

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09700

研究課題名(和文) サイトカインプロセシング酵素を標的にした新規CKD治療薬の開発

研究課題名(英文) Development of new CKD therapeutic agent targeting cytokine processing enzyme

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) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病性腎症発症の成因に、Bone Morphogenetic Protein 4 (BMP4)シグナルが作用しており、糸球体を構成する3種の細胞を個別に解析し、BMP4プロセシング酵素をターゲットとした治療効果の検証を行った。2型糖尿病モデルdb/dbマウスにプロセシング抑制低分子化合物を投与したところ、尿蛋白の改善、BUN改善、糸球体メサンギウム基質増生の抑制を認めた。ポドサイト細胞で前駆型BMP4はプロセシングを受け活性型BMP4になる。プロセシング抑制化合物は、活性型BMP4の細胞外分泌抑制を起し糖尿病性腎症の発症を抑制したと推測された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CKDのスタンダードな治療法であるレニン-アンジオテンシン系の阻害薬では、進行を抑えるだけで未だ根治できる治療薬は見つかっていない。糖尿病性腎症への特異性を追求するため、糸球体構成細胞ごとに検証を行い、腎機能低下に直結する分子と分子標的治療について良好な結果を得た。これは、病態の理解と実臨床上也意義が大きい。サイトカインプロセシング酵素を対象にした新規薬剤は、BMP4をピンポイントで不活化し病態進行を抑える効果があり、新たな細胞特異性の高い治療薬として現状抱えている問題を解決できると考えている。

研究成果の概要(英文)：Bone Morphogenetic Protein 4 (BMP4) signal acts on the development of diabetic nephropathy. The glomerular constituent cells were analyzed and the therapeutic effect of BMP4 protease enzyme was examined. A processing inhibitor compound was administered to a type 2 diabetes model (db/db). The mice showed amelioration in urinary protein and BUN and suppression of glomerular mesangial matrix hyperplasia. Precursor BMP4 is modified to become active BMP4 in podocyte cells. It is considered that the processing inhibitor blocked the modification of active BMP4 and suppressed the development of diabetic nephropathy.

研究分野：腎臓学

キーワード：糖尿病性腎症 慢性腎臓病 サイトカイン BMP4

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

CKD の主となる病因の糖尿病性腎症(DN)による透析患者数は急速に増加しており、現行の療法では根本的治癒を望めず患者数の増加に歯止めをかけられない。したがって、初期病変の腎症発症メカニズムを明らかにし、病態特異的に作用する分子を標的にする創薬は、現行治療法に大きな風穴をあけることになる。研究代表者は、DN 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ことを証明した。BMP4 は Smad1 をリン酸化させ細胞外基質タンパクである IV 型コラーゲンの産生を増加させる。研究代表者は、糸球体全域に BMP4 を過剰発現するマウスの作製に成功し、このマウスはヒトの DN に類似した糸球体硬化病変を発症することを確認した。また、糖尿病を誘発した BMP4 ノックアウトマウスでは、野生型に比べて糸球体障害が緩和されることを実証した。腎不全に至る最大の原因は、糸球体毛細血管が果たす糸球体濾過機能の異常である。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、それらは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と考える。BMP4 治療手段として、糖尿病マウスへ BMP4 中和抗体を投与したところ、糸球体硬化の進展を抑えることができた。これらのことから、BMP4 が細胞外へ分泌される段階を止めることは、効果的に病態進展を抑えることができるとの考えに至った。発生過程で臓器形成に不可欠な BMP4 は、subtilisin-like proprotein convertase family の PACE4 によって膜結合部位を分断され、活性型のサイトカインとなる。発生過程での PACE4 と BMP4 の発現部位は一致している。しかしながら、腎症進展時における PACE4 と BMP4 の作用機序について報告はない。疾患形成時の PACE4 作用メカニズムを明らかにし、活性型 BMP4 の分泌を抑制する分子について検証することは、新規 CKD 治療法として画期的であり非常に意義深いと考える。

