
原 著 (第39回徳島医学会賞受賞論文)

BMP4 regulates both podocyte injury and mesangial expansion in the diabetic nephropathy藤田 結衣¹⁾, 冨永 辰也²⁾, 寒川 裕未²⁾, 長井 幸二郎¹⁾, 安部 秀斉¹⁾, 土井 俊夫³⁾¹⁾徳島大学大学院医歯薬学研究部腎臓内科学²⁾同 医用検査学系生態機能解析学³⁾徳島大学名誉教授

(平成31年3月6日受付) (平成31年3月12日受理)

われわれは、糖尿病性腎症の主たる病変であるメサンギウム基質増生がBMP4/Smad1シグナルにより惹起されること、また、ポドサイトではBMP4/p38/Caspase3シグナルによりアポトーシスが起り、糸球体硬化症を誘導することを明らかにしている。そこで、BMP4強制発現系マウスとBMP4発現抑制系マウスを用いて、メサンギウム基質増生を過ヨウ素酸メセナミン銀染色にて評価し、ポドサイト障害判定にWT1とNephrinの免疫組織化学染色を行った後、画像解析により数値化し、その関連性を統計的に解析した。WT1陽性細胞数の減少、およびNephrin発現領域の減少と共に、メサンギウム基質増生が進展していることを明らかにした。加えて、培養メサンギウム細胞を用いてBMP4/p38/Caspase3経路の解析を行った。BMP4刺激によりp38, Smad1, Caspase3の活性がみられたが、p38抑制剤によるCaspase3活性の抑制はみられなかった。BMP4が誘導する糸球体障害は、ポドサイトとメサンギウム細胞間のクロストークシステムにより進展していることが示唆された。

末期腎不全による透析患者数は世界的に増加の一途をたどり、透析予備群といわれる慢性腎臓病(Chronic Kidney Disease, CKD)の最大の原疾患は、糖尿病性腎症(Diabetic Nephropathy, DN)である。DNは、微量アルブミン尿だけでは腎障害を正確に把握することができないため¹⁾、DNの早期診断や早期治療に結びつく腎疾患進展機序の解明は重要な課題である。

糸球体は毛細血管内皮細胞、メサンギウム細胞、糸球

体基底膜、ポドサイト、ポウマン囊上皮細胞により構成され、特に毛細血管内皮細胞、ポドサイトと糸球体基底膜の三層から成る糸球体係蹄壁が、血漿中からタンパクを漏出させないようバリア機能を果たしている²⁻⁴⁾。糸球体濾過を行うために、糸球体の内部、特に糸球体基底膜とポドサイトには高い圧力がかかっている。メサンギウム細胞およびメサンギウム細胞が産生するメサンギウム基質は、血圧による外向きの膨張に抗って糸球体の複雑な形態を維持する役割を持つ。ポドサイトは足突起を噛み合わせながら糸球体表面を覆っている糸球体濾過機能を維持する上で重要な役割を果たす終末分化細胞であり、尿中へのタンパク質漏出を防ぐ最終的な障壁となるフットプロセスを形成している。ポドサイトのスリット膜を構成するNephrinは網目構造を成すことからサイズバリア機能として働き⁵⁾、ポドサイトの表面に存在するpodocalyxinはチャージバリア機能として働く⁶⁾。

DNを含むさまざまな腎障害は、メサンギウム細胞、ポドサイトおよび毛細血管内皮細胞といった糸球体構成細胞全ての機能的および構造的変化に起因する⁷⁻⁹⁾。フットプロセスの機能不全およびポドサイト喪失の結果、糸球体基底膜が露出し、糸球体構造の恒常性を保つことができず、糸球体硬化症が誘発されると考えられている¹⁰⁻¹²⁾。

BMP4(Bone Morphogenetic Protein4)は腎発生の際に尿管芽の伸長と分岐に作用している。また、腎臓を含むさまざまな臓器発達にとって重要な幹細胞分化を誘導する分子である¹³⁻¹⁵⁾。われわれは、糖尿病性腎症の病理学的所見であるメサンギウム基質増生の主たる構成成分

