

令和元年6月7日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19490

研究課題名(和文) 糖尿病性糸球体硬化のChip-Seq解析と核内受容体を標的とした効率的治療

研究課題名(英文) Nuclear receptor-targeted effective therapy for diabetic glomerulosclerosis through Chip-Seq analysis

研究代表者

田蔭 昌憲 (TAMAKI, Masanori)

徳島大学・病院・助教

研究者番号：90528902

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ストレプトゾトシン誘発性糖尿病マウスの骨形成蛋白質(BMP)4/IV型コラーゲン(COL4)発現とメサンギウム基質増加はAll-trans Retinoic Acid(ATRA)投与にて改善した。終末糖化産物添加マウス由来培養メサンギウム細胞のBMP4, COL4発現はATRA添加で低下した。ChIP法ではマウスBmp4遺伝子exon1上流11488-11501塩基の推定RAREとRAR, RXRとの結合がATRAにて誘導され、レポーターアッセイでは推定RAREはATRAによるBmp4発現抑制に関与した。RAR, RXRとRAREとの結合を介したBMP4直接制御がメサンギウム基質拡大を抑制した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

代表的なレチノイドであるATRAは様々な腎疾患モデルに治療効果を示すが、糖尿病性メサンギウム基質拡大の治療効果は未解明であった。本研究は世界で初めてATRAによる糖尿病性メサンギウム基質拡大治療を報告した。その作用機序として、これまで知られていなかったRXR/RARを介したBMP4制御機構を報告した。本研究結果は十分な治療法が存在しない糖尿病性腎症の、新規治療法開発の一助となり得る。また、ATRAによるBMP4遺伝子制御機構の解明手法は他の遺伝子制御機構の解明にも応用できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The therapeutic potential of retinoids in diabetic nephropathy (DN) was investigated, focusing especially on the regulatory mechanism of bone morphogenetic protein 4 (BMP4). Glomerular matrix expansion, which was associated with increased BMP4, phosphorylated suppressor of mothers against decapentaplegic (Smad1), and collagen IV (COL4) expression, worsened in streptozotocin-induced diabetic mice at 24 weeks of age. These levels were attenuated after ATRA administration. In cultured mouse mesangial cells, treatment with ATRA or a retinoic acid receptor (RAR) agonist significantly decreased BMP4 and COL4 expression. ChIP analysis and reporter assays indicated that a putative RARE of the Bmp4 gene, located 11488-11501 bp upstream of exon1A and bound to RAR and retinoid X receptor (RXR), which suppressed BMP4 expression after ATRA addition.

ATRA suppressed BMP4 via binding of a RAR/RXR heterodimer to a unique RARE, alleviating glomerular matrix expansion in diabetic mice.

研究分野：腎臓内科

キーワード：糖尿病性腎症 メサンギウム細胞 骨形成蛋白質4 レチノイド 糖尿病性メサンギウム基質拡大 RXR/RAR

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

わが国では糖尿病を代表とする生活習慣病の患者数が増加している。糖尿病性腎症はわが国の最も多い透析導入原因疾患であり、その予後は慢性腎炎の患者より不良である。糖尿病性腎症の治療に対する社会的需要は高まっているが、現行治療の主流であるアンジオテンシン II 受容体拮抗薬の効果は不十分であり、糖尿病性腎症に対する効率的な治療法は存在しない。

糸球体メサンギウム基質拡大と、続発する糸球体硬化は糖尿病性腎症において最も重要な所見である。申請者らの研究室では一貫して糖尿病性腎症進行機構を解析し、メサンギウム細胞における転写因子 Smad1 のリン酸化が IV 型コラーゲンを発現する遺伝子 Col4 の発現を直接亢進し、TGF- β /Smad3 シグナル亢進による糸球体線維化に先行して糸球体メサンギウム基質拡大が進行することを見出した(JBC 279: 14201-14206, 2004. JBC 279: 19816-19823, 2004. JBC 280: 7100-7106, 2005. JBC286: 20109-20116, 2011. Diabetes 64: 2978-2990, 2015.)。さらに、bone morphogenetic protein 4 (BMP4)は ALK3 を介して Smad1 および Col4 の発現を増加させることも明らかにした(JBC2011)。

ビタミン A とその誘導体(レチノイド)は細胞分化、増殖などに大きく寄与する。レチノイドは各種腎疾患モデルにおいて有効性が報告されており、代表的なレチノイドとして all-trans retinoic acid (ATRA)が知られている。ATRA はその受容体であるレチノイン酸受容体(RAR)と結合し、レチノイド X 受容体(RXR)とヘテロダイマーを形成し、レチノイン酸応答配列(RARE)のうち DR2、DR5 と呼ばれる特殊な塩基配列を認識して結合し、様々な遺伝子の発現を調整する。BMP4 発現は ATRA によって負に制御されることが知られている。しかし、糖尿病性メサンギウム基質拡大におけるレチノイドの有効性は報告されておらず、BMP4 の RXR/RAR を介した発現調整機構も知られていない。

