

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09265

研究課題名(和文) 糖尿病性腎症および腎硬化症の血管合併症分子病態解明とその修復法の開発

研究課題名(英文) Elucidation of molecular mechanisms and development of vascular complications in diabetic nephropathy and renal arteriosclerosis

研究代表者

安部 秀斉 (ABE, Hideharu)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学系)・准教授

研究者番号：60399342

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病性腎障害(DKD)において、早期の糖尿病性腎症はアルブミン尿の増加とGFRの低下で古典的に定義されてきた。しかし、この定義に沿わない患者が存在し、様々な程度の腎硬化症がDNに併存している。以前、Smad1がDKDにおいて血管合併症の進展に重要な役割を果たすことを示した。しかしながら、従来より知られているTGFbetaシグナルとの関連性は不明であった。Smad3-KO-DKDマウスにおいて、Smad1のC末端リン酸化が部分的に抑制されていることが明らかとなった。Smad3の活性化は、Smad1のC末端リン酸化を増強する一方で、リンカードメインのリン酸化を減弱させた。

研究成果の概要(英文)：In diabetic kidney disease (DKD), incipient diabetic nephropathy is classically defined by increasing albuminuria, heralding a decline in glomerular filtration rate (GFR). However, a proportion of patients with type 2 diabetes does not follow this classical albuminuric pathway. Varying degrees of arteriosclerosis were seen in the subjects with normoalbuminuria. We previously found that Smad1 plays a critical role in the development of DKD both in vitro and in vivo. However, functional interaction between Smad1 and Smad3 signaling in DKD is unclear. Extracellular matrix (ECM) protein overexpression and Smad1 activation were observed in the glomeruli of db/db mice but were suppressed in the glomeruli of Smad3-KO-DKD mice. Smad3 activation enhanced the phosphorylation of Smad1 C-terminal domain but decreased the phosphorylation of linker domain. Collectively, preferential activation of the Smad1 linker domain may provide a novel therapeutic approach for treating DKD.

研究分野：腎臓病修復学

キーワード：糖尿病性腎症 腎硬化症 腎臓病修復学 Smad1 BMP4

1. 研究開始当初の背景

糖尿病患者は世界規模で急速に増加している。その増加に伴い、引き続いて生じる糖尿病合併症としての糖尿病性腎症患者が世界的に見ると、さらに増加することは必至である。現在、新規透析導入の最大の原疾患であり、腎不全・慢性維持透析患者数の増加は、医療経済的に重大な問題となっている。一方で、高齢化社会を背景として、高血圧を有する患者人口が増加している。その結果として、腎硬化症の割合は直線的に増加してきている。そして、糖尿病の多くが中高年者に発症することから、糖尿病性腎症患者の多くが腎硬化症を併発する可能性が非常に高くなってきており、糖尿病腎障害(DKD)。腎臓という臓器の構造上、糸球体毛細血管だけでなく、輸入細動脈や小葉間動脈などの細動脈硬化もまた、腎機能低下の直接の原因となる。実際、最近の糖尿病性腎症の病期分類の改定に反映されているように、糖尿病性腎症の自然経過にあわない、すなわち、アルブミン尿やタンパク尿の程度が経度でありながら、腎機能低下が有意に進行する患者が非常に増えていることが明らかになっている。また、本症は現在のところ最も有効とされるレニン・アンジオテンシン(RA)系阻害薬による治療によっても、腎不全の進行をわずかに遅らせるのみであり、早期から使用しても網膜症進展には効果があるが、腎症には効果が認められない(NEJM 361:40-51,2009)。糸球体毛細血管だけでなく、輸入細動脈や小葉間動脈などの細動脈硬化の硬化への進展の機序を解明し、各血管構成細胞の本来の正常分化された状態へ引き戻すことができれば、腎症の進展を抑制し、末期腎不全や透析に至る可能性を最大限に低下させることができる。本邦では2012年で24.1%に達し、世界に類を見ない超高齢社会となっている。さらに、糖尿病患者も増加している。したがって、加齢ないし高血圧と糖尿病が原因となる腎機能悪化予防に対する具体的な対応策の策定が急務である。

