

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 4 月 20 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461221

研究課題名(和文)系球体発生シグナルに着目した糖尿病性腎症進展機序の解明と新規治療薬の開発

研究課題名(英文)Molecular mechanisms of mesangial matrix expansion in the progression of diabetic nephropathy

研究代表者

松原 雄 (Matsubara, Takeshi)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：90422964

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病性腎症の病理像は系球体の細胞外基質増加であり、その制御は腎症の新たな治療法となり得る。近年我々は、細胞外基質の主成分IV型コラーゲンの直接制御因子としてSmad1を同定し、そのリン酸化制御因子として骨形成因子4(BMP4)を同定した。本研究では、糖尿病性腎症におけるSmad1/BMP4の役割を検討した。まず、Smad1過発現マウスでは糖尿病性腎症が悪化することを示し、次に、糖尿病マウスにBMP4中和抗体を投与すると腎症が抑制されることを示した。BMP4/Smad1は系球体の発生に重要なシグナルとして注目されているが、本研究ではこのシグナルが糖尿病性腎症の新たな治療標的になることを示した。

研究成果の概要(英文)：Diabetic nephropathy is pathologically characterized by the accumulation of extracellular matrix in the mesangium, of which the main component is 1/2 type IV collagen (Col4). Recently, we identified Smad1 as a direct regulator of Col4 under diabetic conditions in vitro. Here, we demonstrate that Smad1 plays a key role in diabetic nephropathy through bone morphogenetic protein 4 (BMP4) in vivo. Smad1-overexpressing mice were established, and the induction of diabetes resulted in greater mesangial expansion. We also identified BMP4 as a regulatory factor of Smad1 in diabetic nephropathy and showed that diabetic mice treated with a BMP4-neutralizing antibody exhibited decreased Smad1 phosphorylation and less mesangial expansion than those with control IgG. Our data indicate that BMP4/Smad1 signaling is a critical cascade for the progression of mesangial expansion and that blocking this signal could be a novel therapeutic strategy for diabetic nephropathy.

研究分野：腎臓内科学

キーワード：病理学 糖尿病性腎症

## 1. 研究開始当初の背景

糖尿病腎症の主たる病理所見は糸球体硬化である。糸球体硬化の特徴はメサンギウム基質の増加であり、主要成分は糸球体内のメサンギウム細胞により産生されるIV型コラーゲン $\alpha 1/\alpha 2$ 鎖(Col4)である。

申請者らは、このCol4の直接制御因子こそが、糖尿病腎症の治療戦略の新たな鍵であると考え、酵母を用いて網羅的に、Col4のプロモーター結合分子を検索し、Smad1を同定した(安部, 松原ら *J Biol Chem.* 2004)。そして、Smad1が糖尿病条件下のメサンギウム細胞において誘導され、リン酸化を受け、Col4のプロモーターに結合し、その転写が亢進することを示した。さらに、ストレプトゾトシン糖尿病ラットでも糸球体硬化の程度に非常に相関して、Smad1が増加していることを証明した(松原, 安部ら *Labo invest.* 2006)。しかし、Smad1が生体において糖尿病腎症の進展に及ぼす影響は未だ不明であった。

一方、近年の研究から糖尿病腎症の端緒は足細胞傷害であることがわかってきた。しかし、足細胞傷害がいかにしてメサンギウムにおけるCol4産生を亢進させ、臨床的に最も重要な糸球体硬化を引き起こすのかということも不明なままであった。

## 2. 研究の目的

上記の研究の背景をふまえ、本研究では、Col4の新たな直接制御因子 Smad1 およびその調節因子が糖尿病腎症の進展に果たす役割を検討する。即ち、研究の目的は以下の2点である。

- (1) メサンギウム細胞におけるCol4の新規制御因子 Smad1 が、糖尿病腎症進展に及ぼす影響を *in vivo* で検討する。
- (2) 糖尿病において、メサンギウム細胞の Smad1 を活性化する因子を同定し、治療標的になるかどうかを *in vivo* で検討する。

