

機関番号：32202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790535

研究課題名(和文) 糖尿病性腎症の早期診断・治療に向けたバイオマーカーの開発

研究課題名(英文) Development of novel biomarkers for early detection of diabetic nephropathy

研究代表者

細畑 圭子 (Hosohata, Keiko)

自治医科大学・医学部・助教

研究者番号：10547962

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円、(間接経費) 810,000円

研究成果の概要(和文)：自然発症2型糖尿病モデルであるOtsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF)ラットを用い、糖尿病性腎症の早期発見・重症度判定のためのバイオマーカーを探索した。尿中kidney injury molecule-1 (Kim-1)が既存マーカーであるアルブミン尿やN-acetyl-beta-D-glucosaminidase (NAG)よりも早期に組織学的な腎症を反映することを明らかにした。さらに2型糖尿病患者の随時尿を用い、尿中KIM-1が糖尿病性腎症患者において増加することを明らかにし、尿中KIM-1の糖尿病性腎症バイオマーカーとしての有用性を示した。

研究成果の概要(英文)：Using spontaneous type 2 diabetic Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats, we examined temporal pattern of novel tubular markers in the urine for early diagnosis and evaluation of the severity of diabetic nephropathy. Urinary kidney injury molecule-1 (Kim-1) showed significant elevation before increase in albuminuria and N-acetyl-beta-D-glucosaminidase (NAG) in the OLETF rats with histopathologically proven renal tubular injury, compared with non-diabetic controls, Long-Evans Tokushima Otsuka (LETO) rats. In addition, urinary human KIM-1 showed elevation in type 2 diabetic patients with nephropathy compared with nondiabetic patients. Thus, urinary Kim-1 is a useful biomarker for the detection of early stage of type 2 diabetic nephropathy.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・応用薬理学

キーワード：糖尿病性腎症 バイオマーカー Kim-1 OLETFラット 腎臓学

## 1. 研究開始当初の背景

糖尿病は世界中で急増しており、合併症も増加の一途を辿っている。その中でも糖尿病性腎症は全身状態を悪化させるのみならず、進行すると血液透析が必要となり、患者の生活の質を著しく低下させる。また、糖尿病性腎症は透析導入の原疾患の第1位であり(2010年 日本透析医学会)透析医療の国民負担も大きく膨らんでいることから、経済的にも大きな問題となっている。

糖尿病性腎症の臨床診断には尿中アルブミン排泄量が用いられるが、これらが陰性的の場合でもすでに腎症を発症していることが少なくない。そのため、腎症を早期に発見するための鋭敏な診断マーカーの開発が望まれている。申請者らは急性腎障害を早期に検出するための新規バイオマーカーとして尿中 vanin-1 を同定した。一方、現在研究が進んでいる尿中バイオマーカー候補分子の中で kidney injury molecule-1 (Kim-1; 別名 T cell immunoglobulin and mucin 1, TIM-1)、neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL)、L-type fatty acid-binding protein (L-FABP) は近位尿細管のダメージに対して感度と特異度が高いことから実用化が期待されている。しかし、いずれのマーカーも長所と短所を兼ね備えており、現時点では糖尿病性腎症の早期鑑別診断にどのマーカーを測定するのが最も有用であるかは明確でない。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、糖尿病性腎症の早期診断に有用である尿中バイオマーカーを明らかにすることである。

## 3. 研究の方法

(1) 自然発症 2 型糖尿病モデルとして汎用されている OLETF (Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty) ラットを用いて、糖尿病性腎症の進展を組織学的に評価するとともに、既存マーカーであるアルブミン尿および N-acetyl-D-glucosaminidase (NAG)、新規尿中バイオマーカーである vanin-1、Kim-1、NGAL の濃度推移を比較した。生後 4 週齢の雄性 OLETF ラットおよびそのコントロールである雄性 LETO (Long-Evans Tokushima Otsuka) ラットを水と固形試料が自由に摂取できる条件下で 60 週齢まで飼育し、4 週間毎に採尿および採血を行った。採尿のために代謝ケージ飼育下で 24 時間蓄尿を行った。尿サンプルは採尿後ただちに遠心分離し上清を分注したのち Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) 測定に供するまで -80 °C で保存した。各種バイオマーカー濃度は尿量で補正した。病理学的変化(腎糸球体基底膜の肥厚、メサンギウム領域の拡大、尿細管の変性、刷子縁膜の脱落)を観察するため、14 週齢、30

週齢、60 週齢の腎組織を用いて PAS 染色を行った。

(2) 新規尿中バイオマーカーの臨床的有用性を検討した。金沢大学附属病院で診療を受ける成人患者を対象として、金沢大学医学倫理委員会承認の得られた説明同意文書を用いて十分な説明を行い、被験者の自由意思による同意を文書で取得した。

糖尿病性腎症の各病期(腎症前期、早期腎症期、顕性腎症期)の患者および対照群として非糖尿病患者より得た随時尿を用いて、各種バイオマーカー濃度を ELISA により定量した。

## 4. 研究成果

(1) 糖尿病性腎症進展過程において、尿中 Kim-1 は 14 週齢から有意に高値を示した。これに対して、アルブミン尿は Kim-1 よりも遅い 18 週齢から有意な増加を認めた。14 週齢の OLETF ラットでは、組織学的な尿細管の変性や委縮が認められた。一方、尿中 vanin-1 はアルブミン尿検出よりも早期に上昇したものの、一過性であった。NAG および NGAL はアルブミン尿が認められた段階でも OLETF と LETO の間に有意差は認められなかった。