2. 研究の目的

糸球体全域 BMP4 過剰発現マウスでは、ポドサイトの剥離とスリット膜の変性を電子顕微鏡で確認した。また、ポドサイト核内伝達因子である WT1 の陽性細胞数が顕著に減少し、WT1 陽性細胞数と糸球体硬化指数が逆相関を示した。これは、ポドサイト細胞の減少により、メサンギウム細胞の増生が起こるという細胞連関の証明である。また、PACE4 の局在性は、糖尿病マウス糸球体内のポドサイトを中心に発現していることを確認した。慢性腎臓病 (CKD) には効果的な治療法がなく、アンジオテンシン変換酵素阻害剤などの腎保護作用を示す薬剤はあるが、糸球体硬化病変を治療する薬剤はない。本研究では、腎糸球体硬化症の成因に、Bone Morphogenetic Protein 4 (BMP4)シグナル系が重要な役割を果たしていることに着目し、糸球体を構成する3種の細胞間病態形成機序の解析と BMP4 プロセシング酵素 (PACE4)をターゲットとした新規治療標的分子の機能及び効果の検証を目的とした。

3. 研究の方法

- (1) BMP4 の直接的な作用を検証するために、ポドサイト細胞、メサンギウム細胞に BMP4 刺激し腎症進展メカニズムを解析した。
- (2) BMP4 遺伝子改変マウスを糸球体構成細胞特異的に誘導し、発現細胞が異なる状態での病変形成について解析した。
- (3) これまでの研究では、糸球体内の前駆型 BMP4 発現部位を特定するに至っていない。糖尿病マウスでの PACE4 発現機序を解析し、活性型 BMP4 の増加と糸球体硬化発症メカニズムを解析した。PACE4 抑制物質を用いて治療効果を確認した。

4 . 研究成果

糖尿病性腎症を発症すると BMP4 が主にメサンギウム細胞で観察されるが、一部ポドサイトにも確認されている。分泌された BMP4 は、4 型コラーゲンが発現する部位に集積しやすい性質があるためメサンギウム細胞に集積し、細胞外基質蛋白の増生を誘導し糸球体障害に至ると推測される。糖尿病性腎症発症初期にポドサイトのスリット膜の構造変化が起こり、サイズバリアが徐々に破綻する。病態進展に伴いポドサイトが糸球体基底膜から脱落し、メサンギウム基質の不可逆的な増生から糸球体硬化症を発症する。

今回の研究では、基底膜を隔てて存在するポドサイト細胞とメサンギウム細胞の相互連携について詳細な分子メカニズムを解析した。培養メサンギウム細胞を用いて、アポトーシスに関与する BMP4/p38/Caspase3 シグナルを解析した。BMP4 刺激下で dorsomorphin、SB202190、SB242235、SB203580 を添加し p38、pSmad1/5/9、Cleaved caspase3 の発現を確認した。BMP4 刺激により p38 および Smad1 のリン酸化が誘導され、Cleaved Caspase3 が増加した。dorsomorphin は Smad1 のリン酸化を抑制し、Cleaved Caspase3 を減少させた。SB242235 および SB202190 は p38 のリン酸化を抑制したが、Smad1 のリン酸化を抑制しなかった。また、メサンギウム細胞では、SB203580、SB242235、SB202190 による Caspase3 の抑制は確認されなかった。

培養ポドサイト細胞への BMP4 刺激を行ったところ、Nephrin 発現の減少、p38 のリン酸化、Caspase3 の活性化が誘導された。また、同条件下で、SB242235 及び SB202190 により p38 のリン酸化抑制と共に、Caspase3 の活性化阻害が確認された。糖尿病性腎症でみられるポドサイト障害は、BMP4/p38/Caspase3 シグナルによりアポトーシスを誘導し、メサンギウム細胞では BMP4/Smad1/Col4 シグナルにより細胞外基質蛋白の増生を誘導していることが明らかになった。糸球体を構成する代表的な 2 つの細胞で BMP4 が病態進展に作用しており、BMP4 をターゲットとした治療法は有望と考えられる。

conditional *Bmp4* knockout マウス (*Bmp4^{loxP}*) と *Podocin Cre* マウスを交配させポドサイト特異的 *Bmp4* ノックアウトマウス (*Bmp4^{loxP} x Pod-Cre*) を作製し、病態発症機序について解析した。STZ により糖尿病を誘発させた *Bmp4^{loxP} x Pod-Cre* マウスは、野生型糖尿病マウスに比べてポドサイト障害が緩和され、メサンギウム基質増生が抑えられていた。

