

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591201

研究課題名(和文) 加齢に伴うネフロン減少の分子病態の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanism underlying aging-related nephron loss

## 研究代表者

安部 秀斉 (ABE, Hideharu)

徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部・准教授

研究者番号：60399342

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：高齢化社会を背景として、加齢に伴う腎機能低下が問題となっている。しかし、加齢に伴うネフロンの減少、さまざまなストレスが加わった早期老化が腎構成細胞においてどのように進行し、ネフロンの減少が加速されるかは、不明な点が多い。我々はこれまでにSmad1が糸球体硬化の形成に中心的な役割を果たすことを示してきた。Smad1の下流因子で、細胞老化を制御するE12タンパクの結合分子が糸球体では不明であり、Y2Hによって新規結合分子Flashを得た。Flashは、非糖尿病条件下で、E12によって誘導される細胞老化促進因子p21waf1/cip1の発現を抑制し、メサンギウム細胞の細胞老化の形質を抑制した。

研究成果の概要(英文)：It seems likely with the increases in the incidence of diabetes, vascular disease, and the general aging of the population that the true prevalence of CKD has increased, but it is very hard to make a precise diagnosis and predict the prognosis. Molecular mechanisms leading to nephron loss with normal aging or with aging accompanying some CKD remains unknown. We previously Smad1 plays a critical role for the initiation of glomerulosclerosis. Mesangial cells isolated from Smad1 transgenic mice exhibit typical changes of cellular senescence. Since E12 proteins induce p21waf1/cip1 under non-diabetic conditions and thereby promote cellular senescence. We conducted to screen E12-binding proteins using Y2H method and found Flash (casp8ap2) protein. Flash critically suppress TNFalpha-p21-dependent cellular senescence in a p53-independent manner. Moreover, high dose of TNFalpha induces Flash expression in parallel with a decrease of p21waf1/cip1. Collectively, Flash might be a therapeutic target.

研究分野：腎不全治療

キーワード：慢性腎臓病 細胞老化 加齢 Smad1

### 1. 研究開始当初の背景

高齢化社会を背景として、慢性腎臓病 (CKD: chronic kidney disease) を有する患者人口が増加している。わが国では 65 歳以上の男性の約 30%、女性の約 40% が CKD 患者である (Clin Exp Nephrol 11, 156-63, 2007)。血液ろ過の機能ユニットであるネフロン数の減少は、通常の血液・尿の検査においてなんら異常を認めず、また自覚症状もないまま、30~40 歳代から、その数が減少をはじめることが以前より知られている。こうした加齢による変化に加えて、現代では、生活習慣の変化による糖尿病・高血圧・脂質異常症・高尿酸血症などにより、ネフロンの障害・喪失は加速され、腎機能低下がより進行する。特に糖尿病人口の増大により、10~15 年後には末期腎不全・透析患者が爆発的に増加する予測がたてられている。これらの疾患の治療に必要とされる医療費の増加に対する対策は医療上、社会上、そして経済的側面からも、21 世紀のわが国における喫緊の課題となっている。現状では、こうした CKD に対しては、主に、腎保護を目的として、アンジオテンシン系抑制薬をはじめとする降圧療法、食事療法が行われているが、腎不全への進展をわずかに遅延させるのみである。また、分子病態が不明であるため、加齢による腎機能低下に対する具体的な対策はなされていない。したがって、今後、高齢化がより加速していくことが確実視されている現状を踏まえると、加齢によるネフロン喪失の分子機序、ならびに現代病ともいべき生活習慣病を有した高齢者におけるネフロンの障害促進の分子病態を解明し、旧来の治療に加えて、加齢腎に特異性の高く、有効な治療法の開発を行うことは急務といえる。