2. 研究の目的

糖尿病性腎症は慢性腎臓病(CKD: chronic kidney disease)の主たる原因である。また、糖尿病は多くが中高年者に発症し、高血圧を合併する頻度が高く、糖尿病性腎症患者においては、同時に、腎硬化症による血管障害が腎機能の予後の悪さに関与している。ヒト腎組織の解析において、糖尿病性腎症にさらに腎硬化症を合併すると、腎血管発生に必須であるタンパク質群(BMP4, Smad1など)の発現が増強することが明らかとなった。本研究では、糖尿病かつ高血圧・加齢というリアルワールドのヒトでの腎血管障害克服にむけて、いまだ治療に向けた治療法のないこの分野において、血管構成細胞特異的分子標的修復治療法の開発をめざす。すでに一連の研究で、BMP4がSmad1の発現を誘導かつリ

ン酸化・活性化することを *in vitro*, *in vivo* において明らかにしてきた。ただ、BMP4, Smad1 はともに、腎における発生に必須の因子でもあり、全身性のノックアウトやトランスジェニックマウスは解析に適さない。これらの課題を解決しながら、DKDの修復治療のkeyとなるcritical eventを探索する。

3. 研究の方法

糖尿病性腎症および腎硬化症の血管合併症の分子機序の解明および治療法開発のために、(1)糖尿病or非糖尿病条件下の血管構成細胞のBMP-Smad1シグナル活性化の*in vitro*解析、(2)高齢マウスにおけるBMP4-Smad1活性化機構解明、(3)加齢Smad3-KOマウスを使用し、糖尿病誘導および加齢による糸球体硬化および細動脈硬化の抑制効果を解析する、(4)高齢マウスに糖尿病を誘導した際の、通常の若いマウスの場合とのBMP-Smad1シグナル活性化機構解明、(5)AGE刺激により、早期老化を誘導した血管構成細胞と若い細胞間での、Smad1誘導・活性化調節分子の同定を行い、現在、増加を続ける高血圧をあわせもつ糖尿病性腎症患者の血管障害の分子病態、進行過程を解明し、現在有効な抑止策がないまま増加し続けている現況の改善のために、治療をめざす治療法の開拓を行う。Drug repositioningとして、すでにヒト糖尿病性腎症において、アルブミン尿減少などの効果が確認されているprobucolに関して、このBMP4-Smad1シグナルおよび関連分子のうちprobucolのターゲットとなっている分子に与える影響を解析し、実存薬の効果を発揮する標的分子に関して検討を加える。

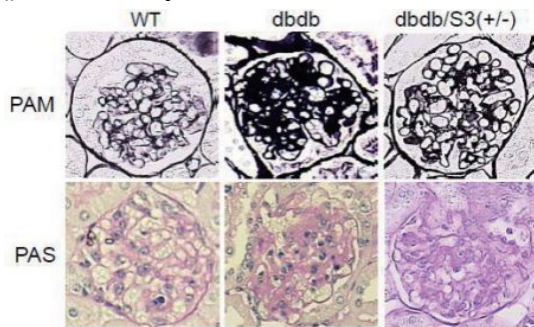
4. 研究成果

C57BLKS(BKS)/Vehicle(9匹)、C57BLKS(BKS)/Probucol(9匹)、BKS/Cg-m+/+Lepr db(db/db)/Vehicle(10匹)、BKS/Cg-m+/+Lepr db(db/db)/Probucol(10匹)の4群に対して実験を行った(BKS/Cg-m+/+Lepr db(db/db)/Vehicle群で経過中に1匹死亡)。各群のマウスは6週齢より投薬を開始し、18週間投与後(24週齢)に解剖を行った。

