

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 25 年 5 月 17 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22390169

研究課題名（和文） RA系非依存的な糖尿病性腎症の発症予測バイオマーカーと分子標的治療法の開発

研究課題名（英文） Development of Specific Biomarker and Molecular Targeting Therapy for Diabetic Nephropathy by RAS-independent Pathway

研究代表者

土井 俊夫 (DOI TOSHIO)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授

研究者番号：60183498

研究成果の概要（和文）：BMP4がSmad1の活性化を直接制御し、腎症モデルではメサンギウム基質増生に伴いBMP4とリン酸化Smad1の発現を認めた。BMP4の誘導型 transgenic miceでは、誘導後BMP4の発現に伴い糸球体硬化症を認めた。BMP4(+/-) miceではストレプトゾシンによるメサンギウム病変は改善していた。さらに糖尿病マウスにBMP4の中和抗体を投与し、組織病変の改善とリン酸化Smad1の発現低下を認めた。本研究ではBMP4/Smad1系の糖尿病性腎症の発症進展における意義を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：BMP4 directly regulated Smad1 signaling in vitro. Both BMP4 and phosphorylated Smad1 were expressed in association with mesangial matrix hyperplasia in diabetic kidney. BMP4 knock-in transgenic mice showed typical mesangial matrix increase as well as BMP4 expression after induction by tamoxifen. On the other hand, BMP4 knock-out (BMP4(+/-)) mice showed amelioration of glomerular matrix hyperplasia induced by streptozotocin. Furthermore, neutralizing antibody for BMP4 normalized glomerular matrix hyperplasia and phosphorylated Smad1 expression in glomeruli of diabetic mice. These results suggest that BMP4/Smad1 signaling plays the critical pathogenetic role for diabetic nephropathy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	10,900,000	3,270,000	14,170,000
2011年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2012年度	1,400,000	420,000	1,820,000
総計	15,000,000	4,500,000	19,500,000

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：BMP4、糖尿病性腎症、Smad1

1. 研究開始当初の背景

(1) 糖尿病患者の急速な増加は現代の解決の急がれる最も重要な医学的課題のひとつである。糖尿病合併症としての糖尿病性腎症は現在、新規血液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。さらに、本症によるタンパク尿や腎機能低下は脳

血管疾患、心疾患などの心血管事故死の強力な危険因子でもある。また、本症は現在のところ最も有効とされるレニン・アンギオテンシン(RA)系阻害薬による治療においても、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の進展には効果があるが、腎症には効果が認められないことも明らかとなってきている(NEJM

361,40-51,2009)。糖尿病性腎症の発症機序・進展機構を分子レベルで解明し、病態に直結する分子標的薬の開発が必要な状況にある。

(2) 糖尿病性腎症から腎不全に至る病態は、メサンギウム基質産生亢進によるメサンギウム硬化症から結節性病変に至る過程で認められる、糸球体硬化が本態である。RA系の阻害のみでは、この腎症の発症や進展を抑制することができないという決定的な問題点があった。また、心血管事故のリスクファクターとして、一般に用いられているアルブミン尿は、正確な糖尿病性腎症の診断に用いることができないという事実も明らかになってきた。しかし、未だ特異性にすぐれたバイオマーカーの実用化には至っていない。

2. 研究の目的

(1) 本申請代表者らは糖尿病により産生亢進されるメサンギウム細胞外基質の主たる構成分子である IV 型コラーゲン(Col4)の発現を直接制御する転写因子を酵母 One Hybrid 法によりクローニングした。Smad1 が糖尿病で初めて発現するシグナル分子であり、さらにこの Smad1 が糖尿病による糸球体硬化症の責任分子であることを見いだした(J Biol Chem 279,14201-14206,2004)。さらに、Smad1 は糸球体硬化の発症に伴い出現することが知られていた、HSP47、 α SMA、I 型コラーゲン、オステオポンチンなどの発現も転写レベルで制御していることも明らかにした(J Biol Chem 279, 19816-19823, 2004, J Biol Chem 280, 7100-7106, 2005)。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)。この糸球体硬化責任分子 Smad1 は、TGF β 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。糖尿病性腎症は成因として、遺伝的素因を含めて、複数の分子機構が関わる多因子疾患であるが、糸球体硬化症が鍵となり不可逆的に病変が進行することより、その直接の責任分子である Smad1 を中心とした分子機構を解明することが最も重要と考えられる。すなわち、本研究では Smad1 分子の活性化に関わる分子群のうちでも、糖尿病ではじめて糸球体内・尿中に出現するようになる BMP4 の意義を明らかにし、糖尿病性腎症の発症機構を詳細に解明し、バイオマーカーとしての有用性、治療のターゲットとしての可能性・有効性を

