

令和 3 年 6 月 23 日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17703

研究課題名（和文）糖尿病性腎症の予後予測因子としての血清Angpt12測定に関する検討

研究課題名（英文）Examination on serum Angpt12 measurement as a prognostic factor of diabetic nephropathy

研究代表者

高橋 和也 (TAKAHASHI, Kazuya)

山梨大学・大学院総合研究部・助教

研究者番号：00646135

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,900,000円

研究成果の概要（和文）：血管内皮細胞に発現している管新生制御因子であるアンギオポエチン様因子2（Angiopoietin-like protein2：Angpt12）は、高インスリン血症下のマクロファージにおいて産生が亢進し、Angpt12は糸球体上皮細胞において障害を惹起する可能性が示唆されるデータが得られている。また、血清Angpt12の上昇が糖尿病性腎症予後予測マーカーとなり得ることを示唆する結果が得られている。現在、病体生理学的な機序の解明と症例集積と検討を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本邦において、糖尿病性腎症は透析導入原疾患の第一位であり、糖尿病性腎症の早期診断と予後予測において尿中アルブミンの測定が広く行われている。近年の高齢化に伴い、アルブミン尿が軽微にも関わらずeGFRが低下している糖尿病患者の割合が増加しているが、その腎予後、生命予後は必ずしも良好ではない。糖尿病性腎症予後予測マーカーとしての血清Angpt12の有用性の確立、糖尿病性腎症進展の過程におけるAngpt12の病態生理学的な作用機序を明らかにすることは、糖尿病性腎症の早期発見と進展抑制治療の一助となることが期待できる。

研究成果の概要（英文）：Angiopoietin-like protein2 (Angpt12), a ductogenesis regulator expressed in vascular endothelial cells, is upregulated in macrophages under hyperinsulinemia, and Angpt12 is found in glomerular epithelial cells. Data have been obtained that suggest that it may cause disability. In addition, results suggest that an increase in serum Angpt12 can be a predictor of the prognosis of diabetic nephropathy. Currently, pathophysiology is elucidating the mechanism and collecting and examining cases.

研究分野：腎臓内科

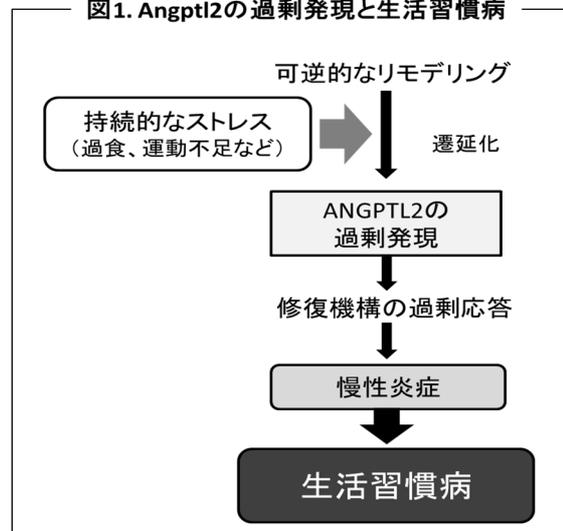
キーワード：糖尿病性腎症 Angpt12

1. 研究開始当初の背景

糖尿病性腎症は透析導入原疾患の第一位であり、患者の QOL 改善、増大する医療費の抑制の点からも、糖尿病性腎症の進展を抑制し透析導入患者を減らすことは急務の課題である。糖尿病性腎症の早期診断と予後予測において尿中アルブミンの測定が広く行われているが、高齢化に伴いアルブミン尿が軽微な慢性腎臓病糖尿病患者の割合が増加している。アルブミン尿、eGFR 低値はともに末期腎不全、心血管障害の発症、総死亡の独立したリスクであり、アルブミン尿が陰性であっても eGFR が低下した糖尿病患者の腎予後、生命予後は必ずしも良好とはいえない。糖尿病性腎症における、新規バイオマーカーの確立は急務である。

