

平成23年 5月11日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007～2010

課題番号：19590964

研究課題名(和文) BMP4の糸球体血管係蹄発生と尿細管成長維持における役割

研究課題名(英文) Role of BMP4 on the development of glomerular capillary tufts and the growth of proximal tubules

研究代表者

宮崎 陽一 (MIYAZAKI YOICHI)

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号：60266690

研究成果の概要(和文)：糸球体上皮細胞から産生される BMP と VEGF はお互いに拮抗的に作用しながら、糸球体血管係蹄形成に寄与する可能性が示唆されたため、Tet-on system を利用し、BMP4 と VEGF の糸球体上皮細胞特異的過剰発現マウスを作成、両者を交配させたところ、それぞれに認められる異常形質はレスキューされず、むしろ顕著になった。マウス胎児大動脈の三次元培養の結果と考えあさせると、BMP と VEGF は糸球体血管係蹄の発生にむしろ協調的に働き、BMP は VEGF により誘導された新生血管の成熟因子・安定化因子であるという仮説に至った。

研究成果の概要(英文)：In the basis of our prior studies, we hypothesized that BMP and VEGF from the glomerular podocytes have antagonistic roles for the development of glomerular capillary tufts. To assess the hypothesis, we generated inducible podocyte-specific BMP4 and VEGF transgenic mice (Tg), and analyzed phenotypes in double Tg. When compared to the single Tg, double Tg displayed more prominent phenotypes seen in the glomerulus and tubule. In conjunction with ex vivo study using mouse embryonic aortic ring, therefore, the result suggests that BMP and VEGF have collaborative effects on the tuft development, and BMP can stabilize newly formed capillary tufts by VEGF.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	500,000	150,000	650,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
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：mutants、glomerulus、noggin、VEGF

1. 研究開始当初の背景

BMP は発生段階における器官形成や臓器障害の修復過程においてさまざまな重要な生理作用を有す(Genes&Dev 1996, Nat Med 2003)。これまで申請者らは BMP が腎臓の初期発生において重要で多面的な役割を担うことを明らかにしてきたが(J Clin Invest, 2000; Kidney Int 2003)、BMP は腎臓の初期発生だけではなく糸球体の発生段階においても時間的・空間的に調節された非常に強い発現パターンを呈することがわかっており、糸球体の発生・分化に重要な役割を有する可能性が示唆されていた。申請者らはこれまでに、糸球体上皮細胞にのみほぼ特異的に発現を drive する *Nephrin promoter* の下流に、BMP の endogenous な inhibitor である *noggin* を連結し、transgenic mouse (*Nephrin-Noggin* TG)を作成した(Biochem Biophys Res Commun 2006; J Am Soc Nephrol in revision)。その結果 *Noggin* の発現が強い TG では、虚脱した糸球体血管係蹄を有する異常糸球体の存在がみられ、糸球体におけるメサンギウム細胞の欠如がその主因と考えられた。さらに同時に作成した糸球体上皮細胞に特異的な BMP4 の過剰発現マウス(*Nephrin-Bmp4* TG)を解析した結果、糸球体内皮細胞の欠如を主因とした糸球体血管係蹄の形成不全が明らかとなった。

一方これまでの研究から、糸球体血管係蹄の発生に必須な分子がいくつか同定されたが、そのなかでも VEGF は中心的な役割を担う。VEGF は糸球体原基の podocyte に発現し、内皮前駆細胞に対し chemoattractant として作用し、糸球体原基への内皮前駆細胞の嵌入を促進する。それに対して、VEGF の糸球体上皮特異的過剰発現マウスでは、メサンギウム細胞の糸球体原器へ嵌入不全が生じることが明らかにされた。したがって、糸球体上皮細胞に発現する BMP と VEGF は抑制モデルと過剰発現モデルの形質が極似しており、両者は糸球体血管係蹄発生に対して、お互いに拮抗作用を発揮しながら、その発生調節に寄与する可能性が示唆された。

糸球体血管係蹄の発生調節の解明は多くの糸球体障害の進展あるいは修復機序解明に重要である。特に糖尿病性腎症においては、VEGF がその病変形成に促進的に働き、BMP はその進展抑制に働くという報告を考慮すると、BMP と VEGF の拮抗作用の証明とその分子機序の解明は糸球体障害進

展機序解明の一つの糸口になると考えられる。

2. 研究の目的

VEGF の糸球体血管係蹄発生の調節機構をまず明らかにし、次に糸球体上皮細胞に発現する BMP の作用を VEGF との関係から明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) VEGF の糸球体上皮細胞特異的な過剰発現マウスは出生後早期に死亡する。そこで本研究では Tet-on system を利用して、Doxycycline で誘導可能な VEGF transgenic mouse (Tg) を作成し、その phenotype を解析する。