検討する。糖尿病性腎症の発症および進展における分子病態に基づいた発症予測・治療効果判定バイオマーカーを確立すること、さらには本症に特異的な分子を標的とした治療法の開発こそが、糖尿病患者数が増加の一途にある現状において、糖尿病性腎症から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) 以前より、糖尿病性腎症において、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、Scx (Scleraxis)、HSP47、 α SMA などの細胞外基質タンパクや制御因子の発現が誘導されることは知られていたが、その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。また、尿中 Smad1 が腎症発症時に出現することも解明した。本研究では Smad1 の活性化に関わるこれら分子群に着目し、①糸球体硬化の進行過程における BMP4 による Smad1 活性化機構の解析、②糖尿病性腎症モデルマウスでの検討、③BMP4 のコンディショナルトランスジェニックマウスを用いた組織学的な病態の解析と治療のターゲットとしての可能性・有効性の検討、④上記マウスを用いた糖尿病性腎症の発症・進展時の尿中 BMP4 のバイオマーカーとしての有用性の検討、⑤腎生検などにおいて診断が確定したヒト糖尿病性腎症の患者の尿・腎組織を用いた検証、を行い、糖尿病による糸球体硬化病変の形成過程の分子病態を解明し、有効な抑止策がないまま増加し続けている糖尿病性腎症の発症予測・治療効果判定バイオマーカーの確立、さらには本症に特異的な分子を標的とした治療法の開発を行う。

(3) 糖尿病性腎症の発症メカニズムは申請者らが見出した Smad1 シグナルが関与する。本症では、組織学的に主要な変化は、微量アルブミンさえ出現しない腎症前期(第1期)にすでに認められる。メサンギウム領域の拡大や糸球体基底膜の肥厚が確認され、すでに、少数ながら結節性病変さえこの時期に認められる。潜在性腎症、あるいはさらに早期に治療を開始することができると、不可逆的な腎不全、ひいては透析への進展を防止できる。そのためには、本症の発症の機構解明が不可欠である。病態を反映するバイオマーカーはアルブミン尿の問題点を解決し、より早期の腎症検出に極めて有用である。また、RA系阻害薬治療による糸球体硬化への進行の抑制効果は十分なものといえず、病態を形成する分子を直接のターゲットとする治療の開発は現行の治療の限界を打破するものとなり、糖尿病性腎症の腎機能低下の進行・透析

導入を抑制することも可能となる。このように、分子レベルでの成因に基づくバイオマーカーの確立および分子標的治療法の開発は世界をリードするものとなる。

3. 研究の方法

(1) 試験系

培養メサンギウム細胞
糖尿病性腎症動物モデル (ストレプトゾトシン (STZ) 誘導マウス)

BMP4 conditional knock-in transgenic mice、
BMP4 heterozygous knockout mice
iNos transgenic mice

(2) 試薬類および使用機器類

抗-BMP4, 抗-phospho-Smad1 (Upstate),
抗-Smad1, 抗-Col14, (Abcam)

(3) 試験方法

①培養細胞による機序解明

培養メサンギウム細胞に対して糖化終末産物 (AGE) 刺激により BMP4/Smad1/コラーゲン IV (Col14) の発現にいかなる影響を及ぼすか検討する。AGE の受容体である RAGE を SiRNA で阻害すると発現系に如何に影響するか検討する。BMP4 刺激で下流分子が如何に発現するか検討し、その受容体である ALK3/6 の影響を SiRNA で検討する。

②糖尿病モデルにおける発現解析

8 週齢の C57BL/6 マウスにストレプトゾトシン (STZ) (50mg/kg) を 5 日連続腹腔内投与する。すべてのマウスは血糖 400mg/dl 以上を示した。20 週後に病態を解析した。

