

特集：糖尿病性腎症の成因と病態—新たな展開

BMP4・Smad1 シグナルと糖尿病性腎症

安部秀斉*¹ 富永辰也*¹ 松原 雄*² 土井俊夫*¹

はじめに

近年、糖尿病患者の増加に伴い、糖尿病性腎症による糸球体硬化から腎不全・透析へと至る患者数は増加の一途にある。一方、現行の糖尿病性腎症病期分類にあてはまらない症例、すなわち、正常アルブミン尿(腎症前期)であっても腎機能低下を示す患者、逆に、腎機能低下(腎不全期)であっても蛋白尿が陰性という患者が多くみられることが指摘されている。こうした問題の背景には、診断という観点からは、心血管イベントのマーカーとしては優れた微量アルブミン尿が、糸球体硬化を反映しないという問題がある。それを解決すべく、本稿では、糖尿病性腎症の分子病態解明、非侵襲的バイオマーカーとしての糸球体硬化を特異的かつ鋭敏に反映する尿中 Smad1 の開発に関して述べる。

アルブミン尿の課題

18世紀の後半に、蛋白尿が糖尿病患者に認められることが初めて指摘され、それから40年ほどして、Brightによって糖尿病に特徴的な変化であることが示された¹⁾。さらに、Kimmelstielらによって特徴的な結節性病変が示され²⁾、その後の数多くの検討により、糖尿病性腎症における基本的な病理学的所見としての糸球体基底膜肥厚やメサンギウム領域の拡大が確立してきた。

糖尿病性腎症では、特に早期発見が重要であり、それを目的として微量アルブミン尿がしばしば日常診療で用いられている。それでは、アルブミン尿は本当に硬化の指標として有用なものなのであろうか。糖尿病患者に腎生検を施行したところ、微量アルブミン尿が陰性であっても、糸球

体障害の進行している患者が存在し、逆に、微量アルブミン尿が陽性でも組織は正常と変わらない患者が多数存在していることが知られている^{3,4)}。また糖尿病患者で腎機能低下があっても、蛋白尿が陰性という患者も少なくないとされる^{5,6)}。そして、糖尿病に合併した他の原因による腎障害においても、当然ながらアルブミン尿を認める場合は多い⁷⁾。こうした問題点を抱えており、腎症初期においては、少なくとも微量アルブミン尿単独では実際の糸球体障害を評価することは困難である。また、微量アルブミンが認められない時期に、すでに病理学的変化(糸球体基底膜肥厚、メサンギウム領域の拡大)が確認されている⁸⁾。すでにこの時期より、高血糖の持続によって、メサンギウム細胞より過剰産生される細胞外基質(extracellular matrix: ECM)によって病変が形成されていることを示している。少数ながら結節性病変もこの時期に認められる。このように、最終的な変化である糸球体硬化に至る変化がこの時期より存在することは重要である。微量アルブミン尿も出現していない、より早期の糖尿病性腎症の診断のために、成因に基づく、糸球体硬化発症を予測可能な非侵襲的診断用バイオマーカーの探索・開発が望まれている。

糖尿病性腎症の分子病態

糖尿病性腎症の病態は、組織学的には糸球体基底膜の肥厚とメサンギウム基質の増加を特徴とし、徐々に増加するECMによって糸球体毛細血管の閉塞が進行し、やがて糸球体硬化に至るところにある。蓄積するECMの最も主要な構成成分はIV型コラーゲン(Col4)である。したがって、糖尿病性腎症における糸球体硬化症の成因を考えるうえで、Col4が増加する機構の解明が重要であった。発症機序については、これまでの疫学的調査から、高血糖に起因する細胞内代謝異常が発症の要因であるということが明白である^{9,10)}。特に、持続する高血糖の結果形成される advanced

BMP4-Smad1 signaling pathway in the pathogenesis of diabetic nephropathy

*¹徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部腎臓内科学

*²京都大学大学院腎臓内科学

glycosylated end-product (AGE)が重要な因子である。AGE が糖尿病の血管壁、網膜、腎に沈着し、その合併症と相関を示すことも知られており、動物実験レベルでは、正常ラットに AGE を投与すると、メサンギウム基質の増加、糸球体基底膜の肥厚といった糖尿病性腎症に特徴的な病理学的所見が認められたという報告もある。AGE が、メサンギウム細胞に発現している AGE 受容体 (RAGE) を介して PDGF や TGFβ などのサイトカインを産生亢進させ、Col4、I 型コラーゲン (Col1) などの ECM の産生を亢進させ、糸球体基底膜の肥厚と ECM の蓄積、ひいては糸球体硬化へ至る¹¹⁾。しかしながら、ECM 蛋白を異常に産生する細胞内シグナル伝達経路に関しては、十分な解明がなされていない。

