

学位論文

微細な慢性炎症が  
慢性腎臓病の発症および進展に  
及ぼす影響に関する研究

学位申請者 箸方 厚之

広島大学大学院医歯薬保健学研究科医歯薬学専攻

主指導教員 柴 秀樹 教授

2015 年度



## 謝辞

本研究に際し、終始御懇篤なる御指導ならびに御校閲を賜りました本学統合健康科学部門歯髓生物学研究室 柴秀樹教授に衷心より感謝の意を表します。

また、本研究遂行上および本論文作成上において、御教示、御校閲を賜りました本学応用生命科学部門歯周病態学研究室 栗原英見教授、本学統合健康科学部門小児歯科学研究室 香西克之教授に謹んで深く感謝の意を表します。

ならびに、本研究の遂行、および本論文の作成において、御助言、御高閲を賜りました本学基礎生命科学部門医化学研究室 浅野知一郎教授、鎌田英明准教授、本学応用生命科学部門歯科矯正学研究室 谷本幸太郎教授に深く感謝申し上げます。

そして、本研究遂行上および本論文作成上、多大なる御支援と終始御助言、御鞭撻を賜りました九州大学大学院歯学研究院口腔機能修復学講座歯周病態学分野 西村英紀教授、山下明子助教に厚く御礼申し上げます。

あわせて、常日頃より心温かい御支援を頂きました本学統合健康科学部門歯髓生物学研究室内の教室員の皆様に厚く御礼申し上げます。

最後に、勉学、研究の機会を与えると共に、常に私を支えてくれた父 俊雄、母 眞美子をはじめ家族の皆様に心より感謝申し上げます。

2015 年 3 月

広島大学大学院医歯薬保健学研究科  
統合健康科学部門 歯髓生物学研究室

箸方 厚之

本論文の要旨は以下の学会において発表した。

第 55 回     秋季日本歯周病学会学術大会（2012 年 9 月 茨城）

第 56 回     春季日本歯周病学会学術大会（2013 年 5 月 東京）

本論文の一部は以下の雑誌に掲載された。

Hashikata A, Yamashita A, Suzuki S, Nagayasu S, Shinjo T, Taniguchi A, Fukushima M, Nakai Y, Nin K, Watanabe N, Asano T, Abiko Y, Kushiya A, Nagasaka S, Nishimura F: The inflammation-lipocalin 2 axis may contribute to the development of chronic kidney disease. *Nephrology Dialysis Transplantation* 2014; 29: 611–618

# 目次

第1章	緒言.....	1
第2章	メサンギウム細胞ーマクロファージ共培養系における 炎症性サイトカイン産生性におよぼす LPS の影響の検討	
第1節	概要.....	3
第2節	材料および方法.....	3
	1. 細胞および細胞培養.....	3
	2. DNA マイクロアレイ解析.....	4
	3. リアルタイム PCR 解析.....	4
	4. 培養上清中のサイトカイン量の測定(ELISA 法) .....	4
	5. 統計解析.....	4
第3節	結果.....	5
第3章	LCN2 の各細胞に産生性についての検討	
第1節	概要.....	12
第2節	材料および方法.....	12
	1. 細胞および細胞培養.....	12
	2. 培養上清中のサイトカイン量の測定(ELISA 法) .....	12
	3. 統計解析.....	12
第3節	結果.....	13

## 第4章 LCN2のバイオマーカーとしての有用性に関する疫学的検討

第1節	概要.....	15
第2節	対象および方法.....	15
	1. 対象.....	15
	2. 血中 LCN2 濃度および各種血液・生化学特性.....	15
	3. 統計解析.....	16
第3節	結果.....	16

## 第5章 LCN2 遺伝子発現におよぼす LPS および TNF- $\alpha$ の 相乗効果の検討

第1節	概要.....	20
第2節	材料および方法.....	20
	1. 細胞および細胞培養.....	20
	2. リアルタイム PCR 解析.....	20
	3. 統計解析.....	20
第3節	結果.....	21

## 第6章 考察.....24

## 第7章 総括.....27

## 参考文献 .....28

## 第1章 緒言

歯周病はこれまで局所の慢性感染症と考えられてきたが、歯周病原細菌 *Porphyromonas gingivalis* (*P.g*) に対する血清 IgG 抗体価と末梢血中 C-反応性蛋白 (CRP) 濃度が正の相関を示すことや(1)、重度歯周病を併発した 2 型糖尿病患者に歯周治療を行った場合、治療後に高感度 CRP 値が有意に低下すること(2, 3)などから、軽微な慢性炎症を生体に惹起する炎症性疾患と捉えられようになった。重度歯周病による炎症反応によって、活性化されたマクロファージから種々の炎症性サイトカインが産生される。一方、肥満脂肪組織では、脂肪細胞から分泌される種々のアディポサイトカインによってマクロファージが脂肪組織に遊走・浸潤し、脂肪細胞と相互作用を発揮することでより多量の炎症性サイトカイン放出が促進される。このようにして歯周病や肥満が全身に軽微な慢性炎症を惹起し、糖尿病や心血管系疾患などの全身疾患に影響を及ぼすことが明らかにされつつある(4-6)。

近年、慢性腎臓病(Chronic Kidney Disease; CKD) の概念が注目されている。CKD はタンパク尿などの腎機能障害や推算糸球体濾過量(estimated glomerular filtration rate; eGFR) が 60ml 未満のいずれか、あるいは両者が 3 ヶ月以上持続する場合に診断され、これらの腎障害が慢性的に持続する病態すべてを包括した概念であり、放置・進行すると透析を必要とする末期腎不全に至る。CKD が注目される理由としては、諸外国および本邦において、腎透析や腎移植を必要とする末期腎不全患者数が急激に増加していること(7)、腎透析患者の生命予後が極めて不良であること(8)、にもかかわらず CKD に有用なバイオマーカーが未だにないこと(9)、そして最も大きな理由として CKD が心血管疾患(Cardio Vascular Disease; CVD) の強力なリスク因子であることが挙げられる(10)。CKD を引き起こす主な疾患は、糖尿病性腎症(腎症)であり、CKD 患者全体の 40 % 以上を占めている(11)。腎症の原因として、高血糖に基づく代謝異常が示唆されてきた(12, 13)。しかしながら、CKD の発症・進行の機序を高血糖に基づく代謝異常のみで説明するのは困難である(14)。

これまでに腎症の進行に伴い、糸球体間質細胞であるメサンギウム細胞からの基質産生が増加し、メサンギウム細胞周囲に蓄積することによって、メサンギウム細胞とメサンギウム基質からなるメサンギウム領域が拡大し、尿細管間

質の線維化や濾過率の減少などの腎機能の低下が引き起こされることが報告されている(15)。腎症患者の病理組織においては、種々の炎症性サイトカインが上昇すること(16)、および多量のマクロファージが糸球体や間質に浸潤し、腎症を進展させることが示唆されている(10, 17)。また、メタボリックシンドロームが CKD の発症に関与すること(18, 19)、CKD 患者は血清 CRP 値が上昇すること(20)、さらに、CKD 患者は重篤な歯周病罹患が多いとの疫学研究がある(21-25)。これらのことから炎症と CKD の発症・進行との関連性が考えられる。

以上から、歯周病感染などで活性化されたマクロファージが腎組織に浸潤し、メサングウム細胞とマクロファージの相互作用が起こることで、腎組織での炎症反応が増悪する結果、腎症の進行が促進するという仮説を設けた。

そこで、炎症と CKD の関連性についての分子基盤を明らかにするために、軽微な慢性炎症を想定した低濃度 Lipopolysaccharide (LPS) 刺激を加えたメサングウム細胞とマクロファージの共培養系におけるサイトカインの発現動態と発現遺伝子の変化を解析した。さらに、発現が有意に増加した特定の遺伝子に注目し、腎機能低下の有用なマーカーとなり得るか否かを疫学的に検討した。

## 第2章 メサングウム細胞ーマクロファージ共培養系における

### 炎症性サイトカイン産生性に対する LPS の影響検討

#### 第1節 概要

腎症の進行過程においてメサングウム細胞にマクロファージが浸潤していること、多くの腎疾患組織で種々の炎症性サイトカインの発現が上昇していることが報告されている(10, 16, 17)。そこで、慢性炎症と腎症の関連性についての分子基盤を明らかにするために、まずマウスメサングウム細胞とマクロファージの共培養系を確立した。続いて、その系において軽微な炎症を想定し低濃度 LPS 刺激を加えた際の、遺伝子発現変動を検討するため、DNA マイクロアレイの手法を用い、解析を行った。DNA マイクロアレイ解析の結果のうち発現に変動があった遺伝子について、関連するパスウェイの検討を行った。

#### 第2節 材料および方法

##### 1. 細胞および細胞培養

マウスメサングウム細胞株 CRL-1927 (American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, USA) およびマウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 (ATCC)を用いた。培養は 37°C, 5%CO<sub>2</sub> 気相条件下で行った。CRL-1927 は既法に従い 5% Fetal bovine serum (FBS) (Cansera International Inc., Canada), 1 % Penicillin Streptomycin (PS) (Gibco Invitrogen, Grand Island, NY, USA) を含む Dulbecco's Modified Eagles medium Low Glucose (Gibco Invitrogen) と Ham's F-12 Nutrient Mixture (Gibco Invitrogen) を 3:1 の割合で混合した培地で培養した。RAW264.7 は 10% FBS, 1% PS, 2.0mM L-glutamine (Gibco Invitrogen) を含む Dulbecco's Modified Eagles medium High Glucose (Gibco Invitrogen) 培地で培養した。

