総合病院 糖尿病・内分泌内科、国立病院機構千葉東病院 糖尿病・内分泌内科に通院した2型糖尿病患者(T2D)486名について、1年に1回の頻度で血液、随時尿検体の採取、および付随する臨床情報を取得した。このうち研究参加登録時にeGFR 60 mL/min/1.73m²であり、経過観察期間1年以上のT2D 403名を本研究の解析対象者とした。なお、解析対象者の経過観察期間の中央値は5.5年(IQR: 3.9 - 7.3)だった。年間eGFR低下率は観察研究期間中のeGFR値の回帰直線の傾きから算出し、年間eGFR低下率5%以上を腎機能低下群、5%未満を対照群(腎機能正常~軽度低下群)とした。さらにT2D 403名から218名を選抜し、研究参加登録時に採取した随時尿検体を用いて尿プロテオーム解析を行った。尿プロテオーム解析における測定対象タンパク質は、先行研究にて見出した糖尿病性腎臓病関連タンパク質のうち、測定系に組み入れることが出来たタンパク質75種(105ペプチド)とした。

4. 研究成果

解析対象集団の年齢の中央値は59歳(IQR: 53 - 64)で75%が男性、糖尿病罹病期間の中央値は10年(IQR: 5 - 15)だった。また、観察期間中に47名(11.7%)で腎機能低下が見られた(年間eGFR低下率中央値 -6.51%; IQR: -8.59 - -5.60)。この腎機能低下群では対照群(356名)と比べてHDL-C、Htが有意な低値である一方、空腹時血糖は有意な高値であった。さらに、有意差はないものの、腎機能低下群では対照群と比べてTG、HbA1c、尿アルブミン・クレアチニン比(UACR)が高値を示し、Hbは低値を示した。これらの因子の腎機能低下危険因子としての評

価を多重ロジスティック回帰分析にて行った結果、HDL-C、TG、Ht が独立した危険因子となった (表 1)。

次に尿プロテオーム解析のために腎機能低下群、対照群からそれぞれ 174 例 (国立国際医療研究センター病院 109 例、JR 東京総合病院 65 例) 44 例 (国立国際医療研究センター病院 28 例、JR 東京総合病院 16 例) を選抜した。

これらの集団の年間 eGFR 低下率 [中央値 (IQR)] は、腎機能低下群 -6.51% (IQR, -8.54 - -6.47) 対照群 -1.29% (IQR, -1.43 - -0.65) であった。対象者より観察研究開始時に採取した随時尿を用いて糖尿病性腎臓病関連タンパク質 75 種 (105 ペプチド) の尿中濃度を測定した結果、腎機能低下群と対照群との比較により有意差を示す尿中タンパク質 11 種を同定した (図 1)。このうち、対照群に比べ腎機能低下群で濃度が上昇しているタンパク質は 7 種、濃度が減少しているタンパク質は 4 種であった。なお、申請者らは先行研究において尿中 afamin 濃度は eGFR、UACR の両者と相関すること、また尿中 afamin 濃度は、その後の UACR 変動を予測するバイオマーカーとなる可能性があることを見出した。そこで本研究対象集団にて尿中 afamin 濃度を検討したところ、有意水準には至らなかったものの対照群に比べ腎機能低下群で尿中 afamin 濃度が上昇していた ($P = 0.067$)。このことから、尿中 afamin 濃度は UACR 変動に加え eGFR 変化予測においても有用なバイオマーカーとなる可能性が考えられた。

最後に、本研究にて腎機能低下群で有意な濃度差異を示した尿中タンパク質 11 種について腎機能低下 (年間 eGFR 低下率 5%以上) を目的変数としたロジスティック回帰分析を行った。解析の結果 9 タンパク質が有意な独立危険因子となり、性別、年齢、eGFR、UACR、HDL-C、TG、Ht 調整後の P 値も有意水準を下回った ($P < 0.05$)。

以上、本研究の実施により afamin タンパク質に加え 9 種のタンパク質の尿中濃度が腎機能予後予測に有用となる可能性を得た。これらの因子が腎機能予後予測マーカーとして活用できるかについて、前向き観察研究集団における解析などで今後検証する必要がある。

表1. HDL-C, TG, Htは腎機能低下に対する独立した危険因子であった

	Crude			Adjusted**		
	OR*	95% CI	P value	OR*	95% CI	P value
HDL-C (mg/dL)	0.971	0.948 - 0.994	0.014	0.974	0.949 - 0.999	0.042
TG (mg/dL)	1.003	1.000 - 1.006	0.036	1.003	1.000 - 1.006	0.049
HbA1c (%)	1.207	0.958 - 1.522	0.110	1.232	0.951 - 1.596	0.114
Ht (%)	0.906	0.828 - 0.993	0.034	0.833	0.745 - 0.931	0.001
UACR (μ g/g Cre)	1.001	1.000 - 1.002	0.110	1.001	1.000 - 1.001	0.301