糸球体硬化症の形成過程で最も中心的な変化をきたす Col4 分子は、3 重らせん構造を形成する基底膜型のコラーゲンである。らせん構造を構成する α1 鎖 (COL4A1) と α2 鎖 (COL4A2) の遺伝子は第 13 染色体上に head-to-head の関係で存在し、1 つのプロモーターを共有するという特徴的な構造を形成しており、プロモーターの活性化により双方向に転写が行われる (図 1)。South-Western 法による解析で、そのプロモーター内の蛋白質結合部位が明らかにされており¹²⁾、AGE で刺激した培養メサンギウム細胞から得た核蛋白質のみが結合することが明らかになっていた。この核蛋白質の一つが重要な転写因子であることが想定されていた¹³⁾。そこで、その蛋白質を同定するために、AGE 刺激下で培養したメサンギウム細胞から cDNA ライブラリーを作成し、酵母 one-hybrid 法を用いて、Col4 のプロモーターに対する結合分子をクローニングし (図 2)、その分子が Smad1 であることが同定された¹⁴⁾。糖尿病状態でのメサンギウム細胞では、AGE の刺激により TGFβ が産生・活性化され、R II (TGFβ の II 型受容体) → ALK1 (activin receptor-like kinase 1 : TGFβ の I 型受容体の一つ) → Smad1 とリン酸化のカスケードを経て活性化されたリン酸化 Smad1 (pSmad1) が核内に移行し、標的となる遺伝子 (Col4 など) の転写を誘導する (図 3)。また最近、Smad1 の活性化に関して、bone morphogenetic protein 4 (BMP4) もまた硬化病変形成に関与していることが、BMP4 のコンディショナルトランスジェニック・ノックア

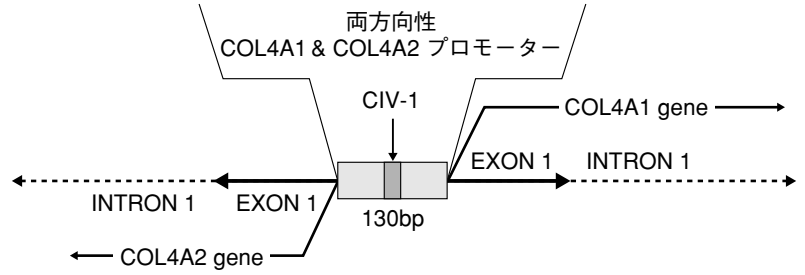


図 1 IV型コラーゲン遺伝子とプロモーター

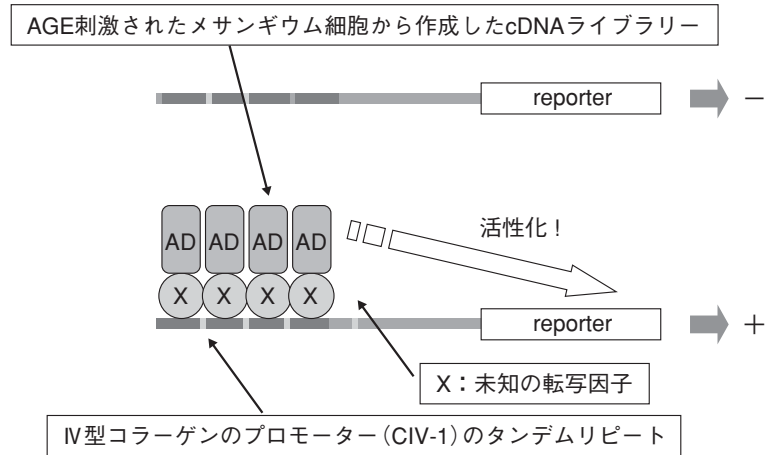


図 2 酵母 one-hybrid 法による Smad1 の同定

酵母 one-hybrid 法の原理 : reporter 遺伝子の 上流に存在する IV 型コラーゲンのプロモーター部分に、AGE による刺激で誘導されたメサンギウム細胞の蛋白質 (X) と AD の融合蛋白質が結合すると、reporter 遺伝子が活性化することを利用して結合蛋白質を同定する。