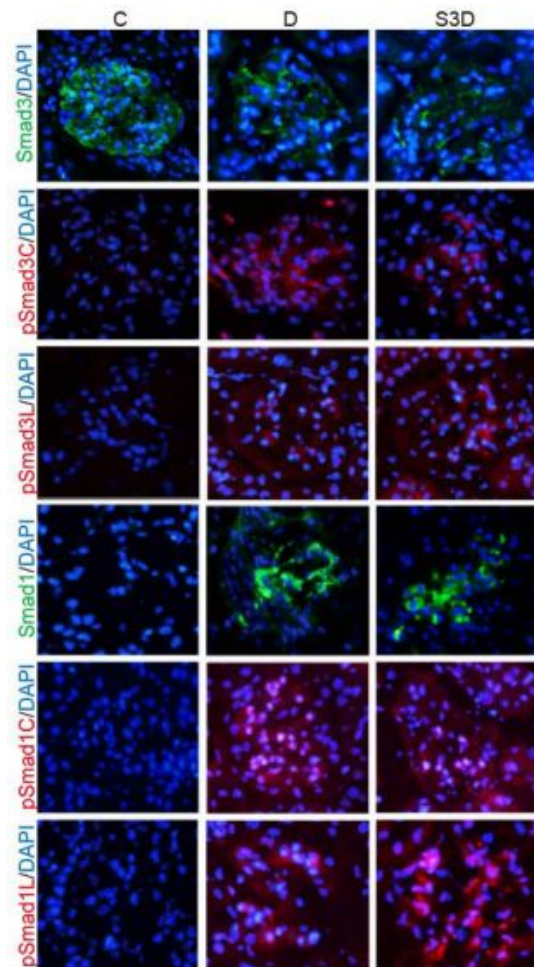
C57BLKS群と比較してdbdb群では明らかな体重増加を認めた。dbdb群内では通常食群、Probucol群で体重に有意差を認めなかったが、腎重量に関しては通常食で低値を呈し、体重補正を加えても同様の結果であった。血液検査ではBUNは通常食群で高値を呈した。脂質プロファイルに関してはT-Cho、HDL-Cの著明な低下を認め、従来の報告と矛盾しない結果であった。

dbdb群において通常食群、Probucol群で最終体重に有意差を認めなかったが体重推移に関しては、通常食群では早期から減少したのに対して、Probucol投与により体重減少の開始は遅延した。また、通常食群では早

