

厚生労働科学研究研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

新規腎障害分子USAG-1を標的とした腎不全回復療法の開発
に関する研究

平成18年度総括／分担研究報告書

主任研究者 柳 田 素 子

平成19 (2007) 年 3 月

目 次

I. 構成員名簿	1
II. 平成18年度総括研究報告書	5
京都大学大学院医学研究科 21世紀COE	COE助教授 柳田 素子
III. 平成18年度分担研究報告	15
京都大学副学長・理事	
京都大学大学院医学研究科循環器内科学	教授 北 徹
IV. 研究成果の刊行に関する一覧表	21
V. 研究成果の刊行物・別刷	25

I. 構成員名簿

班構成員

	研究者名	所属	職名
主任研究者	柳田素子	京都大学大学院医学研究科 21世紀COE	COE助教授
分担研究者	北 徹	京都大学 京都大学大学院医学研究科 循環器内科	副学長・理事 教授
研究協力者	柳沢正史	ハワードヒューズ財団テキサス大	教授
経理事務 担当者	小出 三栄	京都大学医学研究科研究協力掛	事務

Ⅱ. 平成18年度総括研究報告書

新規腎障害分子USAG-1を標的とした腎不全回復療法の開発

主任研究者 柳田素子 京都大学大学院医学研究科21世紀COE

研究要旨

当研究課題では、申請者が最近見出した新規分子USAG-1を標的とした新しい腎不全治療薬の開発を目的とする。

現在透析患者数は25万人を越えており、その医療費は年間1.5兆円にのぼる。さらにこの人数は毎年1万人ずつ増加を続けている。この一因として、現時点では腎不全に陥った腎臓を元に戻す決定的な治療法がないことが挙げられる。

近年、腎疾患モデルにBMP-7 (Bone Morphogenetic Protein-7)を投与すると腎機能が回復することが報告された。これは腎不全からの回復という点で画期的だが、BMP受容体が全身に存在するために副作用が問題となり、実用化には至っていない。

申請者は腎特異的遺伝子の探索の過程で腎臓特異的なBMP-7の制御因子であるUSAG-1を発見した。平成17、18年度には、USAG-1遺伝子欠損マウス(USAG-1 KO)を作成し、USAG-1 KO が急性腎不全モデルおよび腎線維化モデルに抵抗性であること、その腎障害抵抗性はBMP-7のシグナル増強を介していることを証明した。このことからUSAG-1とBMP-7の結合を阻害するような中和抗体は腎臓におけるBMP-7の活性を増強し、腎不全治療薬として働く可能性が明らかとなった。こういった薬剤は従来の予防的薬剤とは異なり、腎不全を回復させる可能性が高く、透析導入患者数を大幅に減少させうると考えられる。さらにUSAG-1の発現が腎臓に限局することからこういった薬剤はBMP-7自体の投与よりも副作用が少ないことが期待される。

平成18年度はその知見を元にして、

- ① USAG-1中和抗体の作成
- ② 慢性腎不全におけるUSAG-1の機能解析
- ③ 内因性BMP-7の腎障害における役割の解明を行なった。

分担研究者
北 徹
京都大学副学長・理事
京都大学大学院医学研究科
循環器内科 教授

研究協力者
柳沢 正史
ハワードヒューズ研究員
テキサスサウスウエスタン大学教授

A. 研究の背景および目的

現在透析患者数は25万人を越えており、しかもその数は年々1万人ずつ増加を続けている。透析費用は患者1人あたり年間600万円必要であり、腎臓病の医療費総額は年間1.5兆円におよぶ。この現状の一因として、現時点では腎不全に陥った腎臓を元に戻す治療法がないことが挙げられ、より決定的な腎不全治療薬の開発が待たれる。

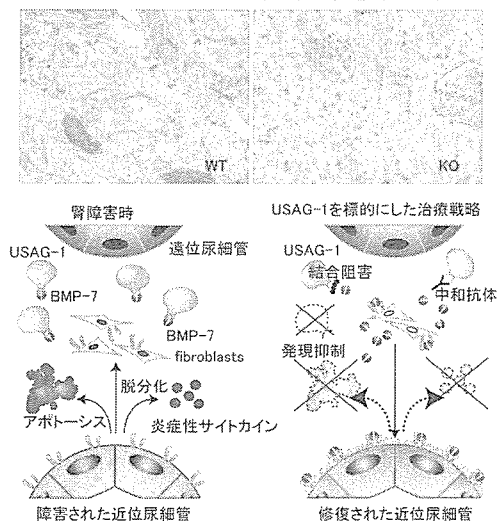
近年、腎疾患モデルにBMP-7 (Bone Morphogenetic Protein-7)を投与すると腎機能が回復することが報告された。これは腎不全からの回復という点で画期的だが、BMP受容体が全身に存在するために副作用が問題となり、実用化には至っていない。

