

平成 21年 5月28日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007年度～2008年度

課題番号：19590973

研究課題名（和文） BMP/ALK/Smad1 の解析による糸球体硬化症機構解明とバイオマーカーの同定

研究課題名（英文） BMP/ALK/Smad1 signaling pathway and analysis of specific biomarkers in the progression of glomerulosclerosis

研究代表者 安部 秀斉 (ABE HIDEHARU) 徳島大学 医学部・歯学部附属病院・講師

研究者番号：60399342

研究成果の概要：糖尿病性腎症による腎不全・透析患者数は増加の一途にある。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。より病態に基づいた効果的な腎症治療法の開発が必要である。そのため、腎糸球体硬化の形成に中心的な役割を果たす転写因子 Smad1 の活性化に関わり、糸球体硬化進行過程の病態を形成する 2 つの経路の調節機構をマウスを用いて解析した。その上で、糸球体硬化症の進展を追跡できる血中・尿中のバイオマーカーの選定を行った。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
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：腎臓学

## 1. 研究開始当初の背景

糖尿病患者の増加に伴い、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いた。現行の治療法である、厳密な血糖管理やアンジオテンシン系抑制薬による血圧管理および低蛋白食においても、腎不全への進展をわずかに遅延させるのみであり、医療財政の負担という観点からも効果的な腎症治療法の開発は急務であった。

それには、腎症発症・進行の分子レベルでの病態の全貌を明らかにすることが不可欠と考えられた。

本研究代表者らは、糖尿病性腎症の発症・

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ており、糖尿病性腎症の特徴である細胞外基質増加と糸球体基底膜肥厚に関わる遺伝子群 (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  $\alpha$  actin)) を直接制御していることを世界で初めて見いだしていた。

## 2. 研究の目的

Smad1 は従来より知られている経路: TGF  $\beta$  -ALK5-Smad3 とは異なり、TGF  $\beta$  -ALK1-Smad1 と BMP (bone morphogenetic

protein) 2/4-ALK3/6-Smad1 という新たな2つの経路によりリン酸化を受け、活性化されており、本研究では、糖尿病性腎症進行の責任遺伝子 Smad1 の活性化調節機構を詳細に解析し、正常糸球体では発現のみられない Smad1 の発現誘導を直接転写調節する因子の同定を行うことを目的とした。

また、糖尿病の各病期における TGF  $\beta$ -ALK1-Smad1 および BMP2/4-ALK3/6-Smad1 の両経路に関わる Smad1 関連分子の血中・尿中での発現プロファイルを作成し、硬化の確実な診断および治療による評価を可能とするバイオマーカーを同定することも目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 糖尿病における Smad1 の制御機構

Smad1 が正常の腎糸球体内には発現がみられず、糖尿病状態においてのみ発現がみられる機構として、TGF  $\beta$  だけでなく、BMPs も Smad1 をリン酸化することで関与していると考えられ、AGEs 刺激による糖尿病条件下で、培養メサンギウム細胞における、TGF  $\beta$ -ALK1-Smad1 および BMP2/4-ALK3/6-Smad1 の両経路に関わる Smad1 活性化の機構を解析する。これらの経路を遮断する中和抗体ないしアンタゴニストの投与により、各経路の糖尿病条件下で示す意義を明らかにする。

#### (2) Smad1 過剰活性化の糖尿病における意義の解析

培養メサンギウム細胞に TGF  $\beta$ 、BMPs 刺激を加え、Smad1 のリン酸化効率、核への転送効率、reporter assay の解析を行い、糖尿病性腎症における TGF  $\beta$ -ALK1-Smad1 および BMP2/4-ALK3/6-Smad1 の両経路の寄与する Smad1 の活性化調節機構を明らかにする。また、Smad1 遺伝子過剰発現マウスは生殖機能異常がみられるため、タモキシフェン誘導型調節発現マウスを作成しており、*in vivo* における Smad1 発現亢進の意義を解析する。

#### (3) 早期腎症モデル動物における各バイオマーカーの測定

ストレプトゾトシン誘導糖尿病ラットを作製し、糸球体病変を惹起させる。本モデルは早期腎症の病変を来す。その硬化形成の早期段階における Smad1 のリン酸化・活性化およびその関連因子の発現を *in vivo* 解析により明らかとする。TGF  $\beta$ -ALK1-Smad1 と BMP2/4-ALK3/6-Smad1 の両経路の活性化を病初期より段階的に解析することで、両経路の相互作用を詳細に調べ、早期腎症の病態を明らかにする。また、糖尿病で発現が誘導されることが知られている Gremlin や Noggin などの BMPs antagonist の発現も解析し、これらが病変形成を修飾している可能性を調べる。