メサングウム細胞およびマクロファージの共培養は、上室の底面に直径 0.4μm の多孔膜を有し液性因子のみが各室間を移動できる 6 well plate トランスウェルシステム(Corning Inc., Acton, MA, USA) を使用し、上室に RAW264.7 (5 x 10<sup>4</sup> cells/ well) を、下室に CRL-1927 (1 x 10<sup>5</sup> cells/ well) を

播種し、行った。

低濃度の 1 ng/ml の LPS (*E.coli*) (Sigma, St. Louis, MO, USA) で細胞を刺激し, 0, 4, 8, 12, 24 時間後の培養上清および RNeasy Mini kit (Qiagen, Crawley, UK) を用いてメサングウム細胞から total RNA を回収した(図 1)。

## 2. DNA マイクロアレイ解析

GeneChip (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) を用いて, 上記で回収したメサングウム細胞における発現遺伝子を LPS 刺激群と LPS 未刺激群間で比較した。

## 3. リアルタイム PCR 解析

ReverTraAce qPCR RT Kit (TOYOBO, Osaka, Japan) を用いて, 回収した RNA の逆転写反応を行い, cDNA を得た。KAPA SYBER FAST qPCR Kit (KAPA Biosystems, Boston, MA, USA) を用いて, 逆転写反応によって合成した cDNA を鋳型として 7300 Real TimePCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を用い, リアルタイム PCR 解析を行った。

Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (GAPDH) 遺伝子をハウスキーピング遺伝子として相対的に定量をおこなった。実験に用いたプライマーの設計を(表 1) に示す。

## 4. 培養上清中のサイトカイン量の測定 (ELISA 法)

Lipocalin2 (LCN2), Chemokine (C-X-C motif) ligand 5 (CXCL5), Chemokine (C-X-C motif) ligand 2 (CXCL2), Granulocyte/ Macrophage-Colony Stimulating Factor (GM-CSF), Chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (CXCL1), Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1) の濃度を, mouse ELISA Kit (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA) を用いて測定した。

## 5. 統計解析

定量化したデータは平均 ± 標準偏差を表し, Student's-*t* 検定を用い, 有意水準を \* $p < 0.05$  として検定した。

### 第3節 結果

#### 共培養系に LPS 刺激を加えた際のメサングウム細胞の mRNA 発現変動

LPS 未刺激のマクロファージと共存するメサングウム細胞と比較して, LPS 刺激によって *Cxcl1*, *Cxcl2*, *Cxcl3*, *Cxcl5*, *Chemokine (C-C motif) ligand 20 (Ccl20)*, *Mcp-1* などの炎症性ケモカイン, 炎症マーカーの *Serum amyloid A2 (Saa2)* の遺伝子発現がメサングウム細胞で亢進した。また腎障害のマーカーとして注目されている *Lcn2* が顕著に発現亢進した(図 2A)。

#### 共培養系に LPS 刺激を加えた際のメサングウム細胞 mRNA 発現変量

*Lcn2*, *Cxcl1*, *Cxcl2*, *Cxcl5*, *Gm-csf*, *Mcp-1* のすべてにおいて前述の DNA マイクロアレイ解析のデータを支持する結果が得られた(図 2B)。

#### 共培養系に LPS 刺激を加えた際のサイトカイン産生量

測定した LCN2, CXCL1, CXCL 2, CXCL 5, GM-CSF, MCP-1 のすべてにおいて LPS 刺激によってその産生量が有意に増加した(図 2C)。

#### DNA マイクロアレイ解析にて発現が亢進した遺伝子群の関連パスウェイ

発現量が亢進していた遺伝子群の多くは炎症反応に関わる NF- $\kappa$ B や IRF のパスウェイに属していた。腎症関連遺伝子として *Mcp-1*, *collagen type VIII  $\alpha$ 1*, *Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1)* の発現が亢進した。また補体活性化経路として, C1s および C3 や Integrin ファミリーの *VCAM-1* の発現が亢進した。これらの経路に加えて, Redox 調節として *Lcn2* の発現が著しく亢進した(表 2)。

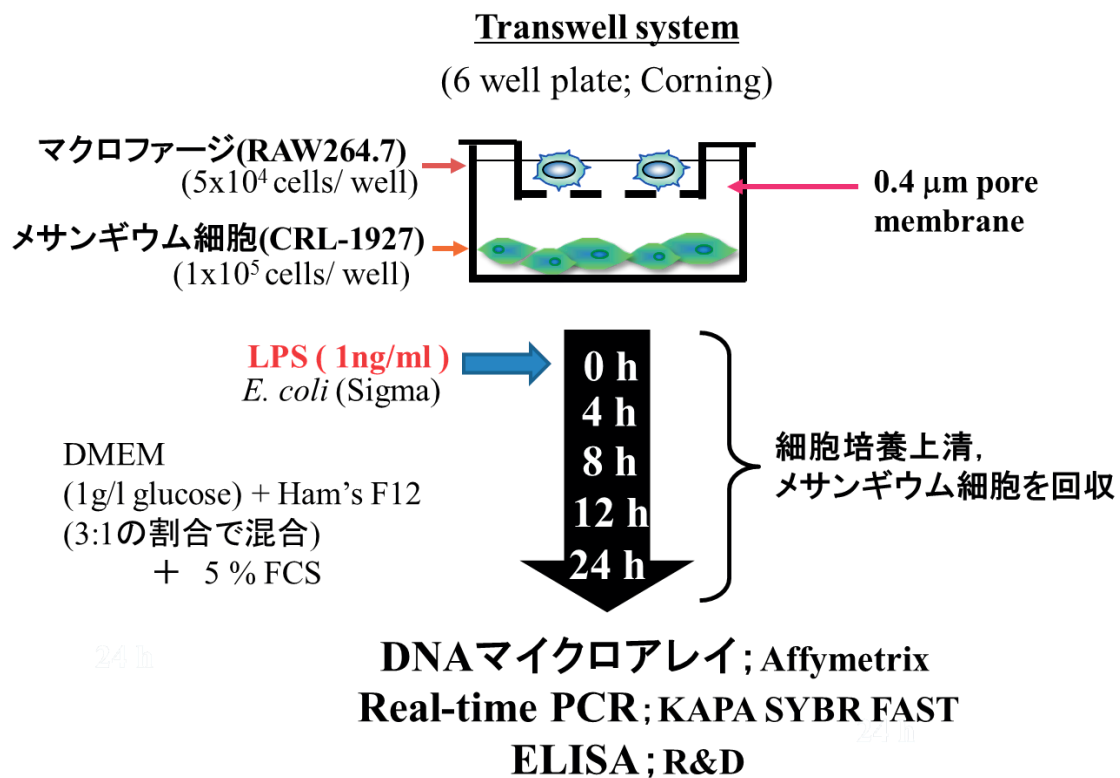


図 1

メサンギウム細胞－マクロファージ共培養系の概略図

LPS 刺激後 0, 4, 8, 12, 24 時間培養後の細胞培養上清の回収およびメサンギウム細胞から total RNA を回収し、解析をした。

表 1

使用したプライマー

Genes	Forward primer	Reverse primer
GAPDH	AATGTGTCCGTCGTGGATCTGA	GATGCCTGCTTCACCACCTTCT
LCN2	CCAGTTCGCCATGGTATTTT	TCCTTCAGTTCAGGGGACAG
CXCL5	GGTCCACAGTGCCCTACG	GCGAGTGCATTCCGCTTA
CXCL2	TCCAGAGCTTGAGTGTGACGC	TGGATGATTTTCTGAACCAGGG
GM-CSF	ATGCCTGTCACGTTGAATGAAG	GCGGGTCTGCACACATGTTA
CXCL1	CACCCAAACCGAAGTCATAG	AAGCCAGCGTTCACCAGA
MCP-1	GAAGGAATGGGTCCAGACAT	ACGGGTCAACTTCACATTCA

