

研究テーマ

高血圧および腎障害進展リスクとしての低ネフロン数出生の分子基盤を探る
(serial knockdown methodを用いたBMP-7による幹細胞プール維持機構の解明)

1 はじめに

腎臓の機能単位であるネフロンの形成はヒトでは出生時までに終了し、その後その数が増えることはない。一方、糖尿病性腎症や腎炎ではネフロン数が減少するが、それを再び増やす治療法は存在しない。さらに、ネフロン数が少ないことは腎臓病から腎不全に陥る最大のリスクの一つである。

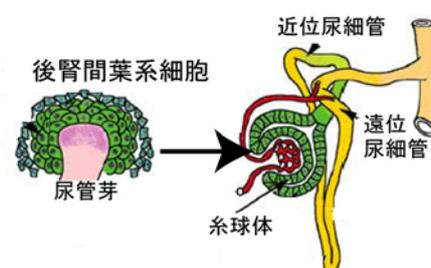
ネフロンの数は出生時に既に2倍から5倍の差があり、ネフロン数が少ない状態で生まれてきた新生児（以後低ネフロン数出生）は成人後の高血圧および腎障害のリスクが極めて高い（N Eng J Med 2003）。新生児のネフロン数が少ない原因としては、母体の低栄養状態や糖尿病、胎盤機能不全などが知られているが、その分子基盤は不明である。

腎発生過程では後腎間葉系細胞と呼ばれる未分化な細胞からネフロンのほとんど全ての部分（糸球体、近位尿細管、遠位尿細管）が分化するため、後腎間葉系細胞の中には腎の幹・前駆細胞が存在すると考えられる（図）。

この後腎間葉系細胞はヒトでは生下時までに失われ、それと同時にネフロン形成が終了する。申請者は、この後腎間葉系細胞の維持機構が破綻するとネフロン形成の材料が枯渇し、ネフロン数が少ない状態で生まれてくると考えている。

一方、骨形成因子のひとつである BMP-7 を欠損すると腎ネフロン数が極端に少なくなることが報告されているが、ネフロン形成におけるその作用機序は明らかになっていない。BMP-7 が後腎間葉系細胞に発現していることから申請者は、「BMP-7 が後腎間葉系細胞に存在する腎の幹・前駆細胞プールの維持に関わっている」という仮説を立てた。本申請課題では腎幹細胞の維持機構を明らかにすることによって、ネフロン数決定の機構を探ることを目的とした。

後腎間葉系細胞からネフロンが分化する



2 方法

本研究課題では以下の3項目の実験を行なった。

【1】 腎幹細胞の増殖と未分化性維持における BMP-7 の役割の解明

この項目では BMP-7 コンディショナルノックアウトマウスと全身性誘導 Cre マウスを交配し、発生中の任意の段階で母マウスにタモキシフェンを投与することで胎仔の BMP7 発現を全身性にノックアウトし、腎臓の表現型を解析した。また同マウスの腎臓を ex vivo で器官培養し、そこに tamoxifen を投与することによって、その形態変化を詳細に観察した。さらに野生型マウスの後腎間葉系細胞をフィーダー細胞上で培養するコロニーアッセイを用いて、BMP-7 が幹細胞の未分化性に与える影響について検証した。

【2】 BMP-7 の下流シグナルおよびエフェクター因子の同定

この項目では BMP-7 ノックアウト腎とコントロール腎の遺伝子発現プロファイルを GeneChip で比較し、下流エフェクター候補遺伝子を同定した。さらに同因子の発現が BMP-7 ノックアウト腎でたしかに低下していることを確認するとともに BMP-7 ノックアウト腎の器官培養に同因子を過剰発現することで表現型が回復するかどうかを検討した。

【3】 癌細胞におけるエフェクター因子の役割の解明

申請者は【2】で同定した BMP の下流エフェクター分子の腎細胞がんにおける発現およびその組織学的な悪性度との相関を評価した。さらに、同因子をノックダウンした腎がん細胞株を作成し、BrdU 取り込み実験を行なった。さらに同因子をノックダウンした細胞とコントロール細胞をヌードマウス皮下に移植し (xenograft)、その生存曲線がどのように変化するかを検討した。