血管新生制御因子であるアンギオポエチン様因子 2 (Angiopoietin-like protein2 : Angptl2) は血管内皮細胞だけでなく、脂肪細胞やマクロファージにも発現が確認されている。細胞接着分子である 5 1 インテグリンを介して NF- B 経路活性化することで、組織障害の修復やリモデリングを促進する。過食、運動不足などの持続的なストレスにより Angptl2 は過剰発現を来し、修復機構の過剰応答に伴う慢性炎症が惹起され、糖尿病、動脈硬化症などの生活習慣病発症の原因となると考えられている(図 1)。ヒトにおける観察研究では、糖尿病患者では健常者と比べ血清 Angptl2 濃度が上昇していることが報告されている。従来、糖尿病性腎症は非炎症性の糸球体障害と考えられてきたが、近年、糖尿病性腎症の発症と進展には、慢性炎症が関与していることが明らかにされてきている。Angptl2 は糖尿病性腎症においても、その発症および進展に重要な関連を有していることが予想されている。

図1. Angptl2の過剰発現と生活習慣病



2. 研究の目的

本研究の目的は、糖尿病性腎症予後予測マーカーとしての血清 Angptl2 の有用性、糖尿病性腎症進展の過程における Angptl2 の病態生理学的な作用を明らかにすることである。

3. 研究の方法

本研究では、糖尿病患者の血清 Angptl2 測定と臨床パラメータを抽出し、統計学的に解析を行い糖尿病性腎症予後予測マーカーとしての血清 Angptl2 の有用性を明らかにする。

後ろ向きコホート研究を開始するに当たり、当研究施設に血清を保管してある糖尿病患者のうち、腎機能の推移を追跡可能な症例の抽出を行う。統計解析後、必要に応じて対象症例数を適宜増やす。ヒト Angptl2 ELISA キット (IBL) を用いて血清の Angptl2 濃度の測定を行い、観察開始時の主要臨床パラメータとラボデータ (尿アルブミン/尿 Cr 比、ヘモグロビン、血清アルブミン、CRP、eGFR) 観察期間中の腎機能 (アルブミン尿、eGFR) を収集す

る。また、対照群を非糖尿病患者とし、同様に血清 Angpt12 の測定を行う。

収集したデータを用いて、糖尿病性腎症における血清 Angpt12 が腎症進行の予後予測因子となり得るか検討を行う。血清 Angpt12 濃度の中央値で 2 群に分類し、高値群と低値群での腎死率、総死亡率についてカプランマイヤー曲線を算出し評価を行う。次に、糖尿病患者を正常アルブミン尿、微量アルブミン尿、顕性蛋白尿の 3 つのステージに分類し、それぞれの腎症ステージごとに血清 Angpt12 高値群、低値群に分け、COX 多変量解析を用いて、追跡期間中の腎症ステージへの進展についてハザード比を算出する。さらに、血清 Angpt12 の糖尿病性腎症の予後予測マーカーとしての潜在的価値を評価するため、腎症進展について ROC 曲線に基づく AUC を算出し、既存のバイオマーカーであるアルブミン尿、eGFR の同 AUC との比較を行う。

さらに、in vitro の実験系を用いて、糖尿病性腎症進展の過程における Angpt12 の病態生理学的な作用を明らかにする。

(1) 糸球体上皮細胞 (podocyte) に対する Angpt12 の作用の解明

脂肪細胞等から過剰に分泌された血中 Angpt12 が糸球体上皮細胞障害を惹起していることを確認するために、培養 mouse podocyte を用いて、これに recombinant Angpt12 を添加することにより惹起される integrin $\alpha 5$ などを介した ILK、PI3K などの細胞内シグナルの変化を確認し、さらに様々な糸球体上皮細胞障害の過程への Angpt12 の関わりを検討し、アルブミン尿の病態と Angpt12 の関わりを明らかにする。

