

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 7 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591131

研究課題名（和文）新規糖尿病性腎症治療標的分子としての uPAR の基礎的・臨床的意義の解明

研究課題名（英文）Research in a experimental and clinical significance of uPAR as a new therapeutic target molecule for diabetic nephropathy

研究代表者

荒木 信一（ARAKI SHIN-ICHI）

滋賀医科大学・医学部・助教

研究者番号：80378455

研究成果の概要（和文）：糖尿病性腎症の新たな治療標的分子としてウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベーター受容体（uPAR）に着目し研究を行った。①12 週間 60%高脂肪食負荷 uPAR 遺伝子欠損マウスでは、体重・血中インスリン・レプチン濃度の低下、腎ファイブロネクチン・4 型コラーゲン発現抑制を認めたが、尿中アルブミン排泄量に有意な差を認めなかった。②2 型糖尿病患者 186 名を対象とした観察研究（観察期間：中央値 14 年）において、血中 suPAR 濃度高値群で腎・心血管複合イベントの累積発症率は高率であった。以上の結果より、uPAR は、糖尿病患者の腎機能悪化に関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：We investigated the role of uPAR as a new therapeutic molecule for diabetic nephropathy. The uPAR knockout mice fed 60% high-fat diet for 12 weeks showed the decrease of body weight, serum insulin levels, serum leptin levels, and the expression levels of fibronectin and type IV collagen in the kidney, whereas albuminuria was not different. In the long follow-up observational study (median: 12 years) including 186 patients with type 2 diabetes, the subgroup with higher levels of serum soluble uPAR showed the higher cumulative incidence of renal dysfunction and cardiovascular events. Thus, these results suggest that uPAR associates with renal dysfunction in diabetic patients.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：エネルギー・糖質代謝異常・糖尿病性腎症

1. 研究開始当初の背景

糖尿病性腎症による慢性腎不全のため血液浄化療法を必要とする患者数は、年々増加の一途を辿り、この増加する腎症患者数を抑制することが医療上のみならず社会的・経済的緊急課題である。これまでに申請者は、厳格な血糖・血圧・脂質管理およびレニン・アンジオテンシン系阻害薬を含めた集約的治療が早期腎症の寛解を高率に誘導し(Araki S et al. *Diabetes*, 2005)、心血管イベントの抑制につながることを報告してきた(Araki S et al. *Diabetes*, 2007)。しかしながら、これら治療(特に血糖管理)の目標達成が容易ではなく、集約的治療に抵抗性を示す症例が少なからず存在するため、新規治療標的分子を探索し、新たな治療戦略を構築する必要がある。

申請者は、2型糖尿病モデル動物であるdb/dbマウスとコントロールマウスであるdb/mマウスの腎組織よりmRNAを抽出し、DNAマイクロアレイ法を用いて経時的遺伝子発現プロファイルの作成し、腎症の発症・進展に関与する新たな治療標的分子を探索してきた(Makiishi T, Araki S et al. *J Am Soc Nephrol* 14, 2003 abstract)。そこで、この経時的遺伝子発現プロファイルより、腎症の発症・進展に重要なPKC-ERK経路に関与する可能性のある遺伝子に着目しスクリーニングをおこなった結果、ウロキナーゼ型プラスミノージェンアクチベーター受容体(uPAR)がdb/dbマウスの腎臓において経時的に発現が亢進していることを見出した。uPAR遺伝子プロモーター領域にSP1ならびにAP1モチーフが存在しPKC活性化物質であるホルボールエステル刺激により培養腎尿細管細胞でのuPAR遺伝子発現が亢進することより、uPARを治療標的分子候補として考えるに至った。

2. 研究の目的

糖尿病状態の腎臓で生じるPKC-ERK活性化異常によりuPAR発現亢進が惹起され、マクロファージなどの炎症性細胞の遊走・微小炎症促進、尿細管間質の線維化などを介して腎症の発症・進展に関与しているのみ

ならず、糖尿病状態で細胞表面に発現亢進したuPARより切断・血中放出された可溶性uPAR(suPAR)が、腎障害ならびに心血管障害を促進し心腎連関の一因となっているとの仮説をたてるに至った。

そこで、uPAR遺伝子欠損マウス(同志社女子大薬学部松野浩之教授より供与)を用い、60%高脂肪食を負荷したuPAR遺伝子欠損マウス(肥満2型糖尿病モデル)を作成し、腎症の発症・進展に及ぼすuPARの関与を検討する基礎研究と共に、ヒト臨床研究として血中suPAR濃度が、腎症の発症・進展、腎機能ならびに心血管イベント発症に及ぼす影響を検討し、uPARがこれら臨床アウトカムに対する新たな予知因子としての有用性を探ることで、uPARが腎症新規治療標的である可能性を基礎研究ならびに臨床研究の両面から検証することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 1型糖尿病モデルであるストレプトゾトシン(STZ)誘発糖尿病マウスおよび2型糖尿病モデルであるdb/dbマウスの腎臓におけるuPAR遺伝子発現を検討した。

(2) uPAR遺伝子欠損マウスに60%高脂肪食を12週間負荷することにより肥満関連uPAR遺伝子欠損マウス(肥満2型糖尿病モデル)を作成し、60%高脂肪食負荷コントロールマウスと比較することで、高脂肪食負荷により惹起される体重、全身代謝、尿中アルブミン排泄量に及ぼすuPAR遺伝子欠損の影響を検討した。