本研究課題では、申請者が最近見出した新規BMPアンタゴニストUSAG-1を標的にした新しい腎不全治療薬の開発を目的とする。

申請者はGeneChipを用いた腎臓特異的遺伝子の探索の仮定で、新規BMPアンタゴニストであるUSAG-1を発見した。さらに平成17年度の本研究でUSAG-1ノックアウトマウス(以後USAG-1 KO)を作成し、USAG-1 KOが急性腎不全モデル、腎線維化モデルに抵抗性であること

を証明した(Yanagita M *et al.* JCI 2006)。さらにUSAG-1 KOにおいてBMPの下流シグナルであるSmad1/5/8のリン酸化が増強していること、BMP-7の中和抗体でUSAG-1 KOにおける腎障害抵抗性が消失することからUSAG-1 KOの腎障害抵抗性はBMP-7シグナルの増強を介したものであることが明らかとなった。さらにUSAG-1が腎臓で最も多く発現しているBMPアンタゴニストであることを証明し、USAG-1が腎臓におけるBMP-7の中心的阻害因子であることを明らかにした(図1)。このことからUSAG-1とBMP-7の結合を阻害するような中和抗体には腎不全治療薬としての可能性がある。さらにUSAG-1の発現が腎臓に局限するため、こういった薬剤はBMP-7自体の投与よりも副作用が少ないことが予想される。腎疾患は進行するまで無症状であることが多く、発見された時点では従来の予防的な腎疾患治療薬では無効なことが多い。USAG-1を標的とした治療戦略は、腎不全を回復させる可能性がある点で、従来の予防的な腎疾患治療薬に比べ高い優位性がある。

図1 USAG-1 KOは腎障害抵抗性である



(短期的目標)

- ① USAG-1 に対する中和抗体を作成し、その腎不全治療薬としての可能性について検証する。
- ② 慢性腎不全モデルにおける USAG-1 の役割を解析する。
- ③ 内因性BMP-7の腎障害における役割の解明

(長期的目標)

USAG-1を標的とした治療戦略は、腎不全を回復させる可能性がある点で、従来の予防的な腎疾患治療薬に比べ高い優位性がある。さらにUSAG-1の発現が腎臓に局限していることから、こういった薬剤はBMP-7自体の投与よりも副作用が少ないことが予想される。

本研究によってUSAG-1を標的とした治療戦略の腎不全治療薬としての可能性が示された場合には、ヒト腎不全における臨床治験を視野に入れたい。

B. 研究方法

当研究課題では『USAG-1が腎におけるBMP-7の調節因子であり、腎疾患の際にはactive BMP-7の量を低下させることによってBMP-7の腎修復機能を阻害する』という仮説を検証するため以下の実験を行った。

- (1) USAG-1 KOを作成し、各種疾患モデルにおける腎障害およびその修復過程がどのように変化するか検証する。
- (2) 臨床医学への展開をより現実的にするために、USAG-1の中和抗体を作成し、その腎疾患治療薬としての可能性を検証する。
- (3) 内因性BMP-7の腎障害における役割の解明
- (4) 倫理面への配慮

マウスを用いる実験は、苦痛負荷は含まず、手術・屠殺は麻酔下に施行した。動物実験計画はすべて京都大学医学部動物実験委員会の承認を得て行った。

C. 研究結果

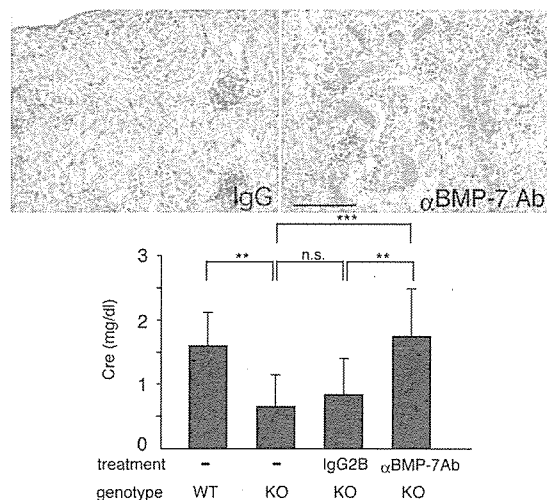
① USAG-1 KOの作成およびその腎障害抵抗性の証明

申請者は腎特異的遺伝子の探索の過程で新規分泌蛋白であるUSAG-1を見だし、USAG-1がBMP拮抗分子として働くことを証明した。さらにUSAG-1の発現が腎臓特異的で腎臓内の局在がBMP-7と完全に一致することから「USAG-1が生体内においてもBMP-7の腎保護修復作用を修飾している」という仮説をたてた。(図1参照)

