

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 5月31日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591033

研究課題名（和文） 慢性腎臓病から腎不全に至る不可逆的形質変化の分子機構解明

研究課題名（英文） Molecular mechanisms for irreversible phenotypic changes leading to renal failure in chronic kidney diseases.

研究代表者

安部 秀斉（ABE HIDEHARU）

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・准教授

研究者番号：60399342

研究成果の概要（和文）： AGE 刺激ではメサンギウム細胞（MC）において軟骨形質マーカーの発現が誘導され、BMP4-Smad1 シグナルを介していた。低酸素下では HIF-1 が発現し、軟骨形質マーカーが誘導された。SOX9 強発現では、MC において軟骨形質が誘導された。iNOS Tg および BMP4Tg においても糸球体に軟骨形質の発現を認め、SOX9 と HIF-1 は発現が一致した。糖尿病で MC は SOX9 によって軟骨の形質を獲得し、病的低酸素・虚血ストレスへ適応を試みるが、結果的には腎不全を不可逆的に進行させる。

研究成果の概要（英文）： Advanced glycation end products induced the expression of chondrocyte marker proteins downstream from the BMP4-Smad1 signaling pathway in MCs. In addition, hypoxia also induced the expression of HIF-1, and chondrocyte markers. Overexpression of SOX9 caused ectopic expression of chondrocyte markers. Glomerular expressions of HIF-1, BMP4, and chondrocyte markers were observed in diabetic nephropathy mice. SOX9 was colocalized with HIF-1 in diabetic glomeruli. BMP4 knock-in transgenic mice showed not only similar pathological lesions to DN, but also the induction of chondrocyte markers in the sclerotic lesions. HIF-1 and BMP4 induce SOX9 expression and subsequent chondrogenic phenotype change in DN. The results suggested that the transdifferentiation of MCs into chondrocyte-like cells in chronic hypoxic stress may result in irreversible structural change in DN.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：糖尿病性腎症

1. 研究開始当初の背景

日本の透析患者数は、2010年末には約30万人に到達している。原因となる腎疾患は糖尿病性腎症、慢性糸球体腎炎、腎硬化症で約

8割を占める。これらは、腎機能低下進行の過程で、糸球体硬化という不可逆的な共通の変化をきたすが、その分子レベルの理解はなされていなかった。

慢性腎臓病 (CKD: chronic kidney disease) は有効な抑止策のないまま増加し続けている。これらの末期像である慢性腎不全から、透析に至る患者数も年々増加の一途にあり、必要とされる医療費の増加は医療上、社会上、そして経済的側面からも、その対策が 21 世紀のわが国における喫緊の課題となっている。なかでも、糖尿病性腎症による透析患者数は増加の一途をたどっており、アンジオテンシン系抑制薬をはじめとする現行の治療法では、腎不全への進展をわずかに遅延させるのみである。したがって、旧来の治療よりも、より腎症に特異性の高く、有効な治療法の開発は急務である。そのためには、腎症発症・進行の分子レベルでの病態を明らかにし、分子治療のターゲットとなるべき標的分子の同定が不可欠であった。本研究代表者らは、糖尿病性腎症および糸球体腎炎の両腎疾患における発症・進行に中心的な役割を果たす転写因子 Smad1 のクローニングに成功し、糸球体硬化症の特徴である細胞外基質増加に関わる遺伝子群 (IV 型コラーゲン、I 型コラーゲン、オステオポンチン、SMA(smooth muscle α actin)) を直接制御していることを初めて見いだした (J Biol Chem 279,14201-14206,2004, J Biol Chem 279,19816-19823,2004)。さらには、腎症のバイオマーカーとしての尿中 Smad1 の検出系を確立し、その検出レベルが実際の糸球体硬化の程度を正確に反映するだけでなく、硬化病変発症の予測マーカーとなりうることも示した (Lab Invest 86, 357-68, 2006, Diabetes 57,1712-22,2008)。また、ヒト糖尿病性腎症において、糖尿病の経過中に合併する高血圧が腎症の進行に深く寄与することが知られているが、Smad1 はアンジオテンシン II の下流で Src により活性化され、糸球体硬化を促進させることも明らかとした (Lab Invest 86, 927-39, 2006, J Biol Chem 280, 7100-6, 2005)。この糸球体硬化責任分子 Smad1 は、TGF β -ALK1-Smad1 と BMPs (bone morphogenetic proteins)-ALK3/6-Smad1 という dual pathway によりリン酸化を受け、活性化される。Smad1 は正常の糸球体では発現が見られず、糸球体硬化病変の形成とともに糸球体内に発現が誘導される。この際、やはり正常ではみられない I 型コラーゲン、オステオポンチン、Cbfa1/Runx2、II 型コラーゲン、Scx (Scleraxis)、Sox9 などの骨・軟骨に特徴的な細胞外マトリックスや制御因子の発現が Smad1 により促進され、硬化病変が不可逆的に進行することを組織学的解析とバイオマーカーの測定により明らかとした (Diabetes 57,1712-22,2008)。腎メサンギウム細胞は、このような骨・軟骨に特徴的な硬化関連遺伝子を発現するように形質が骨