### 2. 研究の目的

CKD の概念が広く認識されてきたが、高齢化社会の到来によって、加齢に伴う腎機能低下が問題となっている。新規透析導入患者のうち、60% が 65 歳以上の高齢者である。しかし、生理的な加齢に伴うネフロンの減少、ならびに糖尿病などの生活習慣病による糖化・酸化・虚血ストレスなどが加わった早期老化 premature senescence が各腎構成細胞においてどのような影響をおよぼすことでネフロンの減少が加速され、腎機能低下に結びつくかに関する機序は不明な点が多い。本研究代表者は、現在、末期腎不全から透析導入となる最大の原因である糖尿病性腎症の発症・進展の機序解明の過程で、転写因子 Smad1 のクローニングに成功し、糸球体硬化症の特徴である細胞外基質増加に関わる遺伝子群 IV 型コラーゲン、I 型コラーゲン、HSP47、SMA (smooth muscle actin) を直接制御し、糸球体硬化の発症に中心的な役割を果たしていることを見いだしてきた (J Biol Chem 279, 14201-14206, 2004, J Biol

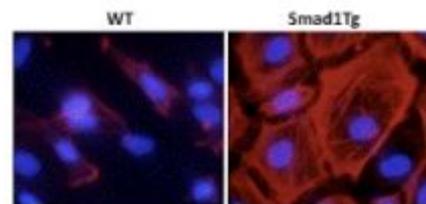
Chem 279, 19816-19823, 2004)。また、30~40 歳代のヒト腎組織中には AGE の沈着を認めないにも関わらず、硬化が進行しはじめた糸球体では Smad1 の発現が誘導されており、ネフロンの障害が進展中であることがわかった。この分子病態を明らかにすることで、今後、確実視されている高齢者の腎不全の進行を抑制する新たな治療法の糸口を見いだす。

### 3. 研究の方法

すでに老化研究の分野では以前より、p16, p21, p27, p53, Id1, Id2, RB などの老化制御因子が同定されてきている。また、これら因子は、TGF や BMP によって転写制御を受けていることも明らかにされている。一方、糸球体構成細胞であるメサンギウム細胞の形質転換と細胞老化の相互作用に関する分子病態も明らかになっていない。糖尿病性腎症において病態形成の中心的な役割を果たしていた TGF- $\alpha$ -ALK1-Smad1 と BMP4-ALK3/6-Smad1 という dual pathway が生理的な加齢や、AGE 非依存的な腎炎などの条件下でどのように活性化され、最終的なネフロンの喪失に至るかは不明な点が多く、上述の老化制御因子の発現調節との cross-talk により病変形成が進行するものと考えられる。本研究では、これらの分子機序の解明のために、(1) 糖尿病 or 非糖尿病条件下の腎構成細胞の継代における老化関連分子の in vitro 解析、(2) 高齢マウスにおける Smad1 活性化機構解明、(3) メサンギウム細胞障害時の AGE 非依存的 Smad1 誘導・活性化調節分子の同定、(4) 培養メサンギウム細胞を用いた形質転換と細胞老化の相互作用に関する解析を行い、生理的老化および早期老化によるネフロン喪失の進行過程の分子機序を解明し、有効な抑止策がないまま増加し続けている加齢を背景とした CKD の進展の病態を明らかにする。

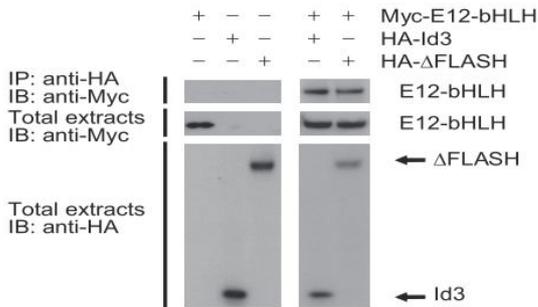
### 4. 研究成果

メサンギウム細胞障害時の AGE 非依存的 Smad1 誘導・活性化調節分子の同定のために、Smad1 transgenic マウスより、メサンギウム細胞の初代培養を樹立した。すると、早期老化の特徴である、細胞の巨大化、扁平化、および増殖速度遅延を認めた



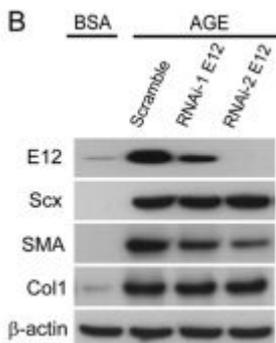
得られた Smad1 発現調節系において、特に下流で発現が誘導される増殖および形質転換に関わる分子である E2A に着目をした。E2A は、細胞特異的 bHLH 型転写因子と heterodimer を形成することが知られていた