平成17年度はこの仮説を証明するためにUSAG-1ノックアウトマウス(以後KO)を作成し、抗がん剤シスプラチンによる急性腎不全モデル、一側尿管結紮による腎線維化モデルを惹起した。シスプラチンによる急性腎不全モデルを惹起されたKOは野生型マウスに比して生存率が高く、腎機能障害および組織障害、尿細管細胞のアポトーシスや炎症性サイトカイン産生が軽微であった。また水腎症(腎線維化)モデルを惹起したKOは野生型マウスに比して間質の線維化が軽微であった。以前の報告によると、大量のBMP-7の投与によって炎症性サイトカイン産生や間質の線維化が抑制されることが報告されており、KOのフェノタイプは過剰なBMPシグナルによるものではないかと予想された。そこでBMPの下流のシグナルであるSmad1/5/8のリン酸化を検証したところ、KOでは野生型マウスに比べてBMPシグナルが増強していることが明らかとなった。さらにKOに上記の腎障害モデルを惹起した上でBMP-7の中和抗体を投与するとKOの腎障害抵抗性が

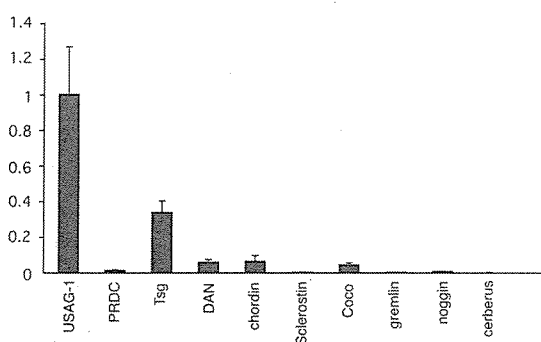
消失すること(図2)から、増強しているBMPシグナルの少なくとも一部分はBMP-7によるものであることを明らかにした。

図2 BMP-7 中和抗体は USAG-1 KO の腎障害抵抗性を消失させる



さらに申請者はUSAG-1が腎臓において最も発現の多いBMPアンタゴニストであることを証明した(図3)。

図3 USAG-1は腎臓で最も発現が多いBMPアンタゴニストである



以上の結果からUSAG-1はBMP-7の腎障害修復機能の中心的阻害因子であることが検証され、USAG-1の中和抗体や発現抑制剤には腎不全治療薬としての可能性があることが明らかとなった。USAG-1の発現は腎臓特異的であることからこのような薬剤はBMP-7よりも副作用が少ないと予想された。

② USAG-1 KOは慢性腎不全モデルに

おいても腎障害抵抗性であった

当結果は未発表であるため詳細に述べることは出来ないが、申請者らはUSAG-1 KOが慢性腎不全モデルにおいても著しく腎障害抵抗性であることを証明した。この結果はUSAG-1 を標的とした治療戦略が慢性腎不全にも有効である可能性を示すものである。

③ USAG-1中和抗体の作成

今年度の途中までは従来の手法でUSAG-1抗体作成を試みてきたが、抗原の大量精製ができないために非常に困難であった。申請者はこれらの問題点を克服すべく、genetic vaccinationの手法を用いて、抗体作成に着手しており順調に進捗している。この手法は免疫原性を高めるためにT細胞エピトープをつないだUSAG-1発現ベクターをUSAG-1 KOの皮下に打ち込み、そこで蛋白合成させるもので、抗原蛋白の大量精製が不要である。既に発現ベクターは作成済みであり、高発現を確認し、打ち込みまで終了している。打ち込み2ヶ月後には抗血清を回収、抗体の力価を検定する。この段階で抗血清からポリクローナル抗体を入手できる。有望な場合には、さらにハイブリドーマ作成を行ない、モノクローナル抗体のスクリーニングを開始する。ここまでの所用期間は合わせて約4ヶ月と推定される。このスクリーニング手法にも工夫をこらし、従来のようにリコンビナント蛋白を用いるのではなく、USAG-1発現細胞を用いた細胞ELISAおよびフローサイトメトリーを用いることで、高次構造を認識する抗体(中和抗体やELISAに使用可能な抗体)が選択的に入手できると期待される。産生された抗体の中で中和活性のあるものを選別する目的では、鋭敏なルシフェラーゼアッセイのスクリーニング系を既に確立しており、準備は整っている。中和抗体が存在すれば、それを各