③誘導型トランスジェニックマウスにおける発現解析

BMP4 トランスジェニックマウスは胎生致死なので、誘導型トランスジェニックマウスを作成した。CMV enhancer-mouse \cdot β -actin promoter-LoxP GFP LoxP-BMP4 (A-a) と murine estrogen receptor-Cre recombinase (A-b) を作成し、C57/BL/6J の卵の前核に導入した double transgenic マウスを作成した。生後 8 週のマウスに Tamoxifen を投与すると estrogen 受容体に結合し、Cre recombinase が LoxP 部位に結合し、GFP がはずれ、BMP4 が発現するマウスを作成した。マウスの系統の選択は GFP が主に糸球体で発現しているマウスを用いた。

④ノックアウトマウスにおける抑制実験

BMP4 ノックアウトマウスは Dr. Hogan の研究室より入手した。このマウスを C57/BL/6 と交配して種をあわした。BMP4 (-/-) は胎生致死なので BMP4 (+/-) を用い系統維持を行った。BMP4 (+/-) は明らかな糸球体病変を来さないため STZ で糖尿病を惹起した。BMP4 (+/-) の 8 週齢マウスに STZ (100mg/kg) を 2 日間腹腔内投与し 20 週後に解析した。

⑤BMP4 中和抗体の投与

前述の STZ 誘導した糖尿病マウスに BMP4 中和抗体の効果を検討した。8 週齢の C57/BL/6 に STZ を投与し、16 週後より BMP4 の中和抗体を (10mg/kg) を 2 週に 1 回腹腔内に投与し 36 週で腎病変を解析した。

(4) 評価項目

BMP4、リン酸化 Smad1、Col14、組織病変

(5) 統計解析方法

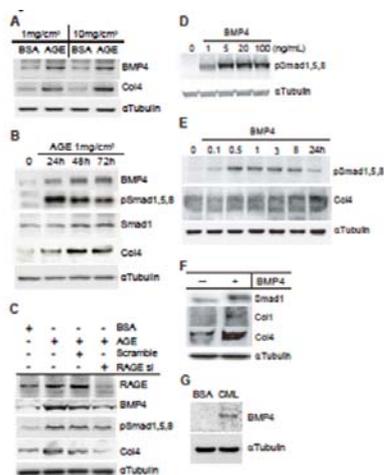
ノンパラメトリック検定 (有意差検定)
Mann-Whitney 試験、有意水準: $p < 0.05$

4. 研究成果

(1) 培養メサンギウム細胞による制御機構

A. AGE の 48 時間刺激において BMP4 および Col14 の発現増強を認めた。

B. AGE 刺激の時間経過では BMP4 は 72 時間刺激まで発現増加していた。リン酸化 Smad1 は 24 時間をピークに発現していた。Smad1 および Col14 も 48 時間および 72 時間で増加していた。



C. AGE 刺激では RAGE も発現増加していた。AGE 刺激下で RAGE を RAGESi で抑制すると、BMP4、リン酸化 Smad1 および Col14 の発現抑制が見られた。

D. BMP4 刺激では濃度依存的にリン酸化 Smad1 の発現増加を認めた。

E. 時間経過では BMP4 刺激の 0.5-3 時間でリン酸化 Smad1 の発現増強を認め、Col14 は 24 時間で著明に増加していた。

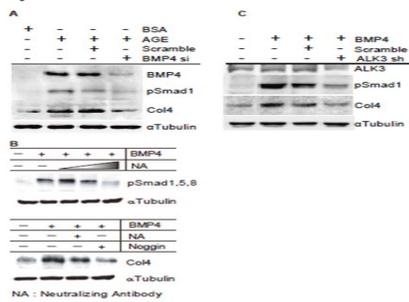
F. BMP4 刺激では 1 型コラーゲンも増加していた。

G. CML 刺激でも BMP4 の発現増強を認めた。

(2) A. AGE 刺激下において BMP4 を BMP4Si で抑制するとリン酸化 Smad1 および Col14 の発現低下を認めた。

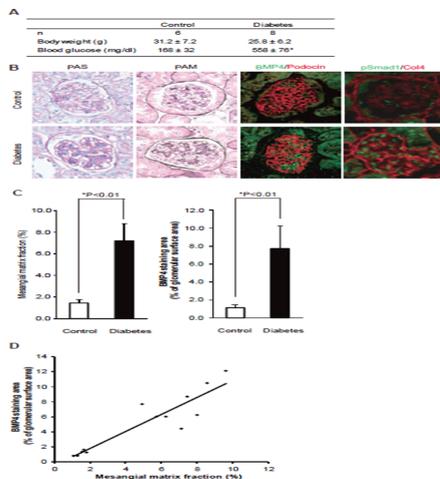
B. BMP4 刺激下で BMP4 中和抗体を添加するとリン酸化 Smad1 の発現低下を認めた。また、BMP4 の natural antagonist である Noggin を添加すると下流分子である Col14 の発現低下を認めた。