(3) 滋賀医科大学で実施している前向き経過観察研究において長期保存されている血清サンプルを用いて可溶性uPAR(suPAR)濃度をELISA法にて測定し、その臨床的意義を検討した。対象は、1997年から1998年に経過観察研究に参加され経年的に経過観察されている正常あるいは微量アルブミン尿期かつeGFR 60mL/min以上の2型糖尿病患者186名である。主要評価項目は、①維持透析療法の導入あるいはCre値2倍化と脳心血管疾患発症からなる腎・心血管複合イベント、②腎症病期の進展とし

た。統計解析として、観察開始時のsuPAR濃度の中央値により対象患者を2群にわけ、1,000人年あたりの各主要評価項目の発症率の算出と、Kaplan-Meier法による累積発症率をログランクテストにより検証をおこなった。また、コックス比例ハザード解析により補正リスクの算出をおこなった。

4. 研究成果

(1) STZ誘発糖尿病マウスの腎皮質でのuPARのmRNA発現は、糖尿病発症2週後より非糖尿病マウスに比べ有意に増加した。また、uPAR mRNA発現量の増加に平行して、C5aR、MCP-1のmRNA発現量ならびにF4/80の増加が認められた。同様に、2型糖尿病モデル動物であるdb/dbマウスの腎皮質においても、時間依存性にuPAR mRNA発現量の増加とマクロファージの腎間質への浸潤・炎症の惹起に参与する分子の発現亢進が認められた。

(2) 12週間60%高脂肪食を負荷したuPAR遺伝子欠損マウスでは、60%高脂肪食負荷ワイルドタイプマウスよりも、体重の増加が有意に抑制され、血中インスリンおよびレプチン濃度の低下が認められた。さらに、高脂肪食負荷により認められる腎でのファイブネクチン・4型コラーゲンのmRNA発現亢進は、uPAR遺伝子欠損マウスでは抑制される傾向であった。しかしながら、腎重量に両群間で差を認められず、高脂肪食負荷による尿中アルブミン排泄量の増加は両群間で統計学的に有意な差を認めなかった。

(3) 前向き経過観察研究： 対象患者の観察開始時背景は、平均年齢60歳、平均糖尿病罹病期間13年、男性53.8%、微量アルブミン尿期21%、平均HbA1c 7.1%(JDS)であった。観察開始時から2011年末までの観察期間(中央値14年)において、腎・心血管複合イベントの発症は48イベント(21/1,000人年)認められた。対象患者を観察開始時のsuPAR濃度の中央値によりを2分割し検討をおこなったところ、腎・心血管複合イベントの1,000人年あたりの発症率は、suPAR濃度低値群 14/1,000人年、suPAR濃

度高値群29/1,000人年であり、suPAR濃度高値群のKaplan-Meier法による累積発症率は低値群に比較し有意に高率(P=0.01)であった(図)。コックス比例ハザードモデルによる腎・心血管複合イベント発症リスクは2.1倍(95%CI 1.2-3.9)であった。特に、Cre値2倍化に対するリスクは5.3倍(1.2-24.2)であった。一方、観察期間中に腎症病期の進展は60症例(44/1,000人年)に認められたが、観察開始時のsuPAR濃度高値群と低値群でその発症率に差を認めなかった。以上の結果より、血清suPAR濃度高値は、糖尿病患者の腎症病期の進展には関与しないものの、腎機能悪化・脳心血管イベント発症の予知因子であり、心腎連関に参与する共通のリスク因子である可能性が示唆された。

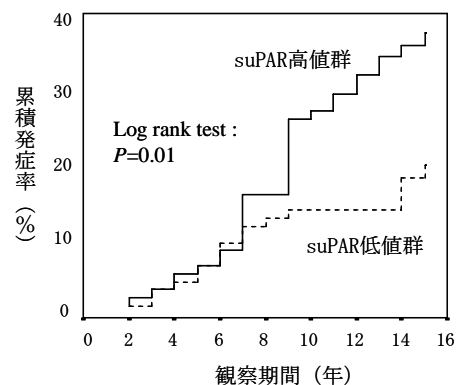


図. 血中suPAR濃度別にみたCre倍化・心血管イベントから成る複合エンドポイント累積発症率の比較 (Kaplan-Meier法)

以上のこれまでの動物研究の結果より、uPARは、糖尿病状態の腎臓でそのmRNA発現が亢進し、腎間質領域での炎症状態と関連して腎尿細管間質障害に参与する可能性が考えられた。しかしながら、尿アルブミン排泄への影響が少ないことより腎糸球体障害への関与は少ない可能性が考えられた。このことは、臨床試験で認められた血中suPAR濃度が、腎機能低下・心血管イベントの発症率と関連するが、尿アルブミン排泄量に基づく腎症病期の進行とは関連が認められなかった成績に矛盾しないものと考えられる。以上の動物・臨床研究の成績より、uPARは糖尿病状態で認められる腎機能障害・心血管合併症の発症の共通

危険因子であり、今後、uPAR発現を抑制することが、糖尿病患者の予後改善を目指す新たな治療戦略の構築において、1つの治療標的となる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕（計1件）

①荒木 信一、集約的治療による糖尿病性腎症の寛解、第47回日本糖尿病学会近畿地方会、2010年11月13日、大阪国際会議場（大阪）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

荒木 信一 (ARAKI SHIN-ICHI)

滋賀医科大学・医学部・助教

研究者番号：80378455