

機関番号 : 14301

研究種目 : 若手研究 (B)

研究期間 : 2009~2010

課題番号 : 21790808

研究課題名 (和文) 加齢と腎障害を架橋する新規シグナル伝達経路の解明

研究課題名 (英文) MOLECULAR MECHANISM OF GLOMERULOSCLEROSIS IN AGING

研究代表者

松原 雄 (MATSUBARA TAKESHI)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号 : 90422964

研究成果の概要 (和文) :

加齢性腎障害の主要病理像の一つに糸球体硬化があり、糸球体中の IV 型コラーゲン増加を特徴とする。本研究では、その機序解明のため、同様の病理像を来す糖尿病モデルマウスを用いた。まず、IV 型コラーゲンの制御因子 Smad1 の強発現により糸球体硬化が加速すること、それには Smad1 の上流因子 BMP4 が必要であることを証明した。現在、BMP4 と加齢との関連を検討中である。次に、細胞老化関連因子 PIASy が転写因子 E2A の SUMO 化を促進し、メサンギウム細胞の形質変化を介して糸球体硬化に関与することを証明した。

研究成果の概要 (英文) :

Glomerulosclerosis is the most common cause of chronic renal failure in aging. It is pathologically characterized by the accumulation of extracellular matrix in mesangium, of which main component is type IV collagen (Col4). Recently, we identified Smad1 as a direct regulator of Col4 under diabetic condition *in vitro*. To elucidate the mechanism of glomerulosclerosis in aging, we addressed the role of Smad1 in glomerulosclerosis during diabetes. First, we showed overexpression of Smad1 exacerbates glomerulosclerosis in diabetic mice, and identified bone morphogenetic protein 4 (BMP4) as a potent stimulator of Smad1 during diabetes. Now we are checking the role of BMP4 for biological aging process. Id (Inhibitor of differentiation), one of the important transcriptional factors regulated by Smad1, is known to inhibit basic-helix loop helix protein such as E2A, and to regulate cellular senescence. We showed that PIASy, which was also identified as a regulator of cellular senescence, is also a novel E2A binding partner, and enhances its sumoylation as a specific SUMO-E3 ligase, leading to down-regulate phenotypic changes of mesangial cells.

交付決定額

(金額単位 : 円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：(1) 老化 (2) 細胞・組織 (3) 病理学

## 1. 研究開始当初の背景

高齢者の腎不全は、近年急速に増加している。加齢が腎障害の加速因子であることは疫学的に証明されているが、分子生物学的な機序は不明であり、その解明が急務である。加齢に伴う腎障害の代表的病理像は糸球体硬化であり、糖尿病性腎症のそれと酷似しているため、その病変形成には共通の過程が存在すると考えられる。近年、糖尿病性腎症の進展に重要な役割を果たす終末糖化産物(AGE)が加齢に伴う腎障害にも関与していることが示された。従って、加齢性腎障害の分子機構を解明するためには、AGE蓄積による糸球体硬化の制御因子に注目し、それらと老化関連因子との相互作用の機構を解明することが重要である。

糸球体硬化ではメサンギウム細胞におけるIV型コラーゲン(Co14)の産生増加およびメサンギウム細胞の形質変化が生じる。近年、AGE刺激下でCo14を直接制御する分子のcloningを試み、Smad1を見いだした。その結果、AGE刺激によりメサンギウム細胞にSmad1が誘導され、Co14発現を直接制御することを世界で初めて証明し(JBC 279, 14201-6, 2004)、硬化の指標となりえることを明らかにした(Labo invest 86, 347-68, 2006, Diabetes 57, 1712-22, 2008)が、生体における糸球体硬化とSmad1の機能的役割は未だ不明である。

また、Smad1は老化関連因子Id1(Nature 409, 1067-70, 2000)の上流に位置することが知られている。実際、申請者が確立したSmad1過剰発現メサンギウム細胞は老化細胞のごとく、細胞は巨大化、扁平化し、増

殖速度遅延を認めた。以上から、糸球体硬化制御因子Smad1は、細胞老化調節因子と関連している可能性が示唆され、Smad1を修飾する新たなシグナル伝達経路を解析することで、細胞老化制御と臓器老化(=糸球体硬化)の新たな相互調節機構を解明すると考えられた。

