

平成 23 年 5 月 30 日現在

機関番号：14301
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20590954
 研究課題名(和文) BMP とその新規調節因子 USAG-1 を軸に慢性腎障害の治療法および診断法を探る
 研究課題名(英文) Elucidate the role of BMP and BMP antagonist USAG-1 in the progression of chronic kidney diseases and therapeutic application
 研究代表者
 柳田 素子 (YANAGITA MOTOKO)
 京都大学・次世代研究者育成センター・准教授
 研究者番号：70378769

研究成果の概要(和文)：

腎臓病患者数は増え続けていますが、いまだ根本的な治療薬は開発されていません。骨形成因子 BMP7 は障害された腎臓を修復することが報告され注目を集めました。他臓器への広範な副作用が問題となり、実用化には至っていません。また大量の蛋白投与が必要なことから、内因性の阻害分子があるのではないかと考えられてきました。申請者は腎臓における BMP7 の作用を抑制する阻害分子 USAG-1 を発見し、USAG-1 が腎臓の尿細管から分泌される BMP7 の保護作用を抑制し、尿細管障害および糸球体障害を悪化させることを発見しました。USAG-1 を標的とする薬剤には、腎臓病治療薬としての可能性があります。

研究成果の概要(英文)：

Dialysis dependency is one of the leading causes of morbidity and mortality in the world, and once end-stage renal disease develops, it cannot be reversed by currently available therapy. Although the administration of large dose of bone morphogenetic protein7 (BMP7) has been shown to repair established renal injuries and improves renal function, pathophysiological role of endogenous BMP7 and regulatory mechanism of its activities remain elusive. Here we show that uterine sensitization-associated gene-1 (USAG-1), novel BMP antagonist abundantly expressed in the kidney, is the central negative regulator of BMP function in the kidney, and that inhibition of USAG-1 will be promising therapeutic trial for kidney diseases.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：臨床医学

科研費の分科・細目：腎臓内科学

キーワード：慢性腎臓病、糸球体、尿細管、修復

1. 研究開始当初の背景

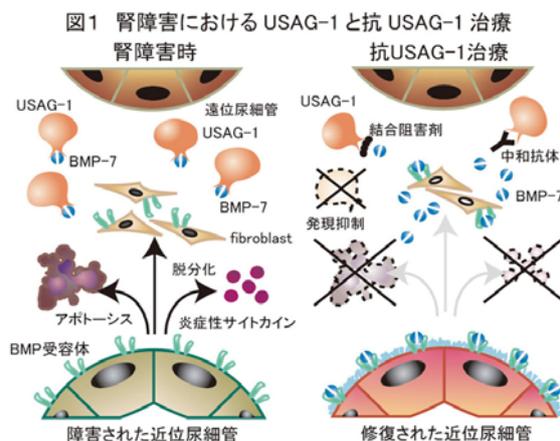
透析患者数は増加を続けており治療薬の開発は急務であるが、従来の腎臓病治療薬は予防的側面が強く、腎不全に陥った腎臓は治療不可能と考えられてきた。

近年、腎疾患モデルに BMP7 (Bone Morphogenetic Protein) を投与すると障害尿細管が修復され腎機能が回復することが報告された。これは腎不全からの回復という点で画期的であるが、他臓器への広範な副作用が問題である。

申請者は新規腎臓特異的 BMP 拮抗分子 USAG-1 を発見し、USAG-1 欠損マウス (以後 USAG-1 KO) を用いた解析でこの因子が遠位尿細管特異的に発現し、同じく遠位尿細管から分泌される BMP7 の活性を抑制することによって、その尿細管障害修復作用を抑制することを証明した (Yanagita M et al. J Clin Invest 2006, BBRC 2004, Kidney Int 2006)。

