

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08593

研究課題名(和文)DKDが近年増加している原因の分子メカニズムの解明

研究課題名(英文)Elucidation of the molecular mechanisms responsible for the recent increase in DKD

研究代表者

富永 辰也(TOMINAGA, Tatsuya)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・准教授

研究者番号：80425446

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：BMP4はポドサイトのアポトーシスを誘導し、同時にメサンギウム基質増生を惹起させる因子であり腎障害を引き起こす。女性が閉経後から動脈硬化が進行しやすくなるように、エストロゲン受容体などの核内受容体と動脈硬化の関連性は強く、大動脈石灰化を誘導するBMP2/4は、核内受容体であるEstrogen Related Receptor (ERR)の調整を受ける。核内受容体に作用するリガンド物質は、腎硬化症を含むDKDの治療薬として期待される。これらの検証報告を元に、腎硬化症を含む動脈硬化性腎障害について、ERRとBMP4の詳細な分子機序を明らかにし、腎症抑制作用を持つ低分子化合物について研究を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病性腎症の主たる病変であるメサンギウム基質増加がBMP4/Smad1シグナル系によって惹起される。糸球体硬化病変の本態は、メサンギウム基質の増生、ポドサイト喪失、糸球体血管内皮の透過性亢進であり、単独で起こるものではない。各細胞で連鎖的に起こる障害と他細胞へ波及するメカニズムを総合的に分析し、病態を把握することが治療薬開発の土台になる。本研究は、実際の臨床上の未解決な問題に対して、腎硬化症への特異性を追求するため、血圧以外の病態発症メカニズムの検証を行い、腎機能低下に直結する分子の同定と、分子標的治療の開発へと新規分野を開拓するものであり、病態の理解にも、実臨床上也意義が大きい。

研究成果の概要(英文)：BMP4 is a factor that induces apoptosis of podocytes and at the same time induces mesangial matrix proliferation, leading to renal injury. Women are more likely to develop atherosclerosis after menopause because of the strong association between nuclear receptors, such as estrogen receptors, and atherosclerosis. The BMP2/4 that acts to induce aortic calcification is modulated by the nuclear receptor, Estrogen Related Receptor (ERR). Ligand substances that act on nuclear receptors are expected to be therapeutic agents for DKD, including nephrosclerosis. Based on these reports, we investigated the detailed molecular mechanisms of ERR and BMP4 in atherosclerotic kidney damage including nephrosclerosis, and studied the effects of low molecular weight compounds on the inhibition of nephropathy.

研究分野：腎臓

キーワード：腎硬化症 DKD BMP4 ERR

1. 研究開始当初の背景

国内の透析導入の原因は、糖尿病性腎症、慢性糸球体腎炎、腎硬化症の順に多い。高血糖の厳格な治療が進み糖尿病性腎症患者数は減少した一方で、腎硬化症を含む非典型症例は増加している。特に腎硬化症は、高齢化に伴いその割合が増加しており、高年齢で発見された時には腎萎縮が進行しており透析導入に至る。腎硬化症は持続的な高血圧によって、細動脈や小動脈における内膜の肥厚やフィブリノイド壊死などの動脈硬化病変により血管内腔が狭窄することで、糸球体虚血から糸球体硬化を引き起こすとされていた。しかし、高血圧の罹病期間と腎硬化症の程度が必ずしも相関しないことなどから、腎硬化症は必ずしも長期間の高血圧のみによる変化ではないという報告もある。また、腎硬化症は通常腎生検の適応がないことが、診断の信頼性に問題を起こし、正しく診断できず他の病態に分類される症例も多々あるとされ、実際の患者数はさらに多いと考えられている。大血管と細小血管の両者に異常が認められる動脈硬化性腎障害は、糖尿病性腎臓病 (DKD) のうち、近年増加している非典型症例に含まれ、発症原因の解明が急がれている。研究代表者は、糖尿病性腎症 (DN) の発症進展に BMP4 (Bone morphogenetic protein 4) が作用することを明らかにしてきた。我々は「核内受容体である Estrogen Related Receptor (ERR) と Bone morphogenetic protein 4 (BMP4) の作用について新規の腎硬化症の分子病態機序」を見出した。核内受容体に作用するリガンド物質は、腎硬化症を含む DKD の治療薬として期待される。

