

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591322

研究課題名(和文) 糖尿病性腎症の発症・進展における多機能性生理活性ペプチドサルューシン の役割

研究課題名(英文) The pathogenetic role of Salusin-beta in diabetic nephropathy

研究代表者

守屋 達美 (MORIYA, TATSUMI)

北里大学・医学部・教授

研究者番号：50191052

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：サルューシン-β (S)が糖尿病性腎症の新たな特異的マーカーになりうるかどうか正常対照(C)群28例、1型糖尿病(T1)10例、2型糖尿病(T2)66例を対象に検討した。1)血漿S濃度は、C 4.11 ± 1.68 nmol/l、T1 4.71 ± 2.04 、T2 4.40 ± 1.87 と3群に差はなかった。2)正常アルブミン尿期(58例)と微量アルブミン尿期(18例)との差はなかった。3)GFRと血漿S濃度との間には相関を認めなかった。4)糸球体過剰濾過例と正常濾過例との差もなかった。断面的検討では、血漿S濃度は腎機能および尿中アルブミン排泄と関連は認めなかったが、縦断的な検討の必要がある。

研究成果の概要(英文)：We evaluated the Salusin-beta in 28 normal controls (C), 10 type 1 diabetic patients (T1) and 66 type 2 diabetic patients (T2) to elucidate its pathogenetic roles on diabetic nephropathy. Plasma concentration of Salusin-beta did not differ among 3 groups (C; 4.11 ± 1.68 nmol/l, T1; 4.71 ± 2.04 , T2; 4.40 ± 1.87). In all diabetic subjects, there was no significant difference of Salusin-beta between 58 normoalbuminuria (4.44 ± 1.90 nmol/l) and microalbuminuria (4.42 ± 1.89). Salusin-beta did not correlate with GFR measured using iohexol injection. There was no significant difference of Salusin-beta between hyperfiltration or normofiltration. In the cross-sectional study, there was no relationships between Salusin-beta and renal functional changes, i.e. albuminuria or GFR in Japanese diabetic patients. Further longitudinal study is warranted to elucidate its pathogenetic roles on diabetic nephropathy.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：糖尿病性腎症

1. 研究開始当初の背景

(1) **研究の学術的背景**: 糖尿病の慢性合併症の代表である糖尿病性腎症(以下腎症)は、未だに予後不良であり、それによる新規透析療法導入患者数は1998年の時点で、慢性腎炎を原疾患とする透析導入患者数を凌駕した。これは、医療費の膨大化に直結する由々しき問題であることは周知の事実である。腎症は臨床的に明らかになる(試験紙法にて顕性蛋白尿が出現する)と大多数の例が非可逆的に進行し、慢性腎不全に至る。したがって、腎症は顕性蛋白尿が出現する以前の早期発見・診断が極めて重要であるが、そのための臨床的指標は十分に確立されているとはいえない。すなわち、腎症の早期診断、経過観察、そして組織所見を反映するマーカーのいずれも確立されているとはいえない。その大きな理由は、腎症早期の腎組織変化自体の検討が不十分であること、腎組織と尿所見や腎機能との関連が充分検討されていないことである。現在使用されている腎症の早期診断の臨床的指標は、尿中アルブミン排泄の増加であるが、尿中アルブミンはその値の変動が大きく1回のみでの測定では判断できないこと、腎症以外の腎病変でも増加すること、その多寡が必ずしも腎組織病変の重症度と関連しないことなどの問題点が指摘されている。腎症の典型的な組織所見は糸球体基底膜の肥厚およびメサンギウム基質の増加であるが、実は臨床的には腎症が存在しないと判断される正常アルブミン尿期に上記の変化は既に存在することが欧米人1型糖尿病(Mauer SM, et al.: J Clin Invest 74: 1143-1155, 1984)において示されているし、研究代表者らも日本人2型糖尿病(Moriya T, et al.: Nephron 91: 292-299, 2002)において同様の現象を指摘してきた。一方、アルブミンは腎病変だけではなく、全身の血管病変、内皮細胞障害を反映するともいわれ、動脈硬化症との関連も指摘されている。