AD (activating domain) : reporter 遺伝子を活性化させる部分

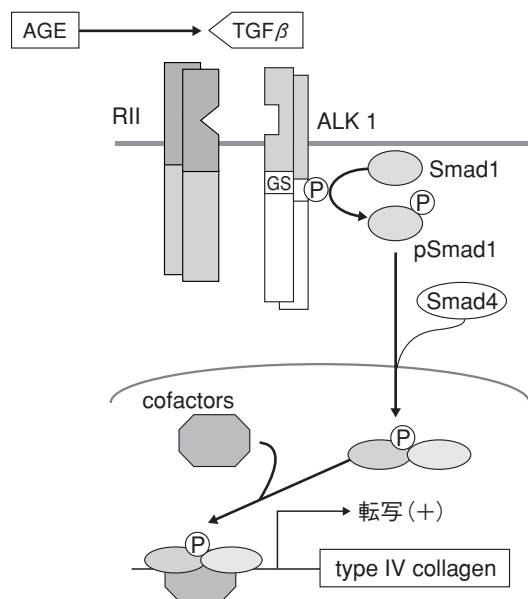


図 3 TGFβ による Smad1 の活性化機構

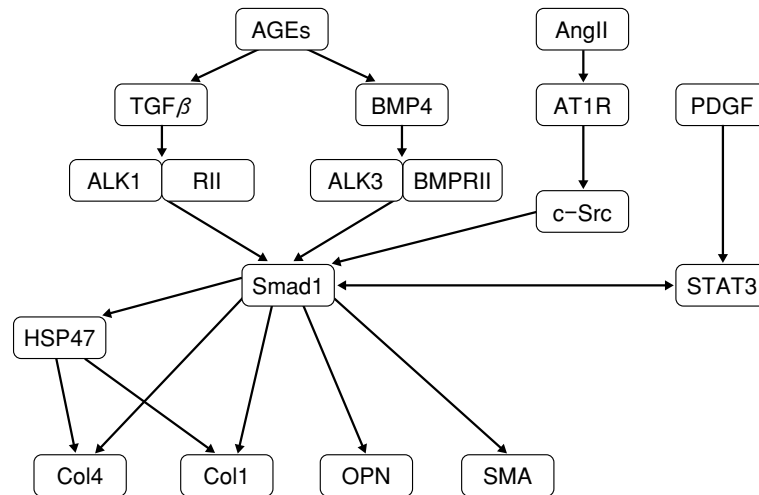


図 4 糖尿病性腎症の分子病態
AT1R : type 1 angiotensin II receptor

ウトマウスを用いた解析によって明らかとなった¹⁵⁾。すなわち、BMP4→BMPRII (BMP の II 型受容体)→ALK3 (BMP の I 型受容体)→Smad1 という経路も糖尿病や AGE 刺激下で活性化される (図 4)。BMP4 は Smad1 蛋白の発現をも強力に誘導することから、TGFβ と比べて、糖尿病性腎症の発症・進展にいつそう深く寄与していることが示唆された。現在、BMP4 を特異的に中和する抗体の投与によって、糖尿病性腎症の典型的な病理学的変化を改善させることが可能となりつつある。

アンジオテンシン II と Smad1

糖尿病性腎症の多くは高血圧を合併しやすく、腎症の進行とともに、血圧異常も著明となる。また、腎症の悪化因子としての高血圧が指摘されている。実際の臨床において、アンジオテンシン II (Ang II) による硬化の進展促進と、RA 系阻害薬などによるその抑制効果が示されている。レニン・アンジオテンシン (RA) 系の活性化に伴う Smad1 の活性化機構に関して、Ang II の下流でチロシンキナーゼの一つである c-Src が Smad1 のリン酸化に作用していることが明らかとなった¹⁶⁾ (図 4)。さらに、c-Src のノックアウトマウスを用いた解析および Src インヒビター投与による検討で、糖尿病性腎症における c-Src の病変進行における関与が確認された。また、*in vivo*, *in vitro* におけるアンジオテンシン II 受容体拮抗薬 (ARB) の投与により c-Src の活性化が抑制されることで、腎障害の進行抑止にかかわる機構が明らかとなった¹⁶⁾。RA 系阻害薬による糸球体硬化の進行抑制の機序の一端が明らかとなり、同剤の抗硬化作用を