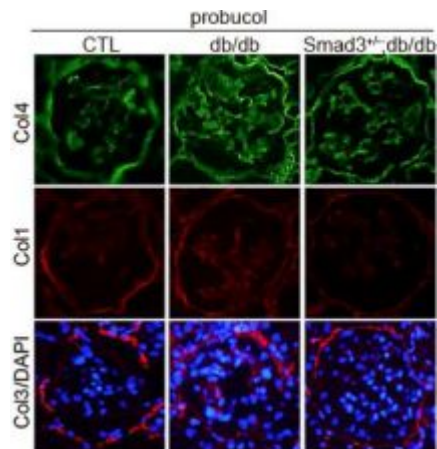
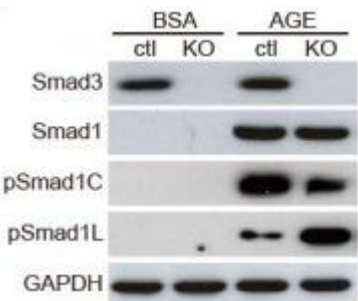
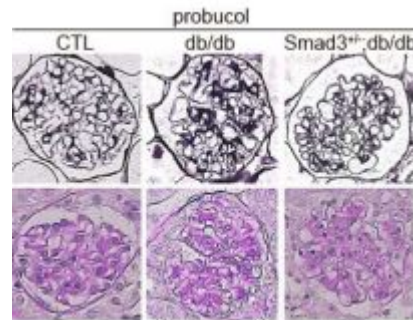
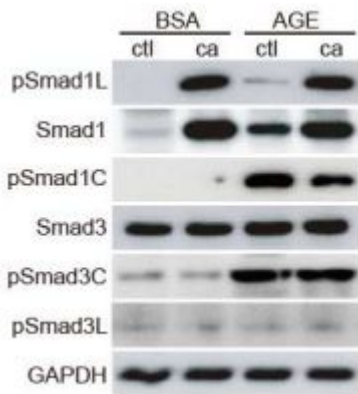
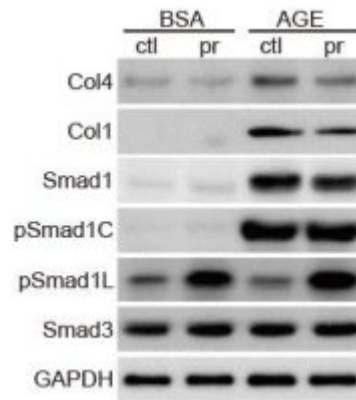
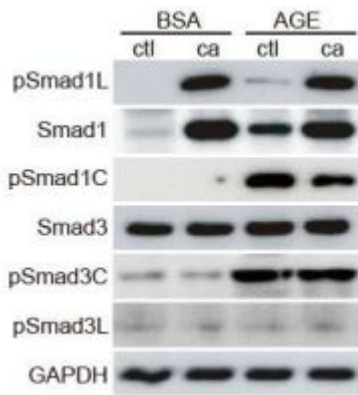
期からアルブミン尿が著明に増加したが、ProbucoI によりアルブミン尿のピークの時期は遅延した。これらの結果から ProbucoI が糖尿病性腎症の進展を遅らせている可能性が示唆された。腎重量に差異が生じたのは、通常食群では早期から低 Alb 血症を呈し脱水傾向であった可能性、また、腎組織還流量低下がより長期間にわたったことによる腎障害(腎萎縮)の可能性等が示唆された。PAS、PAM 染色において正常マウスと比較して、dbdb マウスではメサンギウム基質の増加による糸球体血管腔の減少と内腔の狭小化が顕著であったが、ProbucoI 投与によりはそれらは軽減された。間質に関しては有意な変化を認めなかった。



次に糸球体硬化関連蛋白の発現を免疫染色および qPCR で解析した。dbdb 群では Col4、SMA、Col1、Col3 の発現が増加したが、それらは ProbucoI 投与により軽減された。qPCR に関しては Col4 は ProbucoI 群で低下傾向であった。SMA は ProbucoI 群で有意に増加していた。さらに、こうした糸球体硬化関連分子の上流にある Smad1 の発現およびそのリン酸化を解析した。正常マウスと比較して、dbdb マウスでは Smad1 の発現が増加していた。ProbucoI 投与により発現量自体に差を認めなかったが(qPCR では発現に有意差なし)、その局在は通常食群では核内に、ProbucoI 群では核周囲の細胞質に有意であった。また、C 末のリン酸化は dbdb 群で核内有意に増加したのに対して ProbucoI 群では細胞質に有意であった。さらにリンカー部のリン酸化は dbdb 群で増加し、ProbucoI 群では細胞質中心に増加がより顕著であった。Smad3 に関してはその発現に有意な変化を認めなかった。



