

200731042A

厚生労働科学研究費補助金

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19年度 総括／分担研究報告書

主任研究者 柳 田 素 子

平成20 (2008) 年 3 月

目 次

I. 構成員名簿	1
II. 平成19年度総括研究報告書	5
京都大学大学院医学研究科キャリアパス形成ユニット 講師	柳田 素子
III. 平成19年度分担研究報告	17
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	25

(研究成果の刊行物・別刷は総合研究報告書をご参照ください)

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 キャリアパス形成ユニット	講師
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
研究協力者	桜井武	金沢大学大学院医学研究科分子神 経科学・統合生理学	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19年度総括研究報告書

平成19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)
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キャリアパス形成ユニット

研究要旨

本申請課題では私たちの体に内在する腎再生メカニズムを明らかにし、それを元にした腎不全治療薬の可能性を探ることを目的とする。近年、薬理量のBMP-7投与によって腎機能が回復することが報告されたが広範な副作用が問題である。申請者は新規分子USAG-1を発見し、USAG-1がBMPアンタゴニストであること、その発現部位が腎臓特異的であり、BMP-7と一部局在が一致することを明らかにした(平成17年度)。さらにUSAG-1ノックアウトマウスを作成し、USAG-1ノックアウトマウスが尿細管障害に抵抗性であること、USAG-1ノックアウトマウスではBMPシグナルが増強していることを明らかにした(平成18年)。さらにはUSAG-1ノックアウトマウスの腎障害抵抗性はBMP-7の中和抗体でキャンセルされたことから、USAG-1がBMP-7の腎修復機能の中心的抑制因子であることを証明した。このことから、USAG-1を標的とした治療戦略には腎不全治療薬としての可能性があるだけでなく、USAG-1の発現が腎臓特異的であるため、副作用が少ないことが予想される。

平成19年度は糸球体疾患由来の慢性腎不全におけるUSAG-1の役割を明らかにすることによって、これらの治療戦略の適応拡大をはかることを試みた(テーマ1)。また、BMP-7コンディショナルノックアウトマウス(BMP-7 CKO)とInducible Creマウスを用いた解析で、腎障害および加齢変化における内因性BMP-7の機能を明らかにし、USAG-1を標的とする治療戦略への裏づけを得ようと試みた(テーマ2)。

1 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。

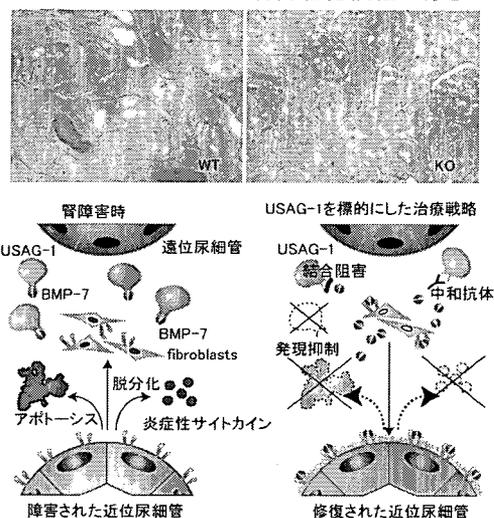
近年、腎疾患モデルにBMP-7 (Bone Morphogenetic Protein-7)を投与すると腎機能が回復することが報告された。これは腎不全からの回復という点で画期的だが、BMP受容体が全身に存在するために副作用が問題となり、実用化には至っていない。

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を標的と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.* J Clin Invest 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の発現が腎臓に限局するため、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



(当初の短期的目標)

当研究課題では、この仮説を検証するために、以下の3点を目標とした。

- (1) USAG-1 遺伝子改変マウスを用いた生体内の機能解析
USAG-1 の腎障害における役割を明らかにすることで前述の仮説を検証し、USAG-1 を標的とした治療戦略の妥当性を検証する。さらに腎臓以外の臓器における USAG-1 遺伝子欠損マウスの表現型を検証することによって USAG-1 を標的とした治療戦略の副作用の可能性を探ることが可能になる。
- (2) USAG-1 の発現制御機構の解明

(分担研究者)

USAG-1 の発現抑制剤には腎障害治療薬としての可能性がある。そのため USAG-1 の発現制御機構の解明は重要である。

(3) USAG-1 中和抗体など USAG-1 を標的とした治療法の可能性を探る

(長期的目標)

当研究課題にて上記の仮説が正しいことが証明された場合には、ヒューマナイズド USAG-1 中和抗体や低分子の USAG-1/BMP-7 結合阻害剤が腎不全治療薬としてきわめて有望となる。またそのような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 の発現が腎臓特異的であるため、USAG-1 を標的とした薬剤は BMP-7 自体の投与よりも副作用が少なく、長期的に投与可能であろうと予想される。