芽・軟骨細胞様変化をきたす。間葉系細胞は、マスター遺伝子ともいべき各々の細胞特異的な転写因子によって分化誘導を受けることで、脂肪細胞、骨芽細胞、軟骨細胞などの固有の細胞へ最終分化すると考えられてきたが、これら細胞の分化は決定的なものではなく、外的ストレスに応じて、transdifferentiation という形質変化をきたすことが、多くの間葉系細胞由来の細胞にも広く認められることが報告されるようになってきた (Mol Cell 4:597-609,1999)。この事実は、間葉系細胞由来のメサンギウム細胞にもみられ、骨芽・軟骨細胞様に形質が変化する (osteo-/chondro-cyte like cells) ことが考えられる。糖尿病や炎症に腎組織が長期的なストレスにさらされ、それに対する応答としての骨芽・軟骨細胞様変化が腎組織のリモデリング、すなわち不可逆的な腎不全病変形成の背景にあることを示唆している。したがって、間葉系細胞由来の糸球体構成細胞が最終的に骨芽・軟骨細胞様形質変化をきたし、不可逆的に腎不全に至る過程の詳細を、分子レベルで解明することこそが、不可逆的な腎不全に至る患者数の増加抑止のために先ず取り組まなければならない、解決すべき、最も重要な課題と考える。

2. 研究の目的

以前より、TGF β が糖尿病性腎症や糸球体腎炎において、SMA の発現を誘導し、病変形成に関わっていることは知られていたが、正常腎では発現がみられない、I 型コラーゲン、オステオポンチン、Cbfa1/Runx2、II 型コラーゲン、Scx (Scleraxis)、Sox9 などの骨・軟骨に特徴的な細胞外基質や制御因子の発現調節機構は不明であった。本申請者らは、これら分子を転写制御する Smad1 を同定することにより、TGF β -ALK1-Smad1 と BMP4-ALK3/6-Smad1 という dual pathway が病態の中心にあることを明らかとしてきた。本研究では、なかでも、他のコラーゲンなどの発現を制御し、間葉系幹細胞から軟骨細胞への分化のマスター遺伝子である Sox9 に着目し、(1) 糸球体硬化の進行過程における Sox9 制御機構の解析、(2) 糖尿病性腎症ないし腎炎動物モデルでの検討、(3) BMP4 および Smad1 のコンディショナル トランスジェニックマウスの解析、(4) Sox9 遺伝子改変マウスを用いた糖尿病および腎炎における Sox9 活性化の意義の検討、を行い、不可逆的な糸球体硬化病変の形成過程の詳細を解明し、有効な抑止策がないまま増加し続けている慢性腎臓病の進展の分子病態を明らかとする。間葉系細胞由来のメサンギウム細胞が糖尿病や慢性炎症という外的ストレスを受けることで、骨芽・軟骨細胞様に形質が変化 (osteo-/chondro-cyte like cells) し、

多くの腎疾患の最終的な共通プロセスである糸球体硬化病変を形成する過程の詳細を分子レベルで明らかにし、不可逆的な変化とされる糸球体硬化病変の進行抑制に向けた治療のターゲットとなりうるキー分子 Sox9 の発現調節機構を解明する。