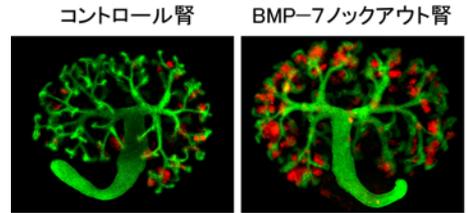
3 結果

【1】 腎幹細胞の増殖と未分化性維持における BMP-7 の役割の解明

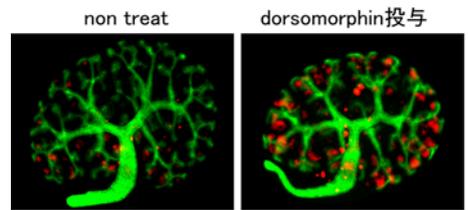
申請者は BMP-7 コンディショナルノックアウトマウスと全身性誘導 Cre マウスを用いて BMP-7 を発生中期で全身性にノックアウトすると、不釣り合いに成熟した少数のネフロンが出現するとともに後腎間葉系細胞の増殖が抑制され、アポトーシスに陥ることを見出した。さらに器官培養を用いた系では、in vitro で発生中の腎の BMP-7 をノックアウトすると、後腎間葉系細胞のアポトーシスが増加するとともに上皮化が促進することを見出した (図)。BMP の下流シグナルには転写因子 Smad1/5/8 と p38 が知られているが、Smad1/5/8 のリン酸化阻害剤 dorsomorphin を投与すると BMP-7 ノックアウトと同様のフェノタイプが観察された (図)。一方で p38 の阻害剤では変化が見られなかった。

さらに後腎間葉系細胞を用いたコロニーアッセイを行い、BMP-7 存在下では幹細胞が未分化性を保ち、上皮化しないこと、その作用は BMP アンタゴニストである noggin の同時投与で抑制されることを証明した。これらの結果は、BMP-7 が腎ネフロンの幹細胞である後腎間葉系細胞を未分化に保つ役割があることを示唆している。

申請者らは同マウスで前脳が薄いことを見出しており、神経幹細胞数も少ない可能性があると考えている。既に preliminary な解析では、BMP-7 ノックアウト脳で neurosphere の形成が少ないことを見出しており、BMP-7 の幹細胞維持機構が普遍性をもつことが示唆された。



赤が未分化性を失い上皮化した後腎間葉系細胞
緑が尿管芽を表している。
BMP-7ノックアウト腎では上皮化が促進している



dorsomorphin 投与で BMP-7 ノックアウトと似た
所見が得られた。

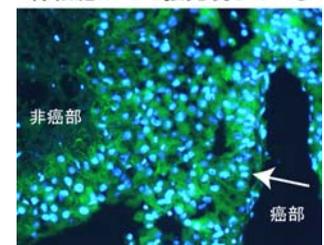
【2】 BMP-7 の下流シグナルおよびエフェクター因子の同定

申請者は BMP-7 ノックアウト腎とコントロール腎の遺伝子発現プロファイルを GeneChip で比較し、下流エフェクター候補遺伝子を複数同定した。申請者はそのうちの1つの遺伝子 (エフェクター因子 A) が BMP-7 ノックアウト腎で発現低下していること、BMP-7 ノックアウト器官培養にレンチウイルスで遺伝子導入すると上皮化促進のフェノタイプが回復することを見出した。さらに腎初代培養細胞に BMP-7 を添加すると dose dependent にエフェクター因子 A が発現増加すること、dorsomorphin 存在下ではその反応が見られないことを証明した。

【3】 癌細胞におけるエフェクター因子の役割の解明

申請者は【2】で同定した BMP の下流エフェクター分子 A が腎細胞がんで高発現していること (図)、その発現の強さが悪性度と相関することを見出した。さらに同因子をノックダウンした腎がん細胞株を用いて BrdU 取り込み実験を行なったが、増殖の速度には明らかな差を認めなかった。しかしながら同因子をノックダウンした細胞とコントロール細胞をヌードマウス皮下に移植したところ、コントロール細胞群に比べて、ノックダウン細胞を移植した群は早期に死亡した。現在、腫瘍の大きさ、周囲臓器への浸潤および転移の有無について検証中である。

BMP エフェクター分子 (緑) は
腎細胞がんで強発現している



4 考察：この研究の意義および今後の展望

低ネフロン数出生が腎臓病進展や高血圧のリスクであることは広く知られているが全て臨床疫学データであり、その分子基盤は明らかになっていない。一方で BMP-7 のようにノックアウトマウスが低ネフロン数出生を来すマウスは複数報告されているものの、その知見と臨床疫学データを結ぶような研究は未だなされていない。

