

論 文 内 容 要 旨

題目 Novel Interplay Between Smad1 and Smad3 Phosphorylation via AGE Regulates the Progression of Diabetic Nephropathy  
(AGEを介したSmad1とSmad3のリン酸化を介した新規相互作用は糖尿病性腎症の進展を制御する)

著者 Hiroyuki Ono, Hideharu Abe, Akiko Sakurai, Arisa Ochi,  
Tatsuya Tominaga, Masanori Tamaki, Seiji Kishi, Taichi  
Murakami, Kojiro Nagai, Masayuki Kohashi, and Toshio Doi  
平成30年発行 Scientific Reports に掲載予定

内容要旨

糖尿病患者の増加に伴い、その合併症である糖尿病性腎症患者の腎予後不良が問題となっている。これまでに我々の研究グループは、BMP4 conditional transgenic mice などの解析によって、*in vivo*においてBMP4-Smad1シグナルおよびその関連分子が糖尿病性腎症における糸球体硬化症の発症・進展に中心的な役割を果たしていることを、糸球体メサンギウム細胞およびポドサイトで明らかにしてきた。Smad1のC末端がリン酸化(pSmad1C)され、核内へ移行し、IV型コラーゲン(Co14)、I型コラーゲン(Co11)、III型コラーゲン(Co13)などの細胞外基質や形質変換マーカーの発現を誘導・亢進することで、糸球体硬化化に関与していた。

Smad1のリン酸化部位にはC末端以外にLinker部が存在する。Smad1のLinker部のリン酸化(pSmad1L)はSmad1の核内移行を抑制し、Smad1シグナルを減弱させることが胚発生では知られているが、糖尿病においてpSmad1Lに関する報告は皆無である。

一方、transforming growth factor (TGF)  $\beta$ -Smad3シグナルも糖尿病性腎症の進展に関与し、Smad3ノックアウト糖尿病マウス(Smad3K0-db/dbマウス)では糖尿病マウス(db/dbマウス)に比して糸球体病変が軽度であったが、Smad3のC末端およびLinker部のリン酸化(pSmad3C、pSmad3L)を含めて、Smad1との関連は不明である。

そこで、我々は糖尿病性腎症の発症・進展においてSmad1とSmad3のリン酸化を介した新規相互作用が病態を修飾するという仮説のもと研究を行った。得られた結果は以下の如くである。

(1) Smad3K0-db/dbマウスを作製し、6週齢から4週毎に尿中アルブミン量を

## 様式(8)

測定し、24 週齢で屠殺し、db/db マウスとの比較解析をおこなった。Smad3K0-db/db マウスでは尿中アルブミン量の減少を認め、PAM 染色ではメサンギウム領域の拡大は抑制された。また、免疫組織染色および定量的 PCR による解析では糸球体硬化関連蛋白である Col4、Col1、Col3 の発現は Smad3K0-db/db マウスで軽減した。さらに Smad3K0-db/db マウスでは pSmad1C の発現は減少し、pSmad1L の発現は増加した。

(2) Smad1 の Linker 部の中で主要なリン酸化部位である Ser206 をグルタミン酸に置換したプラスミドを用いて培養メサンギウム細胞に pSmad1L を強制発現させ、終末糖化産物 (AGE) を添加し、糖尿病条件下にしたところ、pSmad3C、pSmad3L の発現には変化を認めず、pSmad1C の発現が減少した。

(3) Smad3K0 培養メサンギウム細胞を樹立し、AGE 刺激を加えたところ、pSmad1C の発現は減少し、pSmad1L の発現は増加した。また、pSmad3C を強制発現させたメサンギウム細胞における AGE 刺激では pSmad1C の発現は増加し pSmad1L の発現は減少した。

(4) 糖尿病性腎症患者における進行抑制効果が知られている脂質異常症治療薬 Probuco1 を db/db マウスに投与したところ、pSmad1C の発現は減少、pSmad1L の発現は増加し、糸球体硬化病変も有意に抑制された。

本研究結果は糖尿病条件下における Smad1 と Smad3 の新規相互作用を明らかにし、また、pSmad1L が糸球体硬化を抑制し、新たな治療標的となる可能性があることを示唆している。