連携研究者の七里らはバイオインフォマティクス解析によって新規生理活性因子を探索する新たな手法を考案し、ミレニアムゲノムプロジェクトによって完成された全長濃縮cDNAライブラリーを詳細に検索する中

から、2003年には生理活性因子サリューション-および-の存在を予測した(Shichiri M, et al.: Nature Med 9:1166-1172, 2003)。近年になって両ペプチドは予測された通りの分子型でヒト血中、尿中に存在することが確認され(Sato K, et al.: Peptides 27:2561-2566, 2006, Sato K, et al.: Regul Pep 158:63-67, 2009)、バイオインフォマティクスの手法を用いて新規生理活性因子を同定する新たな手法は、従来の古典的な手法やオーファン受容体を用いる手法によっても発見が困難な特殊な物理化学的性状を示す未知の生理活性因子を見いだす重要な手法であることが明らかになりつつある(Shichiri M, et al.: Nature Med 13:661-662, 2007, Sato K, et al.: Regul Pep 158:63-67, 2009)。

サリューション-は、Acyl-CoA:cholesterol acyltransferase-1 (ACAT-1)阻害作用を介した抗動脈硬化作用を有するが、全く逆に、サリューション-は、強力なACAT-1刺激作用に基づく動脈硬化促進作用を惹起するほか、強力な降圧活性も有するなど、いずれも血管病変発症・進展に関与する重要な内因性因子であることが明らかになりつつある(Watanabe T et al: Circulation 117:638-648, 2008, Watanabe T et al: Hypertens Res 31:463-468, 2008)。サリューション-は神経内分泌系にて産生され(Suzuki N. et al: Hypertens Res 30:1255-1262, 2007)、脳下垂体後葉より血中に分泌されるほかに、血管障害部位に遊走するマクロファージからも大量に産生されるため、大血管病変および細小血管病変が主体となる腎症においても何らかの役割を果たしている可能性が極めて高いと考えられるが、に記したような理由によりこれまでサリューション-の高純度ペプチドを用いた実験は困難であったため、国際的にも研究がほとんど進展しなかった経緯がある。今回、連携研究者を中心にこれらの困難が克服され(Sato K et al.: Regul Pep 158:63-67, 2009)、ようやくヒト血中サリューション-濃度の正確な測定が可能になりつつある。予備検討の結果ではヒト血中には十分な生理活性を示すであろう高濃度のフリー体サリューション-様免疫活性が存在することが明らかとなり、大血管障害およ

び細小血管障害の両方を反映する腎症の病態に重要な役割をはたしている可能性が充分考えられるため、本研究を企画することになった。

(2) 研究期間内に何をどこまで明らかにしようとするのか: サリューシン- の糖尿病性合併症、特に腎症の血管病変における病態生理学的意義を明らかにし、腎症の新たな特異的マーカーになりうるかどうかを検討する。また、腎機能との関連、特に腎症の特徴的所見である糸球体過剰濾過との関連を明らかにする。更に、腎症を代表とする細小血管症のみならず、大血管症（動脈硬化症）との関連、血圧などとの関連を明らかにする。最終的に治療（降圧治療、レニン-アンジオテンシン抑制薬など）による反応性を検証する。

(3) 本研究の学術的な特色・独創的な点及び予想される結果と意義: サリューシン- は、ポリプロピレンチューブやポリスチレンチューブなどに著明な吸着性を有するという特異な物理化学的特徴を有しているため、実験上の取り扱いが極めて困難で、その正確な活性の評価やアッセイ系の確立が困難であった。しかし、最近、連携研究者の七里らは、こうした本ペプチドの性状を回避する方法を見出し (Shichiri M, et al.: Nature Med 13:661-662, 2007, Sato K et al.: Regul Pep 158:63-67, 2009)、高感度サンドイッチエンザイムイムノアッセイ (ELISA) 系を確立することに成功し、ヒト血中濃度の正確な測定が可能となった。すでに研究代表者は連携研究者のこの成果をもとに共同研究を始めており、ヒトの様々な生理的変動における解析を共同で行い、正常値の確定、アッセイにおけるアッセイ間・アッセイ内変動の解析など、測定における基本的な解析をすすめてつある。一方、サリューシン- の生理的意義、糖尿病患者における病的意義は全く知られていない。腎症を始めとする慢性合併症における役割も未知のままである。しかし、上述のように血管系細胞に対する増殖促進作用 (Shichiri M, et al.: Nature Med 9:1166-1172,