## 3. 研究の方法

本研究は転写因子 Smad1 とそのシグナル

伝達経路の役割を *in vivo* で検討するものである。従って、以下の通り、遺伝子改変動物実験や、動物への薬剤投与実験が主体となる。

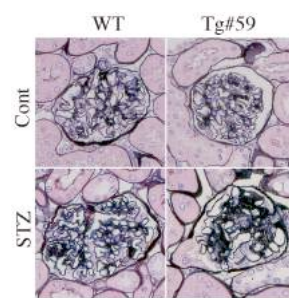
- (1) Smad1 強発現マウス (Smad1Tg) を作成し、糖尿病を惹起して腎症進展が促進されるかどうかを検討した。
- (2) Smad1 ノックアウトマウス(Smad1KO) に糖尿病を惹起して腎症が抑制されるかどうかを検討した。
- (3) 糖尿病マウス糸球体で、Smad1 活性化(リン酸化)を制御する因子を探索した。
- (4) Smad1 のリン酸化制御因子の阻害抗体を作成し、糖尿病腎症に投与して腎症進展が抑制されるかどうかを検討した。

## 4. 研究成果

- (1) Smad1Tg マウスでは糖尿病腎症が加速された

最初に、Smad1Tg マウスを作成し、その糸球体を観察した。非糖尿病状態では、Smad1Tg に大きな変化は見られなかったが、ストレプトゾトシンにて糖尿病を惹起した結果、Smad1Tg は野生型に比して有意なリン酸化 Smad1 の増加と、腎病変悪化を認めた。(図 1)

図 1: Smad1 強発現マウスの糸球体病変  
糖尿病 Smad1Tg マウス糸球体 (右下) では著しいメサンギウム基質拡大を認めた



- (2) Smad1KO マウスでは糖尿病腎症が抑制された。

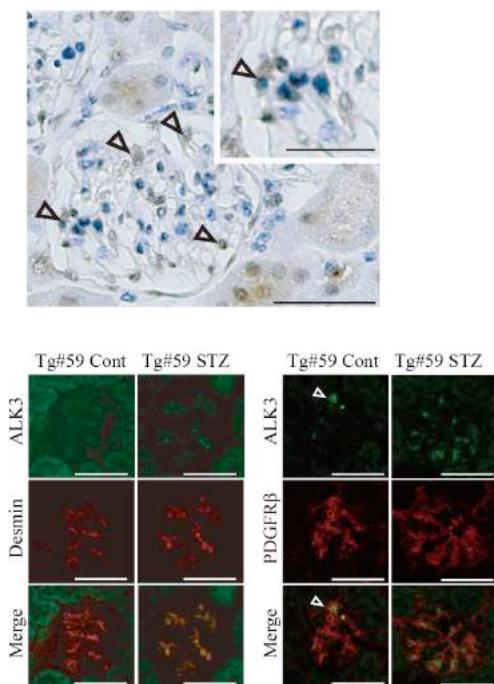
次に、Smad1KO を用いて同様の検討を行った。同マウスは胎生致死のためヘテロ KO マウスを用いた。1)と同様、非糖尿病状態では、糸球体に大きな変化は見られなかったが、糖尿病 Smad1KO マウスでは、メサンギウム基質増加が抑制された。

(3) 糖尿病腎症では、Smad1 のリン酸化を促進する骨形成因子 4(BMP4)とその受容体 Activin Like Kinase 3(ALK3)の発現が亢進していた。

(1)(2)の結果から、糖尿病腎症ではSmad1の発現だけでなく、Smad1のリン酸化が重要であることが示唆されたため、上記マウスにおいて、Smad1のリン酸化促進因子を探索した。

Smad1は、主に骨形成因子(BMP)によりリン酸化され、腎では、特にBMP2, 4, 7の発現が多いこともわかっている(Jason, Eら, Differentiation, 2008)。そこで、各BMPの糸球体発現を検討した結果、BMP4が糖尿病惹起後に著増し、その局在は足細胞にあることがわかった(図3上)。同様に、BMP4と親和性の強い受容体ALK(Activin like kinase)の発現も検討した結果、ALK3が糖尿病で増加し、その局在はメサンギウム中心であることも確認された(図3下)。