## 論文審査の結果の要旨

|      |                                  |    |       |
|------|----------------------------------|----|-------|
| 報告番号 | 甲医第 <b>1384</b> 号                | 氏名 | 小野 広幸 |
| 審査委員 | 主査 金山 博臣<br>副査 常山 幸一<br>副査 石澤 啓介 |    |       |

題目 Novel Interplay Between Smad1 and Smad3 Phosphorylation via AGE Regulates the Progression of Diabetic Nephropathy  
 (AGE を介した Smad1 と Smad3 のリン酸化を介した新規相互作用は糖尿病性腎症の進展を制御する)

著者 Hiroyuki Ono, Hideharu Abe, Akiko Sakurai, Arisa Ochi, Tatsuya Tominaga, Masanori Tamaki, Seiji Kishi, Taichi Murakami, Kojiro Nagai, Masayuki Kohashi, and Toshio Doi

平成 30 年 7 月 12 日発行 Scientific Reports 第 8 巻 article number:10548 に発表済  
 (主任教授 香美祥二)

要旨 糖尿病患者の増加に伴い、その合併症である糖尿病性腎症患者の腎予後不良が問題となっている。申請者らは、これまでに遺伝子改変動物を用いて、BMP4-Smad1 シグナルおよびその関連分子が糖尿病性腎症における糸球体硬化症の発症・進展に中心的な役割を果たしていることを明らかにしている。糖尿病では Smad1 の C 末端がリン酸化 (pSmad1C) され、核内へ移行し、IV 型コラーゲン (Col4)、I 型コラーゲン (Col1)、III 型コラーゲン (Col3) などの細胞外基質や形質変換マーカーの発現を亢進することで、糸球体硬化の形成に関与していた。

Smad1 のリン酸化部位には C 末端以外に Linker 部が存在する。Smad1 の Linker 部のリン酸化 (pSmad1L) は Smad1 の核内移行を

抑制し、Smad1 シグナルを減弱させることが胚発生では知られているが、糖尿病において pSmad1L に関する報告は皆無である。

一方、TGF $\beta$ -Smad3 シグナルも糖尿病性腎症の進展に関与するとされており、Smad3 ノックアウト糖尿病マウス (Smad3K0-db/db マウス) では糖尿病マウス (db/db マウス) に比して糸球体病変が軽度であったが、Smad3 の C 末端および Linker 部のリン酸化 (pSmad3C、pSmad3L) や Smad1 との関連は不明である。

申請者らは、糖尿病性腎症の発症・進展において Smad1 と Smad3 のリン酸化を介した新規相互作用が病態を修飾しているという仮説のもと研究を行った。

得られた結果は以下の如くである。

1. db/db マウスと比較して Smad3K0-db/db マウスにおいて、尿中アルブミン量は減少し、また、免疫組織染色および定量的 PCR による解析では糸球体硬化関連蛋白である Col4、Col1、Col3 の発現は軽減した。さらに pSmad1C の発現は減少し、pSmad1L の発現は増加した。
2. pSmad1L を強制発現させた培養メサンギウム細胞に終末糖化産物 (AGE) を添加し、糖尿病条件下にしたところ、pSmad3C、pSmad3L の発現には変化を認めず、pSmad1C の発現が減少した。
3. Smad3K0 培養メサンギウム細胞において AGE 刺激では pSmad1C の発現は減少し、pSmad1L の発現は増加した。また、pSmad3C を強制発現させたメサンギウム細胞における AGE 刺激では pSmad1C の発現は増加し、pSmad1L の発現は減少した。
4. 糖尿病性腎症患者における進行抑制効果が知られている脂質異常症治療薬 Probucol を db/db マウスに投与したところ、pSmad1C の発現は減少、pSmad1L の発現は増加し糸球体硬化病変も有意に抑制された。

本研究成果は糖尿病条件下における Smad1 と Smad3 の新規相互作用を明らかにし、また pSmad1L が糸球体硬化を抑制し、新たな治療標的となる可能性があることを示唆している。

以上より本研究成果は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。