(2) 糸球体上皮細胞特異的な BMP4 Tg を作成し、上記 VEGF Tg と交配させ、double Tg とそれぞれの single Tg の phenotype の強さや質を検討する。

(3) マウス胎児 aortic ring のコラーゲンゲル内での三次元培養を確立し、この系において VEGF および BMP4 の血管新生や平滑筋の増生に対する影響を解析する。

4. 研究成果

(1) 13 匹の founder mouse から Doxycycline 投与により誘導可能な糸球体上皮細胞特異的 *VEGF* Tg (*Podocin-rtTA;TRE-VEGF*) の 1 系統を作成し得た。この Tg では、Doxycycline 投与により、①糸球体上皮細胞に VEGF が 5 倍から 10 倍程度過剰発現され、②糸球体血管係蹄からの出血にともなう尿細管への赤血球の充満 (図 1) ③ひとつの毛細血管ループにおける未成熟な内皮細胞の増殖と fenestration の消失(図 2)、そして④メサンギウム細胞数の低下と、それに伴う血管係蹄に対するメサンギウム細胞の嵌入性分割の低下が形質として認められた。

(2) 本 *Podocin-rtTA;TRE-VEGF* Tg と *Nephrin-Bmp4* Tg を交配し、得られた

double Tg1 を解析した結果、それぞれの single transgenic mouse に比較し、double transgenic mouse では糸球体、尿細管ともに phenotype が顕著になっていた。

(3) 腎血管の形成は、胎児背側大動脈 (dorsal aorta) から後腎への新生血管の形成と侵入によって開始されると考えられ、まず embryo dorsal aorta の dissection により取り出した aortic ring のコラーゲンゲル三次元培養法を確立した。VEGF 添加による新生血管形成を内皮細胞の whole mount immunohistochemistry により観察したところ、F12 medium 培養下では新生血管が観察されないのに対して、MEM medium 培養下で ring の周囲に多くの新生血管が形成されることを見出した。また VEGF の添加により血管平滑筋や周囲の結合組織がルーズになる現象が認められた。ここに BMP を添加すると、血管平滑筋やその周囲の結合組織の増生がみられ、VEGF 添加によって認められた新生血管の形成を dose-dependent に抑制されることがわかった。この抑制は内皮細胞に対する作用ではなく、血管平滑筋や結合組織がタイトになるためと考えられた。

したがって、上記 in vivo における検討と考え合わせると、BMP と VEGF は単に拮抗的に作用しているのではなく、BMP は VEGF により形成される新生血管の成

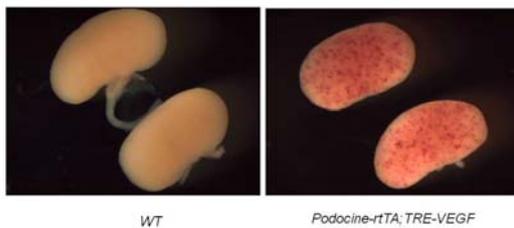


図1

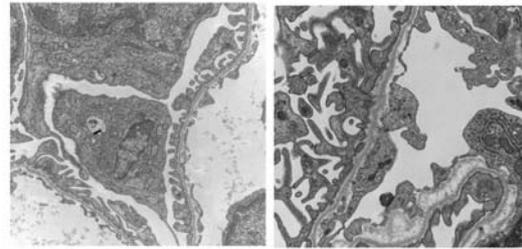


図2

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3件)

① Ueda H, Miyazaki Y, Matsusaka T, Utsunomiya Y, Kawamura T, Hosoya T, Ichikawa I. Bmp in podocytes is essential for normal glomerular capillary formation. J Am Soc Nephrol 査読有 19, 2008, 685-694,

〔学会発表〕 (計3件)

① 宮崎陽一 糸球体血管系蹄の発生と再生 (ワークショップ) 第51回日本腎臓学会 (福岡) 1998 5月31日

〔図書〕 (計3件)

① 宮崎陽一 CAKUT の分子メカニズム 腎と透析 2010年 68頁 東京医学社

② 宮崎陽一 尿路発生異常とレニン・アンジオテンシン系 腎と透析 2008年 64頁 東京医学社

〔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

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮崎 陽一 (MIYAZAKI YOICHI)

東京慈恵会医科大学 医学部 講師

研究者番号：60266690