2 研究方法

上記の目標をもとに、以下の研究方法を計画し、実施した。

(1) USAG-1 遺伝子改変マウスを用いた生体内の機能解析

(1-1) USAG-1 遺伝子欠損マウスの解析

既に作成した USAG-1 ヘテロマウス同士を交配し、メンデルの法則から予測される確率で USAG-1 遺伝子欠損マウス(以後 USAG-1 KO)を得た。各種血清生化学項目、各臓器の組織切片、体重増加曲線を観察し、発生異常および成長障害の有無について検証した。腎の発生異常の有無については特に詳細に検討し、血圧測定および、血中 Cre、血中 BUN、尿中 NAG、尿中 beta2MG、尿中アルブミン、尿中電解質排泄などのパラ

メーターを検討した他、腎組織における各種セグメントマーカーの染色を行ない、部位特異的な異常やネフロン数の差がないことを確認した。さらに申請者は BMP が重要な役割を果たす骨についても、形態、本数、骨密度、骨折しやすさなどについて詳細に検討した。この検索の過程で歯の発生異常が明らかになったが、その詳細は後述する。

腎臓に関しては大きな発生異常が見いだされなかったため、その後、急性尿細管障害モデルとしてシスプラチン腎症を、間質線維化モデルとして一側尿管結紮モデルを(平成18年度まで)、糸球体障害モデルとして馬杉腎炎等を惹起した(平成19年度)。

(1-2) USAG-1 過剰発現マウスの作成および解析

当初は USAG-1 が本来発現している遠位尿細管特異的なプロモーターである ksp-cadherin promoter (テキサス大学 Prof. Peter Igarashi から入手) に USAG-1-IRES-GFP をつないだコンストラクトを作成し、数ラインのトランスジェニックマウスを得た。しかしながら生まれてきた数ラインではトランスジェニックの発現は極めて低く、解析に耐えるものではなかった。高発現ラインは発生段階で BMP の作用を抑制し、胎生致死に陥っていた可能性がある。そこで申請者らは USAG-1 の発現を任意のタイミングで誘導できる inducible USAG-1 トランスジェニックマウスを作成した(平成19年度)。この詳細については結果の項で述べる。

(2) USAG-1 中和抗体を作成し、腎不全治療法としての可能性を探る

USAG-1 を標的とした治療戦略には前述のように腎不全治療薬としての可能性がある。申請者は USAG-1 中和抗体の作成を目標とし、以下のアプローチを行

なった。

(2-1) USAG-1 抗原作成

USAG-1 蛋白はシスチンノットスーパーファミリーに属する分泌蛋白であり、極めて複雑な三次構造を有することが分かっている。すなわち計4本のジスルフィド結合が糸の結び目のような(ノット状)構造を有する他に、2カ所の糖化部位で糖化を受けている。

中和抗体を樹立するためには、その三次構造を認識する抗体を得ることが望ましく、そのためには native protein と近い翻訳後修飾が行なわれた抗原が必要である。申請者は、哺乳類細胞とSF9 昆虫細胞を用いた蛋白発現系を用いて USAG-1 蛋白を精製した。しかしこれらの細胞では確保できる量に制限があるため、バクテリアを用いて USAG-1 蛋白を大量に精製し、それを巻き戻したのも抗原として用いた。

(2-2) 抗体作成に用いたアプローチ

申請者は下記のアプローチを行ない、抗体作成を試みた。詳細は結果の項に記載する。

方法	免疫動物	抗原	抗体の種類
1	うさぎ	ペプチド	ポリクローナル
2	マウス	リコンビナント蛋白 (ほ乳類細胞／昆虫細胞)	モノクローナル
3	ラット	巻き戻しバクテリア蛋白	ポリクローナル
4	ニワトリ	ペプチド	ポリクローナル
5	マウス	発現ベクター	現在進行中

6	USAG-1 KO	リコンビナント蛋白 (ほ乳類細胞／昆虫細胞)	現在進行中
---	-----------	---------------------------	-------

(3) 内因性BMPの機能を探る

USAG-1を標的とした治療戦略は内因性のBMP活性を上げることが期待するものだが、内因性BMPの腎障害における役割は明らかではない。その一因としてBMPのノックアウトマウスが発生段階あるいは新生仔期に死亡し、生後の解析が不可能であることがあげられる。

本項目は当初予定していなかったものだが、申請者は成体腎で発現しているBMP-4とBMP-7のコンディショナルノックアウトマウスを入手し、成体でノックアウトすることを試みた。