介した腎保護作用も裏付けられた。

形質転換と腎障害

腎不全に至る機序には、細胞外基質 (ECM) の産生亢進以外にも、メサンギウム細胞の形質転換が重要であることが知られており、その特徴は、平滑筋型アクチン (smooth muscle α actin : SMA) の発現が誘導されることである。数多くの研究により、メサンギウム細胞が障害を受けると正常に分化していた形質に変化をきたし、その変換のマーカである SMA の発現が著明なものとなることが示されている。これまで、TGFβ による SMA 発現の誘導はよく知られていたが、転写調節に関しては未解決な点が多かった。胎生期の腎発生において、細胞増殖が盛んな部位においては、Smad1 と SMA が強発現していることから、メサンギウム細胞における SMA の発現誘導の機序を解析したところ、やはり、Smad1 が SMA のプロモーター活性を著明に上昇させていた。また、糖尿病モデルの STZ ラットにおいても硬化病変の出現と Smad1・SMA の糸球体内の発現が非常に相関していることが明らかとなり、メサンギウム細胞の形質変化に関しても Smad1 が重要な役割を担うことが示された¹⁷⁾。

糖尿病性腎症のモデル動物であるストレプトゾトシン誘発糖尿病 (STZ) ラットを用いた実験では、糖尿病の惹起により、糸球体過剰濾過、アルブミン尿、糸球体肥大といった所見を共通して呈する一方で、糸球体硬化に関しては、個々のラットによりその程度が大きく異なることが特徴でもあった。糖尿病ラット作製 24 週後に、硬化部位を評価

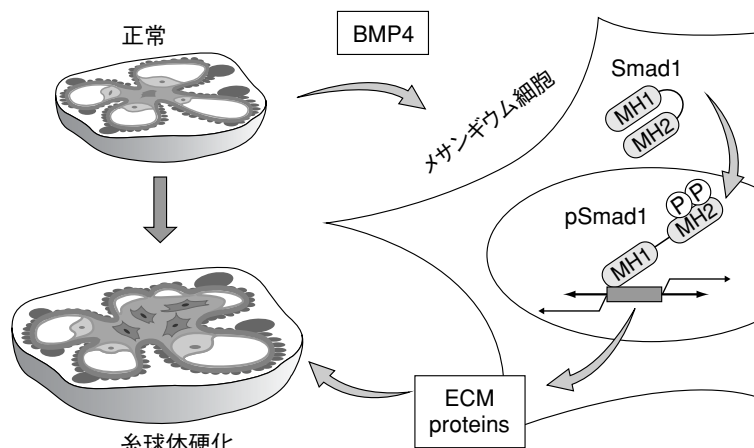


図 5 Smad1 と糸球体硬化

するため PAM 染色を施行し、2 群(硬化群: PAM 領域が正常群+2 SD 以上, 非硬化群: PAM 領域が正常群±2 SD 未満)に分類し、糸球体硬化と Smad1 の関係を検討すると、硬化群では非硬化群に比して、Col4 の産生増加, SMA の発現誘導が認められた。それに一致して、糸球体中の Smad1, pSmad1 の発現亢進は硬化群でのみ確認された¹⁷⁾。

Smad1 と硬化関連遺伝子

Smad1 は興味深いことに、Col4 だけでなく、糸球体硬化の過程で新たに発現がみられるようになるオステオポンチン(OPN)および Col1 をも転写制御していた(図 4)¹⁴⁾。OPN は、さまざまな組織において炎症・免疫などに重要な働きを担っており、糖尿病性腎症の進展における炎症・免疫異常の関与をうかがわせる点でも興味深い。アンチセンスを用いた Smad1 のノックダウンでは、これら硬化関連因子の発現が著明に低下した¹⁴⁾。さらには、コラーゲン線維の成熟や基底膜の形成に必須であるコラーゲン特異的分子シャペロンである heat shock protein 47(HSP47)の発現もまた Smad1 により制御されており¹⁸⁾、糸球体基底膜肥厚や線維化などの変化に HSP47 が関与する機序が明らかとなった。また、メサンギウム細胞は ECM を産生するだけでなく、自身の細胞も増殖することで、より一層病変形成に寄与することが知られている(図 5)。腎症の発症から糸球体硬化に至る過程では、細胞増殖、形質変換、硬化という事象が互いに関連し合って病変を形成するものと考えられる。Smad1 は神経幹細胞がアストロサイトに分化する過程で、転写因子 signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) と転写共役因子 p300 を介する複合体を形成する