であるIV型コラーゲンの発現増加をSmad1が直接制御し、そのシグナルの上流分子であるBMP4がSmad1を強力に活性化することを明らかにしている^{16,17)}。また、糸球体にBMP4を強制発現させたマウスは、非糖尿病状態においても糖尿病性腎症に類似するメサンギウム基質増生を引き起こす。ポドサイト特異的にBMP4を強制発現させたマウスにおいても、非糖尿病条件下でメサンギウム基質増生、間質の線維化を発症する。その過程で活性化されるシグナル経路の1つが、p38/Caspase3のアポトーシス誘導経路である。一方、*Bmp4* heterozygous knockout マウスは、Streptozotocin (STZ) による糖尿病誘発条件下でポドサイト数を維持し、メサンギウム基質増生を抑制する。また、ポドサイト特異的*Bmp4* knockout マウスも同様に、STZ誘導糖尿病条件下でポドサイトの形態を一部維持しており、メサンギウム基質増生を緩和する¹⁸⁾。このことから、ポドサイトにおけるBMP4の発現は、メサンギウム基質増生とポドサイト障害の両方に大きく関与していると考えられた。

近年の研究では、糸球体構成細胞の細胞間相互作用と疾患形成機序の解明に焦点が当てられており¹⁹⁾、糸球体メサンギウム基質増生とポドサイト障害の進展状態について、BMP4遺伝子変異マウスを用いて病理学的に解析し、それらの関連性を統計学的に分析した。

方 法

1. 実験動物

それぞれのマウスの作製方法および飼育方法は、これまでの報告に従い実施した¹⁸⁾。各マウスはStreptozotocin (STZ) により糖尿病を誘発させた。使用した3種類のマウスは、1)野生型マウス(C57BL/6J)、2)*Bmp4* heterozygous knockout マウス (*Bmp4* +/-)、3)conditional *Bmp4* knockout マウス (*Bmp4*^{loxP}) と *Podocin Cre* (*Pod-Cre*) マウスを交配させ、ポドサイト特異的に *Bmp4* を knockout させたマウス (*Bmp4*^{loxP} x *Pod-Cre*) である。さらに、非糖尿病条件下において使用した2種類のマウスは、4)タモキシフェン誘導によりBMP4発現時期を選択的に調節できる conditional *Bmp4* knockin マウス (*Bmp4* tgm+)、5) *CAG-CAT-Bmp4* transgenic マウス (*CAG-Bmp4*) と *Podocin Cre* マウスを交配させ、ポドサイト特異的にBMP4を発現するマウス (*CAG-Bmp4* x *Pod-Cre*) である。

2. 組織解析および統計分析

組織学的解析は、メサンギウム基質増生を過ヨウ素酸メセナミン銀 (PAM) 染色にて行った。ポドサイト足突起の形態についてはNephrin発現を、ポドサイト細胞数についてはWT1発現を、それぞれ免疫組織化学染色にて行った。

画像解析は、Image Jを用いて糸球体内に占めるPAM染色陽性エリアをメサンギウム基質領域として評価した。WT1は単位糸球体面積あたりの陽性細胞数をカウントした。Nephrinは糸球体内の陽性領域の割合をImage Jにて計測した。マウス1頭あたり30個の糸球体を計測し、その平均値を算出した。メサンギウム基質領域とWT1陽性細胞数およびNephrin発現領域の相関関係について、各々の散布図から相関係数 (*r* 値) を算出した。以上の統計処理を、Prism7を用いて行い、危険率 (*p* 値) 5%未満を持って統計学的に有意と判定した。

3. 培養実験

さらに、培養マウスメサンギウム細胞を用いて、BMP4/p38/Caspase3シグナルをWestern Blottingにより解析した。培養細胞はこれまでの報告に従い、正常4週齢マウス (ICR; CD-1) から単離、同定したものを使用し、培養方法も同様に行った¹⁷⁾。BMP4刺激を行い、同時にDorsomorphin (Smad1抑制分子) とSB203580, SB242235, SB202190 (p38抑制分子) を添加、24時間後に蛋白抽出を行い、Bicinchoninate (BCA) 法により蛋白濃度を測定した。Western Blottingにて使用した抗体は、pp38 (CST), pSmad1/5/9 (CST), Cleaved caspase3 (CST), α -Tubulin (SIGMA) である。