## 2. 研究の目的

上記背景を受け、本研究では、1)糸球体硬化におけるSmad1の役割を生体で明らかにするとともに、2)硬化制御因子Smad1の修飾する老化関連因子を検索することにより、加齢現象と糸球体硬化症とを有機的に架橋する新たなシグナル伝達経路を解明する。

## 3. 研究の方法

### 1) Smad1過剰発現マウスの作成

糸球体硬化におけるSmad1の役割を生体で検討する明らかにするために、Smad1強発現マウスを作成し、これに糸球体硬化を来す代表的疾患で、かつ、加齢による腎障害と同様の病理変化を来すとされている糖尿病を惹起して、起こりえる変化を検討した。

### 2) Smad1を修飾する関連分子の検索

Smad1の下流に位置する老化関連因子Id1は転写因子basic Helix loop helix蛋白E2Aの活性を制御する働きがあり、E2Aも細胞老化にともなう細胞の形質変化に深く関わる因子であることが知られている。

従って、E2AをBaitとしたyeast-two hybrid法を用いてE2A関連因子を検索し、その因子の腎障害における役割を検討した。

#### 4. 研究成果

##### 1) 硬化制御因子 Smad1 は生体においても糸球体硬化に重要な役割を果たす

まず、Chicken  $\beta$ -actin プロモーターを用いて全身で Smad1 を強発現するトランスジェニックマウス (Smad1-Tg) を作成し、その糸球体病変を解析した。しかしながら Smad1-Tg では糸球体リン酸化 Smad1 の増加はなく、組織学的にも野生型と差を認めなかった。そこで、次にストレプトゾトシンを用いて糖尿病を惹起し、その腎病変を検討した。その結果、糖尿病 Smad1-Tg は、野生型に比して、16 週より尿アルブミン排泄量が増加し、36 週には著明なリン酸化 Smad1 の増加と、メサンギウム基質の拡大が認められ、糸球体中 Col4 の発現上昇のみならずメサンギウム形質変化の指標である平滑筋(アクチン)(SMA)の発現も亢進していた。以上から、「Smad1 の強発現マウスは糖尿病に伴う Smad1 のリン酸化及び活性化により腎症が加速する」ということが示された。(学会発表 1-4)

さらに、糸球体硬化進展に際し、Smad1 のリン酸化を行う因子を検討した。Smad1 は TGF- $\beta$ ファミリーの刺激を伝える細胞内シグナル伝達分子であり、主に骨形成因子 (BMP) のシグナルを受けて細胞内でリン酸化を受ける。腎では、BMP2, 4, 7 の発現が多いことが知られていることから、糖尿病性腎症の糸球体におけるこれらの分子およびその受容体の発現を検討した。その結果、糖尿病では糸球体のリン酸化 Smad1 とともに BMP4 およびその受容体 ALK3 の発現が増加しており、免疫染色を用いた検討により、増加した BMP4 はおもに足細胞に、ALK3 はおもにメサンギウム領域に存在することがわかった。(学会発表 1-4)

そこで、さらに、全身で BMP4 を強発現す

るマウス (BMP4-Tg) を作成し、その腎病変を解析した結果、BMP4-Tg では糖尿病を惹起せずとも糸球体 Smad1 の著明なリン酸化と著しい糸球体硬化が認められた。(文献 2)

以上から、「糖尿病性糸球体硬化の進展には BMP4/Smad1 シグナルが関与する」ことが示された。

糸球体硬化は糖尿病でも加齢でも共通して見られる病理像である。また、予備実験では、加齢とともに糸球体の BMP4 の発現が増加することや Smad1 のリン酸化が増加することも確認している。今後は BMP4/Smad1 シグナルの加齢性糸球体硬化における役割を検討する予定である。