腎臓特異的Creマウスをこれらのコンディショナルノックアウトマウスと交配すると発生異常を来すことが予想されるため、任意の時点で活性化できるinducible Creマウスが望ましい。さらにBMPは分泌蛋白であるため、腎臓だけではなく、全身性のinducible Creマウスが望ましいと考えた。申請者は全身性のinducible Creマウス(R26CreERT2マウス)を入手し、コンディショナルノックアウトマウスと交配し、内因性の各種BMPを任意の時点で全身性にノックアウトできる系を立ち上げた。

(倫理面への配慮)

本研究ではヒトサンプルを用いた研究は行なっていない。

マウス、ラットなど動物を用いる実験には苦痛負荷は含まず、手術、屠殺などは麻酔下に施行した。これらの動物実験は厚生労働省が定める「実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」に則り、各施設の動物実験委員会に動物実験計画書を提出し、承認を得て

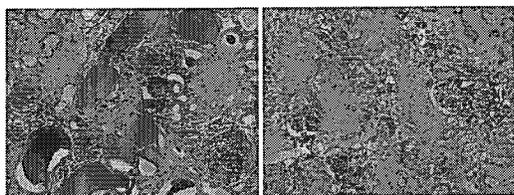
いる。カルタヘナ議定書に基づく国内法を遵守し、動物の飼育、移送に際しては細心の注意を払った。本研究計画は「組換えDNA実験を含む研究計画」であるため、各施設において遺伝子組み換え実験安全対策委員会に研究内容を申請し、「組換えDNA実験申請」の承認を受けた。

3 研究結果

① USAG-1 KOの糸球体障害抵抗性の証明

申請者は上記のように尿細管障害におけるUSAG-1の役割を明らかにしたが、透析導入の原因疾患の大半は糸球体疾患による慢性腎不全である。糸球体疾患においてもUSAG-1 KOが抵抗性であることが明らかになれば、USAG-1を標的とした治療法の適応が拡大され、慢性腎不全に対する有効性が期待される。USAG-1 KOに糸球体腎炎モデルを惹起したところ、糸球体硬化、半月体形成、およびそれに続発する尿細管障害が野生型に比して極めて軽微であった。さらにUSAG-1 KOでは蛋白尿が少なく、腎機能が保たれ、慢性腎不全に陥らないことが明らかになった(図2:投稿準備中)。

図2 USAG-1 欠損マウスは糸球体障害抵抗性である。



この結果はUSAG-1を標的とした治療法が糸球体疾患に対しても有効である可能性を示唆するものである。さらにその過程で、ポドサイト障害においては別の因子が重要な役割を果たすことを発見した。現在同因子のノックアウトマウスを解析中である。

② USAG-1 KOと歯の形成異常

申請者らは USAG-1 KO が切歯および臼歯の過剰歯および融合歯を呈することを見いだした(図3:Yanagita M *et al.* JCI 2006)。マウスなどのげっ歯類では乳歯は存在しないと考えられているが、乳歯にあたる部分が通常萌出せずにそのままアポトシスに陥る(潜在的乳歯)。USAG-1 KO ではこの潜在的乳歯がアポトシスに陥らず過剰歯として萌出する(Murashima-Suginami A, Yanagita M *et al.* BBRC 2007)。

図3 USAG-1 欠損マウスは過剰歯を呈する。



USAG-1 WT

USAG-1 KO

この申請課題の主題である進行性腎障害とは異なるが、USAG-1 を標的とした治療戦略は、歯の本数を増やすような治療法としても有効である可能性がある。自分の歯で咀嚼して食事することは極めて重要であるが、近年では死亡するまで自分の歯で咀嚼できることは稀である。歯が抜けた後にもう一度自分の歯を萌出させるような治療法が期待される。

③ USAG-1 の他臓器における役割(抗USAG-1療法は骨への副作用がない)

USAG-1 を標的とした治療法他臓器への副作用を知ることは重要である。

申請者はUSAG-1 KOの他臓器のフェノタイプを知ることで、抗USAG-1療法で起こりうる副作用を想定することが出来ると考えた。前述のようにUSAG-1 KOは血液検査でも病理組織でも歯以外の臓器では大きな異常を認めなかった。USAG-1がBMPアンタゴニストであることからBMPが重要な役割を果たす骨の異常が起こりうると考え、詳細な解析を行な

った。しかしながら、骨の形態、本数、骨密度、骨形成速度および骨折のしやすさのいずれにおいてもUSAG-1 KOは対照群と比較して異常を認めなかった。これは骨においてはUSAG-1以外に多くのBMPアンタゴニストが発現していることによるのではないかと推察される。以上の結果からUSAG-1を標的とした治療法は骨に対する副作用を持たないと期待された。

④ USAG-1 過剰発現マウスの作成および解析

研究方法の項で述べたように、申請者は当初はUSAG-1が本来発現している遠位尿細管特異的なプロモーターを用いてksp-cadherin promoter-USAG-1-IRES-GFPトランスジェニックマウスを作成したが、高発現ラインを得ることが出来なかった。