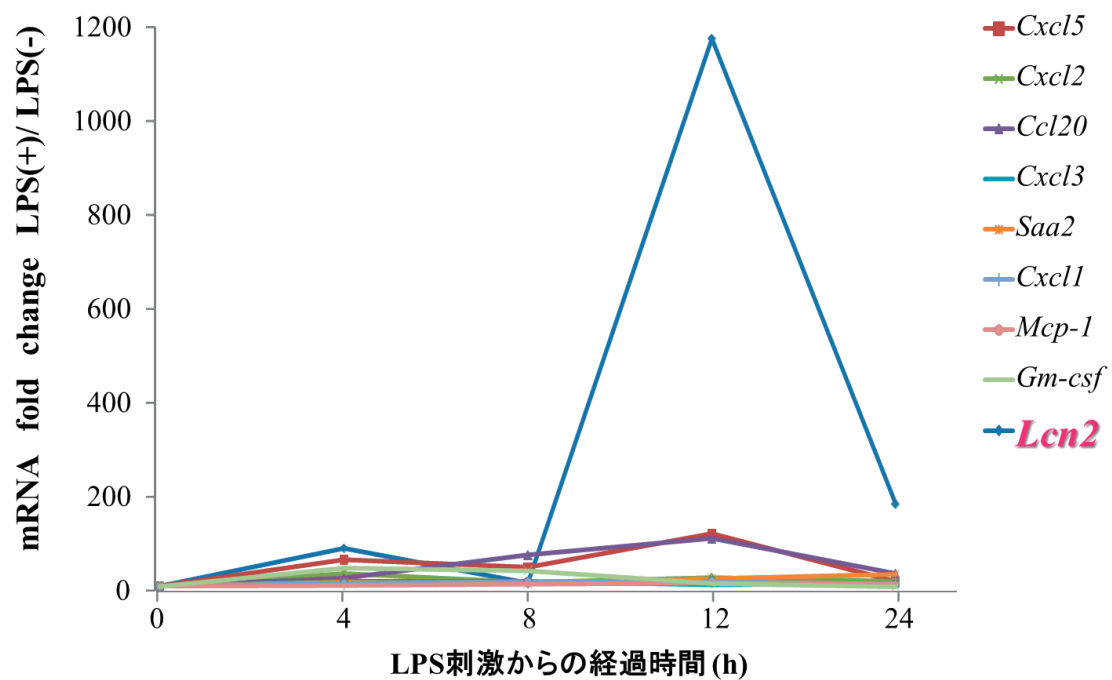


図 2A

共培養系に LPS 刺激を加えた際のメサンギウム細胞の mRNA 発現変動

LPS 未刺激の遺伝子と比較して、LPS 刺激によって *Cxcl5* や *Mcp-1* などの炎症性ケモカイン，炎症マーカーの *Saa2* の発現が亢進した。また腎障害のマーカーとして注目されている *Lcn2* が顕著に発現亢進した。

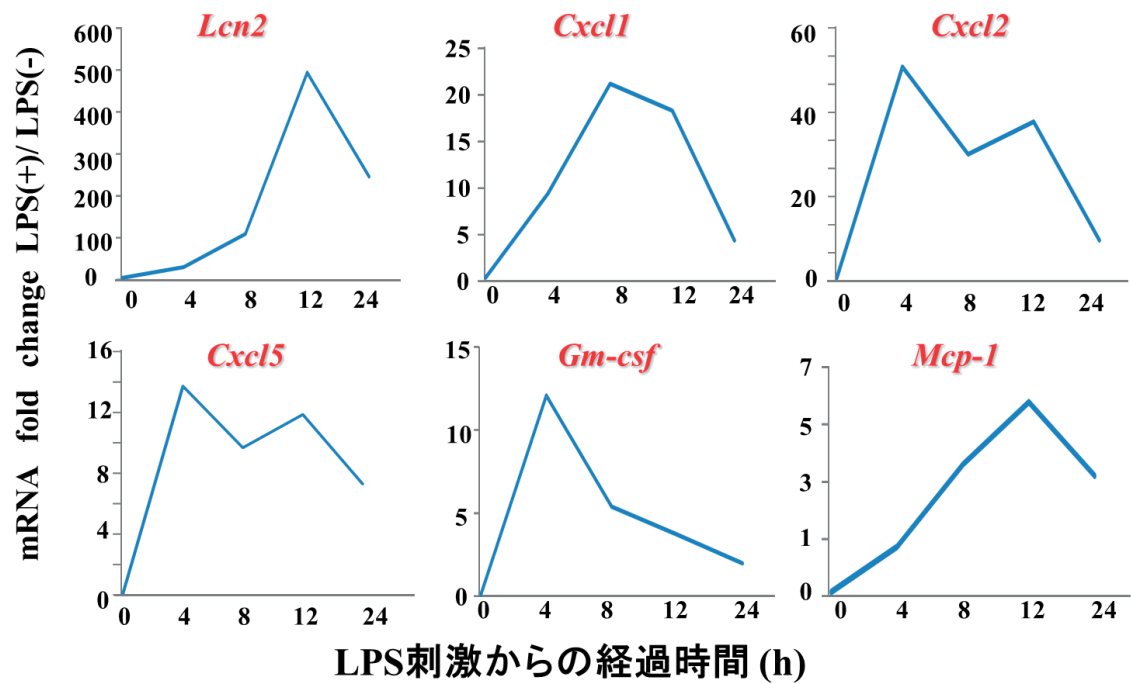


図 2B

共培養系に LPS 刺激を加えた際のメサングウム細胞 mRNA 発現変量

*Lcn2*, *Cxcl1*, *Cxcl2*, *Cxcl5*, *Gm-csf*, *Mcp-1* のすべてにおいて DNA マイクロアレイ解析のデータを支持する結果が得られた。

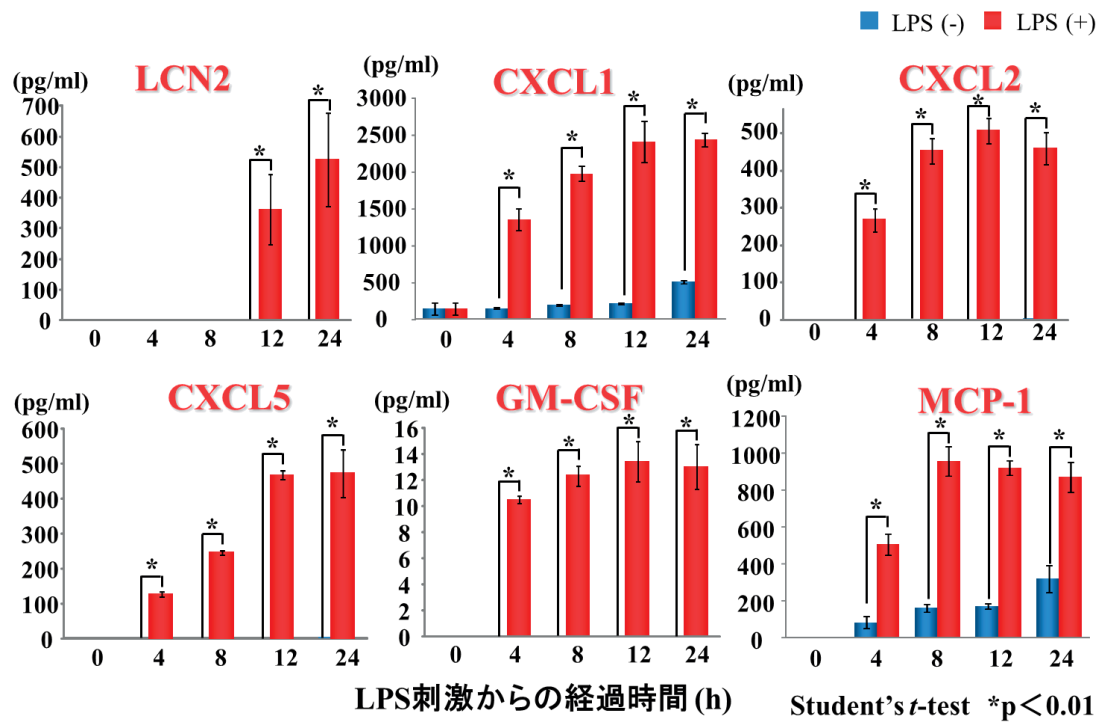


図 2C

共培養系に LPS 刺激を加えた際のサイトカイン産生量

測定した LCN2, CXCL1, CXCL 2, CXCL 5, GM-CSF, MCP-1 のすべてにおいて LPS 刺激によってその産生量が有意に増加した。

表 2

DNA マイクロアレイ解析にて発現が亢進した遺伝子群の関連パスウェイ

関連パスウェイ	遺伝子
NF-κB	<i>Csf2, Cxcl1, Cxcl2, Cxcl3, Fas, Lbp, Nfkb1a, Trp53, Vegfc</i>
糖尿病性腎症	<i>Mcp-1, Collagen type VIII α1, Vcam-1</i>
IRF	<i>Cxcl1, Cxcl2, Cxcl3, Ikbke, Trp53</i>
補体活性化経路	<i>C1s, C3</i>
Integrinファミリー	<i>Vcam-1</i>
Redox調節	<i>Lcn2</i>

発現量が亢進していた遺伝子群の多くは、炎症反応に関わる NF-κB や IRF のパスウェイに属していた。腎症関連遺伝子として *Mcp-1, collagen type VIII α1, VCAM-1* の発現が亢進した。

## 第3章 各細胞からの LCN2 産生能の検討

### 第1節 概要

LCN2 は好中球ゼラチナーゼ関連リポカリンとも呼ばれ、主に好中球から産生され、自然免疫において重要な役割を果たす。その一方で鉄と結合し、その恒常性を制御することで抗酸化作用を示すことが示唆されている(26, 27)。また、LCN2 は肝細胞および腎尿細管細胞にも発現しており、CKD 罹患患者の血中、尿中で濃度が上昇することが報告されている(26, 28, 29)。

LCN2 遺伝子欠損マウスにおいて、CKD の進行が抑制される(30)が、LCN2 の腎障害に及ぼす生理的な機能については未だ不明な点が多い。これまでの研究の多くで、腎障害において産生される LCN2 の産生細胞は傷害を受けた尿細管細胞であることが報告されており、LCN2 は尿細管細胞の傷害マーカーとして認識されている(31)。そこで、メサングウム細胞単独培養系、マクロファージ単独培養系およびメサングウム細胞-マクロファージ共培養系の LCN2 の産生量を比較した。