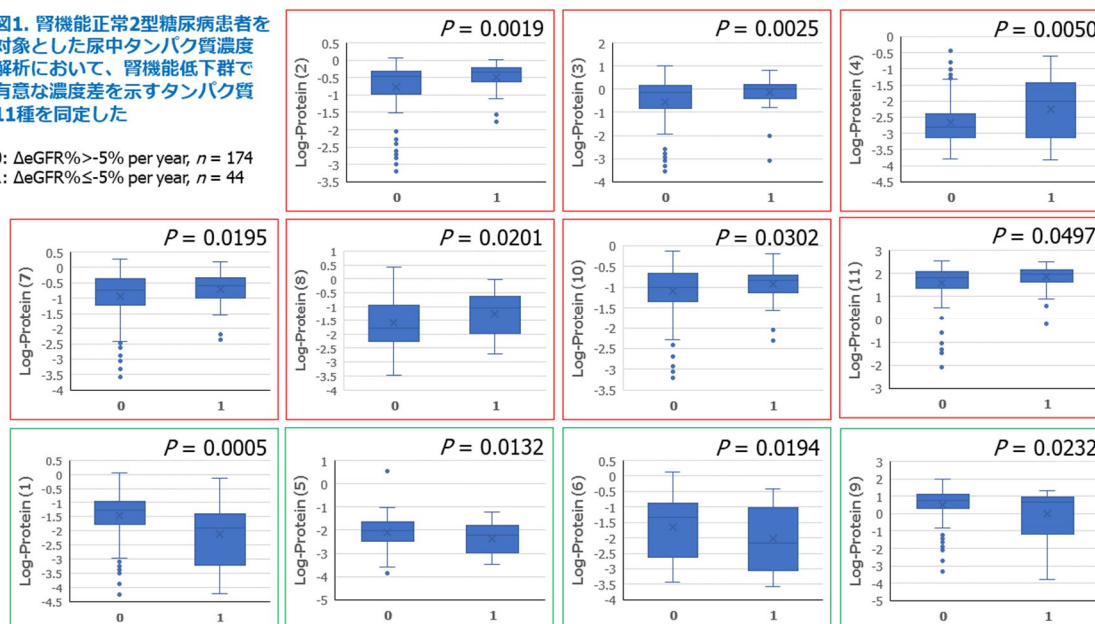
HDL-C, high density lipoprotein-cholesterol; TG, triglyceride; Ht, hematocrit; UACR, urine albumin to creatinine ratio.

* per 1-unit increase.

** Adjusted for gender, age, eGFR, presence of hypertension, and use of biganides.

図1. 腎機能正常2型糖尿病患者を対象とした尿中タンパク質濃度解析において、腎機能低下群で有意な濃度差を示すタンパク質 11種を同定した

0: Δ eGFR% > -5% per year, $n = 174$
1: Δ eGFR% \leq -5% per year, $n = 44$



<引用文献>

Perrin NE, Torbjörnsdotter TB, Jaremko GA, Berg UB. The course of diabetic glomerulopathy in patients with type I diabetes: a 6-year follow-up with serial biopsies. *Kidney Int.* 2006 Feb;69(4):699-705. doi: 10.1038/sj.ki.5000146. PMID: 16518327.

Araki S, Haneda M, Koya D, Hidaka H, Sugimoto T, Isono M, Isshiki K, Chin-Kanasaki M, Uzu T, Kashiwagi A. Reduction in microalbuminuria as an integrated indicator for

renal and cardiovascular risk reduction in patients with type 2 diabetes. *Diabetes*. 2007 Jun;56(6):1727-30. doi: 10.2337/db06-1646. Epub 2007 Mar 14. PMID: 17360976.

Krolewski AS. Progressive renal decline: the new paradigm of diabetic nephropathy in type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 2015 Jun;38(6):954-62. doi: 10.2337/dc15-0184. PMID: 25998286; PMCID: PMC4439536.

Wong TY, Choi PC, Szeto CC, To KF, Tang NL, Chan AW, Li PK, Lai FM. Renal outcome in type 2 diabetic patients with or without coexisting nondiabetic nephropathies. *Diabetes Care*. 2002 May;25(5):900-5. doi: 10.2337/diacare.25.5.900. PMID: 11978688.

Mou S, Wang Q, Liu J, Che X, Zhang M, Cao L, Zhou W, Ni Z. Prevalence of non-diabetic renal disease in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract*. 2010 Mar;87(3):354-9. doi: 10.1016/j.diabres.2009.11.012. Epub 2009 Dec 14. PMID: 20005594.