そこで、申請者はUSAG-1の発現を任意のタイミングで、かつ任意の組織で発現誘導できるinducible USAG-1トランスジェニックマウスを作成した。

その結果、誘導前はUSAG-1発現がなく、誘導刺激後にUSAG-1の高発現を認めるトランスジェニックマウスを数ライン得ることが出来た。

現在申請者はUSAG-1を①ポドサイト、②近位・遠位尿細管細胞および③全身で発現させ、それぞれのラインにおいて腎機能および組織変化を検証中である。

⑤ USAG-1 中和抗体の作成

申請者は研究計画の項の表(3頁)に示した6つの方法を用いてUSAG-1抗体作成を試みた。

そのうち方法5、6は現在進行中である。さらに抗体の中和活性を検出する目的では、鋭敏なルシフェラーゼアッセイ系を立ち上げた。

方法1-4で複数クローンの抗体が得られたため、この中和活性のスクリーニング系を用いて検証を行なったが、いずれもUSAG-1中和活性は弱かった。

この試行錯誤のなかでいくつかの問題点が明らかになってきたので、下に列挙する。

抗原精製に関する問題点の解決:

上記の表の方法2を試みる過程で、リコンビナントUSAG-1蛋白が細胞表面に付着しやすく培養上清に分泌される量が少量であること、分解されやすい性質であることが明らかとなった。そのためリコンビナントUSAG-1蛋白の大量精製が困難であった。

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現在進行中である(表の方法5)。この手法はUSAG-1発現ベクターをマウス皮下に打ち込み、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。

スクリーニング法の改善:

方法1-4についてはリコンビナント蛋白やペプチドを用いたELISAでスクリーニングを行なったが、これらがnative proteinと同じ高次構造を有しているとは限らない。

現在進行中の方法5、6については、従来のように精製蛋白でスクリーニングを行なうのではなく、USAG-1にtransmembrane domainを付けて細胞表面に発現させたUSAG-1発現細胞を用いた細胞ELISAを用いることで、蛋白の高次構造を認識する抗体(中和抗体に望まれる性質)を選択的に入手することを試みている。

抗原性を上昇させる試み:

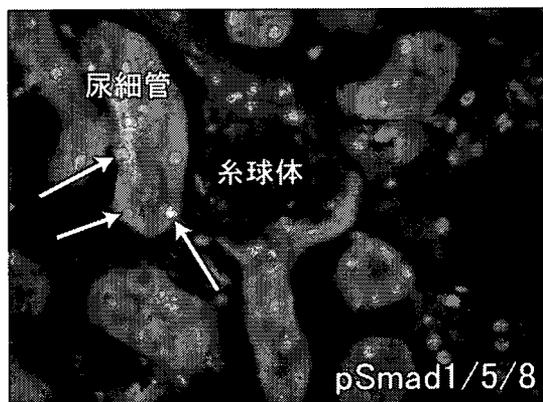
USAG-1蛋白はマウス、ラット、ヒトで98%のアミノ酸が一致しており、種間で高度に保存されている。さらに分泌蛋白は一般的に抗原性が低いことが知られている。申請者はUSAG-1の抗原性をあげる試みとして、種として離れているニワトリへの免疫(方法4)、USAG-1を持たないUSAG-1 KOへの免疫を試みた(方法6)。方法6は現在進行中である。

⑥ 内因性BMPの機能を探る

(1) 腎障害、加齢におけるBMP下流シグナルの変化

申請者はまずBMPの下流シグナルであるSmad1/5/8のリン酸化を検討した。成体の健康な腎臓では尿細管上皮でSmad1/5/8のリン酸化が恒常的に強く認められるが(図4)、シスプラチン腎症や一側尿管結紮モデルなどの尿細管障害モデルを惹起するとそのリン酸化が低下、あるいは消失すること(Yanagita M et al. JCI 2006)、加齢腎でもリン酸化が低下することが明らかとなった。この結果から成体腎においてもBMPシグナルが何らかの役割を担っている可能性が示唆された。