この結果から、USAG-1 と BMP7 の結合阻害剤や USAG-1 の発現制御剤には腎不全治療薬としての可能性があると考えられる。

USAG-1 の発現が腎臓特異的であることから、



このような薬剤は BMP7 自体の投与よりも副作用が少ないと予想される。

2. 研究の目的

当研究課題では、USAG-1 および BMP シグナルの生体内の役割を明らかにし、その知見を元に新しいタイプの腎疾患治療薬開発の可能性を探ることを目的とする。

一方、腎疾患患者の最大の関心事はいつ透析になるか (腎予後) であるが、現時点ではかなり腎機能が悪化するまで腎予後の予知は難しい。USAG-1 が腎臓特異的な分泌蛋白であり、その発現が腎障害時に大きく変動することから、申請者は USAG-1 発現を用いた腎予

後の予知システムを作成したいと考えた。

さらに USAG-1 の発現解析を通して得た手がかりを元に近位、遠位尿細管分化メカニズムを解析したいと考えた。

3. 研究の方法

本研究課題では下記の 3 つの研究を行った。

(1) 糸球体障害における USAG-1 の機能解析
申請者は既に尿細管間質障害における USAG-1 の役割を明らかにしたが、末期腎不全の原因疾患の大半は糸球体疾患である。これらの病態においても USAG-1 が BMP7 の腎修復作用を抑制していることが明らかになれば、USAG-1 を標的とした治療戦略の適応疾患が拡大することとなる。

具体的には、糸球体腎炎から腎不全を来す治療法のない遺伝疾患であるアルポート症候群のモデルマウスを用いて USAG-1 欠損マウスと交配し、その病態がどのように変化するかを検証する。

(2) USAG-1 を標的とした治療戦略およびバイオマーカーの可能性

前述のように USAG-1 を標的とした治療戦略

(USAG-1 中和抗体や USAG-1 発現抑制剤) には CKD 治療薬としての可能性があり、その対象疾患は尿細管障害のみならず糸球体疾患をも含む可能性が高い。本テーマでは USAG-1 中和抗体の作成を試みる。

さらに USAG-1 遺伝子座に LacZ をノックインしたマウスを用いて様々な腎障害における USAG-1 発現を検証し、USAG-1 発現制御機構を明らかにし、USAG-1 発現制御剤への一助とする。加えて腎不全モデルマウスを用いた解析で、腎 USAG-1 発現と腎予後の関連について検証する。

(3) 尿細管セグメント分化メカニズムの解明

腎臓の再生医療の進歩は目覚ましく、*in vitro* で尿細管様のチューブができるまでに発展した。しかしながら、ネフロンはただのチューブではなく、部位 (セグメント) 毎に異なった機能を持ち、極めて複雑な分化を遂げた細胞集団である。腎臓の発生において、均一な間葉系細胞がセグメントごとに異なる分化を遂げる仕組みは未だ不明であり、再生医療を臨床応用する上での壁になっている。さらに、腎障害からの回復、再生においても、脱分化した細胞が再分化し、そのセグメントにふさわしい形質を再び獲得するメカニズムは全く明らかになっていない。

申請者は USAG-1 が遠位尿細管マーカーであ

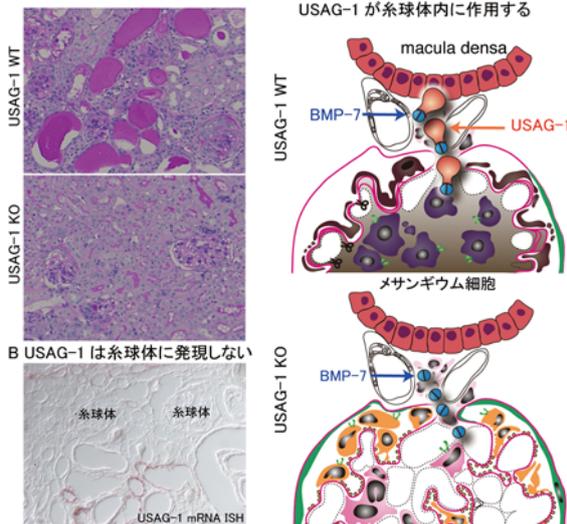
ることを見いだしており、前述の USAG-1/LacZ マウスを用いて尿細管のセグメント分化のメカニズムを明らかにしたい。