種腎障害モデルマウスに投与することによって腎不全治療薬としての可能性を検証する。

④ 内因性BMP-7の腎障害における役割の解明

USAG-1を標的とした治療戦略は内因性のBMP-7活性の増加を目標とするものである。一方、薬理量の外因性BMP-7に腎障害修復作用があることは報告されてきたが、内因性のBMPが腎障害に際してどのような働きをするのかについては不明である。未発表データのため詳述出来ないが、申請者は任意の時点におけるBMP-7の機能解析を可能にした。この手法を用いることで、USAG-1を標的とした治療戦略の裏づけを得るとともに、それらの薬剤の至適投与時期についての情報を得ることが可能になった。

D. 結論、考察

申請者はUSAG-1 KOを用いた解析から、USAG-1がBMP-7の腎修復機構を抑制する中心的な因子であることを証明した。この結果から、USAG-1とBMP-7の結合阻害剤には腎疾患治療薬としての可能性が高いと推測される。BMP-7と異なり、USAG-1の発現は腎特異的であることから、このような薬剤は副作用の可能性も少なく、作用が腎臓に限定すると予測される。

E. 健康危険情報

該当事項なし。

F. 研究発表

1. 論文発表

1 Motoko Yanagita, Shuichiro Endo, Katsu Takahashi, Tomohiko Okuda, Fumihiko Sugiyama, Satoshi Kunita, Satoru Takahashi, Atsushi Fukatsu, Toru Kita, Takeshi Sakurai

USAG-1, a novel BMP antagonist abundantly expressed in the kidney, accelerates kidney injuries.

J Clin Invest. 116: 70-9, 2006.

2 Mari Tanaka, Shuichiro Endo, Tomohiko Okuda, Aris N. Economides, David M. Valenzuela, Andrew J. Murphy, Elizabeth Robertson, Takeshi Sakurai, Atsushi Fukatsu, George D. Yancopoulos, Toru Kita, Motoko Yanagita
Balance between BMP-7 and Uterine sensitization-associated gene-1 (USAG-1), a novel BMP antagonist in kidney disease and development
in submission.

3 Akiko Murashima-Suginami, Katsu Takahashi, Tomohiro Kawabata, Tomoko Sakata, Hiroko Tsukamoto, Manabu Sugai, Motoko Yanagita, Harold C. Slavkin, and Kazuhisa Bessho
Rudiment incisors survive and erupt as supernumerary teeth as a result of USAG-1 abrogation
Dev. Biol in revision

4 Motoko Yanagita
Modulator of bone morphogenetic protein activity in the progression of kidney diseases.
Kidney Int. 70:989-93, 2006

5 Motoko Yanagita
Uterine Sensitization Associated Gene-1 (USAG-1): A Bone Morphogenetic Protein Antagonist in the Kidney. (book chapter)
“**TRANSFORMING GROWTH FACTOR- β IN CANCER THERAPY**”,
edited by Sonia B. Jakowlew, PhD, Humana Press, in press

6 Motoko Yanagita
BMP antagonists: their roles in development and involvement in

pathophysiology
Cytokine & Growth Factor Reviews
16:309-17, 2005.

7 Motoko Yanagita.

The role of the vitamin K-dependent growth factor Gas6 in glomerular pathophysiology.
Curr Opin Nephrol Hypertens.13: 465-70, 2004.

8 Motoko Yanagita, Masako Oka, Tetsuro Watabe, Haruhisa Iguchi, Atsushi Niida, Satoru Takahashi, Tetsu Akiyama, Kohei Miyazono, Masashi Yanagisawa, Takeshi Sakurai.
USAG-1: a bone morphogenetic protein antagonist abundantly expressed in the kidney.
Biochem Biophys Res Commun. 316: 490-500, 2004.

2. 招待講演／invited seminars

1 Motoko Yanagita

Balance between BMP and BMP antagonists in the kidney diseases
Salk Institute, Juan Carlos Bellmonte Labの招聘講演、2006年11月17日 La Jolla, USA.

2 Motoko Yanagita

Therapeutic targets of kidney diseases. Lessons from Gas6 and USAG-1.
Harvard Medical School, Renal divisionの招聘講演、2005年11月14日 Boston, USA

3 Motoko Yanagita

Therapeutic targets of kidney diseases. Lessons from Gas6 and USAG-1.
Columbia University, Department of Medicineの招聘講演、2005年1月15日 NY, USA

4 Motoko Yanagita

Therapeutic targets of kidney diseases.

