

# バイオマーカーの進歩

Recent progress in the development of biomarkers for diabetic nephropathy

稲熊大城\*<sup>1</sup> 秋山真一\*<sup>2</sup> 湯澤由紀夫\*<sup>1</sup>

Daijo INAGUMA, Shinichi AKIYAMA, and Yukio YUZAWA

## はじめに

全世界で糖尿病は増え続けており、特に日本が含まれる「西太平洋地域」は世界で最も糖尿病人口が多い地域である。糖尿病性腎症による透析導入も依然増加しており、糖尿病性腎症進展予防に向けた取り組みがますます重要となってきている。このような背景から、早期診断、特異的診断、予後予測、治療反応性の評価、薬剤有効性の評価、合併症予測、予防、それぞれのフェーズで、既報の糖尿病性腎症のバイオマーカーに加え、新規バイオマーカーの開発が強く求められている。

2014年に従来の糖尿病性腎症の病期分類に慢性腎臓病(CKD)のGFRのステージを加味した新たな病期分類が提唱され<sup>1)</sup>、糖尿病性腎症の臨床・臨床研究推進に大きく貢献している。一方、糖尿病性腎症の重症化予防のために開始された平成21年から26年までの2期にわたる厚生労働省腎疾患対策研究事業(和田隆志班長)は、平成27年からの研究課題「糖尿病性腎症の進展予防に向けた診断法の開発」へと引き継がれている。このなかでは探索的バイオマーカー研究も継続して行われている。和田班で収集された臨床データに紐付けられた腎病理標本を用い、糖尿病性腎症に特徴的な病理所見と腎予後との関連が明らかになってきた(Furuichi K et al, NDT 2017)。さらに、糖尿病性腎症に特徴的な各病理像とよく相関するバイオマーカーを明らかにし、新病期分類の各病期における病理所見、バイオマーカーを統合した診断法の開発に向けた作業が進行中である。

本稿では、既報の各種バイオマーカーの紹介と新規バイオマーカー開発に向けた統合オミックス解析、さらに和田

班で取り上げられている探索的バイオマーカーについて紹介する。

## 既報のバイオマーカー

これまでも糖尿病性腎症としてのバイオマーカーは、尿中あるいは血清を含めて、報告され検証されてきた<sup>2)</sup>。以下に詳細を記す(表1)。特に尿サンプルは非侵襲的に採取でき、汎用性が高いため、糖尿病性腎症のバイオマーカーのサンプル標的として注目され、新たなバイオマーカーの報告も相次いでいる。

### 1. 尿中バイオマーカー

#### 1) 尿中アルブミン

アルブミン尿は、現在最もよく確立された糖尿病性腎症のバイオマーカーである。アルブミン尿の定義は、正常アルブミン尿 30 mg/日未満、微量アルブミン尿 30 ~ 299 mg/日、顕性アルブミン尿 300 mg/日以上である。

2型糖尿病患者の20 ~ 40%は、診断から10 ~ 15年以内に微量アルブミン尿を認め、さらに20 ~ 40%の患者が15 ~ 20年以内に顕性蛋白尿期に移行する<sup>3)</sup>。微量アルブミン尿は糖尿病性腎症の早期のマーカーであり、腎症進行の予測因子である。また、治療反応性の良い指標にもなっている。2型糖尿病の微量アルブミン尿患者は、正常アルブミン期の患者に比べて42%高い顕性蛋白尿期への進行リスクを有する。また、RENNAL研究においては、ベースラインのアルブミン尿が最も強い末期腎不全への移行のリスク因子であり、6カ月後のアルブミン尿の減少が腎症進展のリスク軽減によく関連していた<sup>4,5)</sup>。微量アルブミン尿は糖尿病性腎症において、早期腎症および心血管イベントのリスク上昇に関する確立されたマーカーとなっている<sup>6)</sup>。

1980年代前半においては、尿中微量アルブミン排泄を認

\*<sup>1</sup> 藤田保健衛生大学医学部腎内科学

\*<sup>2</sup> 名古屋大学医学研究科病態内科学腎臓内科学

表 1 糖尿病性腎症に関する既報のバイオマーカーの特徴

バイオマーカー	サンプル	特 徴	
糸球体障害マーカー			
アルブミン	尿	微量アルブミン尿の病期内の尿中アルブミン値は、末期腎不全の予測になる。ばらつきが大きく糖尿病性腎症の特異度が低い。 自然退縮、微量アルブミン尿期内の $\Delta AER \neq \Delta GFR$	
IV型コラーゲン	尿	糖尿病性腎症早期からみられる。組織変化に一致する。	
セルロプラスミン	尿	アルブミン尿出現前から尿中排泄が増える。	
尿細管障害性マーカー			
NGAL	尿	尿中アルブミン排泄が出現する以前から尿中への排泄が増加する。	
$\alpha_1$ -MG	尿	比較的廉価で測定が可能である。	
KIM-1	尿	糖尿病性腎症早期の病態である糸球体過剰濾過においても尿中排泄が増加する。	
L-FABP	尿	測定が保険収載されており、一般臨床現場でも評価が可能である。正常アルブミン尿の糖尿病患者で尿中排泄量が増える。	
アンジオテンシノゲン	尿	正常アルブミン尿の糖尿病患者で尿中排泄量が増える。	
NAG	尿	腎疾患の鑑別に日常臨床においても頻用される。	
炎症性マーカー			
炎症性サイトカイン	IL-6	血液・尿	糖尿病性腎症発症前あるいは早期から、血清レベルならびに尿中排泄が増加する。
	IL-8	血液・尿	
	IL-18	血液・尿	
	IP-10	血液・尿	
	TNF- $\alpha$	血液・尿	
	TNF- $\alpha$ 受容体	血液	
成長因子	TGF- $\beta$	尿	治療により尿中排泄が減少する。
	CTGF	血液・尿	尿中アルブミン排泄ならびに GFR と関連がある。末期腎不全あるいは死亡と関連している。
接着分子	ICAM-1	血液	尿中アルブミン排泄あるいは微量アルブミン尿発生と関連している。
	VCAM-1	血液	
Fetuin-A	血液・尿	アルブミン尿と GFR 低下に関連している。	
可溶性 CD40 リガンド	血液・尿	糖尿病性腎症発症前に上昇する。	
ヒト $\alpha$ 1 酸性糖蛋白質	尿	糖尿病患者の正常アルブミン尿期から尿中排泄量が増加する。	
酸化ストレスマーカー			
8-OHdG	尿	糖尿病性腎症の進行と関連している。	
ペントシジン	血液	微小血管病変と関連している。	
CKD マーカー			
GFR		糸球体障害マーカー。腎機能の最良の指標。正常高値内の GFR を推測する正確な方法はまだない。	
シスタチン C	血液・尿	尿中排泄増加は尿細管障害マーカーとして利用される。血清レベルについては、筋肉量、年齢ならびに性別の影響を受けず、早期腎機能障害のマーカーとして、実臨床で利用される。	
尿酸	血液	酸化ストレスマーカーの一つで、治療ターゲットになりうる。尿酸値を対象とした腎疾患転帰介入試験が依然必要である。	