4. 研究成果

(1)糸球体障害における USAG-1 の機能解析
申請者は尿細管障害におけるUSAG-1の役割を明らかにしてきたが、糸球体疾患においてもUSAG-1が増悪因子として働くことが明らかになれば、USAG-1を標的とした治療法の適応が拡大される。

申請者はUSAG-1 KOと遺伝性糸球体腎炎モデルマウスを交配したところ、USAG-1 KOでは糸球体障害が極めて軽微で、慢性腎不全に陥らないこと（図2：J Clin Invest 2010）、遠位尿細管から分泌されたUSAG-1がmacula densaを介して糸球体に作用する

図2 USAG-1 は macula densa から分泌され糸球体障害を促進する
A USAG-1 KO は糸球体障害抵抗性 C macula densa から分泌された BMP-7/USAG-1 が糸球体内に作用する



可能性が高いことを見出した。

(2) USAG-1 を標的とした治療戦略およびバイオマーカーの可能性

申請者はUSAG-1/LacZ ノックインマウスを作成し、LacZ の発現部位がUSAG-1 mRNA と完全に一致することを確認した。

このマウスを用いた解析で、障害尿細管ではUSAG-1 発現が低下し、再生尿細管ではUSAG-1 が健康な尿細管よりも強く発現することが明らかになった (Kidney Int 2008)。

さらに USAG-1 強陽性の再生尿細管が多い個体ほど予後が悪く、腎 USAG-1 発現量と予後に正の相関があることが明らかになった。

USAG-1 は抗原性が低く、蛋白精製も困難であることから抗体作製は困難を極めたが、最終的に複数クローンの抗体を得ることができた。しかしながらいずれも中和活性は低く、

よりよい抗体を得るべく、スクリーニングを継続する必要がある。

(3) 尿細管セグメント分化メカニズムの解明

申請者らは USAG-1/LacZ マウスを用いて USAG-1 が遠位尿細管のマーカーとして有用であり、新生仔期の腎臓では、ひとつの尿細管断面で近位マーカー陽性細胞と遠位マーカー陽性細胞が隣り合ってパッチワーク状に存在していることを見いだした。これは細胞毎に cell fate が決まっていることを示唆する所見である。申請者は Genetic lineage tracing 法を用いて、このパッチワーク構造が成熟したネフロンの遠位尿細管にそのまま分化することを明らかにすることを目標として USAG-1CreERT2 mouse を作製中である。

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6件) 全て査読あり

1 Mari Tanaka, Misako Asada, Atsuko Y Higashi, Jin Nakamura, Akiko Oguchi, Mayumi Tomita, Sachiko Yamada, Nariaki Asada, Masayuki Takase, Tomohiko Okuda, Hiroshi Kawachi, Aris N. Economides, Elizabeth Robertson, Satoru Takahashi, Takeshi Sakurai, Roel Goldschmeding, Eri Muso, Atsushi Fukatsu, Toru Kita, and Motoko Yanagita

Loss of the BMP antagonist USAG-1 ameliorates disease in a mouse model of the progressive hereditary kidney disease Alport syndrome

J Clin Invest. 120(3):768-77, 2010

2 Motoko Yanagita

Antagonists of bone morphogenetic proteins in kidney diseases

Curr Opin Invest Drugs 11(3):315-22, 2010

3 Atsuko Yoshioka Higashi, Tomokatsu Ikawa, Masamichi Muramatsu, Aris N. Economides, Akira Niwa, Tomohiko Okuda, Andrew J. Murphy, Jose Rojas, Toshio Heike, Tatsutoshi Nakahata, Hiroshi Kawamoto, Toru Kita, and Motoko Yanagita

Direct hematological toxicity and illegitimate chromosomal recombination

caused by the systemic activation of CreER^{T2}

J Immunol. 182 (9):5633-40, 2009

4 Kentaro Suzuki, Aris Economides, **Motoko Yanagita**, Daniel Graf, and Gen Yamada. New horizons at the caudal embryos: coordinated urogenital/reproductive organ formation by growth factor signaling.