3. 研究の方法

(1) 糸球体硬化における Sox9 の制御機構

Sox9 は間葉系細胞において、BMP4 により強力に発現が誘導されることが知られている。Sox9 は正常の腎糸球体内には発現がみられず、糖尿病や持続炎症下においてのみ発現がみられるので、この誘導機構を、培養メサンギウム細胞を用いて、糖尿病において活性化が確認されている TGF β -ALK1-Smad1 および BMP4-ALK3/6-Smad1 の両経路による Sox9 発現誘導の機構を解析し、osteo-/chondro-cyte like cells への形質転換を分子レベルで明らかにする。

(2) 糖尿病性腎症モデルでの検討および治療法の評価

ストレプトゾトシン誘導糖尿病マウスを作製し、糸球体病変を惹起させる。本モデルは潜在性腎症に類似した糸球体硬化症を来す。また、より進行した硬化病変を有する iNOS トランスジェニックマウスも用いる。各々のモデルにおいて、腎糸球体内における Sox9 および BMP/Smad1 などの Sox9 制御分子の存在・発現を病期の早期から各段階で、単離糸球体での mRNA 発現、免疫組織学的解析によるタンパク質発現を詳細に調べ、糸球体硬化病変形成との関係を、尿中アルブミンや、すでに樹立している硬化のバイオマーカーである尿中 Smad1 の測定により明白にする。Sox9 誘導に関与する BMP4 の抑制分子を用いた Sox9 をターゲットとした新規治療法としての可能性を検討する。

(3) BMP4 コンディショナル トランスジェニックマウスの解析

BMP4、Smad1 とともに、全身での過剰発現マウスは発生期において異常をきたすため、タモキシフェン誘導型調節発現マウスの作成を行った。腎糸球体内での強力な発現を惹起する strain を選定・樹立し、ヒト腎症に類似した糸球体硬化のモデルを作製する。Smad1 および BMP4 により発現誘導される Sox9 の腎での局在を免疫組織学的染色により確認する。同時に、BMP4、Smad1、Sox9 の下流にある骨・軟骨関連分子群の発現の増強と病理学的な糸球体硬化病変の程度が一致することを明らかにする。

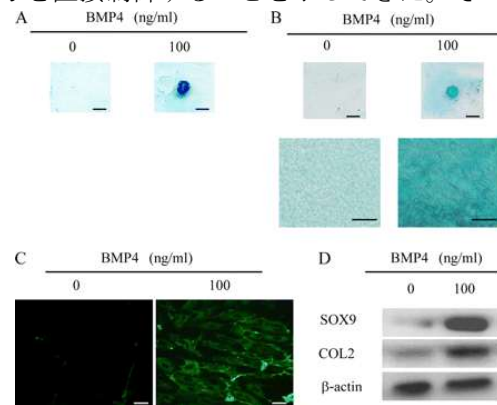
(4) Sox9 遺伝子改変マウスを用いた硬化促進モデルの作成

Sox9-EGFP ノックインマウスを用いて、糖

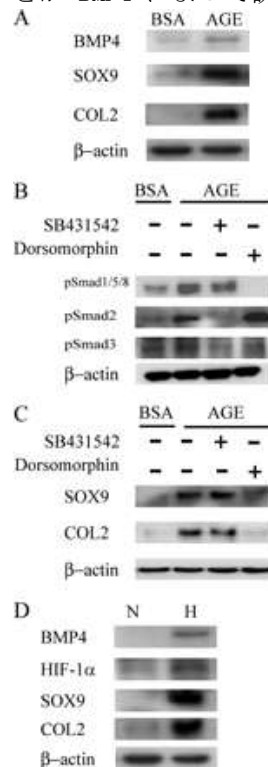
尿病を惹起し、経時的腎生検を行い、Sox9 が発現する過程を、腎の病理組織学的評価および尿蛋白や尿中 Smad1 の経時的測定結果とあわせて、糸球体硬化病変形成過程への寄与を明らかにする。

4. 研究成果

(1) 我々は、糖尿病条件下ではメサンギウム細胞 (MC) に Smad1 が発現し、IV 型コラーゲンをはじめとする細胞外基質遺伝子群の転写を直接制御することを示してきた。その上