### 第2節 材料および方法

#### 1. 細胞および細胞培養

第2章第2節の1と同様に CRL-1927 メサングウム細胞細株および RAW264.7 マクロファージ細胞株を使用した。CRL-1927 単独培養、RAW264.7 単独培養、CRL-1927 と RAW264.7 の共培養の各群において、1 ng/ml LPS 刺激後 24 時間の細胞培養上清を回収した。

#### 2. 培養上清中のサイトカイン量の測定(ELISA 法)

各群の LCN2 の濃度を mouse ELISA Kit (R&D Systems, Inc.) を用いて測定した。

#### 3. 統計分析

第2章第2節の5を参照。

#### 第 4 節 結果

LCN2 について各細胞からの産生量を比較したところ、LPS 刺激によってメサングウム細胞およびマクロファージから産生されるものの、各々の単独培養時の産生量の和より共培養の方がタンパクの産生量が有意に増加した(図 3)。

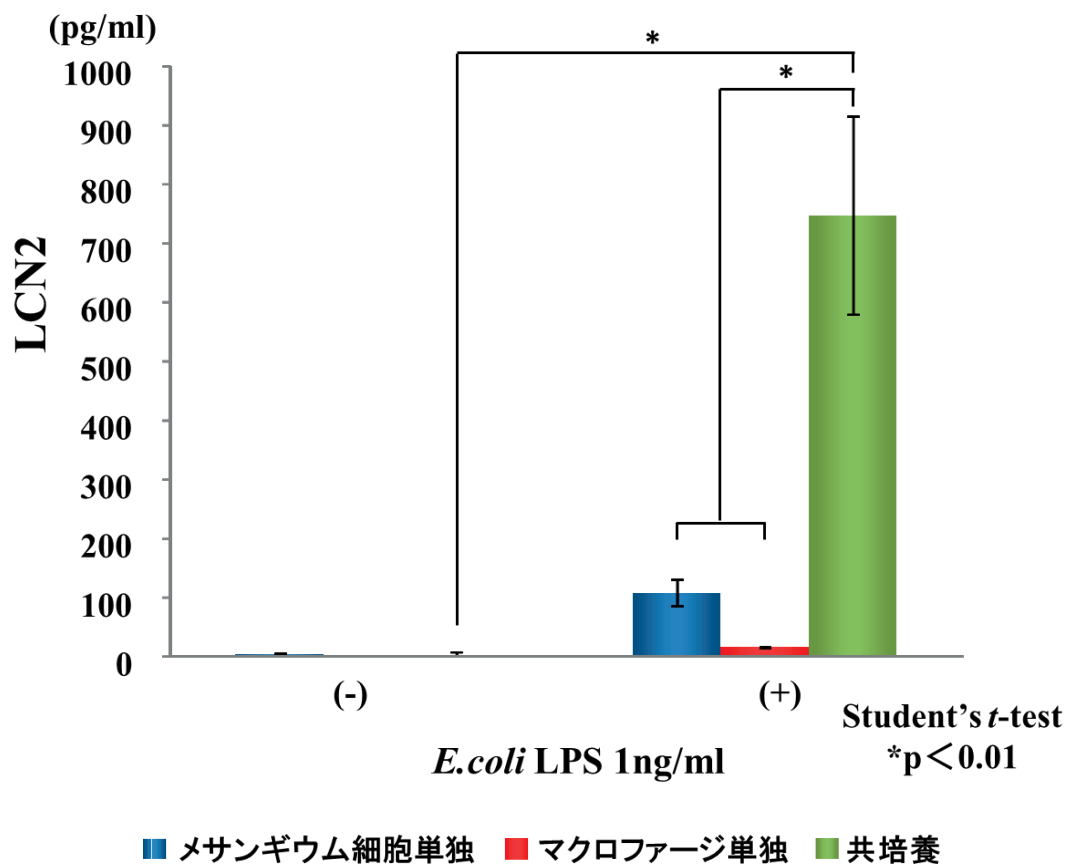


図 3

### LPS 刺激を加えた時の LCN2 産生量の比較

LPS 刺激下で、メサンギウム細胞、マクロファージをそれぞれ単独培養した際の産生量の和と比較して、両細胞を共培養した場合では、タンパク産生量が有意に増加した。

## 第4章 LCN2のバイオマーカーとしての有用性に関する疫学的検討

### 第1節 概要

これまでの *in vitro* の研究で慢性炎症を想定した LPS 刺激によってメサンギウム細胞 - マクロファージ共培養系において LCN2 の遺伝子の発現亢進, タンパク産生量が増加したことを受け, LCN2 が疾患マーカーとなり得るかどうか, あるいは腎障害の進行を把握するための因子として機能するか否かについて疫学的に検討した。

### 第2節 対象および方法

#### 1. 対象

淀川キリスト教病院倫理委員会の承認後, 本研究へ参加する同意を得られた成人健診受診者 420 名(33~82 歳 平均年齢: 55.98 ± 9.34 歳, 男性 301 人, 女性 119 人) を対象とした。なお, 急性疾患を有する患者は事前に除外した。

#### 2. 血中 LCN2 濃度および各種血液・生化学特性

すべての健診受診者は 75g の経口ブドウ糖負荷試験(75g OGTT) を受け, その中で WHO の診断基準で糖尿病と診断された者 50 名を糖尿病被験者, そして残りの 370 名を非糖尿病被験者とした(32)。なお, 健診受診者は, 検査前 3 日間で最低 150g の炭水化物の摂取, ならびに検査前最低 1 週間の禁酒および激しい運動の制限を行った。そのうえで, 12 時間絶食後の朝に前肘静脈から採血を行った。すべての血液サンプルは, 解析時まで -70℃ で凍結保存した。血液検査は, 中性脂肪, 総コレステロール, 高密度リポタンパク質コレステロール(HDL) および低密度リポタンパク質コレステロール(LDL) については通法に従って, 血清インスリン, 高感度 CRP (hsCRP), 高分子量(HMW) アディポネクチン, TNF- $\alpha$ , 可溶性腫瘍壊死因子受容体 1, 2 (sTNF-R1, 2) については参考文献に示す方法で測定した(33-37)。さらに LCN2, Interleukin-18 (IL-18) および MCP-1 の濃度を, ELISA Kit (R&D Systems) を用いて測定した。HbA1c (NGSP) 値は, 日本糖尿病学会で定められている 4.6~6.2% を正常な範囲とした(38)。推定糸球体濾過率(eGFR)

は、Imai らの算出式を用いて換算した(39)。タンパク尿の有無を尿検査試験紙を用いて測定した(表 3)。

### 3. 統計分析

すべてのデータは、平均 ± 標準偏差として表した。TNF- $\alpha$  と hsCRP は、正規分布を示さなかったため、これらの変数については対数変換を行った。LCN2 と腎機能(クレアチニンおよび eGFR) の単相関をスピアマンの順位検定によって調べた。次に、LCN2 に関連する因子を決定するために、LCN2 を従属変数として、多重ロジスティック回帰分析を行った。有意水準を  $p < 0.05$  として検定した。すべての統計データ解析は、SPSS/ w17.0 ソフトウェア(SPSS, Chicago, IL, USA) を用いた。

### 第 3 節 結果

スピアマン順位検定では、LCN2 はクレアチニンと正の相関を示し( $n = 420, r = 0.416$ )、また eGFR と負の相関( $n = 420, r = -0.367$ ) を示した(図 4)。

次に、糖尿病 50 人の患者を含む全ての被験者( $n = 420$ ) に対して、LCN2 に有意に関連する因子を決定するために、多重ロジスティック回帰分析を行った。LCN2 濃度は、クレアチニン( $\beta = 0.348$ )、sTNF-R2 ( $\beta = 0.275$ )、尿酸( $\beta = 0.180$ ) および WBC ( $\beta = 0.21$ ) と有意に相関した。eGFR はクレアチニン、年齢、性別から算出される為、eGFR とクレアチニンは互いに交絡因子となる。そこでクレアチニンを除いて解析を行ったところ、eGFR ( $\beta = -0.151$ ) と負の相関を示した。糖尿病自体が sTNFR2 などの炎症マーカーに何らかの影響を与える可能性があるため、糖尿病患者を省き非糖尿病の被験者を選択し再度解析を行ったところ、LCN2 は sTNFR2 ( $\beta = 0.271$ )、eGFR ( $\beta = -0.151$ )、および尿酸( $\beta = 0.176$ ) と有意に相関した(表 4)。

