

論 文 内 容 要 旨

題目 An adjustment in BMP4 function represents a treatment for diabetic nephropathy and podocyte injury
(BMP4 の機能調節は糖尿病性腎症及びポドサイト障害の治療につながる)

著者 Yui Fujita, Tatsuya Tominaga, Hideharu Abe, Yumi Kangawa, Naoshi Fukushima, Otoya Ueda, Kou-ichi Jishage, Seiji Kishi, Taichi Murakami, Yumiko Saga, Yashpal S Kanwar, Kojiro Nagai, Toshio Doi

平成 30 年 8 月 29 日発行 Scientific Reports, volume 8(1),
Article number:13011 発表済

内容要旨

末期腎不全による透析患者数は世界的に増加している。糖尿病性腎症は、透析予備群といわれる慢性腎臓病 (CKD) の主因であるが、根本的治療法は無く、その進展機序の解明は急務である。これまでに我々は、糖尿病性腎症の主たる病変であるメサンギウム基質増生が Bone Morphogenetic Protein 4 (BMP4)/Smad1 シグナル系によって惹起されることを明らかにしている。CKD の多くは原疾患悪化の過程で、ポドサイト喪失からはじまり糸球体硬化が進行、腎機能低下を招くとされている。その詳細な分子機構は明らかになっていないが、アポトーシスはその主な経路の 1 つとされる。そこで、BMP4 シグナルとアポトーシスに関わる MAPK p38 経路に焦点を当て、ポドサイト障害発生機序の解明を目的とした。

in vivo 解析において、各マウスは Streptozotocin (STZ) により糖尿病を誘発させた (STZ-DM)。使用した 3 種類のマウスは、1) 野生型マウス (C57BL/6J)、2) BMP4 発現が低下した *Bmp4* heterozygous knockout マウス (*Bmp4*^{+/-})、3) conditional *Bmp4* knockout マウス (*Bmp4*^{loxP}) と *Podocin Cre* マウスを交配させ、ポドサイト特異的に *Bmp4* をノックアウトさせたマウス (*Bmp4*^{loxP} x *Pod-Cre*) である。さらに、非糖尿病条件下 (non-DM) において使用した 2 種類のマウスは、4) タモキシフェン誘導により BMP4 発現時期を選択的に調節できる conditional *Bmp4* knock-in マウス (*Bmp4* tgm +)、5) *CAG-CAT-Bmp4* transgenic マウス (*CAG-B4*) と *Podocin Cre* マウスを交配させ、ポドサイト特異的に BMP4

様式(8)

を発現するマウス (*CAG-B4 x Pod-Cre*) である。組織学的解析は、メサンギウム基質増生を PAS 染色及び PAM 染色にて行なった。ポドサイト足突起の形態については Nephritin 発現を、ポドサイト脱落については WT1 発現を、それぞれ免疫組織化学染色、Western blot 法にて解析を行なった。電子顕微鏡にて、ポドサイト足突起の病理学的解析を行なった。アポトーシスの判定には TUNEL 法を用いた。また、*in vitro* 解析において、培養ポドサイト細胞を BMP4 刺激し、アポトーシス関連分子 (p38, Caspase3) の発現変化を解析した。さらに Smad1 抑制分子 (Dorsomorphin) と p38 抑制分子 (SB202190/SB242235) を添加し、下流因子の作用機序を解析した。

はじめに、STZ-DM 野生型マウスはポドサイト障害、メサンギウム基質増生及びアルブミン尿の増加を示した。次に、STZ-DM *Bmp4*^{+/-} マウスは、STZ-DM 野生型マウスと比較し、ポドサイト障害及びメサンギウム基質増生を抑制していた。アルブミン尿は non-DM 野生型マウスと比較し統計学的に有意差を認めなかった。

次に DM 条件下でポドサイトの BMP4 発現を低下させ、腎障害の程度を調べるため *Bmp4*^{loxP} *x Pod-Cre* マウスを用いた。STZ-DM *Bmp4*^{loxP} *x Pod-Cre* マウスは、Cre 誘導をしていない STZ-DM *Bmp4*^{loxP} マウスと比較し、ポドサイト障害及びメサンギウム基質増生の抑制及びアルブミン尿を改善させた。これらの結果は、ポドサイトの BMP4 発現を抑制することが、糖尿病性腎症の緩和に繋がる事を示している。

