

平成 21 年 5 月 25 日現在

研究種目： 若手研究 (B)  
 研究期間： 2007～2008  
 課題番号： 19790580  
 研究課題名 (和文) 加齢性腎障害における新たな分子機構の解明  
 研究課題名 (英文) MOLECULAR MECHANISMS OF GLOMERULOSCLEROSIS IN AGING

研究代表者  
 松原 雄 (MATSUBARA TAKESHI)  
 京都大学・医学研究科・特定病院助教  
 研究者番号： 90422964

## 研究成果の概要：

本研究では、加齢に伴う腎障害、特に糸球体硬化症の分子機構を解明するために、老化で蓄積する終末糖化産物および、終末糖化産物により腎臓のメサンギウム細胞より分泌される新規増殖因子 Gas6 (Growth arrest specific 6) に注目し、Gas6 を発現できなくしたマウスでは加齢性腎障害が緩和されることを証明した。また、我々が同定した糸球体硬化制御因子 Smad1 が糸球体硬化症の尿中新規バイオマーカーになりえることも明らかにした。

## 交付額

(金額単位：円)

|         | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2007 年度 | 2,100,000 | 0       | 2,100,000 |
| 2008 年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 年度      |           |         |           |
| 年度      |           |         |           |
| 年度      |           |         |           |
| 総計      | 3,300,000 | 360,000 | 3,660,000 |

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：腎臓病理・糸球体硬化・老化

## 1. 研究開始当初の背景

高齢化にともなう腎不全は増加の一途にある。加齢は独立した腎障害の危険因子であることもわかっており、そのメカニズム解明が急務である。一般的に、老化のメカニズム解明に関しては、細胞老化と臓器老化の両面より分子生物学的なアプローチが試みられており、両者が互いに関連しながら個体老化に

至るとされ、細胞老化の中心となる分子としては Akt が古くから注目されていた。一方、腎の臓器老化に関しては加齢ともに蓄積する終末糖化産物の刺激により様々な分子が惹起され、最終的に腎障害にいたるという報告はいくつかなされてはいるが、詳細は不明であった。腎臓の臓器老化の主たる病理学的特徴として糸球体硬化が挙げられ、その本質はメサンギウム細胞における細胞外基質の

増加であるということはわかっていたが、これら細胞外基質を制御する分子機序は不明であった。近年、研究代表者らは、終末糖化産物により惹起されるメサンギウム細胞外基質の中で、主たる成分 IV 型コラーゲンの発現制御因子として Smad1 を同定した。すなわち、Smad1 が腎の臓器老化の中心分子となる可能性が示された。しかしながら、細胞老化制御因子 (Akt) と臓器老化制御因子 (Smad1) を架橋するような、本質に迫るシグナル経路は未だ得られていない。加齢による腎障害進展のメカニズム解明には細胞老化制御因子と糸球体硬化制御因子間での新たなシグナル伝達機構の解明が必要である。

## 2. 研究の目的

細胞老化制御因子 Akt と糸球体硬化制御因子 Smad1 の生体の腎の加齢性変化における役割を検討し、さらに、この二つの分子を架橋する新たなシグナル伝達機構を解明することにより、加齢による腎障害進展のメカニズムを明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) 老化で蓄積する終末糖化産物刺激によってメサンギウム細胞で発現が亢進する遺伝子を網羅的に解析した。そして、得られた遺伝子群の中から、細胞老化制御因子 Akt の上流に位置し、かつ、代表者らのグループが以前より研究を続けていた新規増殖因子 Gas6 (Growth arrest specific 6) に注目した。

① まず、加齢腎における Gas6 の役割を検討するために、野生型加齢マウス腎における終末糖化産物や Gas6 の発現を確認した。次に、Gas6 欠損マウスを用いて、加齢とともに生じる糸球体硬化が Gas6 欠損マウスでどのように変化するかを組織学的に検討し、細胞