表 3

## 被験者のプロフィールと測定項目

被験者データ			
被験者数	428 (male:female 306:122)		
平均年齢	56.0±9.3		
測定項目一覧			
LCN2 (ng/ml)			
血液像 好中球	インスリン	性別	GOT
血液像 リンパ球	TNF-α (pg/ml)	実年齢	GPT
血液像 好酸球	HMWadiponectin(μg/ml)	身長	γ-GTP
血液像 好塩基球	sTNF-R1 (pg/ml)	体重	CHE
血液像 単球	sTNF-R2 (pg/ml)	BMI	血糖(空腹時)
hsCRP定量	Leptin(ng/ml)	体脂肪率	血糖(1時間)
眼 圧(右)	sICAM-1 (ng/ml)	腹囲	血糖(2時間)
眼 圧(左)	Homocysteine (μmol/L)	血圧(最高)	HbA1c
努力性肺活量	IL-18 (pg/ml)	血圧(最低)	白血球(WBC)
肺活量比	MCP-1 (pg/ml)	安静心電図心拍数	赤血球(RBC)
1秒量	クレアチニン	総コレステロール	血色素量
1秒率	eGFR	中性脂肪	血小板数
%1秒量	尿酸	HDL-C	ヘマトクリット
		LDL-C	

(淀川キリスト教病院 倫理委員会承認)

(淀川キリスト教病院 倫理委員会承認)

33 歳～82 歳の 428 人の成人を対象に血液・生化学検査を行い、ELISA 法を用いて血中 LCN2 濃度を測定した。

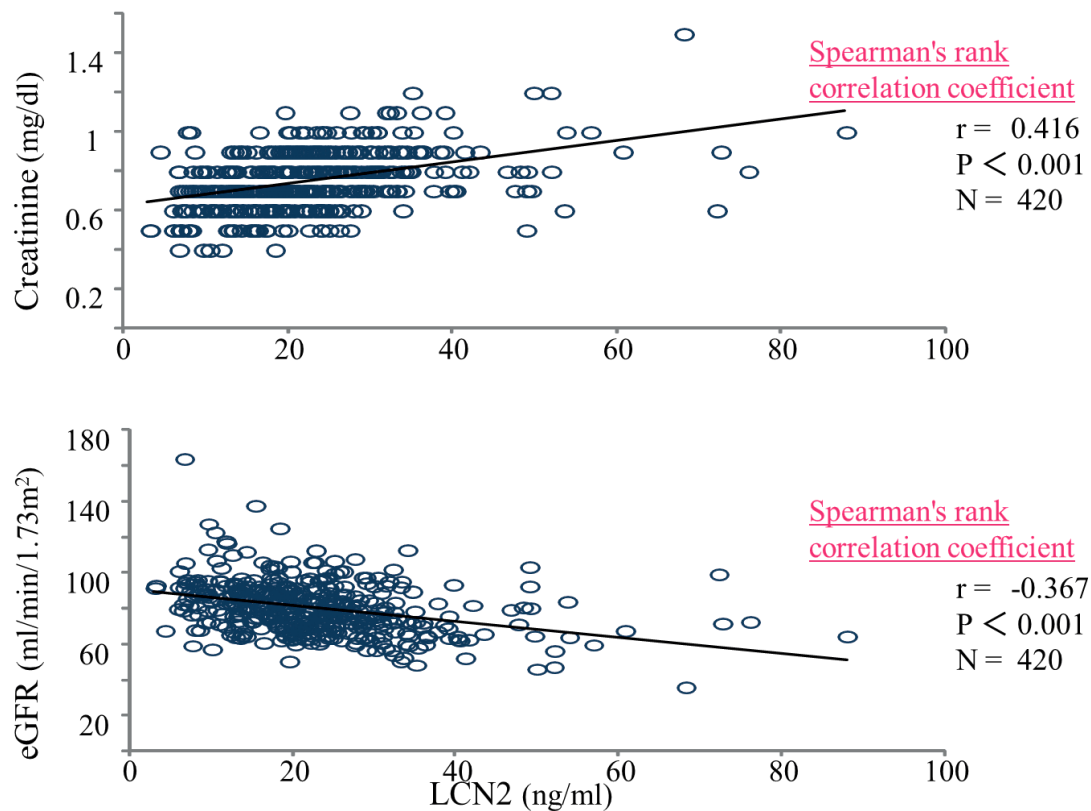


図 4

ヒト血中 LCN2 濃度とクレアチニン, eGFR との関係

LCN2はクレアチニンと正の相関を示し( $n = 420$ ,  $r = 0.416$ ), また eGFR と負の相関( $n = 420$ ,  $r = -0.367$ ) を示した。

表 4

ヒト血中 LCN2 濃度と有意に相関する因子 (多重ロジスティック回帰分析)

**全被験者対象で、全測定項目を予測値として解析**

LCN2濃度と有意に相関する因子	β値	p値
クレアチニン	0.348	0.028
WBC	0.210	0.001
sTNF-R2	0.275	<0.001
尿酸	0.180	0.002

**全被験者対象で、全測定項目からクレアチニンを除外したもので解析**

LCN2濃度と有意に相関する因子	β値	p値
eGFR	-0.151	0.014
WBC	0.194	0.001
sTNF-R2	0.271	<0.001
尿酸	0.176	0.002

**非糖尿病患者で、全測定項目からクレアチニンを除外したもので解析**

LCN2濃度と有意に相関する因子	β値	p値
eGFR	-0.254	<0.001
WBC	0.191	0.004
sTNF-R2	0.215	0.009
尿酸	0.174	0.008

LCN2 濃度とクレアチニン, eGFR, WBC, sTNF-R2, 尿酸値が有意に相関した。

非糖尿病患者の臨床血液データにおいても LCN2 濃度とクレアチニン, eGFR, WBC, sTNF-R2, 尿酸値が有意に相関した。

## 第5章 LCN2 遺伝子発現におよぼす LPS および TNF- $\alpha$ の相乗効果の検討

### 第1節 概要

TNF- $\alpha$  は単球/マクロファージ由来の炎症性サイトカインとして知られている。しかし、血中 TNF- $\alpha$  は半減期が短く、その血中濃度は炎症状態を反映しないとの報告がある。一方 sTNF-R は、半減期が長く、血中に TNF- $\alpha$  の 100 倍以上存在しており、血中 TNF- $\alpha$  濃度と相関することから TNF- $\alpha$  活性を反映するバイオマーカーとして認識されている(40-43)。そこで臨床血液データにおいて、LCN2 と有意な相関を示した sTNF-R2 に注目し、LCN2 発現におよぼす TNF シグナルの関与を検討した。

### 第2節 材料および方法

#### 1. 細胞および細胞培養

第2章第2節の1と同様に CRL-1927 メサングウム細胞細株および RAW264.7 マクロファージ細胞株を使用した。CRL-1927 と RAW264.7 の共培養系(図5)に、1 ng/ml LPS および 1 ng/ml recombinant TNF- $\alpha$  (Sigma) を添加し、0, 4, 8, 12, 24 時間後のメサングウム細胞の total RNA を RNeasy Mini kit を用いて回収した。

#### 2. リアルタイム PCR 解析

ReverTraAce qPCR RT Kit を用いて、生成した RNA の逆転写反応を行い、cDNA を得た。KAPA SYBER FAST qPCR Kit を用いて、逆転写反応によって合成した cDNA を鋳型として 7300 Real TimePCR system を用い、リアルタイム PCR 解析を行った。GAPDH 遺伝子をハウスキーピング遺伝子として相対定量をおこなった。

#### 3. 統計分析

第2章第2節の5を参照。

### 第3節 結果

メサングウム細胞ーマクロファージ共培養系に LPS 刺激および TNF- $\alpha$  刺激を加えたメサングウム細胞は, LPS 単独刺激, TNF- $\alpha$ 単独刺激の場合と比較して高い LCN2 の遺伝子発現を示した(図 6)。

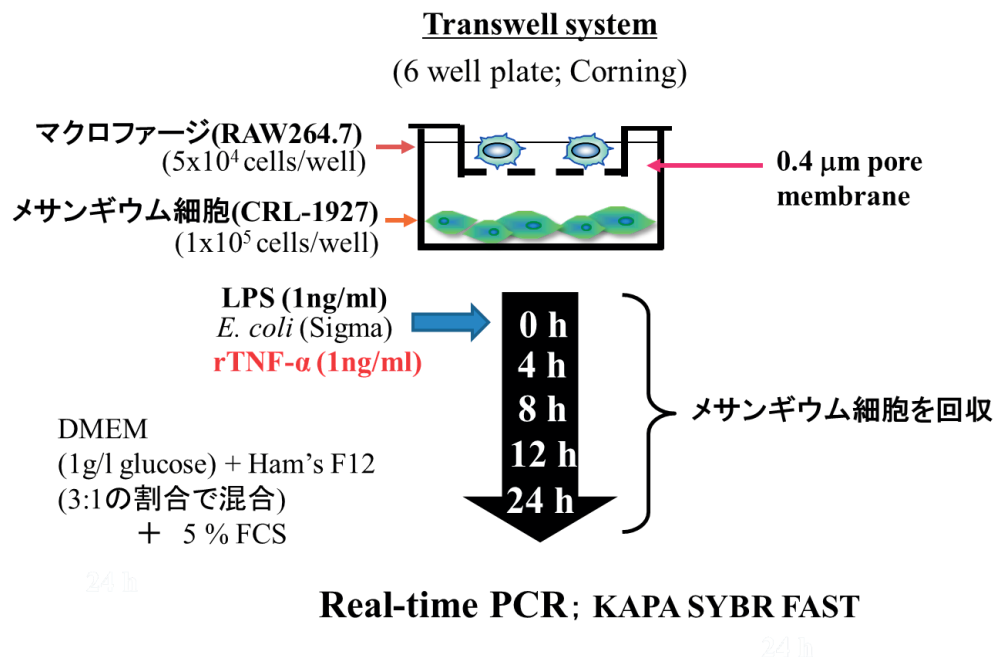


図 5

共培養系への LPS および rTNF- $\alpha$  添加

LPS および TNF- $\alpha$  刺激後 0, 4, 8, 12, 24 時間培養後のメサンギウム細胞の total RNA を回収し, *Lcn2* の遺伝子発現を調べた。