C. BMP4 の受容体である ALK3 を BMP4 刺激下で抑制すると (ALK3 sh を用い) ALK3、リン酸化 Smad1 および Col14 の発現低下を認めた。



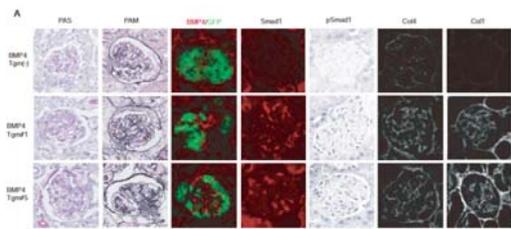
(3) 糖尿病マウス (STZ 誘導) の解析

- A. STZ マウスの血糖は 558 mg/dl であり有意に高値である。
- B. 糖尿病マウスではコントロールと比較して PAS および PAM 染色でメサンギウム基質増生を認めた。BMP4 の発現は糖尿病で明らかに増加しており、その発現部位はポドシン発現部位とは異なった。すなわちメサンギウム、内皮パターンである。リン酸化 Smad1 および Col14 も糖尿病で発現していた。
- C. 画像解析では糖尿病で Mesangial Matrix Fraction (メサンギウム硬化症を検出) および BMP4 の発現増強を認める。
- D. BMP4 の発現強度は Mesangial Matrix Fraction と有意の相関を認めた。



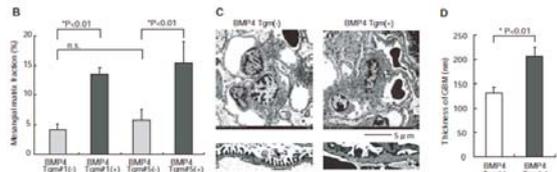
(4) BMP4 トランスジェニックマウスの解析

- A. タモキシフェン誘導前と誘導 5 日後のトランスジェニックマウスの解析である。2 系列のトランスジェニックマウスとも誘導後 BMP4 の発現が見られた。その発現は GFP が消えた部位に認められ、モデルの理論的根拠を裏付けるものである。同時に Smad1 およびリン酸化 Smad1 の発現も惹起された。さらにこのマウスでは著明なメサンギウム基質増生を認めた。また誘導後 Col11 および Col11 の発現も増強していた。



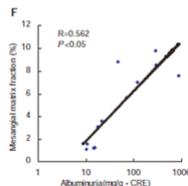
B. Mesangial Matrix Fraction を画像解析すると誘導後 2 系列のモデルで有意に増加していた。

C & D. 電顕での解析ではメサンギウムの拡大のみならず、糸球体基底膜の肥厚も認めた。



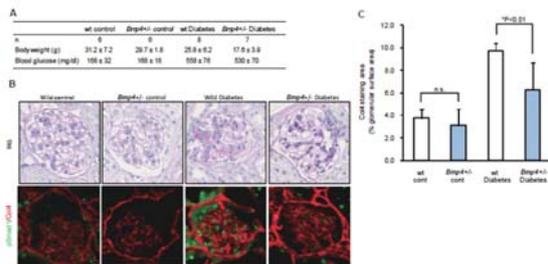
E & F. これら誘導後マウスでは明らかにアルブミン尿が増加しており、メサンギウム基質と有意の相関関係を認めた。

	BMP4 Tg(+)	BMP4 Tg(-)
n	6	7
Albuminuria (mg/g·CRE)	12.9 ± 3.5	242.1 ± 295.0



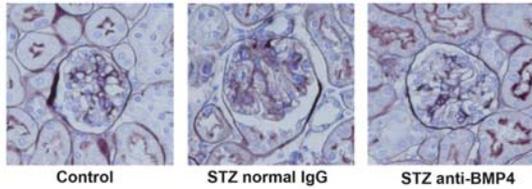
(5) BMP4 ノックアウトマウスの解析

- A. BMP4 (+/-) マウスに STZ を導入し、糖尿病を惹起すると、血糖は 530mg/dl と著明に上昇していた。



- B. その組織解析では糖尿病誘導後でも BMP4 (+/-) で著明にメサンギウム基質増生が抑制されていた。同時に Col14 およびリン酸化 Smad1 のはつげんもよくせいされていた。
- C. Col14 の発現を統計解析しても BMP4 (+/-) の糖尿病マウスでは有意に抑制されていた。