Lessons from Gas6 and USAG-1.
Genzyme corporationの招聘講演、 Framingham, USA. 2006年2月27日

5 Motoko Yanagita.

Therapeutic targets of kidney diseases. Lessons from Gas6 and USAG-1.
Regeneron pharmaceuticalsの招聘講演、 2005年11月10日 NY, USA

6 Motoko Yanagita

Workshop on immunology, cancer and aging主催 2006年2月4日

7 柳田素子、日本腎臓学会 ワークショップ招聘講演 2007年5月25日(予定)

8 柳田素子、第12回阿蘇腎フォーラム 招聘講演 2007年5月12日(予定)

9 柳田素子、宮崎大学医学研究科 招聘講演 2007年6月29日(予定)

10 柳田素子、ROD研究会 招聘講演 2007年8月15日(予定)

11 柳田素子、第11回腎間質障害研究会 招聘講演 2007年9月15日(予定)

12 柳田素子、第18回日本腎性骨症研究会 招待講演 2007年2月24日

13 柳田素子、腎再生修復を目指して—BMPとそのantagonistの織りなす調節機構
埼玉腎臓研究会 招待講演 2006年11月25日

14 柳田素子、Balance between BMPs and their antagonists in kidney injury
東京大学腎臓内分泌内科 招待講演 2006年7月11日

15 柳田素子 新規BMP拮抗分子USAG-1

はBMP-7による腎修復機能を抑制し腎障害を促進する BMP研究会 招待講演 2006年7月9日

16 柳田素子 新規BMP拮抗分子USAG-1はBMP-7による腎修復機能を抑制し腎障害を促進する 熊本大学生命資源研究支援センター 招待講演 2006年2月23日

17 柳田素子 腎疾患進展増悪における新

規BMP拮抗分子USAG-1の機能解析 徳島大学大学院 招聘講演 2005年4月14日

18 柳田素子、日本腎臓学会 腎臓学会財団賞(大島賞)受賞講演 2004年5月24日

G. 知的財産権の出願、登録状況
なし

Ⅲ. 平成18年度分担研究報告書

平成18年度 厚生労働科学研究研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

新規腎臓特異的BMPアンタゴニストUSAG-1の発現解析

分担研究者 北 徹 京都大学副学長・理事
京都大学大学院医学研究科循環器内科 教授

研究要旨

近年腎疾患モデルにBMP-7を投与すると障害尿細管が修復されることが報告されたが、その受容体が全身に存在することから副作用が懸念される。

総括研究者は新規腎臓特異的BMPアンタゴニストUSAG-1を同定し、USAG-1 KOマウスが腎障害抵抗性であることを報告した。USAG-1はBMP-7の腎障害修復機能を抑制していると考えられることから、**USAG-1の発現抑制剤**には腎疾患治療薬としての可能性がある。さらにUSAG-1の発現が腎臓に限局するためBMP-7自体の投与に比べて副作用の可能性も低い。以上のことから**USAG-1の発現制御機構の解明は重要な課題である。**

我々はUSAG-1/LacZノックインマウスを作成し、腎障害、腎発生、細胞の分化・脱分化におけるUSAG-1の発現変化を解析し、その制御機構を検証した。その結果、USAG-1が腎臓で**最も多いBMPアンタゴニスト**であること、その発現が遠位尿細管特異的であり、尿細管障害で発現低下し、再生時に発現増加すること、腎の発生段階では尿細管の分化に伴い発現が増加することが明らかとなった。さらに初代培養尿細管細胞を脱分化させるとUSAG-1の発現は低下し、分化させると発現増加した。以上のことからUSAG-1の発現は尿細管の**分化度と密接な関連**があると考えられる。さらに前述の初代培養尿細管細胞を用いた系でUSAG-1の**発現誘導因子および発現抑制因子をいくつか同定**しており、USAG-1の発現抑制剤開発に結びつく知見と考えられる。

尿細管とは部位(セグメント)毎に異なる機能を持つ極めて分化した細胞集団であるが、一見均一な間様系細胞がどのようにセグメント特異的な尿細管に分化するかは未だ明らかになっていない。我々は発生段階におけるUSAG-1の発現解析を通して、尿細管**セグメント特異的分化のメカニズム解明**への手がかりを得た。

A. 研究目的

当研究課題では、主任研究者が最近見出した腎臓特異的 BMP 拮抗分子 USAG-1 の生体内の役割を明らかにし、その知見を元に新しいタイプの腎疾患治療薬開発の可能性を探ることを目的とする。