BMPs/ALK1/Smad1 に対する特異性の高いモ

ノクローナル抗体を用い、ELISA による測定系を確立し、上記モデル動物の尿中および血中の BMPs/ALK1/Smad1 検出システムを樹立する。

### 4. 研究成果

糖尿病性腎症の発症・進行に中心的な役割を果たす転写因子 Smad1 の発現の制御機構として、TGF  $\beta$  だけでなく、BMPs も Smad1 をリン酸化することで活性化に関与していることを示した。AGEs 刺激による糖尿病条件下で、培養メサンギウム細胞における、TGF  $\beta$ -ALK1-Smad1 および BMP2/4-ALK3/6-Smad1 の両経路に関わる Smad1 活性化の dual pathway が病変形成に機能していた。これらの経路を遮断する中和抗体ないしアンタゴニストの投与により、病変形成タンパク群の発現は抑制された。

Smad1 を直接にリン酸化、活性化させる膜受容体である ALK1 の発現制御機構はこれまで不明であったが、プロモーター解析により、直接 ALK1 の発現を誘導する新規転写因子を同定した。Gel shift assay などにより、その結合、転写活性の誘導を確認した。これは、メサンギウム細胞において、TGF  $\beta$  のシグナル伝達系を modulate することで ALK1 の発現を調整することも明らかとした。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ことを示し、検出感度を上昇させることで、早期腎症の病変を来す STZ 誘導糖尿病ラットにおける硬化病変の発症を予測できるマーカーであることを示した。腎糸球体における Smad1 発現亢進の意義が確認され、糖尿病を惹起後の個体の疾患感受性に Smad1 の活性化が関与することも示した。

BMP2/4 および Smad1 は腎発生に非常に重要な役割を果たしており、ノックアウトマウスは胎生死するため、タモキシフェン誘導型調節発現かつ腎糸球体発現誘導マウスを作成した。腎の正常発生の終了の後、タモキシフェンを投与し、糖尿病性腎症に特徴的な細胞外基質の増加と硬化という組織上の変化を非糖尿病下で抽出することができ、糖尿病性腎症の発症・進展の分子機構を明らかとした。このモデルにおいて、各病期における TGF  $\beta$ -ALK1-Smad1 および BMP2/4-ALK3/6-Smad1 の両経路に関わる Smad1 関連分子の血中・尿中での発現プロファイルの作成している。

樹立した Smad1 過剰発現マウスに STZ を投与し、糖尿病を誘導し、腎症における TGF  $\beta$ -ALK1-Smad1 および BMP2/4-ALK3/6-Smad1 両経路に関わる Smad1 関連分子の発現を解析した。これらは病変形成過程で活性化と発現増強が認め

られ、腎症進展における役割が明らかとなった。

早期腎症モデル動物における各バイオマーカーの測定の検討で上昇のみられた分子 Smad1 につき、リコンビナントタンパクを正常ないし糖尿病マウスに投与し、硬化の発症・進行を解析した。予想に反して、投与した Smad1 は、血中から速やかにクリアランスされ、尿中排泄がみられないことから、血管構成細胞のいずれかにとりこまれるなどの反応がみられたと考えられる。

早期腎症モデルである STZ マウス、より強い硬化病変を有する iNOS トランスジェニックマウスを用い、早期腎症から腎不全期に至るまで各病期における血中・尿中の BMPs/ALK1/Smad1 の発現を、ELISA による測定系を用いて検出・測定した。これら新規マーカーは腎病変の進展とよく相関し、治療判定における有効性もみられた。

Smad1 の下流で機能する、I 型コラーゲン、SMA など、腎病変形成に寄与している分子が Scleraxis と Id1 による発現制御を介していることが明らかとなり、分子標的治療の候補分子として考えられた。さらには、ケモカインとその受容体である MCP-1/CCR2 が糖尿病性腎症の進展に関与し、TGF $\beta$ -Col4 のシグナルを修飾していることも解明した。

#### 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 7 件)

##### (1) 糖尿病とネフローゼ症候群

安部秀斉

日本内科学会雑誌 vol. 98(5), May 10, p. 1048-1054, 2009、査読有

##### (2) 糖尿病性腎症の発症前診断による抗血管老化治療への試み

安部秀斉

未病と抗老化 vol. 18(1), Apr, p. 42-46, 2009、査読有

##### (3) The current clinical problems for early phase of diabetic nephropathy and approach for pathogenesis of diabetic nephropathy.