める糖尿病患者の60～80%が、6～14年の経過で顕性蛋白尿に移行していたが、レニン・アンジオテンシン系阻害薬が積極的に治療に導入されて以来、21～64%の患者において寛解が得られるようになり、アルブミン尿は治療反応性のマーカーとしても有用である<sup>7)</sup>。一方、腎機能障害を有する2型糖尿病患者の約30%の症例でアルブミン尿を認めなかったとする報告<sup>8)</sup>やアルブミン尿のない2型糖尿病患者の腎生検で進行性の糸球体硬化症を認めたとする報告など、アルブミン尿と腎機能低下が必ずしも相関しないケースもある<sup>9)</sup>。このため、腎予後予測、治療反応性に関してアルブミン尿をしのぐバイオマーカーの探索が精力的に行われてきている。

## 2) 尿細管障害性バイオマーカー

### (1) 尿中 $\alpha_1$ -microglobulin ( $\alpha_1$ -MG)

$\alpha_1$ -MGは、糸球体で濾過されて近位尿細管で再吸収され代謝を受けるため、尿細管障害では尿中排泄量が増加する。糖尿病では正常アルブミン尿期から微量アルブミン尿期へ移行する段階の、早期腎症のバイオマーカーの一つと考えられる<sup>10,11)</sup>。本バイオマーカーは比較的廉価で測定可能という特徴がある。

### (2) 尿中 neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL)

NGALは、障害された尿細管細胞から尿中へ排泄される25kDaの小分子蛋白であり、AKIのバイオマーカーとして研究されてきた。糖尿病性腎症においては、尿中アルブミン排泄が出現する以前から尿中への排泄が増加し、後述するKIM-1と同様に尿中排泄が増加している症例では、進行性の病態を表わし腎予後予測マーカーになるとの報告がある<sup>12)</sup>。

### (3) 尿中 kidney injury molecule-1 (KIM-1)

KIM-1は、近位尿細管細胞に局在する膜蛋白であり、尿細管障害で尿中排泄が増加し、AKIのバイオマーカーとして研究されてきた。糖尿病性腎症においては、糸球体過剰濾過を反映して早期診断マーカーとして有用であるだけでなく、腎予後の予測にも有用である<sup>13)</sup>。

### (4) 尿中 L-type fatty acid binding protein (L-FABP)

L-FABPは、近位尿細管細胞質内に存在するキャリア蛋白で、AKIのバイオマーカーとして利用される。またCKDにおける末期腎不全への進行と心血管病の予測因子にもなりうる<sup>14)</sup>。本邦において、L-FABPの測定が保険収載されており、一般臨床現場でも評価可能である。糖尿病性腎症においても、糖尿病患者の早期診断、さらに腎予後の予測因子としても有用性が報告されている<sup>15,16)</sup>。

### (5) 尿中アンジオテンシノゲン

尿中アンジオテンシノゲンは腎臓局所におけるレニン・アンジオテンシン系の亢進を反映し、正常アルブミン尿の糖尿病患者で尿中排泄量が増えることが報告されている<sup>17)</sup>。

### (6) 尿中 cystatin C (Cys C)

Cys Cは低分子蛋白の一種で、体中のすべての有核細胞で産生される。糸球体で濾過された後、尿細管で再吸収される。尿中Cys Cは、糖尿病性腎症の早期診断のマーカーであると同時に、腎予後予測マーカーとしての報告がある<sup>18,19)</sup>。

### (7) 尿中 N-acetyl-B-D-glucosaminidase (NAG)

NAGは近位尿細管に存在する酵素であり、尿細管障害において確立されたバイオマーカーである<sup>20)</sup>。The Diabetes Control and Complications Trial (DCCT)の対象症例である1型糖尿病において、ベースラインの尿中NAG上昇が、9年間の観察期間におけるアルブミン尿出現の独立したリスク因子であることが示されている<sup>21)</sup>。

## 3) 糸球体障害バイオマーカー

### (1) 尿中IV型コラーゲン

IV型コラーゲンは糸球体基底膜ならびにメサンギウム基質の構成成分である。尿中IV型コラーゲン排泄の増加は、アルブミン尿より感度の高い早期腎症のマーカーの可能性があり、さらに糸球体の構造的変化を反映しており、特徴的な病理像を反映している可能性がある<sup>22)</sup>。尿中コラーゲン排泄は糖尿病性腎症に比較的特異性が高いとされ、他の腎疾患との鑑別にも利用される。