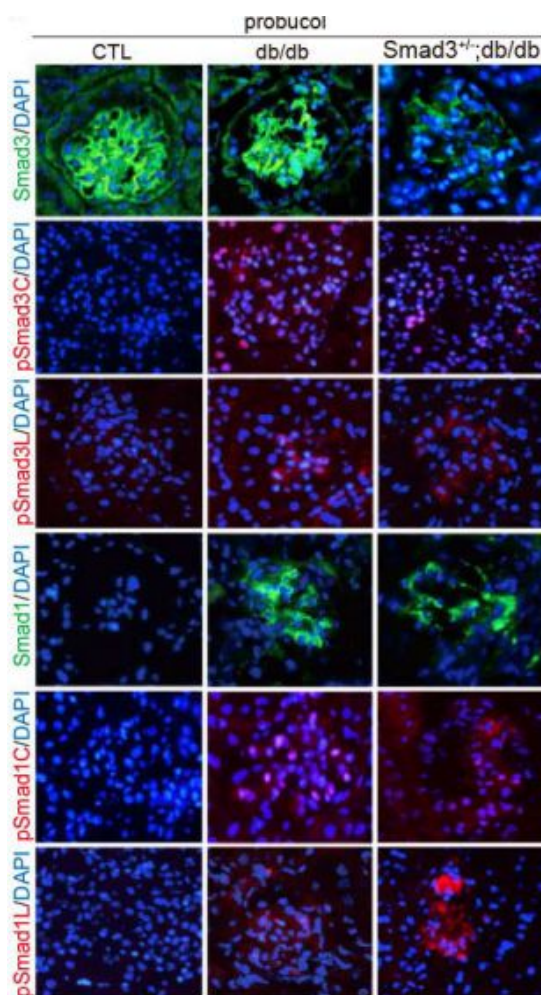
上記のような vivo で認められた ProbucoI の効果の作用点を解析する方針とした。はじめに AGE 刺激による糖尿病条件下で ProbucoI の影響を解析した。AGE 刺激により、糸球体硬化関連蛋白である Col4、Col1、SMA の発現増加を認めたが、それらは ProbucoI 投与により軽減された。また Smad1、C terminal のリン酸化(pSmad1C)も AGE 刺激により増加したが ProbucoI 投与による変化は明らかではなかった。Linker 部のリン酸化(pSmad1L)は ProbucoI 投与により亢進したが、それは非 AGE 刺激下においても同様であった。次に AGE 刺激によるメイン passway である BMP4 刺激下において ProbucoI の影響を解析した。AGE 刺激と同様に BMP4 刺激により Col4、Col1、SMA、Smad1、pSmad1C の発現増加を認めたが、それらは ProbucoI 投与により軽減し、AGE 刺激下では明らかでなかった ProbucoI による Smad1、pSmad1C の抑制効果をも捉えることができた。pSmad1L の発現は BMP4 刺激下においても ProbucoI 投与で亢進した。



このように Probuco1 による Smad1 の Linker 部のリン酸化の著明な亢進が認められたが、Smad1 の Linker 部のリン酸化に関して現在、下記のようなことが明らかになってきている。

過去に報告したように BMP4 により Smad1 の C terminal がリン酸化されることによって Smad1 は核内へ移行し、硬化関連遺伝子の発現を惹起するが、その一方で Linker 部のリン酸化が Smad1 の分解に関与していることが明らかになってきている

従来の理解では BMP4 により Smad1 の C terminal がリン酸化されることによって Smad1 は核内へ移行し、硬化関連遺伝子の発現を惹起する。しかし、その経路だけではなく、Linker 部のリン酸化が Smad1 の分解に関与していることが明らかになってきている。糖尿病状態における Smad1 の Linker 部のリン酸化等は Smad1 の分解促進、そして negative feedback 的に ECM 産生抑制につながり、糖尿病性腎症の抑止に寄与している可能性がある。Probuco1 は、腎組織染色、AGE、BMP 刺激下における Probuco1 投与時の結果にみられるように、pSmad1L の発現・活性化を増強しており、糖尿病腎障害の進展における critical event としての Smad1 の C 末端リン酸化を、間接的にはあるが抑制することで、DKD の新たな治療の標的分子を提示している。



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 5 件)

Urinary IgG4 and Smad1 are Specific Biomarkers for Renal Structural and Functional Changes in Early Stage of Diabetic Nephropathy. Doi T, Moriya T, Fujita Y, Minagawa N, Usami M, Sasaki T, Abe H, Kishi S, Murakami T, Ouchi M, Ichien G, Yamamoto K, Ikeda H, Koezuka Y, Takamatsu N, Shima K, Mauer M, Nagai K, Tominaga T. *Diabetes*. 2018 May;67(5):986-993、査読有 doi: 10.2337/db17-1043.