Doi T, Mima A, Matsubara T, Tominaga T, Arai H, Abe H.

Diabetes Res Clin Pract. 2008 Nov 13(82) Suppl 1:S21-4. 査読有

##### (4) CKD における糖尿病性腎症の位置づけ—診療の課題と今後の展望 【総説】

美馬晶、安部秀斉、土井俊夫

Diabetes Frontier vol. 19(5), Oct

20, p. 583-589, 2008、査読有

##### (5) 糖尿病性腎症の発症・進展の分子病態

安部秀斉、土井俊夫

日本内科学会雑誌 医学と医療の最前線 vol. 97(4), Apr 10, p. 820-826, 2008、査読有

##### (6) Urinary Smad1 is a novel marker to predict later onset of mesangial matrix expansion in diabetic nephropathy.

Mima A, Arai H, Matsubara T, Abe H, Nagai K, Tamura Y, Torikoshi K, Araki M, Kanamori H, Takahashi T, Tominaga T, Matsuura M, Iehara N, Fukatsu A, Kita T, Doi T.

Diabetes 2008, 57(6):1712-22. 査読有

##### (7) Inhibition of MCP-1/CCR2 pathway ameliorates the development of diabetic nephropathy.

Kanamori H, Matsubara T, Mima A, Sumi E, Nagai K, Takahashi T, Abe H, Iehara N, Fukatsu A, Okamoto H, Kita T, Doi T, Arai H.

Biochem Biophys Res Commun 2007, 360, 772-7. 査読有

[学会発表] (計 23 件)

##### (1) Molecular Mechanisms of Diabetic Nephropathy

Araoka T, Tominaga T, Abe H, Doi T

International symposium of Diabetes, Tokushima, Japan., Mar. 16, 2009

##### (2) 慢性腎臓病 (CKD) から不可逆的糸球体硬化症に至る分子病態

岸誠司、安部秀斉、秋山治彦、土井俊夫

第 106 回日本内科学会総会

2009. 4. 10-12 東京

##### (3) BMP4/Smad1 signaling is a key pathway in diabetic nephropathy

Tominaga T, Abe H, Murakami T, Araoka T, Shigeta R, Kishi S, Yoshikawa K, Matsuura M, Mima A, Doi T

48th The American Society for Cell Biology Annual Meeting, San Francisco, U.S.A., Dec. 13-17, 2008

##### (4) 糖尿病性腎症の発症・進展における BMP4 の作用機構

富永辰也、安部秀斉、美馬晶、村上太一、荒岡利和、繁田令子、岸誠司、吉川和寛、岸史、松浦元一、高橋利和、土井俊夫

第 20 回 日本糖尿病性腎症研究会

2008. 12. 6-7 東京

##### (5) BMP4/Smad1 signaling is a key pathway

in diabetic nephropathy

Tominaga T, Abe H, Murakami T, Araoka T, Mima T, Doi T

第16回日本血管生物医学学会学術集会

The 6th Korea-Japan Joint Symposium on Vascular Biology

2008. 12. 3-5 金沢

(6) 糖尿病性腎症の発症・進展における BMP4 の作用機構

富永辰也、安部秀斉、美馬晶、村上太一、荒岡利和、繁田令子、岸誠司、吉川和寛、岸史、松浦元一、高橋利和、土井俊夫

第14回 分子腎臓研究会

2008. 9. 6-7 東京

(7) Src/Smad1 経路は糸球体腎炎発症進展において中心的な役割を演じる

美馬晶、荒井秀典、松原雄、安部秀斉、高橋利和、荒木真、鳥越和雄、家原典之、深津敦司、北徹、土井俊夫

第51回 日本腎臓学会学術総会

2008. 5. 30-6. 1 福岡

(8) 糖尿病性腎症発症・進展における BMP4 の中心的役割

富永辰也、安部秀斉、村上太一、荒岡利和、立部貴典、寺社下浩一、土井俊夫

第51回 日本腎臓学会学術総会

2008. 5. 30-6. 1 福岡

(9) 糖尿病性腎症の進行決定因子 ALK1 の発現調節機構の解析

荒岡利和、安部秀斉、富永辰也、村上太一、土井俊夫

第51回 日本腎臓学会学術総会

2008. 5. 30-6. 1 福岡

(10) 糖尿病性腎症における BMP4 の硬化進展機構

安部秀斉

第12回 シンポジウム糖尿病

2008. 4. 19 東京

(11) 糖尿病における新規腎硬化関連因子 ALK1 の転写調節機構の解析

荒岡利和、安部秀斉、富永辰也、平野隆弘、村上太一、土井俊夫

第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 合同大会

2007. 12. 11-15 東京

(12) 硬化・線維化関連 bHLH 型転写因子 Scleraxis のクローニングと機能解析

安部秀斉、富永辰也、村上太一、荒岡利和、片上幹子、中村玲、高松典通、松浦元一、高橋利和、土井俊夫

第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 合同大会

2007. 12. 11-15 東京

(13) Cloning and characterization of Scleraxis: fibrosis- and sclerosis-specific basic HLH transcription factor

Abe H, Tominaga T, Araoka T, Murakami T, Takahashi T, Doi T.