こと、正常メサンギウム細胞においては、これまで、特異的 bHLH 型転写因子が未同定であったことから、E2A タンパク質に結合するタンパク質の網羅的解析を行った。マウスメサンギウム細胞 cDNA ライブラリーを用いて、Yeast two-hybrid assay を施行したところ、既知の結合タンパクで、ubiquitous に発現する Id3 ともう一つ新たな分子を同定した。得られた FLICE-associated huge protein (Flash) は E2A の新規共役分子であった。



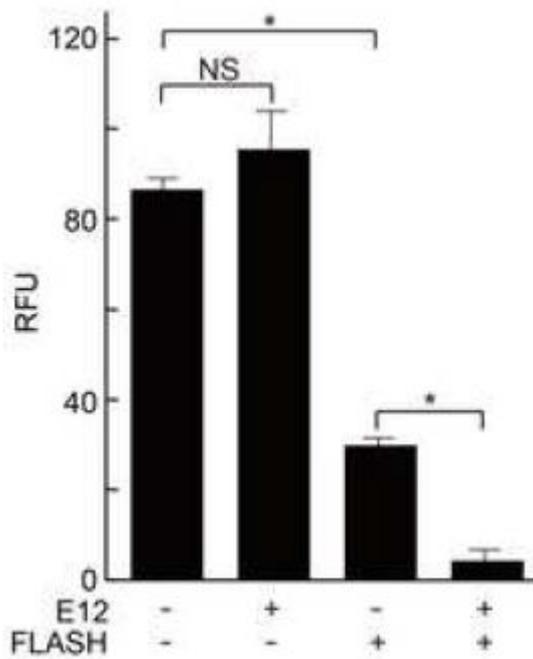
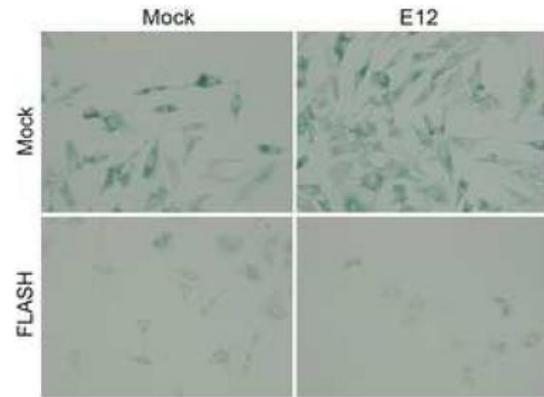
メサンギウム細胞において、Flash を siRNA によりノックダウンすると細胞増殖が抑制された。しかし、同時に E2A もノックダウンするとその抑制効果は減弱した。一方、E2A を過剰発現させると、CDK インヒビターである p21 waf1/cip1 が増加したが、Flash 過剰発現下では p21 waf1/cip1 の増加は消失した。メサンギウム増殖性腎炎ラットにおいては、メサンギウム増殖期に糸球体内で E2A および Flash の発現上昇を認めた。

一方、強制発現による解析では、E12 だけでは、メサンギウム細胞の増殖を促進しなかった。反面、糖尿病条件下では、形質転換のマーカーである SMA に対して、発現量が並行していることが確認できた。

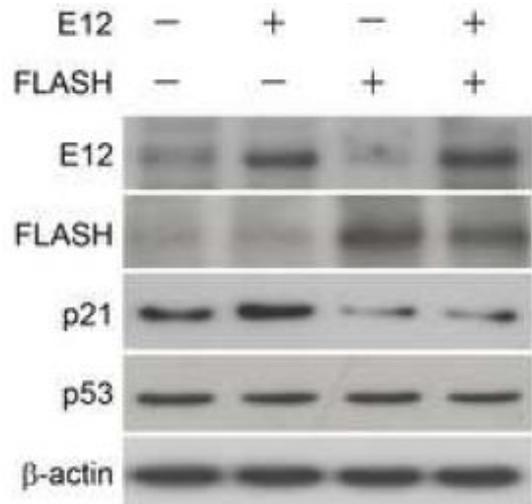


老化関連分子群の機能をより明確にするために、E12 タンパク質の強制発現を行うと、細胞増殖には影響は与えなかったものの、p21waf1/cip1 の誘導が認められ、それは、Flash の co-overexpression によってキャンセルされた。このことから、メサンギウム細胞の増殖には、E12 と Flash の interaction が重要であることが示唆された。さらに、p21 waf1/cip1 は premature senescence をさまざまな細胞において誘導することが知られていたが、p21waf1/cip1 を誘導する E12 の overexpression によっても premature senescence の誘導が確認できた。細胞老化の