糖尿病性腎症の分子病態解明と修復治療法の開発 安部秀彦 細胞 vol.49, No.10, p.26-27, 2017 (ニューサイエンス社) 査読有

Decline in estimated glomerular filtration rate is associated with risk of end-stage renal disease in type 2 diabetes with macroalbuminuria: an observational study from JDNCS. Shimizu M, Furuichi K, Toyama T, Funamoto T, Kitajima S, Hara A, Ogawa D, Koya D, Ikeda K, Koshino Y, Kurokawa Y, Abe H, Mori K, Nakayama M, Konishi Y, Samejima KI, Matsui M, Yamauchi H, Gohda T, Fukami K, Nagata D, Yamazaki H, Yuzawa Y, Suzuki Y, Fujimoto S, Maruyama S, Kato S, Naito T, Yoshimura K, Yokoyama H,

Wada T *Clin Exp Nephrol*. 2017 Apr;22(2):377-387、査読有 doi: 10.1007/s10157-017-1467-9

Probucoi modulates Nrf2 function and ameliorates diabetic nephropathy in db/db mice.

Arai H, Abe H, Sakurai A, Yamashita K, Murayama T, Minami M, Yoshikawa T, Kohashi M, Nozako M, Yokode M, Doi T. *Medical Research Archives*. 2017 Jan 10;4(9):1-16、査読有.

Conditional Deletion of Smad1 Ameliorates Glomerular Injury in Progressive Glomerulonephritis.

Araki M, Matsubara T, Abe H, Torikoshi K, Mima A, Iehara N, Fukatsu A, Kita T, Arai H, Doi T. *Sci Rep*. 2016. Aug 5;6:31216、査読有 doi: 10.1038/srep31216

〔学会発表〕(計 4 件)

Glomerulosclerosis Attenuated by Retinoic Acid through Bone Morphogenetic Protein 4 Suppression in Mice with Streptozotocin-Induced Diabetes.

Tamaki M, Tominaga T, Fujita Y, Kishi S, Murakami T, Nagai K, Abe H, Doi T

50th American Society of Nephrology (ASN) Annual Meeting, New Orleans, LA, U.S.A., Oct. 31, 2017

Palovarotene, Selective Retinoic Receptor- γ Agonist, Inhibited Both BMP4 and TGF- β Signaling Pathways in Diabetic Nephropathy.

Fujita Y, Tominaga T, Tamaki M, Murakami T, Kishi S, Nagai K, Abe H, Doi T

50th American Society of Nephrology (ASN) Annual Meeting, New Orleans, LA, U.S.A., Oct. 31, 2017

糖尿病性腎症の糸球体硬化抑制過程における Smad1 の新規リン酸化部位の同定と解析

小野広幸、安部秀彦、上田紗代、西村賢二、田蔭昌憲、村上太一、岸誠司、長井幸二郎、土井俊夫

2017.8.6 第255回徳島医学会学術集会

徳島県医師会館(徳島市、徳島県)

レチノイン酸による糖尿病性糸球体硬化分子 BMP4 制御機構の検討

田蔭昌憲、富永辰也、藤田結衣、松浦元一、岸誠司、村上太一、長井幸二郎、安部秀彦、土井俊夫

第60回日本腎臓学会学術総会

2017. 5.27 仙台国際センター(仙台市、宮城県)

〔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：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.tokudai-kidney.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安部 秀斉 (ABE, Hideharu)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・准教授
研究者番号：60399342

(2) 研究分担者

村上 太一 (MURAKAMI, Taichi)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・助教
研究者番号：30403736