結 果

1. BMP4発現抑制系マウスの解析

1-1. *Bmp4* heterozygous knockout マウスにおけるメサンギウム基質増生とポドサイト障害の関連性

BMP4発現が低下している *Bmp4* heterozygous knockout マウス (*Bmp4* +/-) を用いて、STZにより糖尿病を誘発させた。このマウスは同誘導を行った野生型マウスよりもメサンギウム基質増生の抑制やWT1陽性細胞数に反映されるポドサイト数減少の抑制、Nephrin発現領域に反映されるフットプロセスの破綻が抑制され、尿中アルブミンの排出も改善される¹⁸⁾。メサンギウム領域分画とWT1陽性細胞数の相関を検証したところ (n=32)、

$r = -0.722$, $p < 0.01$ と強い負の相関があった。またメサンギウム領域分画と Nephrin 陽性領域の相関においても, $r = -0.834$, $p < 0.01$ と有意に負の相関性を示した(図1)。

1-2. ポドサイト特異的 *Bmp4* knockout マウスにおけるメサンギウム基質増生とポドサイト障害の関連性

次に, ポドサイト特異的に *Bmp4* を knockout させたマウス (*Bmp4^{loxP} x Pod-Cre*) を STZ により糖尿病を誘発させ, ポドサイト特異的に BMP4 の分泌レベルが低下した状態での腎障害を解析した。コントロールである Cre 非誘導の *Bmp4^{loxP}* マウスと比較し, *Bmp4^{loxP} x Pod-Cre* はメサンギウム基質増生が抑制され, WT1 陽性

細胞数の減少および Nephrin 陽性領域の減少を抑制した¹⁸⁾。メサンギウム領域分画と WT1 陽性細胞数の相関を検証したところ ($n=24$), $r = -0.855$, $p < 0.01$ と強い負の相関があった。またメサンギウム領域分画と Nephrin 陽性領域の相関においても, $r = -0.904$, $p < 0.01$ と有意に負の相関性を示した(図2)。

2. BMP4過剰発現系マウスの解析

2-1. タモキシフェン誘導 *Bmp4* knockin マウスにおけるメサンギウム基質増生とポドサイト脱落の関連性

この系統マウスはいずれも非糖尿病である。出生後タモキシフェン誘導により糸球体内に BMP4 を過剰発現させた conditional *Bmp4* knockin マウス (*Bmp4* tg⁺)

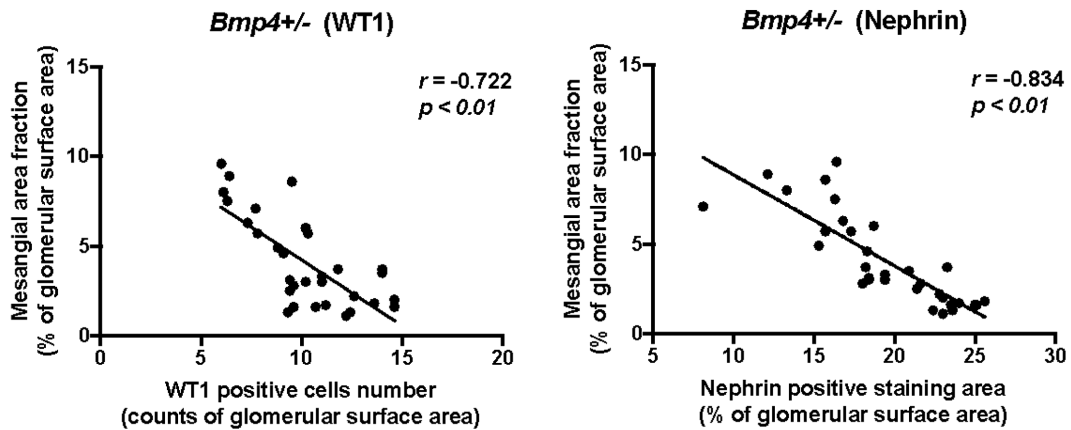


図1) *Bmp4* heterozygous knockout マウスにおけるメサンギウム基質増生とポドサイト障害の関連性 ($n=32$)。メサンギウム領域分画と WT1 陽性細胞数は, $r = -0.722$, $p < 0.01$ と負の相関があった。またメサンギウム領域分画と Nephrin 陽性領域において, $r = -0.834$, $p < 0.01$ と有意に負の相関性を示した。