### (2) 尿中セルロプラスミン

セルロプラスミンは銅輸送に用いられる血清蛋白である。セルロプラスミンは陰性荷電しているため、通常は糸球体から濾過されないことから糸球体障害のバイオマーカーとして位置づけられる。糖尿病患者において、アルブミン尿出現前から尿中排泄が増えるとする報告があり、アルブミン尿をしのぐ早期腎症マーカーの可能性もある<sup>23)</sup>。

### (3) その他

尿中トランスフェリン、尿中IgG、尿中ラミニン、尿中グリコサミノグリカン、尿中lipocalin-type prostaglandin-D synthaseなどが糖尿病性腎症の早期バイオマーカーとしての可能性がある。

## 2. 血清・尿中の炎症性バイオマーカー

### 1) 炎症性サイトカイン

慢性炎症は糖尿病性腎症の進展に深く関与しており、各種炎症性サイトカインが糖尿病性腎症のバイオマーカーになりうる。血清IL-6は、尿中アルブミン排泄の増加にした

がって上昇するという報告<sup>24)</sup>や、1型糖尿病患者においてベースラインの尿中 IL-6, IL-8, MCP-1 ならびに IP-10 は、早期診断とともに腎予後予測マーカーの可能性が報告されている<sup>25)</sup>。

血清 IL-18 は糖尿病性腎症早期より上昇し、心血管死亡と関連している<sup>26,27)</sup>。

血清ならびに尿中 TNF- $\alpha$  も早期診断マーカー<sup>28)</sup>であるが、血清 TNF- $\alpha$  受容体がより腎症の病態を反映しているとの報告がある<sup>29)</sup>。

## 2) 成長因子

尿中 TGF- $\beta$  は、糖尿病性腎症患者で排泄が増加している<sup>30)</sup>。2型糖尿病患者に対して、アンジオテンシン変換酵素阻害薬あるいはビタミン D の使用により尿中 TGF- $\beta$  が減少したと報告されて、治療反応性の評価マーカーとして有用である可能性がある<sup>31)</sup>。

結合組織成長因子(connective tissue growth factor : CTGF) は、TGF- $\beta$  同様に生体で重要な役割を果たしている成長因子である。尿中 CTGF は尿中アルブミン排泄と強い関連がある<sup>32)</sup>。1型糖尿病患者において、尿中 CTGF は尿中アルブミン排泄ならびに GFR との関連を認めたとする報告がある<sup>33)</sup>。一方、血清 CTGF レベルは1型糖尿病患者における末期腎不全あるいは死亡率と関連していると報告されている<sup>34)</sup>。

## 3) 接着分子

血清 ICAM-1 上昇が尿中アルブミン排泄あるいは微量アルブミン尿と相関するとの報告がある<sup>35)</sup>。その他、血清 VCAM-1 ならびにセレクチンが糖尿病性腎症の病態と関連があるとの報告<sup>36)</sup>がある一方、相対するデータもあり評価は定まっていない。

## 4) その他

Fetuin-A は肝臓から分泌される血管石灰化抑制因子で、腎機能障害の進行に伴い血清レベルが低下する。Inoue らは尿のレクチンマイクロアレイ解析により、尿中 Fetuin-A が早期診断と腎予後予測マーカーになることを報告している<sup>37)</sup>。

急性冠症候群のマーカーである血清可溶性 CD40 リガンドは、微量アルブミンに先駆けて上昇し早期診断マーカーとなる可能性がある<sup>38)</sup>。

急性期反応物質の一つとされるヒト  $\alpha$ 1 酸性糖蛋白質(オロソムコイド : orosomuroid) は、ネフローゼ症候群では尿中へ大量に排泄される。糖尿病患者の正常アルブミン尿期から尿中排泄量が増加することが示されている<sup>39)</sup>。

## 3. 血清・尿中の酸化ストレスバイオマーカー

1型および2型糖尿病において、血清 reactive oxygen species(酸化 LDL など)の上昇と抗酸化物質(superoxide dismutase, 抗酸化ビタミン, ビリルビンなど)の低下が示されている<sup>40)</sup>。尿中 8-OHdG が酸化ストレスマーカーとして測定されている。尿中 8-OHdG が腎予後予測マーカーであるとする報告<sup>41)</sup>はあるが、まだ評価は定まっていない。また、酸化ストレスの血清マーカーであるペントシジンは2型糖尿病における微小血管病変の独立したマーカーであるとする報告がある<sup>42)</sup>。

尿酸は、酸化ストレスの上昇、レニン・アンジオテンシン系を亢進させることで糖尿病合併症を進行させることから、病態ならびに治療ターゲットにもなりうるマーカーである<sup>43)</sup>。

## 新規バイオマーカーの開発

### 1. 網羅的バイオマーカー開発における統合的オミックス解析

新規の疾患バイオマーカーの開発では、病態を担う分子だけでなく病態には直接関与しないが病態を反映する分子(surrogate marker)、さらには将来の病態や治療効果を予測する分子を発見することを目指す。糖尿病性腎症のように長期にわたる多因子の相互作用によって病態を形成する疾患においては、臨床的に有用なバイオマーカーを探し当てるには膨大な検索作業を行わなければならない。近年、効率的な新規バイオマーカーの探索手法として“オミックス解析”が急成長している。オミックス解析は、質量分析計や次世代シーケンサーといった分析機器や人工知能などのインフォマティクス技術の急速な進展に後押しされて登場した新しい研究手法で、分析試料に含まれるゲノム DNA(ゲノム)、ゲノム DNA 修飾(エピゲノム)、mRNA(トランスクリプトーム)、蛋白質(プロテオーム)、代謝物(メタボローム)などの全体像を、高感度かつ高速な方法で、大規模かつ網羅的に一斉に解析して、得られた結果を俯瞰することで新たな知見を得ようとするデータ駆動型研究手法であり、従来の仮説検証型の研究手法とはアプローチが根本的に異なっている。解析対象となる分子数は各オミックスによって異なっており、ゲノミクスで約 22,000 種類、プロテオミクスで約 100,000 種類、メタボロミクスで約 8,000 種類程度と見積もられている。さらに、複数のオミックスを統合した多層的統合解析を行うことによって、疾患などの生命現象をシステムとして理解しようとするシステムズ