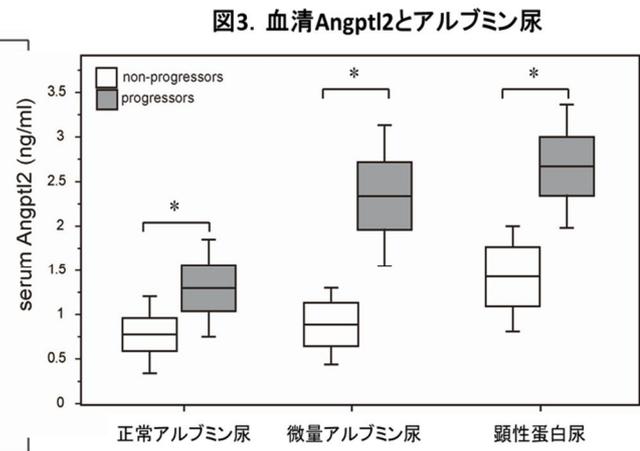
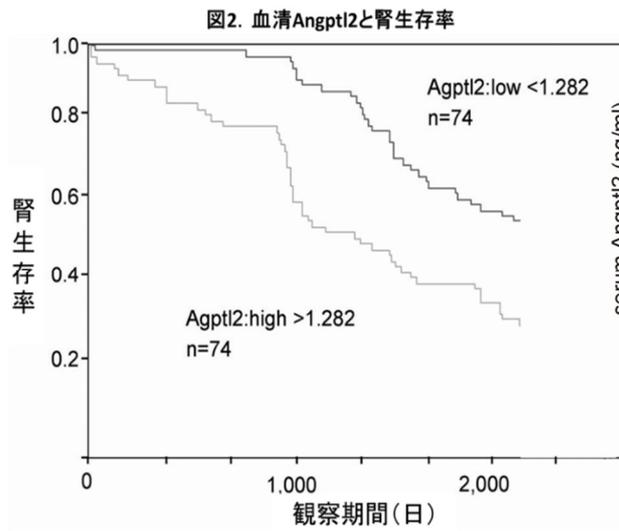
(2) マクロファージにおける Angpt12 の産生亢進と腎機能障害進展との関連を検討

末期腎不全への進展における、腎局所におけるマクロファージからの Angpt12 過剰産生を明らかにして、腎間質の線維化や尿細管障害の進展に対するマクロファージ及び Angpt12 の病態生理学的な関わりを検討する。マウスの骨髄を回収し 1 次培養を行い、M-CSF の添加により分化後、インスリン刺激を行い、高インスリン血症の病態下でのマクロファージにおける Angpt12 の mRNA、蛋白の発現の変化を、リアルタイム PCR 法および western blotting 法によって検討する。また、高インスリン血症下でのマクロファージにおける Angpt12 の過剰発現を確認出来た後に、野生型マウスに片側尿管結紮 (UUO) を行い腎間質障害モデルを作成し、腎間質線維化や尿細管障害の進展に対する Angpt12 の関与を明らかにする。

4. 研究成果

2005 年から山梨大学医学部附属病院、関連施設を受診した糖尿病患者のうち、腎機能の追跡が可能な患者を抽出し、血清 Angpt12 を測定した。血清 Angpt12 濃度の値により、患者を 2 群に分けて解析した結果、Angpt12 濃度が高い群では腎生存率が低い結果が得られた (図 2)。また、アルブミン尿の程度によって 3 群に分類したところ、いずれにおいても腎症が悪化した患者の血清 Angpt12 は有意に高値であった (図 3)。この結果は、Angpt12 が糖尿病性腎症の進展と深く関わりがあることを示唆するものである。今後、検討症例数を増やすことで、Angpt12 がアルブミン尿、eGFR とは独立した腎症の早期発見、予後予測マーカーとしての有用性が明らかにされることが期待できる。

in vitro の実験系については、現在検討を進めている。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------