図4 成体マウスの健康な腎尿細管では恒常的にBMPシグナルが活性化されている



(2) コンディショナルノックアウトマウスの解析

申請者はBMP-4, BMP-7コンディショナ

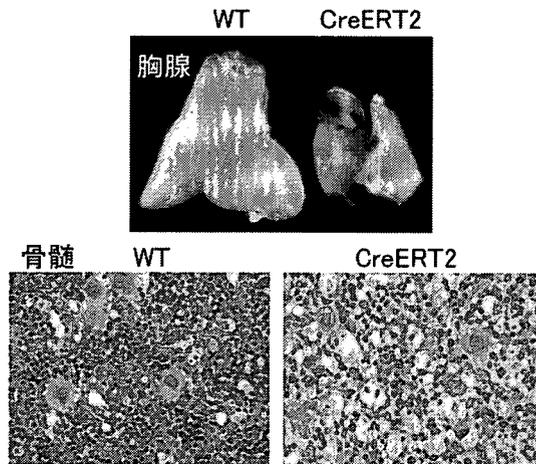
ルノックアウトマウスと全身性のinducible Creマウス(R26CreERT2マウス)を交配し、タモキシフェン投与によってBMP-4およびBMP-7が元の発現量の数%以下にノックダウンされることを確認した。

このマウスに急性腎不全モデル(シスプラチン腎症、虚血再還流モデル)および糸球体腎炎モデルを惹起し、モデル惹起前および惹起後に遺伝子発現をオフにすることで腎障害修復がどのように修飾されるかを検討した。さらにノックダウンした後に長期観察することで老化に伴う腎機能低下におけるBMPの役割について検討した。しかしながら、申請者はこの解析の過程で知られていなかったCreERT2のtoxicityを見いだした。このtoxicityはフェノタイプ解析上障害になりうると考えたため、その対策を講じた(後述)。

(3) CreERT2のtoxicity

一般にCre関連蛋白は生体に対して無害であると信じられているが、R26CreERT2マウスにタモキシフェン投与してCreERT2を活性化すると、汎血球減少や胸腺、脾臓などの造血系組織の萎縮および骨髄の低形成を来することが明らかとなった(図5)。さらにこれらの血球細胞ではタモキシフェン依存的に染色体異常が惹起されていることが明らかとなった。

図5 R26CreERT2 マウスは造血障害を起こす



近年、マウスおよびヒトゲノムにおいては、loxP配列に類似したpseudo-loxP siteがあることが報告された。このCreERT2のtoxicityは、大量のCreERT2がタモキシフェン投与時に急激に活性化されることによってpseudo-loxP siteでゲノムの断裂や組み替えが起きることが原因ではないかと推察される。

通常、コンディショナルノックアウトマウスのフェノタイプ解析の際にはCreの有無で比較することが多い。そのため、このCreERT2のtoxicityはフェノタイプ解析上の障害になるだけでなく、フェノタイプそのものと誤認される可能性が高い。申請者はこの知見を論文にまとめ、現在投稿中である(Yoshioka A, Yanagita M et al. in revision)。

(4) コンディショナルノックアウトマウスの解析を進めるためにとった対策
腎障害の過程には腎組織中に浸潤する

4 結論、考察

申請者はUSAG-1 KOを用いた解析から、USAG-1が急性、慢性腎不全において、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。

申請者はR26CreERT2マウスにタモキシフェンを投与した際の汎血球減少が腎障害の経過に大きく影響すると考えた。そこでコンディショナルノックアウトマウスの解析を正しく進めるために、申請者は以下の2つの方法を用いて解析を進めた。

① Creコントロールを取り、汎血球減少の回復を待つ解析する。

例えばBMP-7コンディショナルノックアウト:CreERT2マウスとBMP-7野生型マウス:CreERT2マウスを比較する。さらに申請者はタモキシフェン投与1ヶ月後には汎血球減少が回復することを見いだしたので、その時点での腎障害モデルの惹起を試みている。

② 腎臓特異的CreERT2マウスを作成し、これをBMPコンディショナルノックアウトマウスと交配する。

汎血球減少を回避するためには、腎臓特異的Creが望ましいが、通常の腎臓特異的Creとコンディショナルノックアウトマウスを交配すると腎発生異常が起こるため、成体での機能解析には不向きである。

申請者は尿細管特異的CreERT2マウスを作成し、現在その組み替え効率を検討中である。

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。

5 健康危険情報

該当事項なし。

6 研究発表

(1) 口頭発表

- 1 柳田素子 2008年2月2日 第2回CKDフォーラム
- 2 柳田素子 2008年1月15日 金沢大学大学院医学研究科セミナー
- 3 柳田素子 2007年12月1日 腎不全病態治療研究会 招聘講演
- 4 柳田素子 2007年11月17日 CKD award 2007
- 5 柳田素子 2007年9月15日 第11回腎間質障害研究会 招聘講演
- 6 柳田素子 2007年8月25日 第16回ROD-21研究会 招聘講演
- 7 柳田素子 2007年6月29日 宮崎大学医学研究科 COE workshop招聘講演
- 8 柳田素子 2007年6月5日 第9回Rokko Nephrology Research Forum 招聘講演
- 9 柳田素子 2007年6月5日 COE final symposium
- 10 柳田素子 2007年5月28日 筑波大学基礎医学系大学院セミナー
- 11 柳田素子 2007年5月25日 日本腎臓学会 ワークショップ講演
「BMPとその新規調節因子USAG-1が織りなす腎障害発症進展メカニズム」
- 12 柳田素子ほか 2007年5月26日 日本腎臓学会 一般演題
「尿細管セグメント特異的な分化メカニズムの検討」
- 13 柳田素子 2007年5月12日 第12回阿蘇腎フォーラム 招聘講演