前述のように BMP-7 は腎不全回復剤として唯一の候補であるが、作用が腎臓に限局せず広範な副作用が問題である。一方、総括研究者が見いだした新規 BMP 拮抗分子 USAG-1 は BMP-7 に対する抑制活性が強く、その発現が腎臓に限局している。

総括研究者は USAG-1 ノックアウトマウス(以後 KO)を作成し、KO が野生型に比して腎疾患抵抗性が強いこと、この腎疾患抵抗性は BMP-7 の作用増強を介したものであることを明らかにし、USAG-1 が生体内において BMP-7 の腎修復機能の阻害因子として働くことを証明した。

この結果から USAG-1 の発現抑制物質には腎疾患治療薬としての可能性があることが明らかとなった。(総括研究報告書の添付図1参照)。こういった薬剤は従来の予防的薬剤とは異なり、腎不全を元の状態に戻すことができる可能性が高く、透析導入患者数を大幅に減少させ、腎不全患者のQOLを著しく改善させると考えられる。さらに USAG-1 の発現が腎臓に限局することから BMP-7 自体の投与よりも副作用が少ないことが予想される。

当研究課題では、USAG-1 の発現制御機構についても明らかにすると同時に USAG-1 の発現制御因子を同定したい。

B. 研究方法

我々は USAG-1/LacZ ノックインマウスを作成し、腎障害、腎発生、細胞の分化・脱分化における USAG-1 の発現変化を解析し、その制御機構を検証した。

- (1) 腎臓における BMP 拮抗分子の発現量およびその局在の比較
- (2) 各種腎疾患モデルにおける USAG-1 の発現制御機構の解析
- (3) 発生段階における USAG-1 発現解析
- (4) 初代培養尿細管細胞を用いた USAG-1 の発現制御因子の同定

(倫理面への配慮)

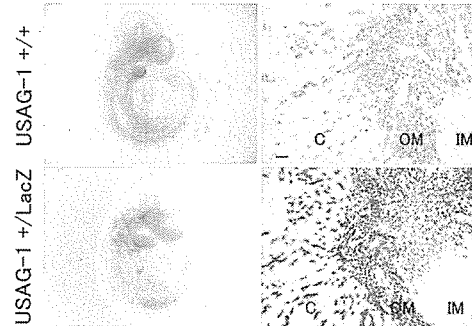
マウスを用いる実験は、苦痛負荷は含まず、手術・屠殺は麻酔下に施行した。動物実験計画はすべて京都大学医学

部動物実験委員会の承認を得て行った。

C. 結果および考察

我々は USAG-1/LacZ ノックインマウスを作成し、その LacZ 発現が内因性 USAG-1 の発現を反映していることを確認した(図4)。

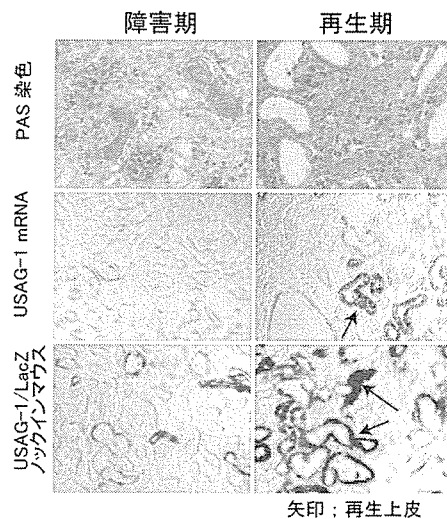
図4 USAG-1/LacZ ノックインマウスの LacZ は USAG-1 発現を反映する



(1) USAG-1 は腎臓における発現が最も多い BMP アンタゴニストであり(総括研究報告図3)、その局在が BMP-7 と一致するのは、USAG-1 と Twisted gastrulation のみであった。

(2) USAG-1 の発現は尿細管障害モデルで低下し、再生上皮では健常な遠位尿細管よりも強く発現した(図5)。

図5 USAG-1 は再生上皮のマーカである



(3)腎の発生段階では尿細管の分化に伴い発現が増加し、分化した尿細管のみでBMP-7とオーバーラップした。

(4) 初代培養尿細管細胞を脱分化させるとUSAG-1の発現は低下し、分化させると発現増加した。

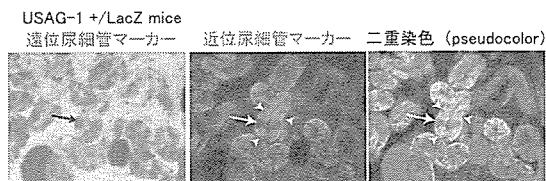
以上のことからUSAG-1の発現は尿細管の分化度と密接な関連があると考えられる。さらに我々は初代培養尿細管細胞を用いた系でUSAG-1の発現誘導因子、発現抑制因子をいくつか同定しており、USAG-1の発現抑制剤開発に結びつく知見と考えられる。