老化制御因子 Akt、臓器老化制御因子 Smad1 の発現を野生型マウス、Gas6 欠損マウスおのおので比較検討した。

② 次に、終末糖化産物による糸球体硬化における Gas6 の役割を *in vitro* で検討するため、Gas6 欠損マウスよりメサンギウム細胞を単離し、終末糖化産物刺激を行うことにより、IV 型コラーゲンの発現がどう変化するかを検討した。

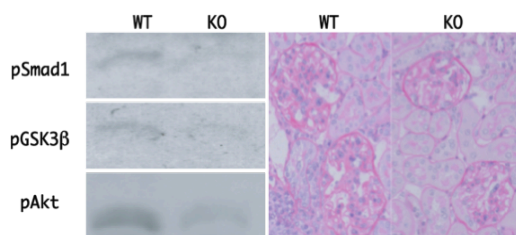
(2) 糸球体硬化制御因子 Smad1 の生体における発現を検討するとともに発現量の測定系 (ELISA) を確立し、糸球体硬化モデル動物 (ストレプトゾトシン惹起性糖尿病ラット) での尿中における Smad1 の発現量を検討した。

## 4. 研究成果

(1) Gas6 は加齢とともに糸球体での発現が増加し、加齢性糸球体硬化に関与する

若齢マウスに比べて高齢マウスでの腎糸球体での Gas6 の発現は約 2.5 倍に上昇しており、その発現部位は主にメサンギウム領域であった。また、野生型マウスでは、加齢とともに糸球体肥大やメサンギウム拡大が認められたが、Gas6 欠損マウスでは、24 週齢で糸球体肥大が、48 週齢では糸球体肥大とともにメサンギウム拡大も抑制されていた (下図左)。さらに、それに相関して、腎臓における老化制御因子 Akt および、硬化制御因子 Smad1 の活性化も抑制されていた (下図右)。腎臓内の終末糖化産物蓄積量は加齢とともに増加していたが、WT と KO 間では差を認めなかった。次に WT 由来のメサンギウム細胞においては、終末糖化産物刺激により IV 型コラーゲンの転写活性が約 1.3 倍上昇したが、Gas6 欠損マウス由来のメサンギウム細

胞においてはその転写活性が抑制されていた。(学会発表①～④)



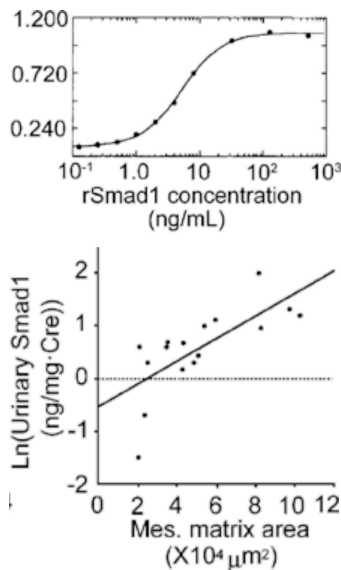
右) Gas6KO高齡(48ヶ月齢)マウスは野生型比して糸球体硬化が緩和された。  
左) 腎臓より抽出した蛋白のウェスタンブロッティング。野生型では、老化関連因子Aktおよび、硬化責任分子Smad1の活性化が認められた

以上の結果より、加齢に伴うマウスの糸球体障害に AGE の増加が関与し、Gas6 がその下流因子として関与している可能性が示された。また、分泌蛋白である Gas6 は加齢性腎障害の治療の標的分子となる可能性も示唆された。さらに、今回の実験において、Gas6 欠損マウスでは、組織の改善とともに、老化、硬化制御因子の双方に発現抑制が認められた。この事実は、当初の研究目標である両者を架橋するシグナル伝達経路の存在を示唆するものであり、今後は、これらのツールを用いて老化、硬化シグナルを架橋する新たな伝達経路を解明する必要がある。