2. 研究の目的

腎硬化症の主な治療は、降圧療法であり腎硬化症の病変を修復させる薬剤はなく、根本的治癒を望めず患者数の増加に歯止めをかけられていない。DN の発症進展に作用する BMP4 は、血管新生・分化、脂肪細胞分化、造血幹細胞分化など恒常性維持に作用する一方で、血管障害を含む様々な疾患形成を促すサイトカインである。全身の BMP4 作用から腎硬化症を含む動脈硬化性腎障害の発症機序を解明し、原因分子とそれらの抑制化合物を探索することを目的とした。女性が閉経後から動脈硬化が進行しやすくなるように、エストロゲン受容体などの核内受容体と動脈硬化の関連性は強い。大動脈石灰化を誘導する BMP2/4 は、核内受容体である ERR の調整を受ける。ERR はオーファン核内受容体であるが、内在性リガンドの詳細は未解明である。糖尿病マウスへ ERR (α , β , γ) の各種 agonist を投与したところ尿蛋白抑制効果を示し、構造解析から治療薬の開発に繋がること期待される。ERR と BMP4 の作用について、新規の腎硬化症の分子病態機序を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

Ti2Cre マウスと CAG-CAT-Bmp4 マウスを交配させ (Bmp4xTie2 マウス) 血管内皮に BMP4 を発現させることで、BMP4 の腎硬化症と動脈硬化への作用を解析した。血管周辺への BMP4 増加により血管近傍と血管周囲の病理学的解析を行なった。血液中に増加した BMP4 が、腎臓の虚血障害、脂肪細胞の分化に影響するか調べることで、腎硬化症と関連があることを示す。具体的には、BMP4 の増加による血管内皮の α SMA 発現の増加、白色脂肪細胞の増加、組織リンパ球浸潤と病態形成の進行度との関連性について検証した。SM22 Cre マウスと CAG-CAT-Bmp4 マウスを交配させ血管平滑筋特に BMP4 を発現させる、同様の解析を行なった。アテローム性動脈硬化を呈するとされる ApoE 欠損マウスは、通常食飼育下でも高脂血症を起こすとされている。ApoE 欠損マウスと Bmp4xTie2 マウス、Bmp4xSM22 マウスを比較し、腎硬化症の発症原因を追求した。核内受容体 ERR を介した BMP4 調整がもたらす腎硬化症を含む動脈硬化性腎障害を抑える化合物のスクリーニングを行った。ERR を標的とするフラボノイドの一種 Kaempferol の骨格を元に化合物ライブラリーから調査を行い、骨格のフェノールの OH 基数、カルボキシル基の位置、分子量 200~1000 などを条件にして、候補化合物を得た。ERR をターゲットとした創薬分子の検証結果から得られた数種類の化合物について、db/db マウスにて効能効果の検証を行った。

4. 研究成果

Bmp4xTie2Cre マウスと Bmp4xSM22Cre マウスは、血管内皮または中膜に BMP4 を発現させることで腹部大動脈にプラークを形成し、腎細動脈の中膜および外膜の肥厚を引き起こし腎硬化様の病理所見を示した (図 1, 2)。また、糸球体虚血性変化による糸球体硬化と尿細管間質の間質障害を引き起こした (図 3)。腎細動脈が肥厚した周囲の腎組織に α SMA, Desmin を高発現する線維芽細胞の増殖による間質線維化を起こした (図 4)。また、これらのマウスでは高齢者の腎組織で形成される三次リンパ組織と類似するリンパ組織の増加が認められ、炎症の誘導、線維芽細胞の増殖を伴った組織病変を呈した。さらに、変異動物の一部で収縮期血圧が 140mmHg を越す個体を確認した。腎臓の血管周囲に間質障害が起こっており、BMP4 によって線維化が亢進されたと示唆される。