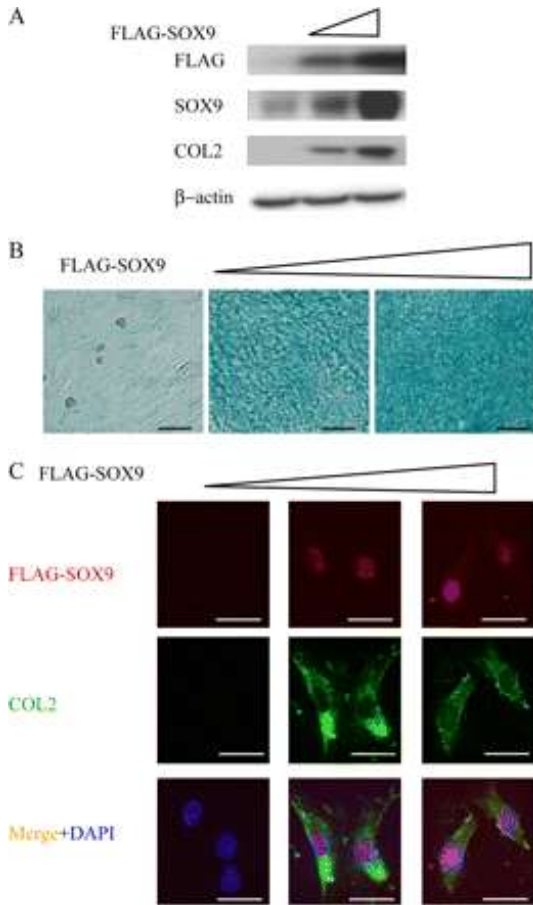


流分子 Bone morphogenetic protein 4 (BMP4) によって、メサンギウム細胞の新たな分化異常の可能性として、間葉系幹細胞から軟骨細胞への分化におけるマスター転写因子として知られる SOX9 の発現の誘導がなされるかどうかをマイクロマス培養で検討したところ、Sox9 ならびに軟骨細胞の形質である Co12 などが BMP4 によって誘導されることが明らかになった。

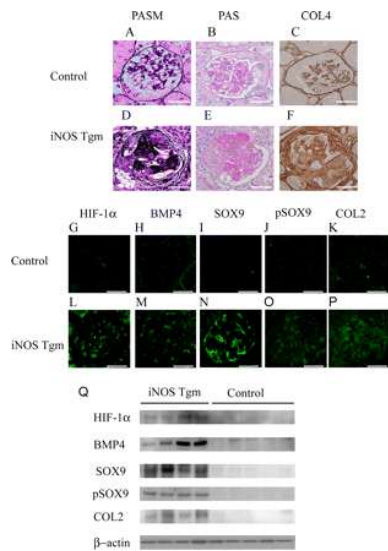


(2) さらに、糖尿病条件下としての AGE 刺激、ならびに低酸素によるストレス刺激によって、BMP4、Sox9、Col2 などの発現がいずれも誘導された。

(3) SOX9 の一過性強発現では、MC において軟骨形質の誘導が確認された。Sox9-EGFP ノックインマウスを用い、STZ 投与によって糖尿病を惹起すると糸球体に Sox9 が新たに発現を呈することを明らかにした。



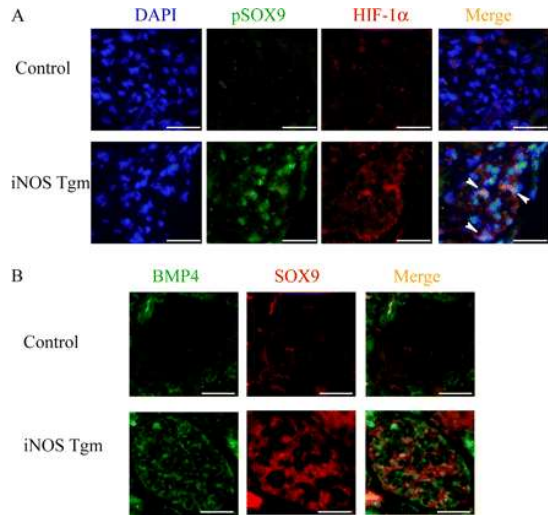
(4) 誘導型 nitric oxide 合成酵素を脾β細胞特異的に過剰発現することでヒト1型糖尿病に類似した病態を形成し、進行したヒト糖尿病性腎症に類似した腎病変を形成するトランスジェニックマウス