##### 2) 細胞老化制御因子 PIASy は E2A の SUMO 化によりメサンギウム細胞の形質変化を制御して腎障害進展に関与する

加齢による糸球体硬化には糸球体を構成するメサンギウム細胞の形質変化が重要であると考えられている。メサンギウム細胞の形質変化に深く関わる分子、平滑筋・アクチン(SMA)の発現制御の一つとして、プロモーター内の E-box 配列に結合する E2A 蛋白を中心とした複合体の関与が知られている。今回、我々は新たな E2A 結合蛋白同定のため、E2A の一つ E12 を bait としてマウスメサンギウム細胞の cDNA ライブラリーを用いた Yeast two-hybrid を施行し、SUMO E3 Ligase の一つでテロメア非依存性細胞老化制御因子でもある PIASy を同定した。まず、免疫沈降法を用いて PIASy と E12 の結合および、PIASy 強発現による E12 の SUMO 化促進を確認した。E12 の強発現によりメサンギウム細胞における SMA の転写活性は約 3 倍に上昇したが、PIASy を強発現させるとその上昇は阻害され、逆に PIASy を knockdown すると SMA は上昇した。さらに、形質変化を引き起こす TGF- $\beta$ 刺激に

より(SMA と共に PIASy も時間・容量依存的に増加した。また、Thy1 腎炎では糸球体の(SMA 発現に相関して PIASy だけでなく E12、TGF- $\beta$  も経時的に変化した。以上から、PIASy はメサンギウム細胞の形質変化と共に誘導され、E12 と共役しその変化を抑制性に制御することが示唆された。(学会発表 8)

#### 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 6 件)

1. Kishi S, Abe H, Akiyama H, Tominaga T, Murakami T, Mima A, Nagai K, Kishi F, Matsuura M, Matsubara T, Iehara N, Ueda O, Fukushima N, Jishage K, Doi T: SOX9 protein induces a chondrogenic phenotype of mesangial cells and contributes to advanced diabetic nephropathy: J Biol Chem. 286(37): 32162-9. 2011(査読有), doi: 10.1074/jbc.M111.244541
2. Tominaga T, Abe H, Ueda O, Goto C, Nakahara K, Murakami T, Matsubara T, Mima A, Nagai K, Araoka T, Kishi S, Fukushima N, Jishage K, Doi T: Activation of bone morphogenetic protein 4 signaling leads to glomerulosclerosis that mimics diabetic nephropathy, J Biol Chem. 286(22): 20109-16, 2011(査読有), doi: 10.1074/jbc.M110.179382
3. Mima A, Abe H, Nagai K, Arai H, Matsubara T, Araki M, Torikoshi K, Tominaga T, Iehara N, Fukatsu A, Kita T, Doi T: Activation of Src mediates PDGF-induced Smad1 phosphorylation and contributes to the progression of glomerulosclerosis in glomerulonephritis, PLoS One. 6(3): e17929, 2011(査読有), doi:10.1371/journal.pone.0017929
4. Abe H, Matsubara T, Arai H, Doi T: Role of Smad1 in diabetic nephropathy: Molecular mechanisms and implications as a diagnostic marker, Histol Histopathol. 26(4): 531-41, 2011(査読有), doi:該当なし
5. Araoka T, Abe H, Tominaga T, Mima A, Matsubara T, Murakami T, Kishi S, Nagai K, Doi T: Transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) regulates activin receptor-like kinase 1 (ALK1)/Smad1 pathway for development of diabetic nephropathy, Mol Cells. 30(3), 209-18, 2010(査読有), doi: 10.1007/s10059-010-0109-9
6. 松原 雄, 家原 典之, 深津 敦司: 電解質異常(低カリウム血症, 高カルシウム血症)(特集 腎障害をきたす全身性疾患--最近の進歩), 日本内科学会雑誌, 100(5), 1313-1318, 2011(査読なし), doi 該当なし

[学会発表] (計 11 件)

1. Takeshi Matsubara, Hideharu Abe, et. al: BMP4/Smad1 Signaling: A Novel Therapeutic Target for the Progression of Diabetic Nephropathy, (Oral presentation), the American Diabetes Association's 71st Scientific Sessions, 26. 6. 2011; San Diego, CA, USA
2. Takeshi Matsubara, Hideharu Abe, et. al: OVEREXPRESSION OF Smad1 EXACERBATES GLOMERULAR LESIONS IN DIABETIC NEPHROPATHY THROUGH BMP-4,