2003)や、遊走したマクロファージからのオートクリン・パラクリン産生に引き続き ACAT-1 刺激作用を介した泡沫化促進作用 (Watanabe T et al: Circulation 117:638-648, 2008)などからも、糖尿病性腎症の発症・進展に深く関与している可能性が充分考えられる。この多機能性生理活性ペプチドサリューシン- の糖尿病合併症における役割が明らかになれば、まず腎症のなんらかの病態を反映する早期診断マーカー、あるいは腎症の進展予測のマーカーになり得る可能性があるうえ、進展予防薬開発の為の創薬シーズになる可能性も充分考えられる。

2. 研究の目的

糖尿病性腎症は新規透析導入の原疾患の第1位であるが、有用な診断、予後判定のマーカーは存在しない。本研究は、大および細小血管病変である糖尿病性腎症の正常アルブミン尿期～顕性蛋白尿期に正確な腎機能検査と血漿サリューシン- 濃度の測定を行い、サリューシン- の糖尿病性腎症発症・進展における病態生理学的役割を解明する。特に発症進展を予測する早期診断マーカーとなりうるか検討することを目的とする。

3. 研究の方法

研究は、3年計画で行われる。1年目は対象のリクルートとベースラインデータの獲得、2年目は引き続き対象のリクルート、ベースラインデータの獲得と1年目の対象となった者のフォローアップデータの獲得を行い、3年目にはすべてのフォローアップデータの獲得を行う。

【対象】65歳未満の正常アルブミン尿期、微量アルブミン尿期、顕性蛋白尿期の2型糖尿病患者200例を対象とする。性別や糖尿病網膜症の合併は問わないが、腎症以外の腎疾患が疑われる患者および腎機能低下が存在する患者は除外する。具体的に以下は除外する。(1) 高度の血尿を呈する例、(2) 尿路感染症が明らかな例、(3) 血清クレアチニンが2.0mg/dl以上の例、(4) 血圧コントロール不能例、(5) 明らかな尿細管障害合併例、その他主治医が適切でない判断した例。

【腎機能検査(アイオヘキソール静注によるGFR測定の実施)】

(1) 該当患者は基本的に空腹で外来を受診する。

(2) アイオヘキソール(オムニパーク)5mlを静脈注射する。

(3) 対側の肘静脈からアイオヘキソール静注2、3、4時間後に採血する。

(4) 血清アイオヘキソールをHPLC法で測定し、得られた濃度の減衰からGFRを算出する。

非イオン性水溶性造影剤であるアイオヘキソールを静脈注射し、その血中濃度の減衰から糸球体濾過値(GFR)を算出する。当科におけるアイオヘキソールGFRは腎機能検査のgolden standardであるイヌリンクリアランスと極めて良好な相関を示すことを研究代表者らは報告している(Jin Y., Moriya T. et al.: Diabetes Res Clin Pract 71: 264-271, 2006)。

【血液・尿検査】

(1) アイオヘキソール静注直前に採血し、血漿中サリューシン濃度の測定を行う。他に血糖コントロール状態(血糖値、ヘモグロビンA1c)、脂質(総コレステロール、中性脂肪、HDL、LDL-コレステロール)、血清シスタチンC、CRPを測定する。