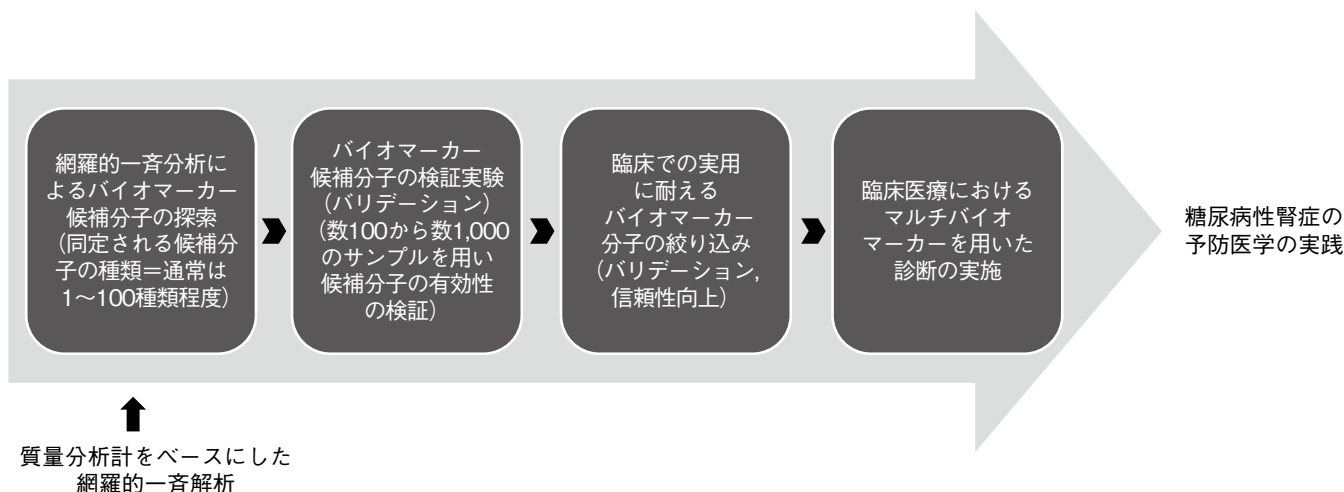


図 糖尿病性腎症のバイオマーカーの開発の流れ

表 2 オミックス解析から得られた糖尿病性腎症のバイオマーカー候補

オミックス解析	バイオマーカー候補分子	文献
プロテオーム	Type I コラーゲンのフラグメント	45
メタボローム	3-インドキシル硫酸 glycerophospholipids 遊離脂肪酸 トリプトファン 尿酸 胆汁酸 有機アニオントランスポーター (OKT1, OKT3) ミトコンドリア機能異常マーカー (PGC1α)	46, 47
miRNA	増加: miRNA-377, miRNA-192, miRNA-216/217, miRNA-144, has-miR-453, has-miR-221, has-miR-524-5p, has-miR-188-3p 減少: miRNA-21, miRNA-375 has-miR-214, has-miR-92b, has-miR-765, has-miR-492, has-miR-373, has-miR-1913, has-miR-638	48, 49
統合的オミックス解析	MDM2 (MDM2 proto-oncogen, E3 ubiquitin protein ligase)	51, 52, 53

生物学と呼ばれる新しい学問体系も生まれており、バイオマーカーの開発においてオミックス解析は有効かつ必須の手段となっている。

図に糖尿病性腎症の新たなバイオマーカーの開発の流れを示す。バイオマーカーの候補物質の検索については、上記のゲノム、トランスクリプトーム、プロテオーム、メタボロームなどすべてのフェーズにおける質量分析計をベースにした網羅的な一斉解析が必要である。続いて、micro-TAS (micro-total analysis systems) ベースの新たな分析プラットフォームを用いて、これらの候補物質から臨床応用に耐えうるバイオマーカー群を絞り込む。

## 2. 糖尿病性腎症の尿中バイオマーカー開発へのオミックス解析の応用(表 2)

### 1) プロテオーム解析

CE-MS の手法を用いた STENO 研究の尿中プロテオーム解析の結果、40 種類の尿中ペプチドパネルにより健常人と糖尿病患者を区別することができ、さらに 65 種類のペプチドにより、微量アルブミン尿期と顕性蛋白尿期が 3 年以上経過した糖尿病性腎症を区別することができた。これらの多くは、Type I コラーゲンのフラグメントである<sup>44)</sup>。さらにこれらの 65 個のペプチドの一部が、アルブミン尿より早期に尿中排泄が減少することを確認しており、糖尿病性腎

症の早期診断マーカーのみならず予後推定マーカーとしての可能性も期待されている<sup>45)</sup>。

## 2) メタボローム解析

メタボローム解析により糖尿病性腎症のバイオマーカーの候補分子も報告されている<sup>46)</sup>。これらは、糖尿病性腎症の発症機序の解明にも重要であるが、バイオマーカーとしての期待も大きく、その臨床的な有用性については今後の課題となっている。