さらに我々は発生段階におけるUSAG-1/LacZノックインマウスの解析の過程で興味深い現象を観察したので報告する。

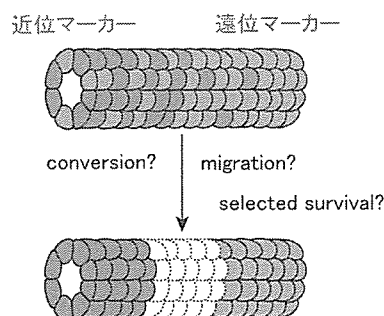
USAG-1の発現は成体腎では遠位尿細管特異的だが、新生仔期においては濃いLacZ陽性細胞と薄いLacZ陽性細胞があり(図6 矢印)、濃いLacZ陽性細胞は遠位尿細管だが、薄いLacZ陽性細胞は近位尿細管マーカー陽性細胞とひとつの尿細管に隣り合ってパッチワーク状に存在していた(図6矢印と矢頭)。同様の結果は他の遠位尿細管マーカーを用いた解析でも観察された。

近位・遠位の分化メカニズムとして液性因子の濃度勾配によって分化するというgradient説と細胞毎にその運命が決まっているとするcell fate説があるが、我々の所見はcell fate説を支持するものである。我々はこのセグメント特異的分化のメカニズムが腎障害からの再生時にも応用できるのではないかと考え、解析を続けている。

図6 近位、遠位分化におけるパッチワーク現象



パッチワークからの分化メカニズム



D. 研究発表

1 Motoko Yanagita, Shuichiro Endo, Katsu Takahashi, Tomohiko Okuda, Fumihiro Sugiyama, Satoshi Kunita, Satoru Takahashi, Atsushi Fukatsu, Toru Kita, Takeshi Sakurai
USAG-1, a novel BMP antagonist abundantly expressed in the kidney, accelerates kidney injuries.
J Clin Invest. 116: 70-9, 2006.

2 Mari Tanaka, Shuichiro Endo, Tomohiko Okuda, Aris N. Economides, David M. Valenzuela, Andrew J. Murphy, Elizabeth Robertson, Takeshi Sakurai, Atsushi Fukatsu, George D. Yancopoulos, Toru Kita, Motoko Yanagita
Balance between BMP-7 and Uterine sensitization-associated gene-1 (USAG-1), a novel BMP antagonist in kidney disease and development
in submission.

IV. 研究成果の刊行に関する一覧表

1 論文発表

1 Motoko Yanagita, Shuichiro Endo, Katsu Takahashi, Tomohiko Okuda, Fumihiko Sugiyama, Satoshi Kunita, Satoru Takahashi, Atsushi Fukatsu, Toru Kita, Takeshi Sakurai

USAG-1, a novel BMP antagonist abundantly expressed in the kidney, accelerates kidney injuries.

J Clin Invest. 116: 70-9, 2006.

2 Mari Tanaka, Shuichiro Endo, Tomohiko Okuda, Aris N. Economides, David M. Valenzuela, Andrew J. Murphy, Elizabeth Robertson, Takeshi Sakurai, Atsushi Fukatsu, George D. Yancopoulos, Toru Kita, Motoko Yanagita

Balance between BMP-7 and Uterine sensitization-associated gene-1 (USAG-1), a novel BMP antagonist in kidney disease and development
in submission

3 Akiko Murashima-Suginami, Katsu Takahashi, Tomohiro Kawabata, Tomoko Sakata, Hiroko Tsukamoto, Manabu Sugai, Motoko Yanagita, Harold C. Slavkin, and Kazuhisa Bessho

Rudiment incisors survive and erupt as supernumerary teeth as a result of USAG-1 abrogation

Dev. Biol in revision

4 Motoko Yanagita

Modulator of bone morphogenetic protein activity in the progression of kidney diseases.

Kidney Int. 70:989-93, 2006

5 Motoko Yanagita

Uterine Sensitization Associated Gene-1 (USAG-1): A Bone Morphogenetic Protein Antagonist in the Kidney. (book chapter)

“**TRANSFORMING GROWTH FACTOR- β IN CANCER THERAPY**”,

edited by Sonia B. Jakowlew, PhD, Humana Press, in press

6 Motoko Yanagita

BMP antagonists: their roles in development and involvement in pathophysiology

Cytokine & Growth Factor Reviews 16:309-17, 2005.