Curr Opin Genet Dev. 19 (5):49106, 2009.

5 **Motoko Yanagita**

BMP modulators regulate the function of BMP during body patterning and disease progression.

Biofactors 35 (2):113-9, 2009.

6 Mari Tanaka, Shuichiro Endo, Tomohiko Okuda, Aris N. Economides, David M. Valenzuela, Andrew J. Murphy, Elizabeth Robertson, **Takeshi Sakurai**, Atsushi Fukatsu, George D. Yancopoulos, Toru Kita, and **Motoko Yanagita**

Expression of BMP-7 and USAG-1 (a BMP antagonist) in kidney development and injury

Kidney Int. 73 (2):181-91, 2008.

[学会発表] (計 39 件)

1 第 5 4 回日本腎臓学会学術総会、横浜、2011 年 6 月 15-17 日 (予定)

ワークショップ「腎臓病治療の新たなターゲットとトランスレーショナルリサーチ」

演題名「腎臓病の進展因子 USAG-1 を標的とした治療法の可能性」柳田素子

ワークショップ「腎臓の線維化と再生を担う細胞群を探る」(企画、司会および講演)

演題名「腎臓の再生と線維化を担う細胞群の同定」柳田素子

男女共同参画委員会企画

「大島賞受賞者にキャリアプランとワークライフバランスを聞く」柳田素子

演題名「何を目指し、何に情熱を傾けるのか：若手腎臓内科医へのメッセージ」

2 World Congress of Nephrology, Vancouver, Canada 2011/4/10 **Motoko Yanagita**

Young Nephrologist Award Presentation
“Bmp7/Smad/Six2 axis maintains nephron progenitor cells in the developing kidney”
(指導した大学院生が 1 位を受賞し、かわり

に発表)

3 American Society of Nephrology, Denver, CO, USA 2010/11/16

“Exploring the origin of the cells responsible for regeneration and fibrosis in the kidneys”

Tomomi Endo, Tomohiko Okuda, Jin Nakamura, Atsuko Y. Higashi, Atsushi Fukatsu, Toru Kita, **Motoko Yanagita**

4 American Society of Nephrology, Denver, CO, USA 2010/11/16

“BMP7 maintains nephron progenitor population and determines nephron number”
Poster

Mayumi Tomita, Itsuro Kazama, Nariaki Asada, Atsuko Y. Higashi, Shuichiro Endo, Toru Kita, Atsushi Fukatsu, Aris N. Economides, Elizabeth Robertson, Jordan A. Kreidberg, and **Motoko Yanagita**

5 日本顕微鏡学会 シンポジウム、金沢、2010/11/12 柳田素子
腎臓における幹細胞維持メカニズムの解明

6 第 4 2 回日本臨床分子形態学会総会 シンポジウム、三島、2010/9/25 柳田素子
遺伝性腎失陥アルポート症候群の基底膜破綻における BMP-7 とそのアンタゴニスト USAG-1 の機能解析

7 International Society of Nephrology, Nexus Symposium, Geneva, Switzerland, 2010/7/2

Symposium “The role of BMP and TGF in kidney fibrosis” **Motoko Yanagita**

8 日本腎臓学会 2010/6/16-18 神戸

「BMP7 は幹細胞プールを維持することでネフロン数を決定する」口演

富田真弓、浅田礼光、東淳子、遠藤修一郎、Aris N Economides、北徹、深津敦司、柳田素子

9 日本腎臓学会 2010/6/16-18 神戸

「Genetic lineage tracing を用いて腎再生および線維化を担う細胞群を探る」口演
遠藤知美、奥田智彦、中村仁、東淳子、深津敦司、北徹、柳田素子