ガスクロマトグラフィと質量分析を組み合わせた尿メタボローム解析によると、糖尿病に比べて糖尿病性腎症では、OKT1 や OKT3 などの有機アニオントランスポーターの異常による有機酸の排泄低下と PGC1 $\alpha$  の発現低下によるミトコンドリアの機能異常を示すプロファイルが得られた<sup>47)</sup>。

われわれも、各ステージの糖尿病性腎症患者から採取した血清、尿を用いて、CE-TOFMS によるメタボローム解析を行った。得られたすべてのピークに対して統計解析を行い、血清から有意差のみられたすべてのピークを用いて主成分分析を行った結果、I 期と II 期の分離は不明瞭であったが、病期の進行に伴い各サンプルのプロットが第一主成分に対して正方向へシフトすることがわかり、メタボロームデータからも病期の推測が可能であることが示唆された<sup>48)</sup>。尿中からも尿アルブミン、腎機能とそれぞれ正相関、逆相関する代謝物が得られており、未同定ピークの同定も行いバイオマーカーとしての評価を行っている。

## 3) miRNA

Yang らは糖尿病性腎症の血中で増加する miRNAs (miRNA-377, miRNA-192, miRNA-216/217, miRNA-144) と減少する miRNAs (miRNA-21, miRNA-375) を報告している<sup>49)</sup>。さらに、Argyropoulos らは、1 型糖尿病患者の腎症の早期診断と予後予測に有望な尿中 miRNA プロファイルを報告しており、今後、糖尿病性腎症の尿中マーカーの可能性が期待されている<sup>50)</sup>。

## 4) 統合的オミックス解析

Saito らは、糖尿病性腎症においてメタボロミクス、プロテオミクスおよびトランスクリプトミクスを併用したシステムズ生物学的解析手法を駆使して、病態のグローバルメタボロームプロファイルの形成にかかわる酵素蛋白質の蛋白質-蛋白質相互作用について解析を行い、キー分子として酵素蛋白質と酵素蛋白質の橋渡し役となる MDM2 (MDM2 proto-oncogen, E3 ubiquitin protein ligase) を同定した<sup>51)</sup>。一方、Mayer ら<sup>52)</sup> および Heinzel ら<sup>53)</sup> は、糖尿病性腎症研究における統合的オミックス解析アプローチについて

表3 和田班 探索的糖尿病性腎症バイオマーカーの臨床的意義

臨床的意義	血液	尿
早期診断		L-FABP C-メガリン WT-1
特異的診断	代謝物(アスパラギン酸, SDMA, アゼライン酸, ガラクタル酸, トリプトファン代謝物)	代謝物 (X, Y, Z)
予後診断	抗 EPOR 抗体	WT-1 A-, C-メガリン L-FABP

レビューし、統合的オミックス解析は糖尿病性腎症の病因解明や診断において有用なデータを得る手段として大変期待できることを述べている。

### 厚生労働省腎疾患対策研究事業(和田班)で取り上げている探索的バイオマーカー

和田班では、平成 26 年度に「糖尿病性腎症の病理診断への手引き」<sup>54)</sup>をまとめ、特徴的な各病理所見の定義とスコア化を提案している。これに基づき、糖尿病性腎症に特徴的な病理所見と腎予後との関連が明らかになってきた (Furuichi K et al, NDT 2017)。

和田班では、国内薬事承認済みの既知のマーカーを含む 5 種類のマーカーを探索的マーカーとして取り上げ (L-FABP, WT-1, A-, C-メガリン, 代謝物, 抗 EPOR 抗体) (表 3)、バイオマーカーとしての特性の評価、パネル化による有用性に関する臨床研究が進められている。これらのバイオマーカーを含む既知のマーカーを用い、新病期分類の各ステージにおける病理所見、バイオマーカーを統合した診断法の開発に向けた作業が進行中である。

L-FABP は、すでに糖尿病性腎症の早期診断、予後予測に関する有用性が報告され<sup>15,16)</sup>、日本国内で薬事承認されている。現在、尿アルブミンと組み合わせることによる予後予測能の精度向上に関する臨床研究が進行中である。

メタボローム解析により得られる代謝物に関しては、糖尿病性腎症の病期分類を可能にする血中バイオマーカー候補代謝物 19 個を同定し<sup>48)</sup>、このうち 4 種の既知物質(アスパラギン酸, SDMA, アゼライン酸, ガラクタル酸)の組み合わせによる鑑別能の有用性を確認した。また、糖尿病性腎症の尿中に特異的に検出される同一代謝経路に由来する 3 種類の代謝物(X, Y, Z: 特許出願中)を同定した。さら

に血中のトリプトファン代謝経路の活性化変化の臨床的意義について検討されている。

尿中エクソゾームの解析により、WT-1 などポドサイト由来分子が糖尿病性腎症の早期診断・予後推定バイオマーカーとして有用であることが報告されている。現在、実臨床への応用のため、少量の尿サンプルを用いた検出方法の開発が行われている。

抗エリスロポエチン受容体(EPOR)抗体は、ループス腎炎における意義が報告されたが<sup>55)</sup>、糖尿病性腎症においても腎予後と関連する可能性があり、現在、体外診断薬開発のための基礎研究が進行中である。

近位尿細管上皮細胞に発現するメガリンに関して、細胞外領域型(A-メガリン)と全長型(C-メガリン)の2種類のタイプが尿中に排泄されることが確認されている。また、早期診断としての尿中C-メガリンの有用性が報告されている<sup>56)</sup>。現在、腎予後予測マーカーとしてのA-、C-メガリンの評価に関する臨床研究が進行中である。