7 Motoko Yanagita.

The role of the vitamin K-dependent growth factor Gas6 in glomerular pathophysiology.

Curr Opin Nephrol Hypertens.13: 465-70, 2004.

8 Motoko Yanagita, Masako Oka, Tetsuro Watabe, Haruhisa Iguchi, Atsushi Niida, Satoru Takahashi, Tetsu Akiyama, Kohei Miyazono, Masashi Yanagisawa, Takeshi Sakurai.

USAG-1: a bone morphogenetic protein antagonist abundantly expressed in the kidney.

Biochem Biophys Res Commun. 316: 490-500, 2004.

V. 研究成果の刊行物・別刷



USAG-1: a bone morphogenetic protein antagonist abundantly expressed in the kidney

Motoko Yanagita,^{a,*} Masako Oka,^b Tetsuro Watabe,^b Haruhisa Iguchi,^a Atsushi Niida,^c Satoru Takahashi,^d Tetsu Akiyama,^c Kohei Miyazono,^{b,e} Masashi Yanagisawa,^{a,f} and Takeshi Sakurai^{a,g}

^a Yanagisawa Orphan Receptor Project, Exploratory Research for Advanced Technology (ERATO), Japan Science and Technology Agency, Tokyo 135-0064, Japan

^b Department of Molecular Pathology, Graduate School of Medicine, Institute for Molecular and Cellular Biosciences, University of Tokyo, Tokyo 113-0033, Japan

^c Laboratory of Molecular and Genetic Information, Institute for Molecular and Cellular Biosciences, University of Tokyo, Tokyo 113-0033, Japan

^d Laboratory Animal Resource Center, Institute of Basic Medical Sciences, University of Tsukuba, Ibaraki 305-8575, Japan

^e Department of Biochemistry, The Cancer Institute of the Japanese Foundation for Cancer Research, Tokyo 170-8455, Japan

^f Howard Hughes Medical Institute and Department of Molecular Genetics, University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, TX 75390-9050, USA

^g Department of Pharmacology, Institute of Basic Medical Sciences, University of Tsukuba, Ibaraki 305-8575, Japan

Received 7 February 2004

Abstract

Bone morphogenetic proteins (BMPs) play critical roles in cellular proliferation, differentiation, and programmed cell death in multiple tissues. An increasing body of recent evidence has suggested that classes of molecules collectively termed BMP antagonists play important roles for the local regulation of BMP actions by binding BMPs and neutralizing their activities. Uterine sensitization-associated gene-1 (USAG-1) was previously reported as a gene of unknown function, preferentially expressed in sensitized endometrium of the rat uterus. Here, we show that USAG-1 is abundantly expressed in the kidney and functions as a BMP antagonist. Recombinant USAG-1 binds directly to BMPs and antagonizes the BMP-mediated induction of alkaline phosphatase in C2C12 cells. USAG-1 also induces formation of secondary axis and/or hyperdorsalization when its mRNA is injected to *Xenopus* embryos. In the early stage of mouse embryogenesis, USAG-1 is expressed in the first and second branchial arches and in metanephros, while in later stages the expression is confined to renal tubules and ameloblasts of teeth. Postnatally, the expression is further restricted to distal tubules of kidney, in a pattern similar to the localization of BMP-7, which has been shown to be important in the development of kidney and preservation of adult renal functions under pathological stresses. Collectively, we suggest that USAG-1 is a BMP antagonist that interacts with BMP-7 in the developing and adult kidney.

© 2004 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Sclerostin; Ectodin; Wise; *Xenopus*; Mouse

Bone morphogenetic proteins (BMPs) are phylogenetically conserved signaling molecules that belong to the transforming growth factor (TGF)- β superfamily [1]. Although these proteins were first identified by their capacity to promote endochondral bone formation, they are now shown to be responsible for many signaling processes in proliferation, differentiation, and programmed cell death

[2]. Furthermore, recent studies show that BMPs play important roles in neuronal differentiation, ventral mesoderm formation in *Xenopus* embryos, and pathophysiology of primary pulmonary hypertension in human [3–5].

The local concentration of active BMP is controlled not only by the precise regulation of its spatial and temporal expression [6], but also by certain classes of molecules that have been recently recognized as BMP antagonists [1]. These BMP antagonists function through direct association with BMPs, thus prohibiting

* Corresponding author. Fax: +81-3-3570-9187.

E-mail address: motoy@orphan.miraikan.jst.go.jp (M. Yanagita).