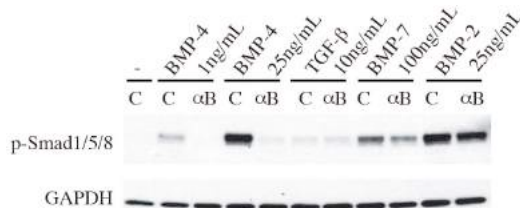
図3: Smad1 上流シグナル BMP4/ALK3 の発現  
 上図: 糖尿病性糸球体における BMP4 の発現を示す。局在は足細胞主体 (矢頭) であることがわかる  
 下図: BMP4 の受容体 ALK3 の発現 (緑色) を示す。局在 (赤と緑の共染色部分) はメサンギウム細胞主体であることがわかる。Desmin (赤) や PDGFRβ (赤) はメサンギウム細胞のマーカーである。



(4) BMP4 中和抗体により糖尿病腎症の進展が抑制された。

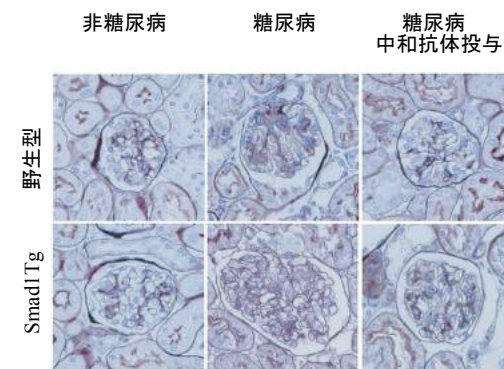
(3)の結果をふまえ、BMP4 中和抗体を作成した。まず、作成した抗体が BMP4 による Smad1 のリン酸化を特異的に阻害することを、メサンギウム細胞を用いて証明した。(図4)

図4: BMP4中和抗体の作成  
 作成した抗体は、BMP4によるSmad1のリン酸化を完全に阻害するが、他の因子によるリン酸化は阻害しない。(C:対照, αB: BMP4 中和抗体)



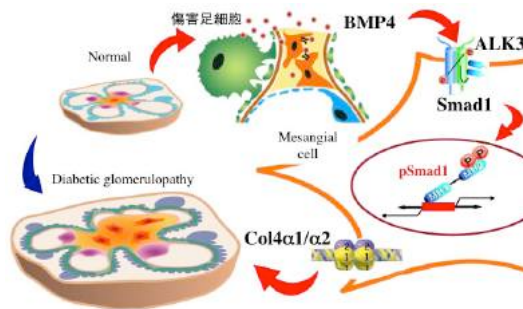
次に、糖尿病マウスに対して、この抗体を、2週毎に10mg/kg、計12週間で皮下注射し、糸球体病変を検討した結果、**BMP4 中和抗体を投与した糖尿病マウスの糸球体病変は有意に抑制された。**(図5)

図5: BMP4 中和抗体投与による糸球体の変化  
 糖尿病を惹起したマウスに BMP4 中和抗体投与すると、野生型でも (上段右)、Smad1 強発現マウスでも (下段右) 糸球体病変の改善が見られた



以上より、Smad1 は *in vivo* でも糖尿病腎症の進展に重要な役割を果たすこと、Smad1 の制御因子としては BMP4 が重要であること、また、BMP4/Smad1 の抑制は糖尿病腎症の新たな治療戦略になることが示唆された。概念図を図6に示す。

図6: 糖尿病腎症におけるBMP4/Smad1シグナルの役割  
 糖尿病環境下では傷害足細胞がBMP4を分泌し、メサンギウム細胞上の受容体ALK3に作用して、Smad1がリン酸化することで糸球体硬化が進展する