Kaburagi Y, Takahashi E, Kajio H, Yamashita S, Yamamoto-Honda R, Shiga T, Okumura A, Goto A, Fukazawa Y, Seki N, Tobe K, Matsumoto M, Noda M, Unoki-Kubota H. Urinary afamin levels are associated with the progression of diabetic nephropathy. *Diabetes Res Clin Pract*. 2019 Jan;147:37-46. doi: 10.1016/j.diabres.2018.02.034. Epub 2018 Mar 6. PMID: 29522788.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ishikane Masahiro, Unoki-Kubota Hiroyuki, Moriya Ataru, Kutsuna Satoshi, Ando Honami, Kaburagi Yasushi, Suzuki Tetsuya, Iwamoto Noriko, Kimura Moto, Ohmagari Norio	4. 巻 28
2. 論文標題 Evaluation of the QIAstat-Dx Respiratory SARS-CoV-2 panel, a rapid multiplex PCR method for the diagnosis of COVID-19	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Infection and Chemotherapy	6. 最初と最後の頁 729 ~ 734
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jiac.2022.02.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 久保田浩之, 今澤俊之	4. 巻 91(5)
2. 論文標題 多層のオミックス解析による慢性腎臓病研究	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 腎と透析	6. 最初と最後の頁 873 ~ 876
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 久保田浩之, 今澤俊之	4. 巻 91(4)
2. 論文標題 遺伝的素因	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 腎と透析	6. 最初と最後の頁 519 ~ 523
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Iwata Wakiko, Unoki-Kubota Hiroyuki, Kato Hideki, Shimizu Akira, Matsumoto Michihiro, Imasawa Toshiyuki, Igarashi Arisa, Matsumoto Kenji, Noda Tetsuo, Terauchi Yasuo, Nangaku Masaomi, Kasuga Masato, Kaburagi Yasushi	4. 巻 15
2. 論文標題 Podocyte-specific deletion of tubular sclerosis complex 2 promotes focal segmental glomerulosclerosis and progressive renal failure	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0229397
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0229397	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Unoki-Kubota H, Ito E, Hirano D, Imasawa T, Kajio H, Yamashita S, Fukazawa Y, Kaburagi Y
2. 発表標題 Urinary Biomarkers for Prediction of Estimated GFR Decline in Patients with Type 2 Diabetes and Preserved Kidney Function
3. 学会等名 American Society of Nephrology (ASN) Kidney Week 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hirano D, Unoki-Kubota H, Imasawa T, Kajio H, Yamashita S, Fukazawa Y, Kaburagi Y
2. 発表標題 Independent Predictive Factors of Estimated GFR Decline in Type 2 Diabetes Patients with Preserved Kidney Function
3. 学会等名 American Society of Nephrology (ASN) Kidney Week 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 今澤 俊之, 久保田 浩之, 平野 大志, 北村 博司, 鍋木 康志
2. 発表標題 多層的オミックス解析によるCKD 研究
3. 学会等名 第51回（令和3年度）日本腎臓学会東部学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Iwata W, Unoki-Kubota H, Kato H, Matsumoto M, Nangaku M, Kaburagi Y.
2. 発表標題 PDK1 is a key regulator of podocyte viability and maintenance of glomerular function.
3. 学会等名 American Diabetes Association 80th Scientific Sessions (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岩田和希子、久保田浩之、加藤秀樹、清水章、松本道宏、寺内康夫、南学正臣、春日雅人、鍋木康志
2. 発表標題 糸球体上皮細胞におけるPDK1の役割と腎機能への影響の解析
3. 学会等名 第56回日本臨床分子医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊藤恵実、久保田浩之、高橋枝里、梶尾裕、本田律子、野田光彦、鍋木康志
2. 発表標題 尿中deoxyribonuclease-I レベルは糖尿病腎症の重症化と関連する
3. 学会等名 第62 回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岩田和希子、久保田浩之、松本道宏、寺内康夫、鍋木康志
2. 発表標題 糸球体上皮細胞特異的Tuberous sclerosis complex 2 欠損マウスポドサイトを用いた糖尿病性腎症関連パスウェイの探索
3. 学会等名 第62 回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yasushi Kaburagi, Emi Ito, Hiroyuki Unoki-Kubota
2. 発表標題 Urinary Levels of Deoxyribonuclease-1 and Lysosomal Alpha-Glucosidase Were Associated with the Progression of Diabetic Nephropathy
3. 学会等名 American Diabetes Association 79th Scientific Sessions (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

国立国際医療研究センター研究所 糖尿病研究センター 臓器障害研究部
<http://www.ncgm-dmcomp.umin.jp/>

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
連携研究者	鎌木 康志 (Kaburagi Yasushi) (40342927)	国立国際医療研究センター・研究所 臓器障害研究部・部長 (82610)	
連携研究者	伊藤 恵実 (Ito Emi) (10889455)	国立国際医療研究センター・研究所 臓器障害研究部・研究員 (82610)	
連携研究者	今澤 俊之 (Imasawa Toshiyuki) (80348276)	国立病院機構千葉東病院・腎臓内科、腎センター・統括診療部長、腎センター長 (82506)	
連携研究者	平野 大志 (Hirano Daishi) (90424663)	東京慈恵会医科大学・医学部 小児科学講座・講師 (32651)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------