10 Annual session of the Society of Cardiovascular Endocrinology and

Metabolism、奈良、2010/4/1 Motoko Yanagita
“USAG-1, a novel BMP antagonist expressed in the kidney, accelerates acute and chronic kidney injury”

11 American Society of Nephrology, USA
2009/11/2

“BMP7 maintains nephron progenitor cells in kidney development”

Mayumi Tomita, Itsuro Kazama, Nariaki Asada, Atsuko Y. Higashi, Shuichiro Endo, Toru Kita, Atsushi Fukatsu, Aris N. Economides, Elizabeth Robertson, Jordan A. Kreidberg, and Motoko Yanagita

12 American Society of Nephrology, USA
2009/11/2

“Generation of proximal tubule-specific inducible Cre mice: a powerful tool to analyze the fate of mature proximal tubule cells.”

Tomomi Endo, Tomohiko Okuda, Jin Nakamura, Atsuko Y. Higashi, Atsushi Fukatsu, Toru Kita, Motoko Yanagita

13 World Health Summit, Berlin 2009/10/15
Motoko Yanagita

Symposium “Improving the research condition of young scientists”

14 第52回日本腎臓学会学術総会、横浜、
2009/6/5

男女共同参画委員会企画「腎臓学の専門性を広げる多彩なモデル」 柳田素子
演題名「腎臓病研究は面白い！」

15 第52回日本腎臓学会学術総会、横浜、
2009/6/5

「BMP拮抗分子USAG-1はアルポート症候群の糸球体障害を増悪させる」

田中麻理、富田真弓、東淳子、山田佐知子、奥田智彦、深津敦司、北徹、柳田素子

16 第52回日本腎臓学会学術総会、横浜、
2009/6/5

「BMP-7は腎発生においてネフロン前駆細胞を維持する」

富田真弓、浅田礼光、東淳子、遠藤修一郎、Economides Aris N、北徹、深津敦司、柳田素子

17 第52回日本腎臓学会学術総会、横浜、
2009/6/6

「BMP拮抗分子TsgはポドサイトにおけるBMPシグナルを抑制し、ポドサイト障害を増悪させる」

山田佐知子、富田真弓、遠藤知美、東淳子、田中麻理、遠藤修一郎、奥田智彦、松阪泰二、Graf Daniel、Economides Aris N、深津敦司、北徹、柳田素子

18 第52回日本腎臓学会学術総会、横浜、
2009/6/5

「尿管芽形成におけるBMP-4の役割」

東淳子、田中麻理、遠藤修一郎、山田佐知子、富田真弓、Brigid M.L. Hogan、Douglas P. Mortlock、Aris Economides、奥田智彦、深津敦司、北徹、柳田素子

19 American Society of Nephrology Meeting, Philadelphia, PA, USA, 2008/11/7 Motoko Yanagita

Symposium: “A Role of BMP/BMP antagonist in Renal Development”

20 American Society of Nephrology Meeting, Philadelphia, PA, USA, 2008/11/7

Generation of Proximal Tubule Specific Inducible Cre Mice

Tomomi Endo, Tomohiko Okuda, Atsushi Fukatsu, Toru Kita, Motoko Yanagita

21 American Society of Nephrology Meeting, Philadelphia, PA, USA, 2008/11/7

USAG-1 (uterine sensitization-associated gene-1), a novel BMP antagonist expressed in the kidney, exacerbates Alport glomerular pathogenesis

Mari Tanaka, Mayumi Tomita, Atsuko Higashi, Tomohiko Okuda, Atsushi Fukatsu, Toru Kita, Motoko Yanagita