2. 研究の目的

これらの知見を踏まえ、申請者は RXR/RAR の観点から糖尿病性腎症進行機構を解析し、RXR/RAR を介した BMP4/Smad1/COL4 軸の制御によって、効率的な糖尿病性腎症の治療を目的とする本研究を着想した。

- (1) レチノイドによる糖尿病モデルマウス治療効果の検討
- (2) レチノイドによるメサンギウム細胞の BMP4/Smad1/COL4 軸への効果の検討
- (3) BMP4 発現制御に最も重要な RAR サブタイプの同定
- (4) レチノイドによる BMP4 発現制御機構の解明

3. 研究の方法

(1) 12 週齢 ICR マウスにストレプトゾトシンを投与し、糖尿病モデルマウスを作成する。16 週齢時点で血糖値 400 mg/dl 以上の個体を糖尿病モデルマウスとみなす。16 週齢から代表的なレチノイドである ATRA 15 mg/kg もしくは corn oil を週 3 回腹腔内投与し、24 週齢時点におけるマウス血糖値と尿蛋白を評価した後、マウスをサクリファイスする。腎皮質の遺伝子発現およびタンパク発現をそれぞれ定量 PCR、ウエスタンブロット法で解析する。糸球体を PAS 染色、PAM 染色、免疫蛍光染色(pSmad1, COL4)で観察する。

(2) マウス由来培養メサンギウム細胞を用いる。糖尿病にて増加する高血糖と酸化ストレスによって生成され、BMP4 の代表的な増加因子である、終末糖化産物(AGE)を添加した培養メサンギウム細胞に ATRA を添加し、BMP4, Smad1, COL4 発現への影響を解析する。

(3) RAR には、 α , β , γ の各サブタイプが存在する。そこで、培養メサンギウム細胞への各サブタイプ特異的アゴニスト添加および、siRNA 法による各サブタイプのノックダウン細胞への ATRA 添加を行い、BMP4 制御に最も重要なサブタイプを同定する。

(4) マウス BMP4 遺伝子上流・下流 8 万塩基の遺伝子配列を入手し、DR2 および DR5 の相同配列を同定する。相同配列と RAR および RXR との結合能を、ChIP 法で確認し、機能性をレポーターアッセイで解析する。

4. 研究成果

(1) レチノイドによる糖尿病モデルマウス治療効果の検討

糖尿病モデルマウスにて増加した尿アルブミン量は ATRA 投与によって減少し、その効果は血糖値非依存性であった。腎皮質 BMP4, COL4 の遺伝子およびタンパク発現量は糖尿病モデルマウスで増加し、メサンギウム基質拡大および糸球体内 pSmad1, COL4 増加を伴っていた。ATRA 投与はこれらの所見を改善した。

これらの知見より、ATRA は糖尿病性腎症治療薬となり得ることが示唆された。

(2) レチノイドによるメサンギウム細胞の BMP4/Smad1/COL4 軸への効果の検討

AGE 200 mg/dl, ATRA 1 μ M を培養メサンギウムに添加し、4 時間、24 時間、48 時間後の BMP4, COL4 遺伝子発現を解析した。AGE による培養メサンギウム細胞の BMP4, COL4 発現は 24 時間以降で顕著であり、ATRA 添加はこれらの発現増加を抑制した。添加後 24 時間時点での BMP4, COL4

タンパク発現も同様であった。添加後 24 時間時点での BMP4, COL4 遺伝子発現は ATRA 1 nM ~ 1 μM まで濃度依存的に減少した。

これらの知見より, ATRA はメサンギウム細胞の BMP4, COL4 発現を負に制御することが示唆された。

(3) BMP4 発現制御に最も重要な RAR サブタイプの同定

マウス由来培養メサンギウム細胞に AGE 200 mg/dl を添加し, RAR α , RAR β , RAR γ 選択的アゴニスト(AM580, CD2314, CD437)をそれぞれ 1 nM から 1 μM まで添加し, 24 時間後に解析した。BMP4, COL4 遺伝子発現は特に RAR α アゴニスト添加によって顕著に低下し, BMP4, pSmad1, COL4 タンパクも RAR α アゴニスト添加にて減少した。つぎに siRNA 法を用いた検討を行った。各サブタイプ発現を siRNA でノックダウンした細胞に ATRA を 24 時間添加した。BMP4, COL4 遺伝子発現低下作用は RAR α ノックダウン細胞にて減弱し, BMP4, pSmad1, COL4 タンパク発現も同様の結果であった。なお, マウス腎皮質および培養メサンギウム細胞の RAR 各サブタイプの発現量は糖尿病および AGE 添加で変化しなかった。免疫蛍光染色で RAR α が糸球体内に存在することが示唆された。培養メサンギウム細胞 RAR α 発現量は他のサブタイプよりも多かった。