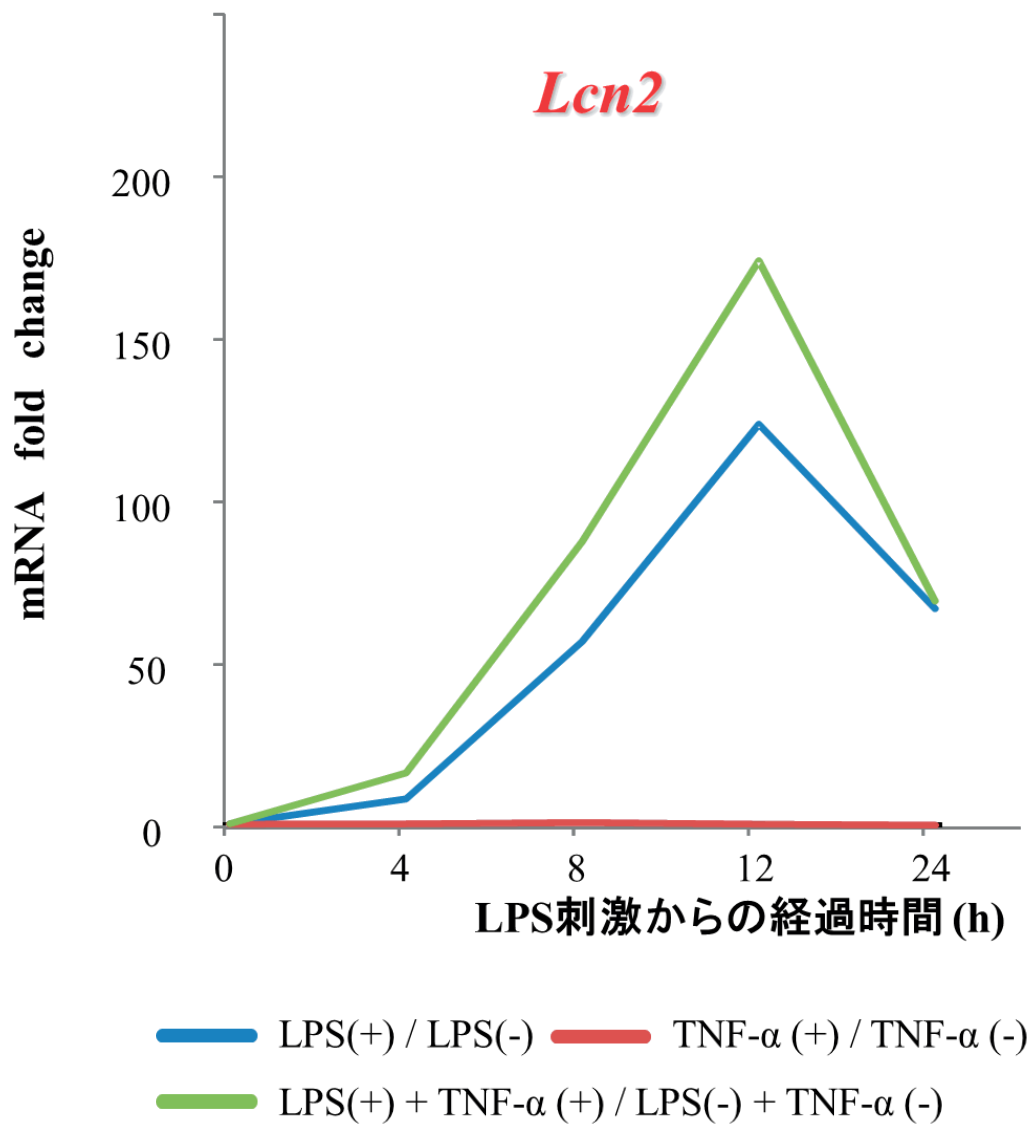


図 6

LPS, TNF-α刺激時の共培養下メサンギウム細胞の mRNA 発現変動

LPS および TNF-αで刺激するとそれぞれの単独刺激に比べて *Lcn2* 遺伝子発現が増加した。

## 第6章 考察

軽微な炎症は、インスリン抵抗性、内臓脂肪蓄積およびアテローム性動脈硬化症などのいわゆるメタボリックシンドロームのコンポーネント疾患の病因に関与しているといわれており、またこれらはいずれも CKD 同様、CVD の危険因子でもある(4,44)。軽微な炎症は CKD の病因に直接関係するとされており(45)、メサングウム領域へのマクロファージ浸潤は、動物モデルおよびヒトの両者においても観察されている(10)。一方で、マクロファージと共培養した脂肪細胞では、LPS 刺激の有無にかかわらず、DNA マイクロアレイ解析によって、発現の亢進が確認された多くの遺伝子が、炎症関連遺伝子であることが報告されている(46)。本研究では、脂肪細胞の代わりにメサングウム細胞を用いて共培養を行い検討したところ、単球/マクロファージの誘導に関与する遺伝子の発現が亢進し、そのタンパク質産生量も増加した。LCN2 は、腎疾患では尿細管細胞から産生されることが報告されている(31)。しかし、本研究において LPS 刺激下メサングウム細胞-マクロファージ共培養系におけるメサングウム細胞で、LCN2 遺伝子発現が著しく亢進することを新規に見出した。メサングウム細胞の代わりに脂肪細胞を用いて同様の実験を行った場合は、LCN2 遺伝子発現に何ら変化は認められなかった(46)ことから LCN2 はメサングウム領域の炎症を特異的に示すマーカーとなり得る可能性がある。事実、後半の疫学研究の結果から、LCN2 は eGFR だけでなく WBC とも相関しており、これは軽微な炎症によって、血清 LCN2 濃度が増加する可能性があることを強く示唆している。

LPS 刺激下脂肪細胞とマクロファージを用いた共培養モデルにおいては、2 hit theory が提唱されている(46)。これは、まず LPS が両細胞を直接刺激し、続いて LPS 刺激によって活性化したマクロファージ由来 TNF- $\alpha$ などが脂肪細胞を刺激することによって 2 相性の活性パターンがあらわれることを意味している。本研究においても、DNA マイクロアレイ解析のタイムコースの結果、同様の傾向が確認された。しかし、リアルタイム PCR 解析において、LCN2 遺伝子の発現は、時間依存的に徐々に大きくなるように見えた。この違いを生じさせる理由は不明だが、リアルタイム PCR 解析では、TNF- $\alpha$ 発現は DNA マイクロアレイ解析よりも早期に誘導され、相乗効果が早期に起こった可能性が考えられる。実際問題 LPS と TNF- $\alpha$ の両方を同時

に共培養系に添加した場合では、時間依存的に LCN2 遺伝子の発現が増加しておりリアルタイム PCR 解析と類似の発現パターンを示していた(図 6)。

血清 LCN2 濃度は、糖尿病性腎症患者に加え、末期以外の CKD 患者において上昇している(28, 29)。さらに、尿および血清 LCN2 濃度は、急性腎障害である IgA 腎症においても上昇することが報告されており、LCN2 が腎尿細管損傷の早期マーカーになり得ることが示唆されている(47)。本研究においても、血清 LCN2 濃度は、被験者の糸球体濾過能の低下と相関を示した。このように、LCN2 は、早期腎機能障害の指標となり得る可能性があるが、本研究の問題点の一つとして、尿中 LCN2 濃度の測定データが無いことが挙げられる。尿中 LCN2 濃度は、糸球体濾過率、間質性線維症および尿細管萎縮に関連していることが示唆されており (31)、腎機能障害の早期マーカーとしての血清および尿中 LCN2 濃度の感度および精度を比較することが、今後求められる。これまでの多くの研究では、IgA 腎症を含む急性腎障害における、LCN2 の主な産生源は傷害を受けた尿細管細胞であると報告されてきた (31, 48, 49)。一方で、本研究ではメサングウム細胞が炎症性刺激に応答して LCN2 を産生し、LCN2 は単に腎尿細管細胞の傷害のマーカーとなるだけでなく、濾過能の低下を伴う腎症のマーカーになる可能性が示唆された。

CKD は、タンパク尿、濾過機能の低下、またはその両方がみられる腎障害として定義される。しかし本研究では、尿中タンパクの有無は血清 LCN2 濃度と相関しなかった。この理由については、(i) 被験者が定期的な健康診断の受診者であり、著しいタンパク尿患者が非常に少なかったこと、(ii) 健診におけるタンパク尿の分析が定性的なものであり、定量的なデータが得られなかったことおよび、(iii) タンパク尿よりさらに感度の高いアルブミン尿を測定できなかったことなどが考えられる。