ことが知られていた。また、STAT3 は増殖性糸球体腎炎や糖尿病性腎症において、糸球体構成細胞への増殖性変化をきたす血小板由来増殖因子 platelet-derived growth factor (PDGF) によって活性化されるという報告が多数なされていた。そこで、増殖性変化と硬化性変化が絡み合いながら進行するプロセスに STAT3 がどのようにかかわるのかを調べると、Smad1 と STAT3 が互いに活性化を促進させながら、核内で標的遺伝子の発現を誘導させることが明らかとなった(図 4)。さらに、これまで血管内皮細胞に特異的に発現する膜受容体とされていた ALK1 が、AGE 刺激を受けたメサンギウム細胞に発現するようになり、Smad1 をリン酸化することで活性化し、シグナルを伝達すること、ヒト糖尿病性腎症患者の組織においても、病変に一致して ALK1 が発現することも明らかとなった^{14,19)}。

尿中 Smad1 の意義

先述の STZ ラットは早期腎症モデルとしての特徴を有しており、アルブミン尿を呈することが知られている。STZ ラットのアルブミン尿を測定し、硬化群と非硬化群で比較すると、両群間でのアルブミン尿の量は変わらず、ヒトの場合と同じくアルブミン尿では糸球体硬化を評価できないことが確認される。各群の尿中 Smad1 量の測定を行ったところ、尿中 Smad1 排泄量は硬化群でのみ有意な上昇を認め、尿中 Smad1 はアルブミン尿に代わる新しい診断用バイオマーカーになる可能性が示唆される結果であった¹⁷⁾。Smad1 が Col4 をはじめとする硬化・形質転換関連分子群の上流に位置する転写因子であることから、糖尿病性腎症の発症前より糸球体硬化、腎不全を予測するバイオマ-

カーとなる期待がもたれる。

次いで、同じく STZ ラットと 2 型糖尿病モデルとしての db/db マウスを用いて、おのおの STZ 投与後 4 週, 6 週齢という早期に尿中 Smad1 を測定し、その後の糸球体硬化の発症を観察した。この時点での尿中 Smad1 の排泄量は、STZ ラットでは STZ 投与後 24 週, db/db マウスでは 18 週齢における、後のメサンギウム領域の拡大と非常に相関していた。一方、アルブミン尿とメサンギウム領域の拡大には十分な相関は認められなかった²⁰⁾。すなわち、正常糸球体では発現のみられない Smad1 が糖尿病により発現するようになると、その活性化によって、Col4 のみならず、他の ECM 蛋白質の産生や細胞の形質変化なども誘導され、腎症が発症すると考えられる。

おわりに

ヒトの糖尿病性腎症の組織を用いた検討でも、Smad1 は正常糸球体内では発現を認めず、糖尿病患者の糸球体において、硬化の程度に一致して発現していることが確認された¹⁴⁾。このように、糸球体の変化を正確に反映するバイオマーカーがヒトにおいても同様に有効であれば、さまざまな過程で Smad1 を中心とする関連分子群の変化がモニタリングされ、各ステージの治療法の選択およびその効果判定が病態に基づいて行われるといった段階に進むものと考えられる²¹⁾。

利益相反自己申告：土井俊夫：研究員(中外製薬株式会社)

文 献

- Bright R. Cases and observations illustrative of renal disease accompanied with the secretion of albuminous urine. *Guy's Hospital Report* 1836 ; 10 : 338-340.
- Kimmelstiel P, Wilson C. Intercapillary lesions in the glomeruli of the kidney. *Am J Pathol* 1936 ; 12 : 83-98.
- Chavers BM, Bilous RW, Ellis EN, Steffes MW, Mauer SM. Glomerular lesions and urinary albumin excretion in type I diabetes without overt proteinuria. *N Engl J Med* 1989 ; 320 : 966-997.
- Brocco E, Fioretto P, Mauer M, Saller A, Carraro A, Frigato F, Chiesura-Corona M, Bianchi L, Baggio B, Maioli M, Abaterusso C, Velussi M, Sambataro M, Virgili F, Ossi E, Nosadini R. Renal structure and function in non-insulin dependent diabetic patients with microalbuminuria. *Kidney Int* 1997 ; 63(Suppl) : S40-44.
- Babazono T, Hanai K, Suzuki K, Kiuchi Y, Inoue A, Tanaka M, Tanaka N, Hase M, Ishii A, Iwamoto Y. Lower haemoglo-