(6) BMP4 中和抗体を糖尿病マウスに導入したデータの解析を行った。糖尿病モデルでは BMP4 中和抗体投与群で著明な改善を認めた。同時にリン酸化 Smad1 の発現低下を認めた。



(7) これらの成果により糖尿病性腎症の特異的病変であるメサンギウム拡大と糸球体基底膜の肥厚さらに進展しておこる糸球体硬化症の成因として BMP4/Smad1 系が重要であることを明白にした。さらにこの系を BMP4 中和抗体で治療すると明らかな改善を認め、現在行われている RA 系抑制剤では治癒できない病変進行の新たな経路が解明できた。今後はさらにこれら分子の制御をターゲットに新たな治療薬のスクリーニングが急がれる。

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 12 件)

① Yoshikawa K, Abe H, Tominaga T, Nakamura M, Kishi S, Matsuura M, Nagai K, Tsuchida K, Minakuchi J, Doi T. Polymorphism in the human matrix Gla protein gene is associated with the progression of vascular calcification in maintenance hemodialysis patients. 査読有、Clin Exp Nephrol. 2013、DOI: 10.1007/s10157-013-0785-9

② Kishi S, Yamada S, Kishi F, Shibata E, Matsuura M, Nagai K, Mima A, Abe H, Doi T. Acute glomerulonephritis in an immunocompetent elderly woman after contact with a child who had been diagnosed as erythema infectiosum. 査読有、Intern Med. 2012; 51(16):2197-2201. DOI: 10.2169/internalmedicine.51.7919

③ Abe H, Tominaga T, Matsubara T, Abe N, Kishi S, Nagai K, Murakami T, Araoka T, Doi T. Scleraxis modulates bone morphogenetic protein 4 (BMP4)-Smad1 protein-smooth muscle α -actin (SMA) signal transduction in diabetic nephropathy. 査読有、Journal of Biological Chemistry. 2012; 287(24):20430-20442. DOI:10.1074/jbc.M111.275610.

④ 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 K, Doi T. SOX9 protein induces a chondrogenic phenotype of mesangial cells and contributes to advanced diabetic nephropathy. 査読有、J

Biol Chem. 2011; 286(37):32162-32169. DOI: 10.1074/jbc.M111.244541.

⑤ Mima A, Shiota F, Matsubara T, Iehara N, Akagi T, Abe H, Nagai K, Matsuura M, Murakami T, Kishi S, Araoka T, Kishi F, Kondo N, Shigeta R, Yoshikawa K, Kita T, Doi T, Fukatsu A. An autopsy case of mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes (MELAS) with intestinal bleeding in chronic renal failure. 査読有、Ren Fail. 2011; 33(6):622-625. DOI:10.3109/0886022X.2011.585730.

⑥ Murakami T, Nagai K, Matsuura M, Kondo N, Kishi S, Araoka T, Kishi F, Sakiyama T, Mima A, Bando Y, Abe H, Doi T. MPO-ANCA-positive anti-glomerular basement membrane antibody disease successfully treated by plasma exchange and immunosuppressive therapy. 査読有、Ren Fail. 2011; 33(6):626-631. DOI: 10.3109/0886022X.2011.581401.

⑦ Tominaga T, Abe H, Ueda O, Goto C, Nakahara K, Murakami T, Matsubara T, Mima A, Nagai K, Araoka T, Kishi S, Fukushima N, Jishage K, Doi T. Activation of bone morphogenetic protein 4 signaling leads to glomerulosclerosis that mimics diabetic nephropathy. 査読有、J Biol Chem. 2011; 286(22):20109-20116. DOI: 10.1074/jbc.M110.179382.

⑧ Mima A, Abe H, Nagai K, Arai H, Matsubara T, Araki M, Torikoshi K, Tominaga T, Iehara N, Fukatsu A, Kita T, Doi T. Activation of Src mediates PDGF-induced Smad1 phosphorylation and contributes to the progression of glomerulosclerosis in glomerulonephritis. 査読有、PLoS One. 2011;6(3):e17929. DOI: 10.1371/journal.pone.0017929.