現在、糖尿病性腎症の進展予防に向けた病期分類一病理一バイオマーカーを統合した診断法の確立が強く望まれている。

## 謝 辞

本研究は日本医療研究開発機構研究費(難治性疾患等実用化研究事業(腎疾患実用化研究事業))「糖尿病性腎症の進展予防に向けた病期分類一病理一バイオマーカーを統合した診断法の開発」の支援を受けた。

利益相反自己申告：申告すべきものなし

## 文 献

- 羽田勝計, ほか. 糖尿病性腎症病期分類 2014 の策定(糖尿病性腎症病期分類改定)について. 日腎会誌 2014 ; 56(5) : 547-552.
- Macisaac RJ, Ekinici EL, Jerums G. Markers of and risk factors for the development and progression of diabetic kidney disease. *Am J Kidney Dis* 2014 ; 63 (2 Suppl 2) : S39-62.
- Remuzzi G, Schieppati A, Ruggenenti P. Clinical practice : nephropathy in patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2002 ; 346 : 1145-1151.
- Bruno G, Merletti F, Biggeri A, Bargero G, Ferrero S, Pagano G, Cavallo Perin P ; Casale Monferrato Study. Progression to overt nephropathy in type 2 diabetes : the Casale Monferrato Study. *Diabetes Care* 2003 ; 26 : 2150-2155.
- de Zeeuw D, Ramjit D, Zhang Z, Ribeiro AB, Kurokawa K, Lash JP, Chan J, Remuzzi G, Brenner BM, Shahinfar S. Renal risk and renoprotection among ethnic groups with type 2 diabetic nephropathy : a post hoc analysis of RENAAL. *Kidney Int* 2006 ; 69 : 1675-1682.
- Ruggenenti P, Remuzzi G. Time to abandon microalbuminuria? *Kidney Int* 2006 ; 70 : 1214-1222.
- Macisaac RJ, Jerums G. Diabetic kidney disease with and without albuminuria. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2011 ; 20(3) : 246-257.
- Kim SS, Song SH, Kim IJ, Kim WJ, Jeon YK, Kim BH, Kwak IS, Lee EK, Kim YK. Nonalbuminuric proteinuria as a biomarker for tubular damage in early development of nephropathy with type 2 diabetic patients. *Diabetes Metab Res Rev* 2014 ; 30(8) : 736-741.
- Budhiraja P, Thajudeen B, Popovtzer M. Absence of albuminuria in type 2 diabetics with classical diabetic nephropathy : Clinical pathological study. *JBiSE* 2013 ; 6 : 20-25.
- Hong CY, Hughes K, Chia KS, Ng V, Ling SL. Urinary alpha1-microglobulin as a marker of nephropathy in type 2 diabetic Asian subjects in Singapore. *Diabetes Care* 2003 ; 26(2) : 338-342.
- Petrica L, Petrica M, Vlad A, Jianu DC, Gluhovschi G, Ianculescu C, Firescu C, Dumitrascu V, Giju S, Gluhovschi C, Bob F, Gadalean F, Ursoniu S, Velciov S, Bozdog G, Milas O. Proximal tubule dysfunction is dissociated from endothelial dysfunction in normoalbuminuric patients with type 2 diabetes mellitus : a cross-sectional study. *Nephron Clin Pract* 2011 ; 118(2) : c155-164.
- de Carvalho JA, Tatsch E, Hausen BS, Bollick YS, Moretto MB, Duarte T, Duarte MM, Londero SW, Premaor MO, Comim FV, Delanghe JR, Moresco RN. Urinary kidney injury molecule-1 and neutrophil gelatinase-associated lipocalin as indicators of tubular damage in normoalbuminuric patients with type 2 diabetes. *Clin Biochem* 2016 ; 49(3) : 232-236.
- Fu WJ, Xiong SL, Fang YG, Wen S, Chen ML, Deng RT, Zheng L, Wang SB, Pen LF, Wang Q. Urinary tubular biomarkers in short-term type 2 diabetes mellitus patients : a cross-sectional study. *Endocrine* 2012 ; 41(1) : 82-88.
- Matsui K, Kamijo-Ikemori A, Imai N, Sugaya T, Yasuda T, Tatsunami S, Toyama T, Shimizu M, Furuichi K, Wada T, Shibagaki Y, Kimura K. Clinical significance of urinary liver-type fatty acid-binding protein as a predictor of ESRD and CVD in patients with CKD. *Clin Exp Nephrol* 2016 ; 20(2) : 195-203.
- Kamijo-Ikemori A, Sugaya T, Yasuda T, Kawata T, Ota A, Tatsunami S, Kaise R, Ishimitsu T, Tanaka Y, Kimura K. Clinical significance of urinary liver-type fatty acid-binding protein in diabetic nephropathy of type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 2011 ; 34(3) : 691-696.
- Nielsen SE, Sugaya T, Hovind P, Baba T, Parving HH, Rossing P. Urinary liver-type fatty acid-binding protein predicts progression to nephropathy in type 1 diabetic patients. *Diabetes Care* 2010 ; 33(6) : 1320-1324.
- Saito T, Urushihara M, Kotani Y, Kagami S, Kobori H. Increased urinary angiotensinogen is precedent to increased urinary albu-