CAG-CAT-Bmp4 transgenic マウス (*CAG-Bmp4*) と *Podocin Cre* マウスを交配させ、ポドサイト特異的に BMP4 を発現するマウス (*CAG-B4 x Pod-Cre*) を作製した。40 週齢経過後に、メサンギウム基質増生、ポドサイト細胞数および Nephrin 領域の減少を示した。メサンギウム基質の増生はポドサイト細胞数と逆相関を示した。*CAG-B4 x Pod-Cre* マウスは、非糖尿病条件下でアポトーシスを惹起していた。ポドサイトで増加した BMP4 が、ポドサイトのアポトーシスとメサンギウム基質の増生を促し、糸球体障害を引き起こすことを明らかにした。今回の研究で、BMP4 発現抑制マウスおよび BMP4 過剰発現マウスで、ポドサイト脱落とメサンギウム基質増生に BMP4 が関与すること、並びに細胞間での病態形成の関連性を証明した。糸球体硬化症を防ぐにはポドサイトの機能を保ち、細胞脱落を抑える必要がある。

BMP4 は生体内では Pro 状態で細胞内にあるゴルジ体に存在しており、プロ蛋白転換酵素である PACE (Paired basic Amino acid Cleaving Enzyme) によって分裂処理を受け mature な状態になる。BMP4 の前駆型は、-RXKR285-および-RXXR250-配列を PACE に認識され R285 と R250 の 2 つの部位で切断される。分裂処理を受けた BMP4 は、生理活性を有するサイトカインとして細胞外に放出される。したがって、BMP4 の分裂過程を阻害することにより腎障害を抑制できると推測した。ポドサイト細胞において LPS 刺激により BMP4 の

分裂を誘発させることが分かった。db/db 糖尿病マウスに PACE 抑制化合物を投与したところ、尿タンパク質、血清 Cre、BUN の改善効果を認めた。糸球体組織学的所見は、コントロール群に比べてメサンギウム基質増生を抑え治療効果を示した。

細胞外分泌タンパクである BMP4 は、生体内ではパラクリンに様々な細胞に作用している。糖尿病で糸球体内に増加した BMP4 の発現量は、メサンギウム基質拡大と正の相関を示す。PACE 抑制化合物は、BMP4 の生理活性を阻害しポドサイトフットプロセスの崩壊とメサンギウム基質増生を抑えたと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Fujita Yui, Tominaga Tatsuya, Abe Hideharu, Kangawa Yumi, Fukushima Naoshi, Ueda Otoya, Jishage Kou-ichi, Kishi Seiji, Murakami Taichi, Saga Yumiko, Kanwar Yashpal S., Nagai Kojiro, Doi Toshio	4. 巻 8
2. 論文標題 An adjustment in BMP4 function represents a treatment for diabetic nephropathy and podocyte injury	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-31464-9	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 該当する
1. 著者名 Tamaki Masanori, Tominaga Tatsuya, Fujita Yui, Koezuka Yasuhiko, Ichien Go, Murakami Taichi, Kishi Seiji, Yamamoto Keiichi, Abe Hideharu, Nagai Kojiro, Doi Toshio	4. 巻 316
2. 論文標題 All-trans retinoic acid suppresses bone morphogenetic protein 4 in mouse diabetic nephropathy through a unique retinoic acid response element	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism	6. 最初と最後の頁 E418 ~ E431
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/ajpendo.00218.2018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ono Hiroyuki, Abe Hideharu, Sakurai Akiko, Ochi Arisa, Tominaga Tatsuya, Tamaki Masanori, Kishi Seiji, Murakami Taichi, Nagai Kojiro, Kohashi Masayuki, Doi Toshio	4. 巻 8
2. 論文標題 Novel Interplay Between Smad1 and Smad3 Phosphorylation via AGE Regulates the Progression of Diabetic Nephropathy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-28439-1	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 -
1. 著者名 Doi Toshio, Moriya Tatsumi, Fujita Yui, Minagawa Naoto, Usami Masaru, Sasaki Tomoko, Abe Hideharu, Kishi Seiji, Murakami Taichi, Ouchi Motoshi, Ichien Go, Yamamoto Keiichi, Ikeda Hiroki, Koezuka Yasuhiko, Takamatsu Norimichi, Shima Kenji, Mauer Michael, Nagai Kojiro, Tominaga Tatsuya	4. 巻 67
2. 論文標題 Urinary IgG4 and Smad1 Are Specific Biomarkers for Renal Structural and Functional Changes in Early Stages of Diabetic Nephropathy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Diabetes	6. 最初と最後の頁 986 ~ 993
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2337/db17-1043	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 該当する