活性測定においても、同様であった。



そして、その誘導は Flash の co-overexpression によって、大部分がキャンセルされた。また、一方、p21 の誘導は p53 によることが多いが、メサンギウム細胞においては、p53 を介さない p21 の誘導であることも確認された。



こうした結果から、例えば癌細胞においては、細胞老化の誘導は、癌細胞の増殖を抑制

する、形質を modulate するなどの点で、成体応答としての protective な現象であると考えられている。同様に、腎障害においても、protective な側面が示唆され、かつ、Flash という新規分子が、増殖ならびに形質転換のブレーキ役を担っていることも考察された。E12 および p21 が Smad1, BMP4 の下流分子であることから、生理的加齢、早期老化による腎機能低下に対する分子治療の標的として Flash がなりうる可能性が示唆された。

#### 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 2 件)

Dual involvement of growth arrest-specific gene 6 in the early phase of human IgA nephropathy.

Nagai K, Miyoshi M, Kake T, Fukushima N, Matsuura M, Shibata E, Yamada S, Yoshikawa K, Kanayama HO, Fukawa T, Yamaguchi K, Izaki H, Mima A, Abe N, Araoka T, Murakami T, Kishi F, Kishi S, Tominaga T, Moriya T, Abe H, Doi T. PLoS One. 2013 Jun 24;8(6):e66759. 査読有 doi: 10.1371/journal.pone.0066759

Polymorphism in the human matrix Gla protein gene is associated with the progression of vascular calcification in maintenance hemodialysis patients.

Yoshikawa K, Abe H, Tominaga T, Nakamura M, Kishi S, Matsuura M, Nagai K, Tsuchida K, Minakuchi J, Doi T. Clin Exp Nephrol. 2013 17(6):882-889 査読有 doi: 10.1007/s10157-013-0785-9

〔学会発表〕(計 4 件)

Flash と E2A の新規相互作用は TNF- $\alpha$ -p21 によって細胞増殖と細胞老化を制御する  
小野 広幸、平野 隆弘、櫻井明子、土井俊夫、安部秀斎  
第 37 回 日本分子生物学会年会  
2014 年 11 月 24 日-26 日 パシフィコ横浜(神奈川県、横浜市)

High-Density Lipoprotein Cholesterol and Matrix Gla Protein Are Implicated in the Progression of Aortic Calcification through Bone Morphogenetic Protein 4- or Activin-Like Kinase 1-Induced Smad1 Activation in Patients Undergoing Maintenance Hemodialysis.

Yoshikawa K, Abe H, Matsuura M, Nagai K, Mima A, Shibara E, Minakuchi J, Doi T.

46<sup>th</sup> American Society of Nephrology (ASN) Annual Meeting, Atlanta, GA, U.S.A., Nov. 6, 2013

Multiple regulatory pathways of BMP-Smad axis through a sclerosis-specific basic HLH transcription factor in diabetic nephropathy

Fujita Y, Sakurai A, Tominaga T, Hayashi S, Abe N, Doi T, Abe H

#### 第 86 回日本生化学会大会

2013 年 9 月 11 日-13 日パシフィコ横浜(神奈川県、横浜市)

BMP4 regulates podocyte injury in the diabetic nephropathy.

Tominaga T, Abe H, Nagai K, Kishi S, Ueda O, Jishage K, Fukushima N, Doi T

American Diabetes Association 72th Scientific Session, Philadelphia, PA, U.S.A., Jun. 6-8, 2012

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.tokudai-kidney.jp/>

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

安部 秀斎 (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

(2) 研究分担者

安部 尚子 (ABE, Naoko)

徳島大学・病院・特任助教

研究者番号: 70623271

岸 誠司 (KISHI, Seiji)

徳島大学・病院・助教

研究者番号: 10519507