終末腎の様相を呈する組織像がみられる段階(60 週齢)では、顕著なアルブミン尿とともに尿中 Kim-1 と NAG は有意に高値を示した。

これにより、尿中 Kim-1 は糖尿病性腎症の進展過程の早期に検出され、かつ進展に伴い高値を維持したことから、尿中 Kim-1 のバイオマーカーとしての有用性が示唆された。

(2) 2 型糖尿病患者における尿中バイオマーカーの臨床評価を行った。解析を行った試料等提供者の内訳は、次の通りであった。

- ・非糖尿病患者：9 例
- ・正常アルブミン尿 (30 mg/g creatinine 未満；腎症前期) を呈する 2 型糖尿病患者：12 例
- ・微量 (30-229 mg/g creatinine；早期腎症期) または顕性 (300 mg/g creatinine 以上；顕性腎症期) アルブミン尿を呈する 2 型糖尿病患者：11 例

尿中 vanin-1 は顕性腎症期の糖尿病患者 3 例においてのみ高値を示したが、腎症前期の糖尿病患者では検出限界以下であった。尿中 KIM-1 は糖尿病患者において非糖尿病患者よりも高値傾向であったが、早期腎症期と顕性腎症期とは同程度であった。尿中 NGAL は 3 群間で有意な差は認められなかった。尿中 NAG は非糖尿病患者に比べ、顕性腎症期の糖尿病患者において有意に高値を示したが、腎症前期の糖尿病患者と非糖尿病患者との間では有意差はなかった。これにより、尿中

KIM-1 は糖尿病性腎症におけるバイオマーカーになり得ることが明らかになった。しかしながら、腎症の重症度を反映するマーカーではないと考えられた。

以上、基礎研究及び臨床研究の結果から、尿中KIM-1は糖尿病性腎症の診断に有用であることが示された (*Diab Vasc Dis Res*.11:243-250, 2014.)。

#### 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7件)

Washino S, Ando H, Ushijima K, Hosohata K, Kumazaki M, Mato N, Sugiyama Y, Kobayashi Y, Fujimura A, and Morita T. Temsirolimus induces surfactant lipid accumulation and lung inflammation in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. in press. 査読有

Hosohata K, Ando H, Takeshita Y, Misu H, Takamura T, Kaneko S, Fujimura A. Urinary Kim-1 is a sensitive biomarker for the early stage of diabetic nephropathy in Otsuka Long Evans Tokushima Fatty rats. *Diab Vasc Dis Res*.11:243-250, 2014. 査読有

Hosohata K, Uesugi M, Hashi S, Hosokawa M, Inui K, Matsubara K, Ogawa K, Fujimoto Y, Kaido T, Uemoto S and Masuda S. Association between CYP3A5 genotypes in graft liver and increase in tacrolimus biotransformation by steroid treatment in living-donor liver transplant patients. *Drug Metab Pharmacokinet*. **29**: 83-89, 2014. 査読有

Hosohata K, Ando H, Fujimura A. Early detection of renal injury using urinary vanin-1 in rats with experimental colitis. *J Appl Toxicol*. **34**: 184-190, 2014. 査読有

Ando H, Ushijima K, Hosohata K, Saito T, Fujimura A. Relationship between the receptor occupancy profile and pleiotropic effects of angiotensin II receptor blockers. *Br J Clin Pharmacol*. **75**: 415-422, 2013. 査読有

Ando H, Otoda T, Ookami H, Nagai Y, Inano A, Takamura T, Ushijima K, Hosohata K, Matsushita E, Saito T, Kaneko S, Fujimura A. Dosing time-dependent effect of raloxifene on plasma plasminogen

activator inhibitor-1 concentrations in post-menopausal women with osteoporosis. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. **40**: 227-232, 2013. 査読有

Hosohata K, Ando H, Fujimura A. Urinary vanin-1 as a novel biomarker for early detection of drug-induced acute kidney injury. *J Pharmacol Exp Ther*. **341**:656-662, 2012. 査読有

[学会発表](計3件)

Hosohata K, Ando H, Yoshioka D, and Fujimura A. Elevations of urinary vanin-1 and neutrophil gelatinase-associated lipocalin precede the appearance of albuminuria in spontaneously hypertensive rats. The 5th International Conference on Fixed Combination in the Treatment of Hypertension, Dyslipidemia and Diabetes Mellitus, Bangkok, Thailand, November 21-24, 2013.

Hosohata K, Ando H, and Fujimura A. Urinary vanin-1 as a kidney-specific biomarker under multiorgan damages. 日本薬物動態学会第27回年会, 千葉, 2012年11月20日~22日.

細畑圭子、安藤 仁、藤村昭夫. 薬物性腎障害を早期に検出するためのバイオマーカー-vanin-1の同定. 第39回日本トキシコロジー学会学術年会, 仙台, 2012年7月17日~19日.

[図書](計1件)

細畑圭子、藤村昭夫. 薬物による治療. がん患者さんの口腔ケアをはじめましょう. 学建書院, 5-8, 2013.

[産業財産権]

出願状況(計0件)

なし

取得状況(計0件)

なし

[その他]

ホームページ等

<http://jglobal.jst.go.jp/search>.

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

細畑 圭子 (HOSOHATA KEIKO)

自治医科大学・医学部・助教

研究者番号: 10547962

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者  
なし