1. 著者名 Kishi Fumi, Nagai Kojiro, Takamatsu Norimichi, Tominaga Tatsuya, Tamaki Masanori, Shibata Eriko, Murakami Taichi, Kishi Seiji, Abe Hideharu, Koezuka Yasuhiko, Minagawa Naoto, Ichien Go, Doi Toshio	4. 巻 13
2. 論文標題 Urinary type IV collagen excretion is involved in the decline in estimated glomerular filtration rate in the Japanese general population without diabetes: A 5-year observational study	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0195523	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 -

1. 著者名 Tominaga Tatsuya, Sharma Isha, Fujita Yui, Doi Toshio, Wallner Aryana K., Kanwar Yashpal S.	4. 巻 316
2. 論文標題 Myo-inositol oxygenase accentuates renal tubular injury initiated by endoplasmic reticulum stress	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 American Journal of Physiology-Renal Physiology	6. 最初と最後の頁 F301 ~ F315
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/ajprenal.00534.2018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Tamaki, Masanori, Tominaga, Tatsuya, Fujita, Yui, Kishi, Seiji, Murakami, Taichi, Nagai, Kojiro, Abe, Hideharu, Doi, Toshio
2. 発表標題 Mesangial Matrix Expansion Attenuated by All-Trans Retinoic Acid Through Direct Suppression of Bone Morphogenetic Protein 4 in Mouse Diabetic Nephropathy
3. 学会等名 The American Society of Nephrology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 寒川 裕未, 富永 辰也, 藤田 結衣, 長井 幸二郎, 安部 秀斉, 土井 俊夫
2. 発表標題 ポドサイト特異的Bmp4 knockoutマウスを用いた糖尿病性腎症の病態解析
3. 学会等名 日本生化学大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yui Fujita, Tatsuya Tominaga, Masanori Tamaki, Taichi Murakami, Seiji Kishi, Kojiro Nagai, Hideharu Abe, Toshio Doi
2. 発表標題 Palovarotene, selective retinoic receptor- agonist, inhibited both BMP4 and TGF- signaling pathways in diabetic nephropathy
3. 学会等名 The American Society of Nephrology (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Tatsuya Tominaga, Yui Fujita, Taichi Murakami, Seiji Kishi, Kojiro Nagai, Hideharu Abe, Toshio Doi
2. 発表標題 The role of BMP4 signal pathway on the glomerulosclerosis.
3. 学会等名 Keystone symposia (国際学会)
4. 発表年 2017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	長井 幸二郎 (NAGAI Kojiro) (40542048)	徳島大学・病院・講師 (16101)	
研究分担者	藤田 結衣 (FUJITA Yui) (30837266)	一般財団法人生産開発科学研究所・腎病態解析研究室・学術員 (74302)	