これらの知見より, BMP4 発現制御に最も重要な RAR サブタイプは RAR α であることが示唆された。

(4) レチノイドによる BMP4 発現制御機構の解明

マウス BMP4 遺伝子上流・下流 8 万塩基の配列を入手し(NC_000080.6, Chromosome 14, 46303525-46470669), ゲノム領域解析を行った。その結果, BMP4 遺伝子の 11488-11501 塩基上流に DR2 相同配列, 54651-54667 塩基上流に DR5 相同配列が存在することを見出した。これらの配列を標的として, RAR および RXR の, それぞれに全てのサブタイプを認識する抗体(pan-RAR 抗体および pan-RXR 抗体)を用い, ChIP 法を施行した。その結果, RAR, RXR と DR2 相同配列との結合が ATRA によって誘導されたが, DR5 相同配列とは結合しなかった。RAR 抗体を用いた ChIP 法では, RAR と DR2 相同配列との結合が ATRA 添加によって誘導され, AGE 添加は結合能に影響しないことが示唆された。DR2 相同配列からマウス Bmp4 遺伝子 Exon1 までを含むレポーターベクター(Ct_vector)と, DR2 相同配列のうち 4 塩基に点変異を加えたレポーターベクター(Mu_vector)を作成した。Ct_vector を用いたレポーターアッセイにて, マウス由来培養メサンギウム細胞のシグナルは AGE 添加で増加し, ATRA または RAR α アゴニスト添加で低下した。しかし, Mu_vector を用いたレポーターアッセイでは AGE 添加によるシグナル増加には影響しなかったが, ATRA または RAR α アゴニストによるシグナル低下作用が減弱した。これらの知見より, DR2 相同配列は RARE であり, BMP4 発現制御に寄与することが示唆された。

以上の成果より, レチノイドが糖尿病性腎症の新規治療薬となる可能性が見出され, その作用機序のひとつとしてこれまでに未解明であった RXR/RAR を介した BMP4 直接制御が挙げられた。今後, 最適な投与方法の検討や, ヒトを対象とした研究への移行が見込まれる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 1 件)

Masanori Tamaki, Tatsuya Tominaga, Yui Fujita, Yasuhiko Koezuka, Go Ichien, Taichi Murakami, Seiji Kishi, Keiichi Yamamoto, Hideharu Abe, Kojiro Nagai, Toshio Doi
All-trans retinoic acid suppresses bone morphogenetic protein 4 in mouse diabetic nephropathy through a unique retinoic acid response element
Am J Physiol Endocrinol Metab. 316: E418-E431, 2019. (査読有)
DOI: 10.1152/ajpendo.00218.2018

[学会発表](計 6 件)

Masanori Tamaki, Tatsuya Tominaga, Yui Fujita, Fumi Kishi, Seiji Kishi, Taichi Murakami, Kojiro Nagai, Hideharu Abe, Toshio Doi
All-trans retinoic acid directly suppresses bone morphogenetic protein 4 in mouse diabetic nephropathy through a unique retinoic acid response element
Japan Kidney Council 2018
2018 年

Masanori Tamaki, Tatsuya Tominaga, Yui Fujita, Seiji Kishi, Taichi Murakami, Kojiro Nagai, Hideharu Abe, and Toshio Doi
Mesangial matrix expansion attenuated by all-trans retinoic acid through direct suppression of bone morphogenetic protein 4 in mouse diabetic nephropathy
51th Annual meeting of American Society of Nephrology
2018 年

田蔭 昌憲, 富永 辰也, 藤田 結衣, 岸 史, 岸 誠司, 村上 太一, 長井 幸二郎, 安部 秀斉,

土井 俊夫
ゲノム領域解析に基づく BMP4 制御機構解析を踏まえた糖尿病性腎症新規治療法の探索
第 9 回分子腎臓フォーラム
2018 年

田蒔 昌憲, 富永 辰也, 藤田 結衣, 岸 史, 岸 誠司, 村上 太一, 長井 幸二郎, 安部 秀斉,
土井 俊夫
レチノイン酸は Bmp4 遺伝子発現を直接制御して糖尿病マウスの糸球体硬化を改善する
第 61 回日本腎臓学会学術総会
2018 年

Masanori Tamaki, Tatsuya Tominaga, Yui Fujita, Seiji Kishi, Taichi Murakami, Koujiro
Nagai, Hideharu Abe, and Toshio Doi
Glomerulosclerosis Attenuated by Retinoic Acid through Bone Morphogenetic Protein 4
Suppression
50th Annual meeting of American Society of Nephrology
2017 年

田蒔 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
秀斉, 土井 俊夫
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
第 60 回日本腎臓学会学術総会
2017 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：富永 辰也

ローマ字氏名：TOMINAGA, Tatsuya

研究協力者氏名：藤田 結衣

ローマ字氏名：FUJITA, Yui

研究協力者氏名：越智 ありさ

ローマ字氏名：OCHI, Arisa

研究協力者氏名：岸 誠司

ローマ字氏名：KISHI, Seiji

研究協力者氏名：村上 太一

ローマ字氏名：MURAKAMI, Taichi

研究協力者氏名：長井 幸二郎

ローマ字氏名：NAGAI, Koujiro

研究協力者氏名：安部 秀斉

ローマ字氏名：ABE, Hideharu

研究協力者氏名：土井 俊夫

ローマ字氏名 : DOI, Toshio

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。