レビュー誌への発表の主なもの (和文)

- 1 柳田素子 内科学会雑誌 第96巻 第10号印刷 2007年10月10日
医学と医療の最前線
腎障害とBMP (Bone Morphogenetic Protein)

2 柳田素子 Annual Review腎臓2006
BMP-7と腎臓特異的BMP拮抗分子
USAG-1

3 柳田素子 医学のあゆみ
新規BMP antagonistである
USAG-1(Uterine sensitization-associated gene-1)は腎不全治療薬のターゲットである

4 柳田素子 医学のあゆみ
腎病変の発症進展に果たすGas6の役割

5 柳田素子 「腎と透析」これだけは知っておきたい分子腎臓学2007
BMP, Gas6の2項

(2) 海外

論文発表およびtextbook

1 Murashima-Suginami A, Takahashi K, Sakata T, Tsukamoto H, Sugai M, Yanagita M, Shimizu A, Sakurai T, Slavkin HC, Bessho K.

Enhanced BMP signaling results in supernumerary tooth formation in USAG-1 deficient mouse. Biochem Biophys Res Commun. 2008 May 16;369(4):1012-6.

2 Atsuko Yoshioka, Tomokatsu Ikawa, Masamichi Muramatsu, Aris N Economides, Akira Niwa, Tomohiko Okuda, Andrew J Murphy, Toshio Heike, Tatsutoshi Nakahata, Hiroshi Kawamoto, Toru Kita, and Motoko Yanagita
Hematological toxicity and illegitimate chromosomal recombination caused by the systemic activation of CreER^{T2} (in revision)

3 Yanagita M.
Balance between bone morphogenetic proteins and their antagonists in kidney injury.

Ther Apher Dial. 2007 Oct;11 Suppl 1:S38-43.

4 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
Kidney Int. in press.

5 Motoko Yanagita
BMP antagonists and kidney. (book chapter)
“Bone Morphogenetic Protein: From Local to Systemic Therapeutics”, edited by Vukicevic Slobodan, PhD, and Kuber Sampath, PhD. Birkhauser, Springer Verlag, in press.

6 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

7 Murashima-Suginami A, Takahashi K, Kawabata T, Sakata T, Tsukamoto H,

Sugai M, Yanagita M, Shimizu A, Sakurai T, Slavkin HC, Bessho K.

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

Biochem Biophys Res Commun. 2007 Aug 3;359(3):549-55.

8 Sawabu T, Seno H, Kawashima T, Fukuda A, Uenoyama Y, Kawada M, Kanda N, Sekikawa A, Fukui H, Yanagita M, Yoshibayashi H, Satoh S, Sakai Y, Nakano T, Chiba T.

Growth arrest-specific gene 6 and Axl signaling enhances gastric cancer cell survival via Akt pathway.

Mol Carcinog. 46:155-64, 2007

学会発表やinvited seminarなど
1 Motoko Yanagita 2007年11月3日
Balance between BMP-7 and USAG-1, a novel BMP antagonist abundantly expressed in the kidney, during kidney disease and development
American Society of Nephrology Meeting. San Francisco, USA

2 Motoko Yanagita ほか 2007年11月4日
Genetic dissection of the role of Grem1 in nephrogenesis
American Society of Nephrology Meeting. San Francisco, USA

III. 平成19年度分担研究報告書

平成19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。さらに申請者はUSAG-1が腎再生上皮マーカーとして有望であることを見いだしている(平成18年)。平成19年度はこれを発展させて、USAG-1発現の腎再生力(腎予後)診断マーカーとしての可能性を証明した(テーマ3)。当該患者の腎予後を知ることは臨床上極めて意義が深い。

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。

1 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。

2 研究方法

① USAG-1/LacZ ノックインマウスの作成および各種腎障害モデルにおける発現検討

申請者は当初 *in situ* hybridization を用いて USAG-1 の発現解析を行なってい

たが、繁雑である上に組織切片のダメージのために詳細な解析が困難であることから、USAG-1 の遺伝子座に LacZ 遺伝子をノックインした USAG-1/LacZ ノックインマウスを作成した。さらに同マウスにおける LacZ の発現部位が USAG-1 mRNA と完全に一致することを確認し、今後同マウスの LacZ 発現を USAG-1 発現として扱うこととした。