(2) 4時間尿からアルブミン、トランスフェリン、IV型コラーゲン、免疫グロブリンG、NAG、₂ミクログロブリンを測定する。

(3) 動脈硬化症との関連を見るために、心電図、脈派伝導速度、頸動脈超音波を行う。

(4) 腎サイズ計測：腎症の臨床的特徴の一つに腎サイズの増大(腎肥大)がある。腹部超音波およびヘリカルCT scanにより腎サイズの計測を行う。

【サリューシン[®]のサンドイッチELISAによる測定方法】

従来、サリューシン[®]のN末端アミノ酸配列(Ala-Ile-Phe-Ile-Phe-Ile)は抗体作製に際しての抗原性はきわめて低く、高感度抗体の作成は困難であったが、連携研究者は独自に考案した「網羅的抗表面抗原抗体作製法

(特願2008-324257)」を用いることによって特異的に認識する鶏卵由来抗体を作成することに成功した。作成した鶏卵からIgYを抽出した後、抗体価の高いものを固相抗体とし、さらにサリューシン[®]のC末端を特異的に認識する家兎由来ポリクローナル抗体を検出用抗体とし、ペルオキシダーゼ標識された抗家兎IgG抗体を用いて発色基質と反応させたのち、吸光度を測定するサンドイッチELISAを確立した。血漿500µlをSepPack C18カラムに吸着させ、アセトニトリル抽出後、上記のサンドイッチELISAによってその濃度を測定する。

【統計解析】

臨床検査データとサリューシン[®]の結果はregression analysisにより検討する。また、正常アルブミン尿群と微量アルブミン尿群、顕性蛋白尿群の3群間比較は、t-test、non-parametric test、ANOVAにより行う。P値0.05未満を有意とする。

平成24年度以降

上記の方法を継続し、解析を行う。1年毎の腎機能検査と共にサリューシン[®]の変化、アルブミン尿の経過の変化を検討する。

【介入試験】

糖尿病患者には血圧コントロールと腎症進行抑制の目的でレニン・アンジオテンシン系の抑制薬などが用いられるが、治療的介入によるサリューシン[®]の変化を解析することで、予後判定のマーカーとなりうるかどうかの検討も行う。

【サリューシン[®]の分子型の解析】

血漿サリューシン[®]の異常値が検出された糖尿病症例において、血中サリューシン[®]の分子存在様式に変化が起こっていないかどうかを検討するため、ACTA Explorerによるゲル濾過クロマトグラフィー解析、ならびに液体高速クロマトグラフィー解析を行って、各分画中のサリューシン[®]様免疫活性を測定する。

4 . 研究成果

正常対照群 28 例 (C 群 : 男性 12 例、56±8 歳、iohexol-GFR 100.3±21.5 ml/min/1.73m²)、1 型糖尿病 10 例 (T1 群 : 男性 5 例、39±11 歳、iohexol-GFR 140.2±34.6 ml/min/1.73m²)、2 型糖尿病 66 例 (T2 群 : 男性 44 例、56±12 歳、iohexol-GFR 108.6±27.8 ml/min/1.73m²) に腎機能検査とサリューシン他の測定を行った。1 型糖尿病の年齢は有意に若く (ANOVA p<0.01)、腎機能は有意に高かった (ANOVA p<0.001)。

1) 血漿サリューシン 濃度は、C 群 4.11±1.68 nmol/l、T1 群 4.71±2.04、T2 群 4.40±1.87 と 3 群に差を認めなかった。糖尿病群全体でも 4.44±1.89 nmol/l であり、C 群と差を認めなかった。2) 糖尿病群全体では、正常アルブミン尿期 (58 例) は 4.44±1.90 nmol/l、微量アルブミン尿期 (18 例) は 4.42±1.89 と差を認めなかった。3) iohexol-GFR と血漿サリューシン 濃度との間には相関を認めなかった。4) GFR 130 ml/min/1.73m² 以上を糸球体過剰濾過例 (16 例) とし、サリューシン 濃度を正常濾過例と比較したが、両者の差はみられなかった。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