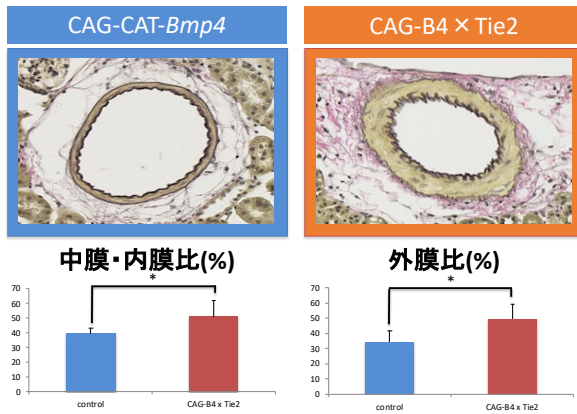


図 1) Bmp4xTie2 マウス：腎血管の肥厚

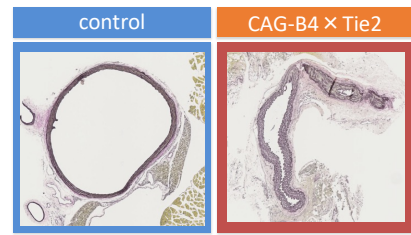


図 2) Bmp4xTie2 マウス：大動脈の肥厚

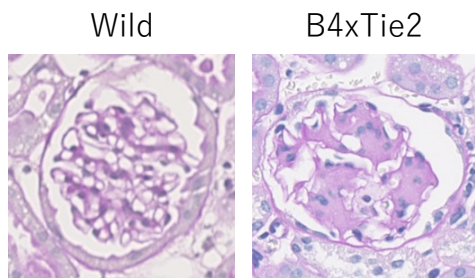


図 3) Bmp4xTie2 マウス：糸球体虚血性変化による糸球体障害

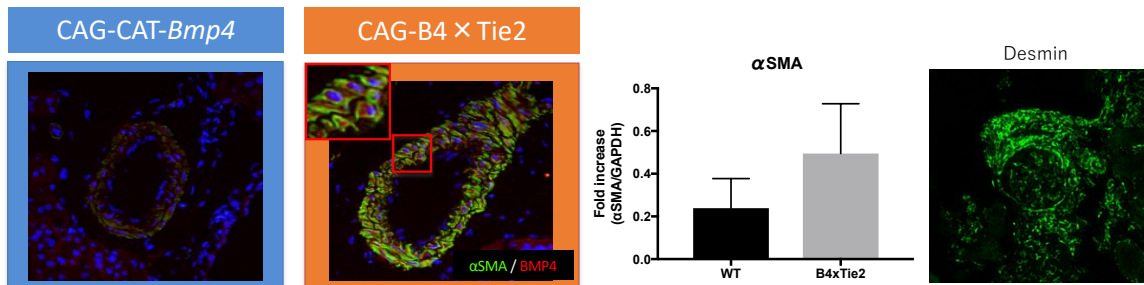


図 4) Bmp4xTie2 マウス：αSMA, Desmin 発現

コントロールマウスに比べて血中 TG が上昇しており、脂質代謝異常を引き起こしていることが示唆された。BMP4 発現マウスにて血清脂質が上昇したことから、ApoE KO の腎組織解析を行った。40 週齢以降の ApoE KO マウスでは、腎血管周囲と糸球体内に BMP4 の発現を認め、糸球体に血栓様物質の沈着と間質線維化を引き起こしていた (図 5)。動脈硬化時に血管周囲に増加する BMP4 が、炎症、血管膠原線維の増加を誘導し、虚血性の腎障害を引き起こしていることが示唆された (図 6)。

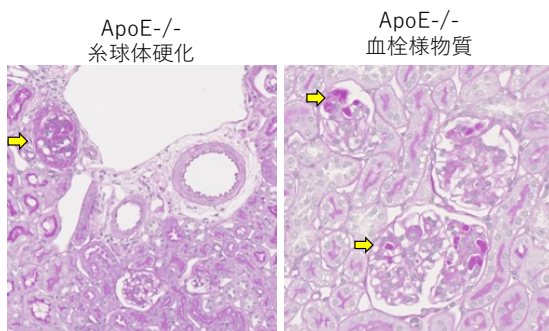


図 5) ApoE KO マウス：糸球体硬化, 糸球体内沈着物

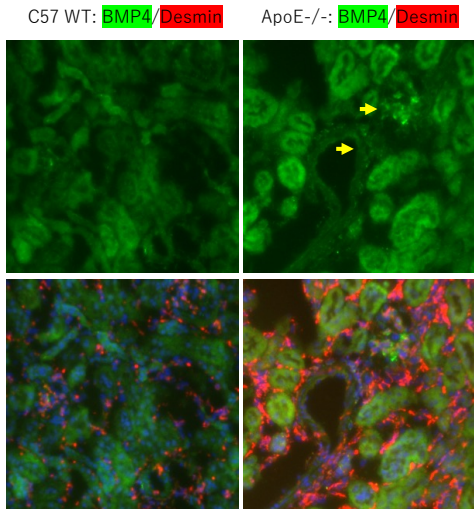


図 6) ApoE KO マウス : BMP4, Desmin 発現

ERR を介した BMP4 がもたらす腎硬化症を含む動脈硬化性腎障害を抑える化合物のスクリーニングを行った。ERR を標的とする Kaempferol の骨格を元に候補化合物を選定した。腎メサンギウム細胞と腎血管内皮細胞を用いた *in vitro* 試験を実施し、ERR (α , β , γ) への作用として BMP4、VEGF 発現を抑制する化合物が得られた。 *in vitro* 試験で効果を認めた化合物を用いて、2 型糖尿病モデルマウス (db/db マウス) に腹腔内投与し検証した。一部の化合物投与群でタンパク尿、血清クレアチニンが減少していた。また、血糖改善効果を示す化合物が得られた (図 7)。