本研究において、著しい損傷が無い培養メサングウム細胞であっても炎症刺激によって顕著に LCN2 を産生することを明らかにした。このことから LCN2 の産生は、メサングウム細胞においては細胞損傷よりもむしろ腎機能障害とより強い関連性があるものと考えられる。近年、LCN2 は、単なる CKD の進行マーカーであるだけでなく、epidermal growth factor receptor (EGFR) を経由して腎尿細管細胞の増殖因子としての役割がある

可能性が示唆されており、CKD の進行に積極的に関与する可能性が考えられる(28)。実際、LCN2 遺伝子欠損マウスで腎機能が改善することが報告されている(30)。つまり、炎症状態のメサングウム細胞で過剰発現した LCN2 は、パラクリンに腎上皮細胞に対して増殖因子として作用する可能性がある。

本研究では、血清 LCN2 濃度はクレアチニン、eGFR だけでなく、血清 sTNF-R2 濃度とも相関した。一方、腎症患者において血清 sTNF-R2 濃度が上昇することが報告されている(50)。本研究の *in vitro* 実験で LPS と TNF- $\alpha$ は、LCN2 遺伝子発現を相乗的に亢進させた。つまり、腎組織に浸潤したマクロファージ由来 TNF- $\alpha$ および LPS などの toll-like receptor 4 (TLR4) リガンドが、メサングウム細胞からの LCN2 遺伝子発現を亢進させると推察する。TNF- $\alpha$ は、血管内皮透過性を調節し、血行動態を変化させることで、糸球体濾過能低下に関連していることが示唆されている(51)。また TNF- $\alpha$ は、今回の *in vitro* 実験において発現亢進を確認した MCP-1 と共に、単球/マクロファージの誘導に関与する。腎組織へのマクロファージの浸潤は、炎症に続く組織の線維化を進展させ、動脈性腎硬化症の病態形成に関与することも示唆されている(52)。

マクロファージの浸潤は、糖尿病性腎症の原因となるだけでなく、進行性糸球体腎炎の上皮細胞増殖および、IgA 腎症のメサングウム細胞増殖のような組織の線維化や修復にも関与している(53)。したがって、CKD においても、マクロファージの浸潤や活性化は、アテローム硬化性変化および間質性線維症などの進行を起こす可能性があると考えられる(54)。

近年、外因性 LPS のみならず、TLR4 リガンドとして酸化 LDL などの内因性リガンドの存在が報告されており(55)、脂質異常症の状態でも LPS 刺激を受けた場合と同様の炎症反応が惹起される可能性がある。すなわち、このことは、メタボリックシンドロームが CKD のリスク因子になることを説明し得る一要因となることを意味するものと考ええる。

今後、腎症の進展に及ぼす LCN2 の詳細な働きをさらに明らかにすることによって、疾患マーカーとしてのみでなく、CKD の治療上の新たな標的の確立につながると考える。

## 第7章 総括

軽微な慢性炎症が CKD の進行に寄与する可能性が示唆された。

また、LCN2 は、これまで腎尿細管細胞の傷害マーカーとして捉えられてきたが、軽微な慢性炎症によってメサンギウム細胞からも産生され、腎症の重症度を反映するマーカーになり得ることを明らかにした。

## 参考文献

1. Nishimura F, Taniguchi A, Iwamoto Y, Soga Y, Fukushima M, Nagasaka S, Nakai Y, Murayama Y: Porphyromonas gingivalis infection is associated with elevated C-reactive protein in nonobese Japanese type 2 diabetic subjects. *Diabetes Care* 2002; 25: 1888
2. Iwamoto Y, Nishimura F, Soga Y, Takeuchi K, Kurihara M, Takashiba S, Murayama Y: Antimicrobial periodontal treatment decreases serum C-reactive protein, tumor necrosis factor- $\alpha$ , but not adiponectin levels in patients with chronic periodontitis. *J Periodontol* 2003; 74: 1231–1236
3. Munenaga Y, The Hiroshima Study Group, Yamashina T, Tanaka J, Nishimura F: Improvement of glycated hemoglobin in Japanese subjects with type 2 diabetes by resolution of periodontal inflammation using adjunct topical antibiotics: Results from the Hiroshima Study. *Diabetes Res Clin Pract* 2013; 100:53–60
4. Femández-Real JM, Ricart W: Insulin resistance and chronic cardiovascular inflammatory syndrome. *Endocr Rev* 2003; 24:278–301
5. Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, Neyrinck AM, Fava F, Tuohy KM, Chabo C, Waget A, Delmée E, Cousin B, Sulpice T, Chamontin B, Ferrières J, Tanti JF, Gibson GR, Casteilla L, Delzenne NM, Alessi MC<sup>4</sup> and Burcelin R: Metabolic Endotoxemia Initiates Obesity and Insulin Resistance. *Diabetes* 2007; 56: 1761–1772
6. Moutsopoulos NM and Madianos PN: Low-Grade Inflammation in Chronic Infectious Diseases :paradigm of periodontal infections. *Ann NY Acad Sci* 2006; 1088: 251–264
7. Nagata M, Ninomiya T, Doi Y, Yonemoto K, Kubo M, Hata J, Tsuruya K, Iida M, Kiyohara Y: Trends in the prevalence of chronic kidney disease and its risk factors in a general Japanese population: the Hisayama Study. *Nephrol Dial Transplant* 2010; 25:4123–4124
8. 中井 滋, 井関邦敏, 伊丹儀友, 尾形 聡, 風間順一 郎, 木全直樹, 重松隆, 篠田俊雄, 庄司哲雄, 鈴木 一之, 谷口正智, 土田健司, 中元秀友, 西 裕志, 橋 本整司, 長谷川毅, 花房規男, 濱野高行, 藤井直彦, 政金生人, 丸林誠二, 守田 治, 山縣邦弘, 若井建志, 和田篤志, 渡邊有三,

- 椿原美治, 日本透析医学会統計調査委員会: わが国の慢性透析療法の現況 (2010 年 12 月 31 日現在). 透析会誌 2012; 45:1-47
9. Jha JC, Jandeleit-Dahm KA, Cooper ME: New insights into the use of biomarkers of diabetic nephropathy. *Adv Chronic Kidney Dis*; 21: 318-326
  10. Kon V, Linton MF, Fazio S. Atherosclerosis in chronic kidney disease: the role of macrophages. *Nat Rev Nephrol* 2011; 7: 45-54
  11. 日本透析医学会統計委員会: 2013 年末の慢性透析患者に関する基礎集計: 図説わが国の慢性透析療法の現況(<http://docs.jsdt.or.jp/overview/index.html>)
  12. Gross ML, Dicow R, Ritz E. Diabetic nephropathy: recent insights into the pathophysiology and the progression of diabetic nephropathy. *Kidney Int Suppl* 2005; 41: S50-S53
  13. ADVANCE Collaborative Group, Patel A, MacMahon S, Chalmers J, Neal B, Billot L, Woodward M, Marre M, Cooper M, Glasziou P, Grobbee D, Hamet P, Harrap S, Heller S, Liu L, Mancia G, Mogensen, CE, Pan C, Poulter N, Rodgers A, Williams B, Bompoint S, Galan BE, Joshi R, Travert F: Intensive blood glucose control and vascular outcomes in patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2008; 358: 2560-2572
  14. 日本腎臓学会: CKD 診療ガイド 2012. 日腎会誌 2012; 54: 1031-1189
  15. Haas M: Histologic subclassification of IgA nephropathy: a clinicopathologic study of 244 cases. *Am J Kidney Dis*. 1997; 29: 829-842
  16. Correa JD, Núñez EM, Fuentes MM, Fernández CM, González JFN: Inflammatory Cytokines in Diabetic Nephropathy. *J Diabetes Res* 2015; 948417, 9
  17. Furuta T, Saito T, Ootaka T, Soma J, Obara K, Abe K, Yoshinaga K: The Role of Macrophages in Diabetic Glomerulosclerosis. *Am J Kidney Dis* 1993; 21: 480-485
  18. Ninomiya T, Kiyohara Y, Kubo M, Yonemoto K, Tanizaki Y, Doi Y, Hirakata H, Iida M: Metabolic syndrome and CKD in a general Japanese population: the Hisayama Study. *Am J Kidney Dis* 2006; 48: 383-391
  19. Wickman C, Kramer H: Obesity and kidney disease: potential mechanisms. *Semin Nephrol* 2013; 33: 14-22
  20. Arici M1, Walls J: End-stage renal disease, atherosclerosis, and

cardiovascular mortality: is C-reactive protein the missing link?