下記はすべて査読のある雑誌に掲載されたものである。

- 1) Yokoyama H, Sone H, Honjo J, Okizaki S, Yamada D, Shudo R, Shimizu H, Moriya T, Haneda A. : Relationship between a Low Ankle Brachial Index and All-Cause Death and Cardiovascular Events in Subjects with and without Diabetes. *J Atheroscler Thromb*. 2014 Feb 4. [Epub ahead of print]
- 2) Fujimoto K, Hayashi A, Kamata Y, Ogawa A, Watanabe T, Ichikawa R, Iso Y, Koba S, Kobayashi Y, Koyama T, Shichiri M.: Circulating levels of human salusin-β, a potent hemodynamic and atherogenesis regulator. *PLoS One*. 2013 Oct 3;8(10):e76714. doi: 10.1371/journal.pone.0076714. eCollection 2013. Erratum in: *PLoS One*. 2013;8(11). doi:

10.1371/annotation/f628c1d6-4bee-4725-b434-690f169a7849.

- 3) Takada T, Kodera Y, Matsubara M, Kawashima Y, Maeda T, Fujita Y, Shichiri M.: Serum monomeric α2-macroglobulin as a clinical biomarker in diabetes. *Atherosclerosis*. 2013 May;228(1):270-6. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2013.02.035. Epub 2013 Mar 13.
- 4) Wada T, Haneda M, Furuichi K, Babazono T, Yokoyama H, Iseki K, Araki SI, Ninomiya T, Hara S, Suzuki Y, Iwano M, Kusano E, Moriya T, Satoh H, Nakamura H, Shimizu M, Toyama T, Hara A, Makino H; The Research Group of Diabetic Nephropathy, Ministry of Health, Labour, and Welfare of Japan. : Clinical impact of albuminuria and glomerular filtration rate on renal and cardiovascular events, and all-cause mortality in Japanese patients with type 2 diabetes. *Clin Exp Nephrol*. 2013 Oct 17. Doi:10.1007/s10157-013-0879-4. [Epub ahead of print]
- 5) Yokoyama H, Araki S, Honjo J, Okizaki S, Yamada D, Shudo R, Shimizu H, Sone H, Moriya T, Haneda M.: Association between remission of macroalbuminuria and preservation of renal function in patients with type 2 diabetes with overt proteinuria. *Diabetes Care*. 2013 Oct;36(10):3227-33. doi: 10.2337/dc13-0281. Epub 2013 Jun 18.
- 6) Moriya T, Tanaka S, Kawasaki R, Ohashi Y, Akanuma Y, Yamada N, Sone H, Yamashita H, Katayama S; Japan Diabetes Complications Study Group.: Diabetic retinopathy and microalbuminuria can predict macroalbuminuria and renal function decline in Japanese type 2 diabetic patients: Japan Diabetes Complications Study. *Diabetes Care*. 2013 Sep;36(9):2803-9. doi: 10.2337/dc12-2327. Epub 2013 Apr 25.
- 7) Tatsumi Moriya, Akiko Tsuchiya, Shin-ichiro Okizaki, Akinori Hayashi, Keiji Tanaka and Masayoshi Shichiri: Glomerular hyperfiltration and increased glomerular filtration surface are associated with renal function decline in normo- and microalbuminuric type 2 diabetes. *Kidney*

International (2012) 81, 486–493;
doi:10.1038/ki.2011.404;

〔学会発表〕(計 1 件)

1) Moriya T., Suzuki Y., Inomata S., Iwano M., Haneda M.: Renal histological heterogeneity and functional progress in normo- and microalbuminuric Japanese type 2 diabetic patients. 73rd Scientific Sessions (2013), American Diabetes Association. 2013 年 6 月 22 ~24 日、シカゴ、アメリカ

6 . 研究組織

(1)研究代表者

守屋 達美 (MORIYA, Tatsumi)

北里大学・医学部・教授

研究者番号 : 50191052

(2)研究分担者

高田 哲秀 (TAKADA, Tesshu)

北里大学・医学部・助教

研究者番号 : 60276144

(3)連携研究者

七里 眞義 (SHICHIRI, Masayoshi)

北里大学・医療系研究科・教授

研究者番号 : 10206097