- (Poster presentation), The World Congress of Nephrology 2011, 8. 4. 2011; Vancouver, Canada
3. Takeshi Matsubara, Hideharu Abe, et. al: BMP4/Smad1 Signaling Is a Critical Therapeutic Target for Diabetic Nephropathy, (Poster presentation), Renal Week 2010 American Society of Nephrology Annual Meeting, 17. 11. 2010; Denver, CO, USA
  4. Takeshi Matsubara, Hideharu Abe, Otoy Ueda, Kou-ichi Jishage, Akira Mima, Chisato Goto, Tatsuya Tominaga, Makoto Araki, Kazuo Torikoshi, Kojiro Nagai, Noriyuki Iehara, Atsushi Fukatsu, Naoshi Fukushima, Hidenori Arai, Toshio Doi: Overexpression of Smad1 Causes Remarkable Glomerulosclerosis in Diabetic Mice, (Poster presentation), the American Diabetes Association's 70th Scientific Sessions, 26, 6, 2010; Orlando, FL, USA
  5. 松原 雄, 家原典之, 土井俊夫: 低ナトリウム血症とその治療, 第41回日本腎臓学会西部学術大会, (口演), 2011年10月1日, 徳島
  6. 松原 雄, 長尾和浩, 他: IV型コラーゲン $\alpha$ 5鎖の新規変異と濃厚な家族歴を有し、遺伝性腎炎が疑われた一例, 第41回日本腎臓学会西部学術大会, 2011年9月30日, (口演), 徳島
  7. 松原 雄, 安部秀斉, 他: 糖尿病性腎症における糸球体硬化とアルブミン尿には異なる病態形成機構が存在する, 第54回日本腎臓学会学術総会, (口演), 2011年6月17日, 横浜
  8. 鳥越和雄, 大島隆幸, 平野隆弘, 安部秀斉, 松原 雄, 荒木 真, 家原典之, 深津敦司, 荒井秀典, 土井俊夫: PIASyはメサングウム細胞においてE12と共役しSMAの発現を制御する, 第54回日本腎臓学会学術総会, (口演), 2011年6月17日, 横浜
  9. 松原 雄, 安部 秀斉, 他: IV型コラーゲンの転写制御因子Smad1は骨形成因子BMP4を介して糖尿病性腎症進展に中心的役割を果たす, 糖尿病合併症学会, (口演), 2010年10月23日, 大津
  10. 松原 雄, 大久保 和俊, 他: 経時的に観察し得た移植後膜性腎症の一例, 第40回日本腎臓学会西部学術大会, (ポスター), 2010年10月8日, 広島
  11. 松原 雄, 安部秀斉, 他: 糖尿病性腎症に関わる新たな治療標的分子の検討, 第53回日本腎臓学会学術総会, (口演), 2010年6月16日, 神戸
  12. 松原 雄, 安部秀斉, 他: Smad1は糖尿病性糸球体硬化症の進展に重要な役割を果たす, 日本臨床分子医学会学術総会, (口演), 2010年4月10日, and 東京
6. 研究組織
- (1) 研究代表者  
松原 雄 (MATSUBARA TAKESHI)  
 京都大学 医学研究科・助教  
 研究者番号: 90422964
- (2) 研究分担者 なし
- (3) 連携研究者  
 荒井秀典 (ARAI HIDENORI)  
 京都大学 医学研究科 教授  
 研究者番号: 60232021  
 安部秀斉 (ABE HIDEHARU)  
 徳島大学・大学院・  
 ヘルスバイオサイエンス研究部・准教授  
 研究者番号: 60399342  
 土井俊夫 (DOI TOSHIO)  
 徳島大学・大学院・  
 ヘルスバイオサイエンス研究部・教授  
 研究者番号: 60183498  
 家原典之 (IEHARA NORIYUKI)  
 京都大学・医学研究科・助教  
 研究者番号: 20281727

(4)研究協力者

長井 幸二郎 (NAGAI KOJIRO)

徳島大学・大学院・

ヘルスバイオサイエンス研究部・助教

美馬 晶 (MIMA AKIRA)

徳島大学・大学院・

ヘルスバイオサイエンス研究部・助教