申請者は同マウスを用いて発生段階における USAG-1 の発現を解析するとともに、各種腎障害モデルを惹起し、その発現変化を詳細に解析した。腎障害モデルとしては、前述のシスプラチン腎症、一側尿管結紮モデル、馬杉腎炎モデルに加えて、尿細管再生モデルとして葉酸腎症モデル、虚血再還流モデルを採用した。

② 腎 USAG-1 発現と予後に関する解析
本項目は当初予定していなかった内容であるが、前述の USAG-1/LacZ ノックインマウスに葉酸腎症モデルを惹起した際に、葉酸腎症が重度である個体では USAG-1 強発現尿細管が多いことに気づき、腎 USAG-1 発現と将来の腎予後の相関を検討した。

野生型 C57BL/6 マウス(8週齢の雄を使用)に葉酸腎症を惹起し、day7(尿細管再生の極期)に麻酔下で開腹し、左腎下極から一部腎生検を行ない、止血後、腹壁、皮膚の順に縫合した。同時に採血を行ない、腎症が起きていないマウスはこの時点で解析から除外した。その後マウスを day14(再生終了期)に sacrifice し、血清中 Cre および BUN を測定した。day7 に採取した腎生検サンプルの USAG-1 発現量をリアルタイム PCR で定量し、day14 の Cre および BUN 値との相関の有無を検討した。

③ 初代尿細管培養細胞を用いた

USAG-1 発現に関する検討

申請者は新生仔の腎臓から初代尿細管培養細胞を樹立する方法を確立し、その細胞を用いて尿細管細胞を分化、脱分化させた際の USAG-1 の発現変化を検討した。申請者は USAG-1/LacZ ノックインマウスからも同様の手法を用いて初代尿細管培養細胞を樹立し、その LacZ 活性をプレートリーダーで定量する方法を確立し、その細胞における lacZ 活性が USAG-1 発現量を反映することを確認した。この細胞は USAG-1 発現制御剤のスクリーニングに有用である。

④ 腎細胞癌モデルと USAG-1 発現に関する検討

本項目は当初予定していなかった内容であるが、申請者は③の実験で USAG-1 発現が細胞の分化度と相関し、分化度が高い細胞で発現が高いことを見いだした(結果の項参照)。そこで本学の病態生物学講座で開発された鉄ニトリロ三酢酸によるラット腎発がんモデル(豊國伸哉准教授からサンプルのご提供をいただいた)を用いて鉄ニトリロ三酢酸投与後2週間、1ヶ月、3ヶ月における USAG-1 発現変化および局在をリアルタイム PCR と *in situ* hybridization を用いて検討した。

(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。

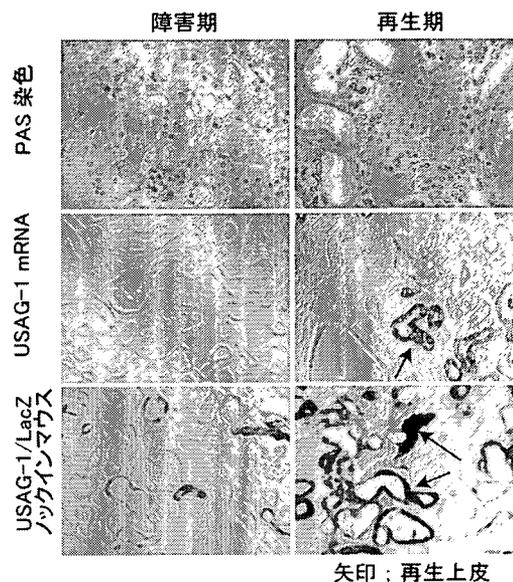
3 研究結果 USAG-1の発現制御機構の解明

① USAG-1/LacZ マウスを用いた検討
研究方法の項で述べたように、申請者は USAG-1/LacZ ノックインマウスを作成し、LacZ の発現部位が USAG-1 mRNA と完

全に一致することを確認した。

このマウスを用いた解析で、障害尿細管では USAG-1 発現が低下し、再生尿細管では USAG-1 が健康な尿細管よりも強く発現することが明らかになった(図6, Tanaka M, Yanagita M et al. *Kidney Int* in press)。さらに USAG-1 強陽性の再生尿細管が多い個体ほど予後が悪い印象があり、③の解析につながった。

図6 USAG-1 は再生上皮のマーカである



② 発生段階における USAG-1 → 近位・遠位分化メカニズムへの手がかり
申請者は、野生型マウス胎児を用いた解析で USAG-1 が発生段階を通じて最も発現の強い BMP アンタゴニストを明らかにした。