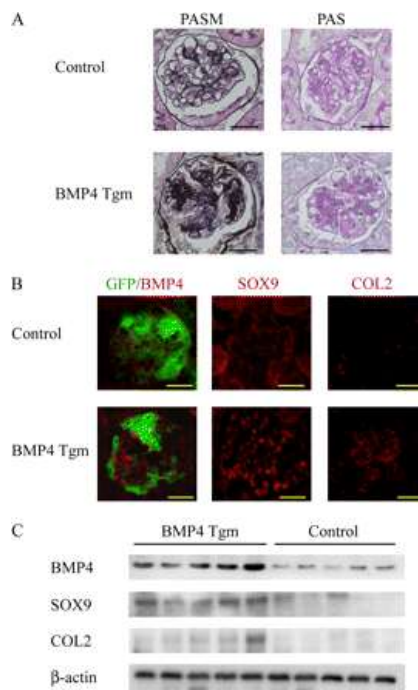
iNOS Tg においても糸球体に軟骨形質マーカーおよび低酸素ストレスを示す転写因子 HIF-1 の発現を認めた。

(5) 最近、低酸素ストレスは転写因子 HIF-1 などを介して、尿細管だけでなく、糸球体においても病変形成に作用しているとの報告がなされており、iNOS Tg においてその連関を解析したところ、糸球体で SOX9 と HIF-1

は発現が一致していた。



(6) BMP4 コンディショナル トランスジェニックマウス (BMP4Tg) は糖尿病性腎症に特徴的なメサンギウム基質増生と糸球体基底膜の肥厚を示した。BMP4Tg においても糸球体に軟骨形質マーカーの発現を認め、SOX9 と HIF-1 は発現が一致しており、糖尿病性腎症が末期腎不全に至る過程で MC が異所性に誘導される SOX9 によって軟骨の形質を獲得することが明らかとなった。これは病的低酸素・



素・虚血ストレスへの適応と考えられるが、結果的には軟骨特異的細胞外マトリックス産生が腎不全を不可逆的に進行させるという新たな機序が示唆された。

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 8 件)

① Scleraxis modulates bone morphogenetic protein 4 (BMP4)-Smad1-smooth muscle α actin (SMA) signal transduction in diabetic nephropathy. Abe H, Tominaga T, Matsubara T, Abe N, Kishi S, Nagai K, Murakami T, Araoka T, Doi T. *J Biol Chem*. 2012; April 2、査読有
doi: 10.1074/jbc.M111.275610

② Sox9 induces a chondrogenic phenotype of mesangial cells and contributes to advanced diabetic nephropathy. Kishi S, Abe H, Akiyama H, Tominaga T, Murakami T, Mima A, Nagai K, Kishi F, Matsuura M, Matsubara T, Iehara N, Ueda O, Fukushima N, Jishage KI, Doi T. *J Biol Chem*. 2011;286(37):32162-9、査読有
doi: 10.1074/jbc.M111.244541

③ Recent progress in understanding the molecular pathogenesis of diabetic nephropathy. Abe H Rinsho Byori. 2011;59(2):179-86.、査読有

④ 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

⑤ Activation of Src Mediates PDGF-Induced Smad1 Phosphorylation and Contributes to the Progression of Glomerulosclerosis in Glomerulonephritis. Mima A, Abe H, Nagai K, Arai H, Matsubara T, Araki M, Torikoshi K, Tominaga T, Iehara N, Fukatsu A, Kita T, Doi T. *PLoS One*. 2011;6(3):e17929.、査読有
<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0017929>

⑥ Role of Smad1 in diabetic nephropathy: Molecular mechanisms and implications as a diagnostic marker. Abe H, Matsubara T, Arai H, Doi T. *Histol Histopathol*. 2011;26(4):531-541、査読有
http://www.hh.um.es/Abstracts/Vol_26/26_4/26_4_531.htm

⑦ Trophoblast glycoprotein: possible candidate mediating podocyte injuries in glomerulonephritis. Murakami T, Abe H, Nagai K, Tominaga T, Takamatsu N, Matsubara T, Araoka T, Kishi S, Takahashi T, Mima A, Takai Y, Kopp JB, Doi T. *Am J Nephrol*. 2010;32(6):