## 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 11 件)

- ① “Molecular Markers of Tubulointerstitial Fibrosis and Tubular Cell Damage in Patients with Chronic Kidney Disease.” Nakagawa S, Nishihara K, Miyata H, Shinke H, Tomita E, Kajiwara M, Matsubara T, Iehara N, Igarashi Y, Yamada H, Fukatsu A, Yanagita M, Matsubara K, Masuda S: PLoS One. (査読有); 10(8): e0136994. 2015.
- ② “Bone Morphogenetic Protein 4 and Smad1 Mediate Extracellular Matrix Production in the Development of Diabetic Nephropathy.” Matsubara T\*, Araki M, Abe H, Ueda O, Jishage K, Mima A, Goto C, Tominaga T, Kinoshita M, Kishi S, Nagai K, Iehara N, Fukushima N, Kita T, Arai H, Doi T. Diabetes. (査読有); 64(8): 2978-90. 2015. (\* Corresponding author)
- ③ “腎不全患者におけるがん診療の実態調査” 松原 雄, 武藤 学, 柳田素子. 最新透析医療：先端技術との融合.(査読無); 741-745, 2015, 医薬ジャーナル社
- ④ “Onco-nephrology: current concepts and future perspectives.” Kitai Y, Matsubara T, Yanagita M. Jpn J Clin Oncol. (査読有); 45(7): 617-28. 2015.
- ⑤ “Use of a polysulfone hemodialysis membrane may prevent recurrent posterior reversible encephalopathy syndrome in a patient undergoing hemodialysis” Mima A, Matsubara T, Endo S, Murakami T, Hashimoto Y. Int Urol Nephrol. (査読有), 46(1): 255-60. 2013
- ⑥ “The authors reply: Physical finding of nutcracker phenomenon.” Matsubara T, Ogawa O, Yanagita M. Kidney Int. 84(6): 1287. 2013 (\*Corresponding author)
- ⑦ “Physical finding of nutcracker phenomenon” Matsubara T\*, Ogawa O, Yanagita M: Kidney Int. (査読有) 83(2): 335. 2013 (\*Corresponding author)
- ⑧ “Exploring the origin and limitations of kidney regeneration.” Endo T, Nakamura J, Sato Y, Asada M, Yamada R, Takase M, Takaori K, Oguchi A, Iguchi T, Higashi AY, Ohbayashi T, Nakamura T, Muso E, Kimura T, Yanagita M: J Pathol. (査読有); 236(2): 251-63. 2015
- ⑨ “Twisted gastrulation, a BMP antagonist, exacerbates podocyte injury.” Yamada S, Nakamura J, Asada M, Takase M, Matsusaka T, Iguchi T, Yamada R, Tanaka M, Higashi AY, Okuda T, Asada N, Fukatsu A, Kawachi H, Graf D, Muso E, Kita T, Kimura T, Pastan I, Economides AN, Yanagita M: PLoS One. (査読有) ; 9(2): e89135. 2014.
- ⑩ “腎不全患者におけるがん診療の実態”, 松原 雄, 腎臓内科・泌尿器科.(査読無) 第1巻第1号 61-67, 534-539, 2015年, 科学評論社.
- ⑪ “Onconephrology-なぜいま注目を集めているのか”, 松原 雄, 比良野圭太, 柳田

素子,臨床泌尿器科(査読無), 第69巻7号,  
2015年, 医学書院

[学会発表] (計4件)

- ① 松原 雄, 武藤 学, 福原俊一, 柳田素子,  
“慢性維持透析患者のがん診療実態調査～  
Onco-nephrology consortiumによる多施設  
共同観察研究～”, 第60回日本透析医学会  
学術集会, 2015年6月26～28日, 横浜
- ② Takeshi Matsubara et.al, ”Active Malignancy  
could be a Novel Risk Factor of  
Community-Acquired Acute Kidney Injury in  
Outpatients”, C-KIN 2015, First Annual  
Conference, 2015年4月15～16日, Brussels.
- ③ 松原 雄, 西岡敬祐, 近藤尚哉, 遠藤修一  
郎, 山田博之, 宮田仁美, 塚本達雄, 柳田  
素子 “外来通院中の腎障害監視システム  
の構築と新たな腎障害危険因子の探索”  
第112回日本内科学会年次講演会, 2015年  
4月10～12日, 京都.
- ④ Takeshi Matsubara, Tatsuo Tsukamoto and  
Motoko Yanagita, “Identification of Risk  
factors of Community-Acquired Acute  
Kidney Injury in Outpatients”, ASN Kidney  
Week 2014, Nov 11-16,2014, Philadelphia

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.kidney.kuhp.kyoto-u.ac.jp>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

松原 雄 (MATSUBARA, Takeshi)

京都大学・大学院医学研究科・腎臓内科  
学・講師

研究者番号 : 90422964

### (2)研究分担者 無

### (3)連携研究者

柳田素子 (YANAGITA Motoko)

京都大学・大学院医学研究科・腎臓内科  
学・教授

研究者番号 : 70378769