その一因として通常のノックアウトマウスではフェノタイプが蓄積的であり、当該遺伝子が発生段階の「いつ、どこで」必要なかは推測の域を出ないという点がある。申請者は conditional ノックアウトマウスと全身性 inducible Cre マウスを用いることで初めて当該遺伝子が「いつどこで」必要なかを明らかにすることを可能にした。

本研究課題の知見から、BMP-7 は後腎間葉系細胞を未分化に維持することによって幹細胞プールを維持していると考えられる。ヒトの腎幹細胞は生下時には消失するため、強く障害されたネフロンは修復できず失われ、腎機能が低下する。BMP-7 を用いることによって、胚から調整した腎幹細胞を増やせる可能性が

あり、腎臓病への幹細胞医療への手がかりとなりうる。さらにこの知見は iPS 細胞や ES 細胞を腎幹細胞へ分化させる試みにも極めて重要であり、本研究領域の知見と有機的に相互作用することによって腎の再生医療領域をも推進すると期待される。

BMP-7 は前脳においても幹細胞維持に重要な役割を果たしていることから、BMP-7 による幹細胞維持機構は臓器をこえて共通した現象と考えられ、興味深い。

5 参考文献

1 Mari Tanaka, Misako Asada, Atsuko Y Higashi, Jin Nakamura, Akiko Oguchi, Mayumi Tomita, Sachiko Yamada, Nariaki Asada, Masayuki Takase, Tomohiko Okuda, Hiroshi Kawachi, Aris N. Economides, Elizabeth Robertson, Satoru Takahashi, Takeshi Sakurai, Roel Goldschmeding, Eri Muso, Atsushi Fukatsu, Toru Kita, and Motoko Yanagita

Inhibition of USAG-1, a BMP antagonist, ameliorates hereditary kidney disease of glomerular basement membrane

J Clin Invest. in press.

2 Motoko Yanagita

BMP antagonists in kidney diseases

Curr Opin Invest Drugs in press.

3 Atsuko Y. Higashi, Tomokatsu Ikawa, Masamichi Muramatsu, Aris N. Economides, Akira Niwa, Tomohiko Okuda, Andrew J. Murphy, Jose Rojas, Toshio Heike, Tatsutoshi Nakahata, Hiroshi Kawamoto, Toru Kita, and Motoko Yanagita

Direct hematological toxicity and illegitimate chromosomal recombination caused by the systemic activation of CreER^{T2}

Journal of Immunology 182 (9):5633-40, 2009.

4 New horizons at the caudal embryos: coordinated urogenital/reproductive organ formation by growth factor signaling.

Kentaro Suzuki, Aris Economides, Motoko Yanagita, Daniel Graf, Gen Yamada.

Curr Opin Genet Dev. 19(5):491-6. 2009

5 Motoko Yanagita

BMP modulators regulate the function of BMP during body patterning and disease progression

Biofactors 35(2):113-9, 2009

6 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

Expression of BMP-7 and USAG-1 (a BMP antagonist) in kidney development and injury

Kidney Int. an;73(2):181-91, 2008.

7 Mima A, Ichida K, Matsubara T, Kanamori H, Inui E, Tanaka M, Manabe Y, Iehara N, Tanaka Y, Yanagita M, Yoshioka A, Arai H, Kawamura M, Usami K, Hosoya T, Kita T, Fukatsu A.

Acute renal failure after exercise in a Japanese sumo wrestler with renal hypouricemia.

Am J Med Sci. 2008 Dec;336(6):512-4.

8 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.

9 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.

10 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.

11 Motoko Yanagita

Modulator of bone morphogenetic protein activity in the progression of kidney diseases.
Kidney Int. Sep;70(6):989-93, 2006

12 Sawabu T, Seno H, Kawashima T, Fukuda A, Uenoyama Y, Kawada M, Kanda N, Sekikawa A, Fukui H, Yanagita M, Yoshiyoshi 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

13 Motoko Yanagita

BMP antagonists: their roles in development and involvement in pathophysiology
Cytokine & Growth Factor Reviews 16:309-17, 2005.

14 Kojiro Nagai, Takeshi Matsubara, Akira Mima, Eriko Sumi, Hiroshi Kanamori, Noriaki Iehara, Atsushi Fukatsu, Motoko Yanagita, Toru Nakano, Yoshikazu Ishimoto, Toru Kita, Toshio Doi, Hidenori Arai
Gas6 induces Akt/mTOR-mediated mesangial hypertrophy in diabetic nephropathy.
Kidney Int. 68:552-61, 2005.

15 Motoko Yanagita.

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

16 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.