*Kidney Int* 2001; 59: 407-414

21. Saremi A, Nelson RG, Reid MT, Hanson RL, Sievers ML, Taylor GW, Shlossman M, Bennett PH, Genco R and Knowler WC: Periodontal Disease and Mortality in Type 2 Diabetes. *Diabetes Care* 2005; 28: 127–132
22. Shultis WA, Weil J, Looker HC, Curtis JM, Shlossman M, Genco RJ, Knowler WC and Nelson RG: Effect of Periodontitis on Overt Nephropathy and End-Stage Renal Disease in Type 2 Diabetes. *Diabetes Care* 2005; 30: 306–311
23. Fisher MA, Taylor GW, West BJ and McCarthy ET: Bidirectional relationship between chronic kidney and periodontal disease: a study using structural equation modeling. *Kidney Int* 2011; 79: 347–355
24. Iwasaki M, Taylor GW, Nesse W, Vissink A, Yoshihara A, Miyazaki H: Periodontal Disease and Decreased Kidney Function in Japanese Elderly. *AM J Kidney Dis* 2012; 59:202–209
25. Iwasaki M, Taylor GW,Manz MC, Kaneko N, Imai S, Yoshihara A, Miyazaki H: Serum Antibody to Porphyromonas gingivalis in Chronic Kidney Disease. *J Dent Res* 2012; 91: 828–833
26. Schmidt-Ott KM, Mori K, Li JY, Kalandadze A, Cohen DJ, Devarajan P, Barasch J: Dual action of neutrophil gelatinase-associated lipocalin. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18: 407–413
27. Srinivasan G, Aitken JD, Zhang B, Carvalho FA, Chassaing B, Shashidharamurthy R, Borregaard N, Jones DP, Gewirtz AT, Vijay Kumar M: Lipocalin 2 deficiency dysregulates iron homeostasis and exacerbates endotoxin-induced sepsis. *J immunology* 2012; 189: 1911–1919
28. Bolignano D, Lacquaniti A, Coppolino G Donato V, Campo S, Fazio MR, Nicocia G, Buemi M: Neutrophil gelatinase associated lipocalin (NGAL) and progression of chronic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol* 2009; 4: 337–344
29. Woo K-S, Choi J-L, Kim B-R, Kim JE, An WS, Han JY: Urinary neutrophil gelatinase associated lipocalin levels in comparison with glomerular filtration rate for evaluation of renal function in patients with diabetic chronic kidney disease. *Diabetes Metab J* 2012; 36: 307–313

30. Viau a, Karoui KE,Laouari D,Burtin M, Nguyen C, Mori K, Pillebout E, Berger T, Mak TW, Knebelmann B, Friedlander G, Barasch J and Terzi F: Lipocalin 2 is essential for chronic kidney disease progression in mice and humans. *J Clin Invest* 2010; 120: 4065–4076
31. Nickolas TL, Forster C, Sise ME, Barasch N, Solá-Del Valle D, Viltard M, Buchen C, Kupferman S, Carnevali ML, Bennett M, Mattei S, Bovino A, Argentiero L, Magnano A, Devarajan P, Mori K, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Allegri L, Barasch J: Monomeric neutrophil gelatinase associated lipocalin is associated with tubulointerstitial damage in chronic kidney disease. *Kidney Int* 2012; 82: 718–722
32. Alberi KG, Zimmeret PZ: Definition, diagnosis, and classification of diabetes and its complications. Part 1. Diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. *Diabetic Med* 1998; 15: 539–553
33. Taniguchi A, Nagasaka S, Fukushima M, Sakai M, Okumura T, Yoshii S, Watanabe T, Ogura M, Yamadori N, Nin K, Kuroe A, Yamada Y, Seino Y, Nakai Y: C-reactive protein and insulin resistance in non-obese Japanese type 2 diabetic patients. *Metabolism* 2001; 51: 1578–1581
34. Yatagai T, Nagasaka S, Taniguchi A, Fukushima M, Nakamura T, Kuroe A, Nakai Y, Ishibashi S: Hypoadiponectinemia is associated with visceral fat accumulation and insulin resistance in Japanese men with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism* 2003; 52: 1274–1278
35. Okumura T, Taniguchi A, Nagasaka S, Sakai M, Fukushima M, Kuroe A, Yoshii S, Nakamura T, Ogura M, Atarashi T, Nishida S, Nakai Y: Relationship of regional adiposity to serum leptin level in nonobese Japanese type 2 diabetic male patients. *Diabetes Metab* 2002; 29: 15–18
36. Taniguchi A, Fukushima M, Nakai Y, Ohgushi M, Kuroe A, Ohya M, Seino Y: Soluble tumor necrosis factor receptor 1 is strongly and independently associated with serum homocysteine in nonobese Japanese type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 2006; 29: 949–950
37. Ohya M, Taniguchi A, Fukushima M, Nakai Y, Kawasaki Y, Nagasaka S, Kuroe A, Taki Y, Yoshii S, Hosokawa M, Inagaki N, Seino Y: Three measures of tumor necrosis factor alpha activity and insulin

- resistance in nonobese Japanese type 2 diabetic patients. *Metabolism* 2005; 54: 1297–1301
38. Seino Y, Nanjo K, Tajima N, Kadowaki T, Kashiwagi A, Araki E, Ito C, Inagaki N, Iwamoto Y, Kasuga M, Hanafusa T, Haneda M, Ueki K: Report of the committee on the classification and diagnostic criteria of diabetes mellitus. *J Diabetes Invest* 2010; 1: 212–228
  39. Imai E, Horio M, Nitta K et al, Yamagata K, Iseki K, Tsukamoto Y, Ito S, Makino H, Hishida A, Matsuo S: Modification of the modification of diet in renal disease (MDRD) Study equation for Japan. *Am J Kidney Dis* 2007; 44: 923–927
  40. Gohda T, Niewczas MA, Ficociello LH, Walker WH, Skupien J, Rosetti F, Cullere X, Johnson AC, Crabtree G, Smiles AM, Mayadas TN, Warram JH and Krolewski AS: Circulating TNF Receptors 1 and 2 Predict Stage 3 CKD in Type 1 Diabetes. *J Am Soc Nephrol* 2012; 23: 516–524
  41. van Riemsdijk-van Overbeeke IC, Baan CC, Hesse CJ, Loonen EH, Niesters HG, Zietse R, Weimar W TNF-alpha: mRNA, plasma protein levels and soluble receptors in patients on chronic hemodialysis, on CAPD and with end-stage renal failure. *Clin Nephrol* 2000; 53:115–123
  42. Liu KD, Glidden DV, Eisner MD, Parsons PE, Ware LB, Wheeler A, Korpak A, Thompson BT, Chertow GM, Matthay MA: National Heart, Lung, and Blood Institute ARDS Network Clinical Trials Group. *Crit Care Med* 2007; 35: 2755–2761
  43. 深山 雄大, 和田 尚弘, 鶴野 裕一, 山田 昌由, 北山 浩嗣: *Yersinia pseudotuberculosis* 感染による急性尿細管間質性腎炎リスクファクターの検討. *日児腎誌* 2013; 26: 187–193
  44. Samak MJ: Cardiovascular complications in chronic kidney disease. *Am J Kidney Dis* 2003; 41: 11–17
  45. Cirillo P, Sautin YY, Kanellis J Kang DH, Gesualdo L, Nakagawa T, Johnson RJ: Systemic inflammation, metabolic syndrome and progressive renal disease. *Nephrol Dial Transplant* 2009; 24: 1384–1387
  46. Yamashita A, Soga Y, Iwamoto Y, Asano T, Li Y, Abiko Y, Nishimura F: DNA microarray analyses of genes expressed differentially in 3T3-L1 adipocytes co-cultured with murine macrophage cell line RAW 264.7 in

- the presence of the toll-like receptor 4 ligand bacterial endotoxin. *Int J Obese* 2008; 32: 1725–1729
47. Ding H, He Y, Li K, Yang J, Li X, Lu R, Gao W: Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) is an early biomarker for renal tubulointerstitial injury in IgA nephropathy. *Clin Immunol* 2007; 123: 227–234
  48. Kuwabara T, Mori K, Mukoyama M, Kasahara M, Yokoi H, Saito Y, Yoshioka T, Ogawa Y, Imamaki H, Kusakabe T, Ebihara K, Omata M, Satoh N, Sugawara A, Barasch J, Nakao K.: Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin levels reflect damage to glomeruli, proximal tubules, and distal nephrons. *Kidney Int* 2009; 75: 285–294
  49. AKasahara M, Mori K, Satoh N, Kuwabara T, Yokoi H, Shimatsu A, Sugawara A, Mukoyama M, Nakao K.: Reduction in urinary excretion of neutrophil gelatinase-associated lipocalin by angiotensin receptor blockers in hypertensive patients. *Nephrol Dial Transplant* 2009; 24: 2608–2610
  50. Izumi Y, Yabe D, Taniguchi A, Fukushima M, Nakai Y, Hosokawa M, Okumura T, Nin K, Matsumoto K, Nishimura F, Nagasaka S, Seino Y: Circulating TNF receptor 2 is associated with the development of chronic kidney disease in non-obese Japanese patients with type 2 diabetes. *Diab Res Clin Pract* 2013; 99: 145–150
  51. Lim AKH, Tesch GH: Inflammation in diabetic nephropathy. *Mediators Inflamm* 2012; 2012: 146154
  52. Kopp JB: Rethinking hypertensive kidney disease: arterionephrosclerosis as genetic, metabolic, and inflammatory disorder. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2013; 22: 266–272
  53. Buemi M, Senatore S, Corica F, Aloisi C, Romeo A, Cavallaro E, Floccari F, Tramontana D, Frisina N: Statins and progressive renal disease. *Medicinal Res Rev* 2002; 22: 76–84
  54. Anders HJ, Ryu M: Renal microenvironments and macrophage phenotypes determine progression or resolution of renal inflammation and fibrosis. *Kidney Int* 2011; 80: 915–925
  55. Erridge C: Endogenous ligands of TLR2 and TLR4: agonists or assistants? *J Leukoc Biol* 2010; 87: 989–999