

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月11日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590628

研究課題名（和文） 糖尿病性血管合併症における血中Smad1の測定系構築と有効性の評価

研究課題名（英文） Establishment and evaluation of the measurement of serum Smad1 in diabetic vascular complications.

研究代表者

近藤 直樹（KONDO NAOKI）

香川大学・医学部附属病院・病院助教

研究者番号：80522789

研究成果の概要（和文）：糖尿病による血管合併症の発現時における血管構成細胞内での Smad1 の役割を明らかにするために、2 型糖尿病における動脈硬化発症・進展を早期に診断する有用な指標としての可能性を検討した。①生体内には、非リン酸化 Smad1、C 末リン酸化 Smad1、リンカー部分リン酸化 Smad1 が存在し、それらの測定系の中における、正常および糖尿病での血中 Smad1 のプロファイルを作成した。②ストレプトゾトシン誘導糖尿病モデルを使用し、血中 Smad1 を含む、関連分子群の変化を糖尿病の進行にあわせ、経時的に評価し、その surrogate marker として、血中 MGP を同定した。③患者の血清 MGP 値と腹部大動脈石灰化スコアとの間に負の相関を認めた。MGP 値の SNPs の違いは、血清 MGP 濃度とは独立して、血管合併症の進展のリスクであり、糖尿病患者において critical であることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：In order to clarify the functional role of Smad1 in vascular cells during the course of progression of diabetic vascular complications, potential of serum Smad1 as an early biomarker to detect the development and progression of atherosclerosis in type 2 diabetes was examined. ① Existence of non-phosphorylated, C-terminus phosphorylated and linker-phosphorylated Smad1 was found. Profiles for the values of each Smad1 form in serum were made. ② Serum MGP was found as a surrogate marker for evaluation of motions of Smad1-related molecules in STZ-induced diabetic mice models. ③ Negative association was observed between severity of atherosclerosis in abdominal aorta and serum MGP levels in patients. Significant difference of MGP-SNPs in the influence on the development of diabetic vascular complications was found, which are independent of the levels of serum MGP in these patients.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2010 年度	600,000	180,000	780,000
2011 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：腎臓病

科研費の分科・細目：境界医学、病態検査学

キーワード：糖尿病、血管合併症、Smad1、バイオマーカー、BMP4、MGP

1. 研究開始当初の背景

本申請代表者らは、糖尿病性糸球体病変を惹起するストレプトゾトシン誘導糖尿病ラットの尿中 Smad1 の時間経過を追って測定した結果、タンパク尿の所見ができる以前から尿中に漏れ出ており、尿中 Smad1 は糸球体病変の程度を鋭敏に反映するバイオマーカーであることを明らかにした。糖尿病患者の死因では、動脈硬化症を含む血管障害が原因となる臓器障害が多いことが知られており、腎血管にとどまらず、全身の血管基底膜に存在し、血管の安定性を担っているIV型コラーゲンの異常は、各血管病の初期に認められるため、STZで誘発した糖尿病ラットを用いた解析で、誘発初期から経時的に、このIV型コラーゲンの制御因子である Smad1 の発現誘導、ないしはそのリン酸化による活性化機構を *in vivo*, *in vitro* で解析し、糖尿病による血管合併症の発現時における血管構成細胞内での Smad1 の役割を明らかにしようとした。

2. 研究の目的

IV型コラーゲンの制御因子である Smad1 の発現誘導、ないしはそのリン酸化による活性化機構を *in vivo*, *in vitro* で解析し、糖尿病による血管合併症の発現時における血管構成細胞内での Smad1 の役割を明らかにする。

Smad1 は、2型糖尿病における動脈硬化発症・進展を早期に診断する有用な指標になり得ると考え、既知の動脈硬化リスクファクターと血中 Smad1 を経時的に測定し、動脈硬化度の関係を明らかにする。

3. 研究の方法

① 血中 Smad1 の分子学的評価：

測定系の構築は選定された候補抗体をもちい、二次元電気泳動と液体クロマトグラフィー/質量分析法を用いて、評価方法の正確さを確認する。生体内には、非リン酸化 Smad1、C末リン酸化 Smad1、リンカー部分リン酸化 Smad1 が存在することがわかっており、それらが測定系の中で、どのようにとらえられるかを分析し、正常および糖尿病での血中 Smad1 のプロファイルを作成し、血中動態を明らかにし、バイオマーカーとしてのより詳細な意義も明らかとする。