505-521.、査読有

DOI: 10.1159/000321366

⑧ Transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) regulates activin receptor-like kinase 1 (ALK1)/Smad1 pathway for development of diabetic nephropathy. Araoka T, Abe H, Tominaga T, Mima A, Matsubara T, Murakami T, Kishi S, Nagai K, Doi T. *Mol Cells*. 2010 ;30(3): 209-218.、査読有
DOI: 10.1007/s10059-010-0109-9

[学会発表] (計 10 件)

① Overexpression of Smad1 Causes Remarkable Glomerulosclerosis in Diabetic Mice.

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

American Diabetes Association 71th Scientific Session, San Diego Convention Center - San Diego., U.S.A., Jun 5-9, 2011.

② Trophoblast glycoprotein regulates the podocyte injuries in experimental glomerulonephritis.

Murakami T, Abe H, Nagai K, Tominaga T, Matsuura M, Kishi S, Kishi F, Yoshikawa K, Kondo N, Jeffrey Kopp, Doi T

World Congress of Nephrology 2011, Vancouver, Canada, April 8-12, 2011.

③ Chondrogenic phenotypic change contributes to the irreversible progression of the diabetic nephropathy.

Kishi S, Abe H, Murakami T, Tominaga T, Nagai K, Mima A, Doi T

50th The American Society for Cell Biology Annual Meeting, Philadelphia, U.S.A., Dec. 11-15, 2010

④ PIASy Regulates SM α -Actin Expression by Interacting with E12 in Mesangial Proliferative Glomerulonephritis.

Torikoshi K, Araki M, Matsubara T, Mima A, Hirano T, Abe H, Fukatsu A, Arai H, Doi T

43rd American Society of Nephrology (ASN) Annual Meeting, Denver, CO, U.S.A., Nov. 21, 2010

⑤ Conditional Knockout of Smad1 Ameliorates Glomerulosclerosis in Progressive Glomerulonephritis.

Araki M, Abe H, Torikoshi K, Mima A, Matsubara T, Iehara N, Fukatsu A, Salant DJ,

Arai H, Doi T
43rd American Society of Nephrology (ASN)
Annual Meeting, Denver, CO, U.S.A., Nov. 21,
2010

⑥ BMP4/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,
Kinosaki 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

⑦ Chondrogenic Potential of Mesangial Cells in
Diabetic Nephropathy.

Kishi S, Abe H, Akiyama H, Doi T

49th The American Society for Cell Biology
Annual Meeting, San Diego, U.S.A., Dec. 5-9,
2009

⑧ The Novel Function of Trophoblast
Glycoprotein (Tpbp) on Actin Remodeling in
Podocyte Injured in Experimental
Glomerulonephritis

Murakami T, Abe H, Matsuura M, Araoka T,
Kishi S, Tominaga T, Shigeta R, Yoshikawa K,
Kishi F, Takamatsu N, Takahashi T, Mima A,
Nagai K, Takai Y, Doi T

American Society of Nephrology (ASN)
Annual Meeting, Pennsylvania, U.S.A., Oct. 30,
2009

⑨ TCF7L2(Transcription factor 7-like 2)
Regulates Activin Receptor-Like
Kinase1(ALK1)/Smad1 Pathway for
Development of Diabetic Nephropathy. (Araoka
T: Young Investigator Travel Grant Award)

Araoka T, Abe H, Matsuura M, Murakami T,
Kishi S, Tominaga T, Shigeta R, Yoshikawa K,
Kishi F, Mima A, Takahashi T, Hirano T, Doi T
American Diabetes Association 69th Scientific
Session, New Orleans., U.S.A., Jun 5-9, 2009.

[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]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安部 秀斉 (ABE HIDEHARU)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス
研究部・准教授
研究者番号：60399342

(2) 研究分担者

秋山 治彦 (AKIYAMA HARUHIKO)
京都大学・医学研究科・准教授
研究者番号：60402830

(3) 連携研究者

岸 誠司 (KISHI SEIJI)
徳島大学・病院・助教
研究者番号：10519057