22 American Society of Nephrology Meeting, Philadelphia, PA, USA, 2008/11/7

Megalin binds to stress-inducible N-myc downstream-regulated gene 1 (NDRG1) in proximal tubules

Sachiko Yamada, Tomohiko Okuda, Tomohito Higashi, Katsuya Okawa, Tadashi Yamamoto, Toru Kita, Motoko Yanagita

23 International Conference on Bone Morphogenetic Proteins, Sacramento, CA, USA, 2008/7/10 Motoko Yanagita

Symposium: “BMP/BMP antagonists during

kidney disease and development”

24 第 5 1 回日本腎臓学会学術総会、福岡、2008/6/5

「BMP 拮抗分子 USAG-1 はアルポート症候群の腎障害を増悪させる」

田中麻理、富田真弓、吉岡淳子、奥田智彦、深津敦司、北徹、柳田素子

[図書] (計 7 件)

1 Takashi Yokoo and Motoko Yanagita.

“Stem cell therapy against oxidative stress and hypoxia.” (Book chapter)

“Oxidative Stress and Hypoxia in Renal Disorders”,

edited by Kai-Uwe Eckardt and Toshio Miyata, published from The Human Press/Springer Science, *in press*.

2 柳田素子

「BMP とその調節因子 USAG-1 が織りなす腎障害進展のメカニズム」

『CKD のサイエンス 基礎と臨床』 榎野 博史編 p178-85、南山堂出版 2010 年

3 柳田素子

「腎の組織修復：BMP-7 調節因子に関する最近の知見」

『Annual Review 2010 腎臓』 御手洗哲也ほか編 p35-42、中外医学社 2010 年

4 Motoko Yanagita

“BMP antagonists and kidney.” (Book chapter)

“Bone Morphogenetic Protein: From Local to Systemic Therapeutics”,

edited by Vukicevic Slobodan and Kuber Sampath, published from Birkhauser, Springer Verlag, p213-232, 2008.

5 Motoko Yanagita

“Uterine Sensitization Associated Gene-1 (USAG-1): A Bone Morphogenetic Protein Antagonist in the Kidney.” (Book chapter)

“TRANSFORMING GROWTH FACTOR- β IN CANCER THERAPY”,

edited by Sonia B. Jakowlew, published from Humana Press, P463-473, 2008.

[その他]

研究業績一覧の論文 1 に対して以下の報道がありました。

【テレビ、ラジオ】

2010 年 2 月 9 日

テレビ NHK 総合 「腎臓病起こすタンパク質特定 京大チーム」

同様の内容が NHK ラジオでも報道されました。

【新聞】

2010 年 2 月 9 日

朝日新聞

「慢性腎臓病の治療法に光 京大チーム 血液濾過障害仕組み解明」

日本経済新聞

「腎不全症状軽減に有望手法 京大が考案 たんぱく質 働き抑制」

毎日新聞

「悪玉たんぱくで腎不全 京大 マウスで確認 遺伝病進行の鍵」

産経新聞

「腎修復阻害、仕組み解明 京大、腎不全治療に期待」

京都新聞

「腎不全悪化の物質発見 京大グループ 治療法の開発へ可能性」

2010 年 2 月 15 日

読売新聞

「腎臓病治療に光 アルポート症候群メカニズム解明」

など

【インターネットニュースサイト】

2010 年 2 月 9 日

YAHOO ニュース 「腎不全悪化のタンパク質を発見 京大グループ 米医学誌に発表」

アサヒ・ドット・コム 「腎臓病の進行を抑える治療の可能性 京大グループ発見」

自身のホームページを作製

<http://www.cp.kyoto-u.ac.jp/Yanagita/index.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柳田素子 (YANAGITA MOTOKO)

研究者番号：70378769

京都大学・次世代研究者育成センター

・特定准教授

(2) 研究分担者

桜井 武 (SAKURAI TAKESHI)

研究者番号：60251055

金沢大学・医学研究科・教授

(3) 連携研究者 なし