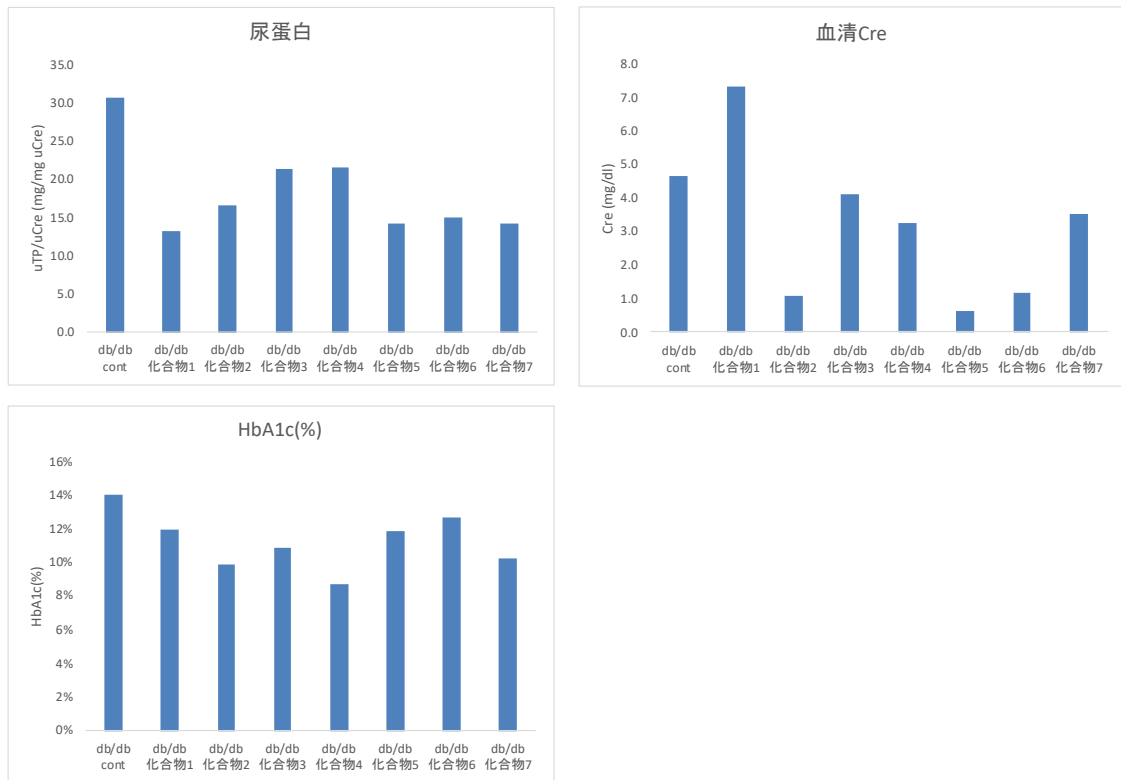


図 7) db/db マウスでの治療薬候補化合物検証 : 尿蛋白, 血清 Cre, HbA1c

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ueda Sayo, Tominaga Tatsuya, Ochi Arisa, Sakurai Akiko, Nishimura Kenji, Shibata Eriko, Wakino Shu, Tamaki Masanori, Nagai Kojiro	4. 巻 11
2. 論文標題 TGF- 1 is involved in senescence-related pathways in glomerular endothelial cells via p16 translocation and p21 induction	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-01150-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田村花菜子、若林龍矢、櫻井明子、富永辰也
2. 発表標題 血管内皮特異的BMP4発現マウスへの高脂肪食負荷による影響について
3. 学会等名 第45回徳島県医学検査学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 若林龍矢、田村花菜子、櫻井明子、富永辰也
2. 発表標題 腎線維化病変発症機序の解析
3. 学会等名 第45回徳島県医学検査学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 若林 龍矢、櫻井 明子、越智 ありさ、富永 辰也
2. 発表標題 腎硬化症における小胞体ストレス分子メカニズムの解析
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 越智 ありさ, 櫻井 明子, 太田 浩二, 飛永 恭兵, 若林 龍矢, 脇野 修, 右手 浩一, 富永 辰也
2. 発表標題 高吸水性ポリマーを用いた新規エクソソーム精製法
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宮城 将展, 若林 龍矢, 櫻井 明子, 富永 辰也
2. 発表標題 腎脂質代謝異常とERストレスの作用機序について 「ApoE欠損動脈硬化症モデルマウスでの検討」
3. 学会等名 第46回徳島県医学検査学会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	安部 秀斉 (ABE Hideharu) (60399342)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・准教授 (16101)	
研究 分担者	田詩 昌憲 (TAMAKI Masanori) (90528902)	徳島大学・病院・講師 (16101)	
研究 分担者	長井 幸二郎 (NAGAI Kojiro) (40542048)	徳島大学・病院・講師 (16101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------