続いて、疾患形成における BMP4 の直接的作用を調べるため、*Bmp4* *tgm* マウスを用いた。タモキシフェンによる誘導をしていない (*Bmp4* *tgm* -) を対照マウスとした。*Bmp4* *tgm* + マウスは *Bmp4* *tgm* - マウスと比較して、ポドサイト障害、メサンギウム基質増生、アルブミン尿増加を示し、BMP4 単独で糸球体障害を進展させることが明らかとなった。*CAG-B4 x Pod-Cre* マウスは、*CAG-B4* 対照マウスと比較し、ポドサイト障害を含む著しい糸球体障害を呈した。また、*Bmp4* *tgm* + 及び *CAG-B4 x Pod-Cre* の両マウスは、non-DM 条件下でアポトーシスを惹起していた。従って、BMP4 の発現増加はポドサイトのアポトーシスを誘導し、糸球体障害を惹起する。

in vitro 解析では、ポドサイトに対する BMP4 作用機序を解明するために、培養ポドサイト細胞への BMP4 刺激を行った。BMP4 の刺激により Nephritin 発現の減少、p38 のリン酸化、Caspase3 の活性化が誘導された。また、同条件下で、SB242235 及び SB202190 により p38 のリン酸化抑制と共に、Caspase3 の活性化阻害が確認された。

これらの結果から、糖尿病性腎症でみられるポドサイト障害が、

様式(8)

BMP4/p38/Caspase3 シグナルを介したアポトーシスにより誘導されていることを明らかにした。また BMP4 シグナルは、メサンギウム細胞において BMP4/Smad1/Col4 シグナルを活性化することから、両経路で中心的作用を及ぼしている。以上の結果より、BMP4 は腎障害における治療戦略の有望な標的分子であることが明らかとなった。

論文審査の結果の要旨

| | | | |
|------|----------------------------------|----|-------|
| 報告番号 | 甲医第 1389号 | 氏名 | 藤田 結衣 |
| 審査委員 | 主査 常山 幸一 副査 宮本 賢一 副査 石澤 啓介 | | |

題目 An adjustment in BMP4 function represents a treatment for diabetic nephropathy and podocyte injury
 (BMP4 の機能調節は糖尿病性腎症及びポドサイト障害の治療につながる)

著者 Yui Fujita, Tatsuya Tominaga, Hideharu Abe, Yumi Kangawa, Naoshi Fukushima, Otoya Ueda, Kou-ichi Jishage, Seiji Kishi, Taichi Murakami, Yumiko Saga, Yashpal S Kanwar, Kojiro Nagai, Toshio Doi
 平成 30 年 8 月 29 日発行 Scientific Reports 第 8 巻
 article number:13011 に発表済
 (主任教授 香美祥二)

要旨 慢性腎臓病の主な原因疾患は糖尿病性腎症であり、その治療戦略に結びつく腎臓病の進展機序の解明は重要な課題である。申請者らは以前に、糖尿病性腎症に特徴的な病理学的変化は、bone morphogenetic protein 4 (BMP4) シグナルが中核をなしていることを証明している。また、ポドサイト構造の破綻は糸球体硬化症の進展と密接に関連している。

本研究は、BMP4 シグナル伝達とポドサイト障害におけるアポトーシス経路に焦点を当て、その分子機構を明らかにすることを目的としている。得られた結果は以下の通りである。

1. Streptozotocin (STZ) 誘導型糖尿病マウスはポドサイトフットプロセス崩壊 (nephrin 発現低下) 及びポドサイト脱落 (WT1

陽性細胞数減少)によるポドサイト障害及びメサンギウム基質増生を呈した。

2. STZ 誘導型糖尿病 BMP4 heterozygous knockout マウスは、ポドサイト障害及びメサンギウム基質増生を抑制した。
3. STZ 誘導型糖尿病ポドサイト特異的 BMP4 knockout マウスは、ポドサイト障害、メサンギウム基質増生の抑制及びアルブミン尿を改善させた。
4. タモキシフェン誘導型 BMP4 conditional knock-in マウスは、ポドサイト障害、メサンギウム基質増生及びアルブミン尿増加を呈した。
5. ポドサイト特異的 BMP4 knock-in マウスは、ポドサイト障害、メサンギウム基質増生及びアルブミン尿増加を呈した。
6. タモキシフェン誘導型 BMP4 conditional knock-in マウス及びポドサイト特異的 BMP4 knock-in マウスは、アポトーシスを惹起していた。
7. STZ 誘導糖尿病 BMP4 heterozygous knockout マウスは、アポトーシスを抑制した。
8. 培養ポドサイト細胞において、BMP4 刺激は nephrin 発現の減少、p38 のリン酸化及び caspase3 の活性化を誘導した。
9. 培養ポドサイト細胞への BMP4 刺激下において、SB242235 及び SB202190 による p38 のリン酸化抑制は、caspase3 の活性化を阻害した。

これらの結果は、糖尿病性腎症で起こるポドサイト障害の原因が、BMP4 シグナル伝達によるアポトーシスであることを明らかにした。BMP4 シグナルは、ポドサイト障害の中心的役割を担い、BMP4 が治療戦略の有望な標的であることを示している。

以上により、本研究成果は糖尿病性腎症の成因研究の発展及び腎臓病診療の向上に寄与するところ大であり、学位授与に値すると判断した。