- min in patients with type 1 diabetes. *Am J Med Sci* 2009 ; 338 (6) : 478-480.
18. Garg V, Kumar M, Mahapatra HS, Chitkara A, Gadpayle AK, Sekhar V. Novel urinary biomarkers in pre-diabetic nephropathy. *Clin Exp Nephrol* 2015 ; 19(5) : 895-900.
  19. Kim SS, Song SH, Kim IJ, Jeon YK, Kim BH, Kwak IS, Lee EK, Kim YK. Urinary cystatin C and tubular proteinuria predict progression of diabetic nephropathy. *Diabetes Care* 2013 ; 36(3) : 656-661.
  20. Parikh CR, Lu JC, Coca SG, Devarajan P. Tubular proteinuria in acute kidney injury : a critical evaluation of current status and future promise. *Ann Clin Biochem* 2010 ; 47(Pt 4) : 301-312.
  21. Kern EF, Erhard P, Sun W, Genuth S, Weiss MF. Early urinary markers of diabetic kidney disease : a nested case-control study from the Diabetes Control and Complications Trial (DCCT). *Am J Kidney Dis* 2010 ; 55(5) : 824-834.
  22. Kotajima N, Kimura T, Kanda T, Obata K, Kuwabara A, Fukumura Y, Kobayashi I. Type IV collagen as early marker for diabetic nephropathy in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Diabetes Complications* 2000 ; 14 : 13-17.
  23. Narita T, Sasaki H, Hosoba M, Miura T, Yoshioka N, Morii T, Shimotomai T, Koshimura J, Fujita H, Kakei M, Ito S. Parallel increase in urinary excretion rates of immunoglobulin G, ceruloplasmin, transferrin, and orosomucoid in normoalbuminuric type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 2004 ; 27(5) : 1176-1181.
  24. Saraheimo M, Teppo AM, Forsblom C, Fagerudd J, Groop PH. Diabetic nephropathy is associated with low-grade inflammation in Type 1 diabetic patients. *Diabetologia* 2003 ; 46(10) : 1402-1407.
  25. Wolkow PP, Niewczas MA, Perkins B, Ficociello LH, Lipinski B, Warram JH, Krolewski AS. Association of urinary inflammatory markers and renal decline in microalbuminuric type 1 diabetics. *J Am Soc Nephrol* 2008 ; 19(4) : 789-797.
  26. Moriwaki Y, Yamamoto T, Shibutani Y, Aoki E, Tsutsumi Z, Takahashi S, Okamura H, Koga M, Fukuchi M, Hada T. Elevated levels of interleukin-18 and tumor necrosis factor-alpha in serum of patients with type 2 diabetes mellitus : relationship with diabetic nephropathy. *Metabolism* 2003 ; 52(5) : 605-608.
  27. Szeto CC, Chow KM, Poon PY, Kwan BC, Li PK. Association of interleukin-18 promoter polymorphism and atherosclerotic diseases in Chinese patients with diabetic nephropathy. *Nephrology (Carlton)* 2009 ; 14(6) : 606-612.
  28. Navarro JF, Mora C, Maca M, Garca J. Inflammatory parameters are independently associated with urinary albumin in type 2 diabetes mellitus. *Am J Kidney Dis* 2003 ; 42(1) : 53-61.
  29. Lopes-Virella MF, Baker NL, Hunt KJ, Cleary PA, Klein R, Virella G ; DCCT/EDIC Research Group. Baseline markers of inflammation are associated with progression to macroalbuminuria in type 1 diabetic subjects. *Diabetes Care* 2013 ; 36(8) : 2317-2323.
  30. Riojas MA, Villanueva-Vedia RE, Zamilpa R, Chen X, Du LC, Phelix CF, LeBaron RG. Prevalence of diabetes mellitus and correlation of urinary transforming growth factor-beta1 with blood hemoglobin A1C in the Atascosa Diabetes Study. *Ethn Dis* 2008 ; 18(2 Suppl 2) : S2-54-59.
  31. Kim MJ, Frankel AH, Donaldson M, Darch SJ, Pusey CD, Hill PD, Mayr M, Tam FW. Oral cholecalciferol decreases albuminuria and urinary TGF- $\beta$ 1 in patients with type 2 diabetic nephropathy on established renin-angiotensin-aldosterone system inhibition. *Kidney Int* 2011 ; 80(8) : 851-860.
  32. Gilbert RE, Akdeniz A, Weitz S, Usinger WR, Molineaux C, Jones SE, Langham RG, Jerums G. Urinary connective tissue growth factor excretion in patients with type 1 diabetes and nephropathy. *Diabetes Care* 2003 ; 26(9) : 2632-2636.
  33. Nguyen TQ, Tarnow L, Andersen S, Hovind P, Parving HH, Goldschmeding R, van Nieuwenhoven FA. Urinary connective tissue growth factor excretion correlates with clinical markers of renal disease in a large population of type 1 diabetic patients with diabetic nephropathy. *Diabetes Care* 2006 ; 29(1) : 83-88.
  34. Nguyen TQ, Tarnow L, Jorsal A, Oliver N, Roestenberg P, Ito Y, Parving HH, Rossing P, van Nieuwenhoven FA, Goldschmeding R. Plasma connective tissue growth factor is an independent predictor of end-stage renal disease and mortality in type 1 diabetic nephropathy. *Diabetes Care* 2008 ; 31(6) : 1177-1182.
  35. Clausen P, Jacobsen P, Rossing K, Jensen JS, Parving HH, Feldt-Rasmussen B. Plasma concentrations of VCAM-1 and ICAM-1 are elevated in patients with Type 1 diabetes mellitus with microalbuminuria and overt nephropathy. *Diabet Med* 2000 ; 17(9) : 644-649.
  36. Rubio-Guerra AF, Vargas-Robles H, Lozano Nuevo JJ, Escalante-Acosta BA. Correlation between circulating adhesion molecule levels and albuminuria in type-2 diabetic hypertensive patients. *Kidney Blood Press Res* 2009 ; 32(2) : 106-109.
  37. Inoue K, Wada J, Eguchi J, Nakatsuka A, Teshigawara S, Murakami K, Ogawa D, Terami T, Katayama A, Tone A, Iseda I, Hida K, Yamada M, Ogawa T, Makino H. Urinary fetuin-A is a novel marker for diabetic nephropathy in type 2 diabetes identified by lectin microarray. *PLoS One* 2013 ; 8(10) : e77118.
  38. Chiarelli F, Giannini C, Verrotti A, Mezzetti A, Mohn A. Increased concentrations of soluble CD40 ligand may help to identify type 1 diabetic adolescents and young adults at risk for developing persistent microalbuminuria. *Diabetes Metab Res Rev.* 2008 ; 24(7) : 570-576.
  39. Jiang H, Guan G, Zhang R, Liu G, Liu H, Hou X, Cheng J. Increased urinary excretion of orosomucoid is a risk predictor of diabetic nephropathy. *Nephrology (Carlton)* 2009 ; 14(3) : 332-337.
  40. Whaley-Connell A, Sowers JR. Oxidative stress in the cardiorenal metabolic syndrome. *Curr Hypertens Rep* 2012 ; 14(4) : 360-365.
  41. Chang CM, Hsieh CJ, Huang JC, Huang IC. Acute and chronic fluctuations in blood glucose levels can increase oxidative stress in type 2 diabetes mellitus. *Acta Diabetol* 2012 ; 49(Suppl 1) : S171-177.
  42. Kerkeni M, Saïdi A, Bouzidi H, Letaïef A, Ben Yahia S, Ham-