(2) 尿中の Smad1 は糖尿病モデルラットにおける糸球体硬化の程度を反映し、新規尿バイオマーカーになり得る

研究代表者は、市販の抗体を用いて、Smad1 の ELISA 測定系を確立した(下図上)。次に、加齢性腎障害と同じく糸球体硬化をきたすモデルラットにおける糸球体硬化の程度(mesangial matrix area)と、尿中 Smad1(Urinary Smad1)の量を比較検討したところ、有意な相関が認められた(下図下)。さらに、研究協力者である美馬 晶は、この

実験系をさらに発展させ、糖尿病早期の尿中 Smad1 はその後の腎糸球体硬化を予測する因子であることを証明した。(発表論文①)



近年、加齢に伴う糸球体硬化や腎障害の治療には、早期発見による治療が不可欠となっている。しかし、現在臨床の現場で用いられている、血清クレアチニンや、尿中微量アルブミン値などは、早期発見という点のみならず、糸球体硬化を正確に反映するという点でも非常に不完全であり、新たなバイオマーカーの存在が待たれている。我々の開発した尿中 Smad1 定量は、糸球体硬化を正確に反映するとともに、糸球体硬化の予測因子となる可能性が示唆された。一方で、今回の測定系は感度が低いという問題もあり、今後は、より感度が高く、再現性も確保された測定系の開発を行う必要がある。

## 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 4 件)

① Mima A, Arai H, Matsubara T, et. al.  
“Urinary Smad1 is a novel marker to predict later onset of mesangial matrix expansion in diabetic nephropathy.”

Diabetes, 57, 1711-22, 2008, 査読有

② Doi T, Mima A, Matsubara T, et. al.

“The current clinical problems for early phase of diabetic nephropathy and approach for pathogenesis of diabetic nephropathy.” Diabetes Res Clin Pract., 82, S21-4, 2008, 査読有

③ Kanamori H, Matsubara T, (10 名省略), Arai H. “Inhibition of MCP-1/CCR2 pathway ameliorates the development of diabetic nephropathy.”, Biochem Biophys Res Commun., 360: 772-7, 2007, 査読有.

④ Sumi E, Iehara N, Akiyama H, Matsubara T, (6 名省略), Doi T. “SRY-related HMG box 9 regulates the expression of Col4a2 through transactivating its enhancer element in mesangial cells.”, Am J Pathol., 170: 1854-64, 2007, 査読有

[学会発表] (計 4 件)

① 松原 雄 他, 「加齢に伴う糸球体変化における Growth arrest specific gene 6 (Gas6) の役割とそのシグナル解析」, 第 51 回日本腎臓学会学術集会, 2008 年 6 月, 福岡

② Takeshi Matsubara ら, “Mice Lacking Growth Arrest Specific Gene 6 Protected Against Age-Associated Glomerulosclerosis”, Renal Week 2007, 2007 年11月, サンフランシスコ

③ Takeshi Matsubara ら, “Advanced Glycation Endproducts is Involved in the Development of Age-associated Glomerulosclerosis through Growth Arrest Specific Gene 6”, 67th Scientific Sessions, 2007 年 6 月, シカゴ

④ 松原 雄 他, 「加齢に伴う糸球体変化における Growth arrest specific gene 6 (Gas6) の役割」, 第 50 回日本腎臓学会学術集会, 2007 年 6 月, 浜松

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

[その他]

ホームページ等なし

## 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・特定病院助教

研究者番号: 90422964

### (2) 研究分担者 なし

### (3) 連携研究者 なし

### (4) 研究協力者

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・医学部・歯学部附属病院・講師

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

柳田素子 (YANAGITA MOTOKO)

京都大学・医学研究科・講師

研究者番号: 70378769

深津敦司 (FUKATSU ATSUSHI)

京都大学・医学研究科・講師

研究者番号: 90247685

家原典之 (IEHARA NORIYUKI)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：20281727

長井 幸二郎 (NAGAI KOJIROU)

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