② 糖尿病モデル動物における血中 Smad1 の測定：

血中 Smad1 を含むバイオマーカーのうち、血管構成細胞内での初期変化である ALK1-Smad1 の発現によく関連するバイオマーカー候補分子からの絞り込みを行う。これまでに樹立した、より血管障害が進行しやすい Smad1 過剰発現マウスにストレプトゾトシンを投与し、糖尿病を誘導し、血管合併症をより促進させたモデルを用いた解析を行う。ヒトでもっとも用いられているアルブミン尿や代謝異常の程度、実際のモデルマウスでの大小血管病変および石灰化などの指標と相関関係の有無を評価しながら、血中 Smad1 を含む、関連分子群の変化を糖尿病の進行にあわせ、経時的に評価する。とくに、糖尿病性腎症進展の際、BMP4 の発現が増加し Smad1 を活性化することを明らかにしており、硬化進展を誘導する BMP4 は、動脈硬化進展時においても同様なメカニズムで作用している可能性が示唆される。動脈硬化進展時の組織解析を行い、BMP4-Smad1 シグナルに関与する分子の変動をあわせて解析する。これらの統合的な解析によって、Smad1 関連分子の病態形成における役割を明白にする。

③ 血中 Smad1 測定系の評価ならびに動脈硬化度との相関解析：

同時再現性を評価するために、患者プール血清を $n = 20 \sim 30$ を測定し、その値から標準偏差と変動係数を求め同時再現性の評価を行う。測定可能な下限濃度を求めるために、最低検出感度の評価を行う。標準物質ゼロ濃度と既知濃度標準物質の希釈系列を複数回測定し、前者の測定値あるいは吸光度の平均 + 2 SD が後者の測定値あるいは吸光度の平均 - SD と重ならない希釈系列の最小濃度を最低検出感度とする。測定系の上限値を定めるために希釈直線性の検討を行う。高値検体あるいは標準物質を段階的に希釈して求めた直線性から得られた値の 90% の値を測定範囲の上限とする。頸動脈エコーや脈波伝播速度などの動脈硬化リスクファクターとしての臨床情報と血中 Smad1 値の相関関係を解析し、経時的な変化から、動脈硬化病変の進展速度と血中 Smad1 値との相関についても解析し、本マーカーの有用性に関して評価する。さらに、総 Smad1 値と活性化 Smad1 (リン酸化 Smad1) 値の変動に、Smad1 のリン酸化タンパク質である BMP4 の血中での推移に関しても動物モデルで観察された関係が、ヒトでも同様であるかどうかを検討する。

4. 研究成果

本申請代表者らは、IV型コラーゲンの制御因子である Smad1 の発現誘導、ないしはそのリン酸化による活性化機構を *in vivo*, *in vitro* で解析し、糖尿病による血管合併症の発現時における血管構成細胞内での Smad1 の役割を明らかにしようとした。また Smad1 は、2型糖尿病における動脈硬化発症・進展を早期に診断する有用な指標になり得ると考え、既知の動脈硬化リスクファクターと血中 Smad1 を経時的に測定し、頸動脈エコーや脈波伝播速度などで動脈硬化度をモニターすることより、血中 Smad1 の変動と動脈硬化度の関係を明らかにした。①血中 Smad1 の分子学的評価:生体内には、非リン酸化 Smad1、C末リン酸化 Smad1 が存在することがわかり、それらが測定系の中で、どのようにとらえられるかを分析し、正常および糖尿病での血中 Smad1 のプロファイルを作成した。これらの、バイオマーカーとしての意義として、腎組織内での Smad1 の活動性に関連を見出した。②糖尿病モデル動物における血中 Smad1 の測定:Smad1 過剰発現マウスにストレプトゾトシンを投与し、糖尿病を誘導した。血管合併症をより促進させたモデルを用い、アルブミン尿や代謝異常の程度、実際のモデルマウスでの大小血管病変および石灰化などの指標と相関関係の有無を評価しながら、血中 Smad1 を含む、関連分子群の変化を糖尿病の進行にあわせ、経時的に評価し、その surrogate marker として、血中 MGP を同定した。③血中 Smad1 測定系の評価ならびに動脈硬化度との相関解析:患者の血清 MGP 値と腹部大動脈石灰化スコアとの間に負の相関を認めた。血清 MGP 値の SNPs の違いによる濃度差は検出されなかったことから、血管局所すなわち血管構成細胞内での異常が血管合併症にとって critical であることが明らかとなった。