- bin level and subsequent decline in kidney function in type 2 diabetic adults without clinical albuminuria. *Diabetologia* 2006 ; 49 : 1387-1393.
- MacIsaac RJ, Tsalamandris C, Panagiotopoulos S, Smith TJ, McNeil KJ, Jerums G. Nonalbuminuric renal insufficiency in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2004 ; 27 : 195-200.
- Middleton RJ, Foley RN, Hegarty J, Cheung CM, McElduff P, Gibson JM, Kalra PA, O'Donoghue DJ, New JP. The unrecognized prevalence of chronic kidney disease in diabetes. *Nephrol Dial Transplant* 2006 ; 21 : 88-92.
- Moriya T, Tanaka K, Moriya R. Glomerular structural changes and structural-functional relationships at early stage of diabetic nephropathy in Japanese type 2 diabetic patients. *Med Electron Microsc* 2000 ; 33 : 115-122.
- The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1993 ; 329 : 977-986.
- UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *Lancet* 1998 ; 352 : 837-853.
- Vlassara H, Striker LJ, Teichberg S, Fuh H, Li YM, Steffes M. Advanced glycation end products induce glomerular sclerosis and albuminuria in normal rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994 ; 91 : 11704-11708.
- Bruggeman LA, Burbelo PD, Yamada Y, Klotman PE. A novel sequence in the type IV collagen promoter binds nuclear proteins from Engelbreth-Holm-Swarm tumor. *Oncogene* 1992 ; 7 : 1497-1502.
- Iehara N, Takeoka H, Yamada Y, Yamada Y, Kita T, Doi T. Advanced glycation end products modulate transcriptional regulation in mesangial cells. *Kidney Int* 1996 ; 50 : 1166-1172.
- Abe H, Matsubara T, Iehara N, Nagai K, Takahashi T, Arai H, Kita T, Doi T. Type IV collagen is transcriptionally regulated by Smad1 under advanced glycation end product (AGE) stimulation. *J Biol Chem* 2004 ; 279 : 14201-14206.
- Tominaga T, Abe H, Ueda O, Goto C, Nakahara K, Murakami T, Mima A, Nagai K, Araoka T, Kishi S, Fukushima N, Jishage KI, Doi T. Activation of bone morphogenetic protein 4 signaling leads to glomerulosclerosis that mimics diabetic nephropathy. *J Biol Chem* 2011 ; 286 : 20109-20116.
- Mima A, Matsubara T, Arai H, Abe H, Nagai K, Kanamori H, Sumi E, Takahashi T, Iehara N, Fukatsu A, Kita T, Doi T. Angiotensin II-dependent Src and Smad1 signaling pathway is crucial for the development of diabetic nephropathy. *Lab Invest* 2006 ; 86 : 927-939.
- Matsubara T, Abe H, Arai H, Nagai K, Mima A, Kanamori H, Sumi E, Takahashi T, Matsuura M, Iehara N, Fukatsu A, Kita

- T, Doi T. Expression of Smad1 is directly associated with mesangial matrix expansion in rat diabetic nephropathy. *Lab Invest* 2006 ; 86 : 357-368.
18. Ohashi S, Abe H, Takahashi T, Yamamoto Y, Takeuchi M, Arai H, Nagata K, Kita T, Okamoto H, Yamamoto H, Doi T. Advanced glycation end products increase collagen-specific chaperone protein in mouse diabetic nephropathy. *J Biol Chem* 2004 ; 279 : 19816-19823.
19. 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. *Mol Cells* 2010 ; 30 : 209-218.
20. 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. Urinary Smad1 is a novel marker to predict later onset of mesangial matrix expansion in diabetic nephropathy. *Diabetes* 2008 ; 57 : 1712-1722.
21. Abe H, Matsubara T, Arai H, Doi T. Role of Smad1 in diabetic nephropathy : Molecular mechanisms and implications as a diagnostic marker. *Histol Histopathol* 2011 ; 26 : 531-541.