47th The American Society for Cell Biology Annual Meeting, Washington D. C., U. S. A., Dec. 1-4, 2007.

(14) 糖尿病性腎症における MCP-1/CCR2 の役割

金森弘志、松原雄、美馬晶、高橋利和、安部秀斉、家原典之、深津敦司、北徹、土井俊夫、荒井秀典

第19回日本糖尿病性腎症研究会

2007. 12. 1 東京

(15) 糖尿病性腎硬化症関連 bHLH 型転写因子 Scleraxis のクローニングと機能解析

安部秀斉、富永辰也、村上太一、荒岡利和、片上幹子、松浦元一、高橋利和、土井俊夫

第15回 血管生物医学学会

2007. 11. 29 福岡

(16) Scleraxis Critically Regulates Diabetic Glomerulosclerosis-Related Genes under the Control of BMP2/4.

Abe H, Tominaga T, Takahashi T, Nakamura A, Araoka T, Murakami T, Doi T.

American Society of Nephrology (ASN) Annual Meeting, San Francisco, U. S. A., Oct 31-Nov 5, 2007.

(17) Urinary Smad1 Is a Novel Diagnostic Marker To Predict Mesangial Matrix Expansion in Rat Diabetic Nephropathy.

Mima A, Arai H, Matsubara T, Abe H, Kanamori H, Iehara N, Fukatsu A, Kita T, Doi T.

American Society of Nephrology (ASN) Annual Meeting, San Francisco, U. S. A., Oct 31-Nov 5, 2007.

(18) Role of Nitric Oxide Synthase (NOS) in the Progression of Diabetic Nephropathy.

Kanamori H, Matsubara T, Mima A, Sumi E, Nagai K, Takahashi T, Abe H, Iehara N, Fukatsu A, Okamoto H, Kita T, Doi T, Arai H.

American Society of Nephrology (ASN) Annual Meeting, San Francisco, U. S. A., Oct

31-Nov 5, 2007.

(19) 腎硬化関連 bHLH 型転写因子 Scleraxis  
のクローニングと機能解析

安部秀斉、富永辰也、村上太一、荒岡利和、片上幹子、中村玲、高松典通、松浦元一、高橋利和、土井俊夫

第 14 回 分子腎臓研究会  
2007. 9.1 東京

(20) 腎硬化関連 bHLH 型転写因子 Scleraxis  
のクローニング

安部秀斉、富永辰也、土井俊夫  
第 50 回 日本腎臓学会学術総会  
2007. 5.25-27 浜松

(21) 糖尿病性腎症の進展における一酸化窒素の意義

金森弘志、松原雄、美馬晶、角栄里子、高橋利和、安部秀斉、家原典之、深津敦司、北徹、土井俊夫、荒井秀典

第 50 回 日本腎臓学会学術総会  
2007. 5.25-27 浜松

(22) 尿中 Smad1 は糖尿病性腎症の治療効果を反映する新規マーカーになりうる

美馬晶、荒井秀典、松原雄、安部秀斉、金森弘志、角栄里子、富永辰也、高橋利和、松浦元一、家原典之、深津敦司、北徹、土井俊夫  
第 50 回 日本腎臓学会学術総会  
2007. 5.25-27 浜松

(23) 糖尿病性腎症の糸球体硬化における

MCP-1/CCR2 の役割

金森弘志、松原雄、美馬晶、角栄里子、長井幸二郎、高橋利和、安部秀斉、家原典之、深津敦司、北徹、土井俊夫、荒井秀典

第 11 回 シンポジウム糖尿病  
2007. 4.14 東京

[その他]  
ホームページ等

<http://www.doitoshio.com/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安部 秀斉 (ABE HIDEHARU) 徳島大学・医学部・歯学部附属病院・講師

研究者番号：60399342

(2) 研究分担者

荒井 秀典 (ARAI HIDENORI) 京都大学・医学研究科・講師

研究者番号：60232021