- mami M. Pentosidine as a biomarker for microvascular complications in type 2 diabetic patients. *Diab Vasc Dis Res* 2013 ; 10 (3) : 239–245.
43. Lytvyn Y, Perkins BA, Cherney DZ. Uric acid as a biomarker and a therapeutic target in diabetes. *Can J Diabetes* 2015 ; 39(3) : 239–246.
44. Rossing K, Mischak H, Dakna M, Zürlbig P, Novak J, Julian BA, Good DM, Coon JJ, Tarnow L, Rossing P; PREDICTIONS Network. Urinary proteomics in diabetes and CKD. *J Am Soc Nephrol* 2008 ; 19 : 1283–1290.
45. Zürlbig P, Jerums G, Hovind P, Macisaac RJ, Mischak H, Nielsen SE, Panagiotopoulos S, Persson F, Rossing P. Urinary proteomics for early diagnosis in diabetic nephropathy. *Diabetes* 2012 ; 61 : 3304–3313.
46. Weiss R, Kim K. Metabolomics in the study of kidney diseases. *Nat Rev Nephrol* 2012 ; 8 : 22–33.
47. Sharma K, Karl B, Mathew AV, Gangoiti JA, Wassel CL, Saito R, Pu M, Sharma S, You YH, Wang L, Diamond-Stanic M, Lindemeyer MT, Forsblom C, Wu W, Ix JH, Ideker T, Kopp JB, Nigam SK, Cohen CD, Groop PH, Barshop BA, Natarajan L, Nyhan WL, Naviaux RK. Metabolomics reveals signature of mitochondrial dysfunction in diabetic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2013 ; 24(11) : 1901–1912.
48. Hirayama A, Nakashima E, Sugimoto M, Akiyama S, Sato W, Maruyama S, Matsuo S, Tomita M, Yuzawa Y, Soga T. Metabolic profiling reveals new serum biomarkers for differentiating diabetic nephropathy. *Anal Bioanal Chem* 2012 ; 404 : 3101–3109.
49. Yang Y, Xiao L, Li J, Kanwar YS, Liu F, Sun L. Urine miRNAs : potential biomarkers for monitoring progression of early stages of diabetic nephropathy. *Med Hypotheses* 2013 ; 81 : 274–278.
50. Argyropoulos C, Wang K, McClarty S, Huang D, Bernardo J, Ellis D, Orchard T, Galas D, Johnson J. Urinary microRNA profiling in the nephropathy of type 1 diabetes. *PLoS One* 2013 ; 8 : e54662.
51. Saito R, Rocanin-Arjo A, You YH, Darshi M, Van Espen B, Miyamoto S, Pham J, Pu M, Romoli S, Natarajan L, Ju W, Kretzler M, Nelson R, Ono K, Thomasova D, Mulay SR, Ideker T, D'Agati V, Beyret E, Belmonte JC, Anders HJ, Sharma K. Systems biology analysis reveals role of MDM2 in diabetic nephropathy. *JCI Insight* 2016 ; 1(17) ; e87877.
52. Mayer P, Mayer B, Mayer G. Systems biology : Building a useful model from multiple markers and profiles. *Nephrol Dial Transplant* 2012 ; 27 : 399–402.
53. Heinzl A, Mühlberger I, Stelzer G, Lancet D, Oberbauer R, Martin M, Perco P. Molecular disease presentation in diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 2015 ; 30 : iv17–iv25.
54. 和田隆志, 湯澤由紀夫(監修), 佐藤 博, 鈴木芳樹, 北村博司(編). 糖尿病性腎症と高血圧性腎症の病理診断への手引き. 東京 : 東京医学社, 2015.
55. Hara A, Furuichi K, Yamahana J, Yasuda H, Iwata Y, Sakai N, Shimizu M, Kaneko S, Wada T. Effect of autoantibodies to erythropoietin receptor in systemic lupus erythematosus with biopsy-proven lupus nephritis. *J Rheumatol* 2016 ; 43(7) : 1328–1334.
56. Ogasawara S, Hosojima M, Kaseda R, Kabasawa H, Yamamoto-Kabasawa K, Kurosawa H, Sato H, Iino N, Takeda T, Suzuki Y, Narita I, Yamagata K, Tomino Y, Gejyo F, Hirayama Y, Sekine S, Saito A. Significance of urinary full-length and ectodomain forms of megalin in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2012 ; 35(5) : 1112–1118.