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 2 件)

① Activation of bone morphogenetic protein 4 signaling leads to glomerulosclerosis that mimics diabetic nephropathy. Tominaga T, Abe H, Ueda O, Goto C, Nakahara K, Murakami T, Mima A, Nagai K, Araoka T, Kishi S, Fukushima N, Jishage KI, Doi T. *J Biol Chem*. 2011;286(22):20109-16、査読有

doi: 10.1074/jbc.M110.179382

②BMP4・Smad1 シグナルと糖尿病性腎症
安部秀斉、富永辰也、松原雄、土井俊夫
日本腎臓学会誌 vol. 53, No. 7, p. 1000-1005, 2011

[学会発表] (計 8 件)

①BMP4/Smad1 Signaling Is a Critical Therapeutic Target for Diabetic Nephropathy.

Matsubara T, Abe H, Ueda O, Tominaga T, Mima A, Nagai K, Torikoshi K, Araki M, Goto C, Kinoshita M, Jishage K, Fukushima N, Iehara N, Fukatsu A, Arai H, Doi T

43rd American Society of Nephrology (ASN) Annual Meeting, Denver, CO, U.S.A., Nov. 19, 2010

②尿中エクソゾームを用いた慢性腎臓病の非侵襲的診断法と予後予測

林早苗、安部秀斉、富永辰也、安部尚子、近藤直樹、土井俊夫
第 34 回 日本分子生物学会年会
2011.11.13-16 パシフィコ横浜 (横浜市)

③Genomic biomarker を用いた CKD 患者の心血管リスク評価の試み

吉川和寛、安部秀斉、富永辰也、岸誠司、近藤直樹、松浦元一、長井幸二郎、土井俊夫、中村雅将、土田健司、水口潤、川島周
第 56 回 日本透析医学会学術集会・総会
2011. 6.17-19 横浜

④加齢による影響を受けない腎症新規バイオマーカーの探索

芦名茂人、安部秀斉、土井俊夫
第 21 回 日本老年医学会四国地方会総会
2010. 2.20 徳島大学医学部・歯学部歯学部附属病院(徳島市)

⑤CKD 患者の血中 MGP および関連分子と、病態に関する検討

吉川和寛、安部秀斉、富永辰也、岸誠司、岸史、荒岡利和、村上太一、近藤直樹、松浦元一、長井幸二郎、土井俊夫、中村雅将、土田健司、水口潤、川島周
第 55 回 日本透析医学会学術集会・総会
2010. 6.18-20 神戸

⑥新規バイオマーカーとしての尿中エクソゾーム中の CD2AP による CKD 患者の予後解析

近藤直樹、安部秀斉、芦名茂人、吉川和寛、岸史、荒岡利和、岸誠司、松浦元一、村上太一、中村雅将、長井幸二郎、土井俊夫
第 55 回 日本透析医学会学術集会・総会
2010. 6.18-20 (神戸市)

⑦新規バイオマーカーとしての podocyte 由来尿中エクソゾームによる慢性腎臓病患者の病態解析
安部尚子、安部秀斉、近藤直樹、吉川和寛、土井俊夫

第 33 回 日本分子生物学会年会、第 83 回日本生化学会大会
2010.12.7-10 神戸ポートアイランド(神戸市)

⑧糖尿病性腎症発症とアルブミン尿排泄に関与する BMP4 の分子機構

富永辰也

第52回日本生化学会中国・四国支部総会、広島大学・広仁会館（広島市）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

特記事項無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

近藤 直樹 (KONDO NAOKI)

香川大学・医学部附属病院・病院助教

研究者番号：80522789

(2) 研究分担者

富永 辰也 (TOMINAGA TATSUYA)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究科・助教

研究者番号：80425446

松浦 元一 (MATSUURA MOTOKAZU)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究科・助教

研究者番号：10403734

(3) 連携研究者

（該当者無し）