⑨ Murakami T, Endo S, Moriki T, Doi T, Matsumoto Y. Mixed connective tissue disease developing into MPO-ANCA-positive polyangiitis. 査読有、Intern Med. 2011; 50(6):591-595. DOI: org/10.2169/internalmedicine.50.3958

⑩ Abe H, Matsubara T, Arai H, Doi T. Role of Smad1 in diabetic nephropathy: Molecular mechanisms and implications as a diagnostic marker. 査読有、Histol Histopathol. 2011; 26(4):531-541. Review. http://www.hh.um.es/Abstracts/Vol_26/26_4/26_4_531.htm

⑪ Murakami T, Abe H, Nagai K, Tominaga T, Takamatsu N, Araoka T, Kishi S, Takahashi T, Mima A, Takai Y, Kopp JB, Doi T. Trophoblast glycoprotein: possible

candidate mediating podocyte injuries in glomerulonephritis. 査読有、Am J Nephrol. 2010; 32(6):505-521.

DOI: 10.1159/000321366.

⑫ Araoka T, Abe H, Tominaga T, Mima A, Matsubara T, Murakami T, Kishi S, Nagai K, Doi T. Transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) regulates activin receptor-like kinase 1 (ALK1)/Smad1 pathway for development of diabetic nephropathy.

査読有、Mol Cells. 2010; 30(3):209-218.

DOI: 10.1007/s10059-010-0109-9.

[学会発表] (計 11 件)

- ① Tominaga T. Role of BMP4 for regulating podocyte injury in the diabetic nephropathy, American Society for Cell biology, 2012 年 12 月 15 日, The Moscone Center(USA)
- ② Tominaga T. BMP4 regulates podocyte injury in the diabetic nephropathy, American Society of Nephrology, Kidney Week 2012, 2012 年 11 月 1 日, San Diego Convention Center(USA)
- ③ Miyoshi M, Expression of Gas6 and Axl in Human IgA Nephropathy: A Possible Involvement of Gas6 in Podocyte Damage, American Society of Nephrology Kidney Week, 2012 年 11 月 1 日, San Diego Convention Center(USA)
- ④ Tominaga T. BMP4 regulates podocyte injury in the diabetic nephropathy, The American Diabetes Association's 72nd Scientific Sessions, 2012 年 6 月 10 日, Pennsylvania Convention Center(USA)
- ⑤ Kishi S, SOX9 induces irreversible chondrogenic phenotypic change in diabetic nephropathy, American Society of Cell Biology Annual Meeting 2011, 2011 年 12 月 3~7 日, Colorado Convention Center(USA)
- ⑥ Tominaga T. BMP4 Regulates Podocyte Injury in the Diabetic Nephropathy, American Society of Nephrology Renal Week 2011, 2011 年 11 月 8~13 日, Pennsylvania Convention Center(USA)
- ⑦ Matsubara T, BMP4/Smad1 Signaling: A Novel Therapeutic Target for the Progression of Diabetic Nephropathy, The American Diabetes Association's 71th Scientific Sessions, 2011 年 6 月 24~28 日, San Diego Convention Center(USA)
- ⑧ Kishi S, Chondrogenic Phenotypic Change Contribute to the Irreversible Progression of the Diabetic

Nephropathy, 50th American Society of Cell Biology Annual Meeting, 2010 年 12 月 11 ~ 15 日, Pennsylvania Convention Center(USA)

- ⑨ Araki M, Conditional Knockout of Smad1 Ameliorates glomerulosclerosis in Progressive, American Society of Nephrology Kidney Week 2010, 2010 年 11 月 16~21 日, Colorado Convention Center(USA)
- ⑩ Matsubara T, BMP4/Smad1 signaling is a critical therapeutic target for diabetic nephropathy, American Society of Nephrology Renal Week 2010, 2010 年 11 月 16~21 日, Colorado Convention Center(USA)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

土井 俊夫 (DOI TOSHIO)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授

研究者番号: 60183498

(2) 研究分担者

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

長井 幸二郎 (NAGAI KOJIRO)

徳島大学・病院・講師

研究者番号: 40542048

美馬 晶 (MIMA AKIRA)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教

研究者番号: 00432401

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部・助教

研究者番号: 80425446