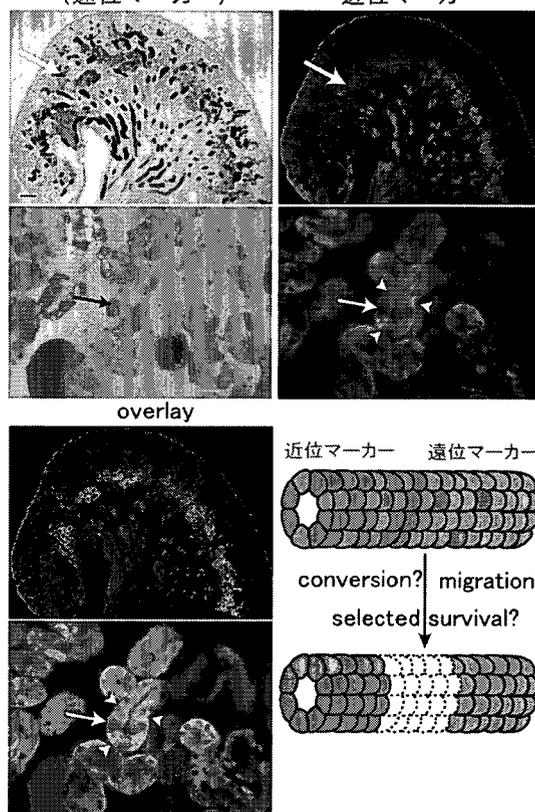
そこで本課題の主題とは少し外れるが、USAG-1/LacZ ノックインマウスを用いて、発生段階における USAG-1 の発現解析も行なった。

その結果、新生仔期の腎臓では、未分化な尿細管内で近位マーカ陽性細胞と遠位マーカ陽性細胞 (USAG-1/LacZ 陽性細胞) が隣り合ってパッチワーク状に存在していることを見いだした(図7, Tanaka M, Yanagita M et al. *Kidney Int* in press)。

腎臓の発生において、未分化で均一な

間葉系細胞集団がどのようにしてセグメントごとに異なる分化を遂げてネフロンをかたちづくるのか、そのセグメント特異的な分化のメカニズムはほとんど明らかにされておらず、再生医療を臨床応用する上での壁になっている。今回の結果は、未分化な尿細管の段階からそれぞれの細胞に cell fate が決まっていることを示唆するものである。

図7 近位、遠位分化におけるパッチワーク現象
USAG-1/LacZ マウス
(遠位マーカー)

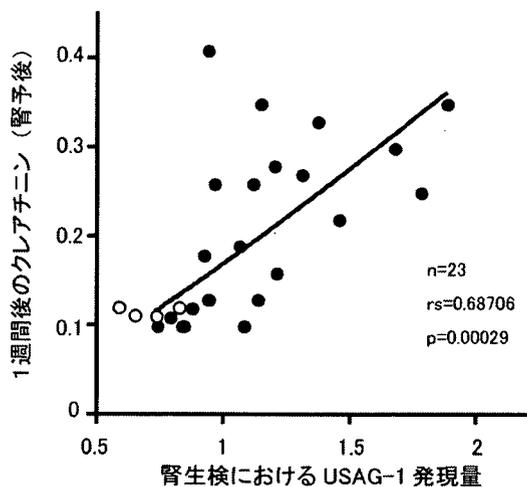


③ 腎 USAG-1 発現と予後に関する解析
申請者は①に述べたように、USAG-1 強陽性の再生尿細管が多いほど葉酸腎症が重度であることに気づき、腎 USAG-1 発現と将来の腎予後の相関を検討した。その結果、腎生検サンプルにおける USAG-1 発現量が多いほど、将来の腎機能が悪いことが明らかになった(図8)。

腎疾患患者の最大の関心事はいつ透析になるか(腎予後)であるが、現時点では腎障害がかなり進展するまで腎予後を正確に予知することは難しい。さらに医療者にとっても、将来腎機能が低下する群を正しく把握して早期から治療を行なうことが出来れば医療経済上極めて意義が大きい。

さらに USAG-1 の発現は腎臓に局限するので、腎臓における USAG-1 発現量は血中 USAG-1 濃度に反映されることが期待される。その場合には、血液検査で腎予後判定が可能となり、検診時のスクリーニングとしての有用性が極めて高い。USAG-1 は発現が腎臓特異的であること、発現量も多いこと、変化の幅が大きいことなど、よいバイオマーカーとしての要件を備えている。

図8 腎 USAG-1 発現量は将来の腎機能と相関する



④ 初代尿細管培養細胞を用いた USAG-1 発現に関する検討
腎障害時には尿細管が脱分化して Epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) を起こし線維芽細胞様に変化すると言われている。申請者は研究計画の項で述べたように、新生仔の腎臓から初代尿細管培養細胞を樹立する方法を確立し、その細胞を用いて尿細管細胞を分化、脱分化させた際の USAG-1 の発