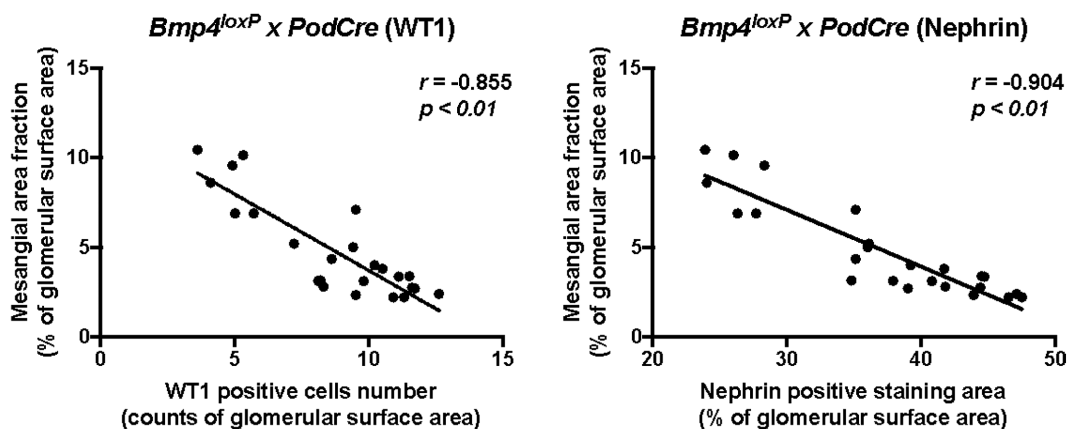


図2) ポドサイト特異的 *Bmp4* knockout マウスにおけるメサンギウム基質増生とポドサイト障害の関連性 ($n=24$)。メサンギウム領域分画と WT1 陽性細胞数は, $r = -0.855$, $p < 0.01$ と負の相関があった。メサンギウム領域分画と Nephrin 陽性領域において, $r = -0.904$, $p < 0.01$ と有意に負の相関性を示した。

は、非誘導マウスと比較して、メサンギウム基質拡大、ならびにWT1陽性細胞数およびNephrin陽性領域の有意な減少を示した¹⁸⁾。メサンギウム領域分画とWT1陽性細胞数の相関を検証したところ (n=13), $r=-0.803$, $p<0.01$ と強い負の相関があった (図3)。

2-2. ポドサイト特異的 *Bmp4* knockin マウスにおけるメサンギウム基質増生とポドサイト障害の関連性

ポドサイト特異的にBMP4を発現するマウス (*CAG-Bmp4 x Pod-Cre*) においても同様に、非糖尿病状態で、

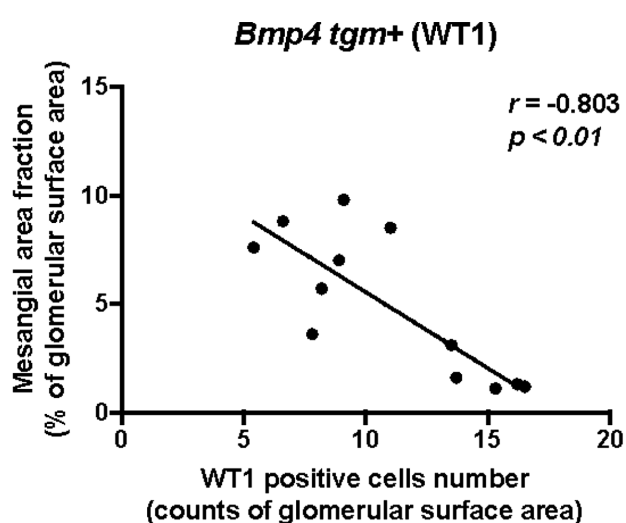


図3) タモキシフェン誘導 *Bmp4* knockin マウスにおけるメサンギウム基質増生とポドサイト脱落の関連性 (n=13) メサンギウム領域分画とWT1陽性細胞数は、 $r=-0.803$, $p<0.01$ と強い負の相関を示した。

コントロールマウスである *CAG-CAT-Bmp4* transgenic マウスと比較して、週齢の経過とともに、メサンギウム基質増生、WT1陽性細胞数およびNephrin領域の減少を示した¹⁸⁾。メサンギウム領域分画とWT1陽性細胞数の相関を検証したところ (n=12), $r=-0.684$, $p<0.01$ と負の相関があった。またメサンギウム領域分画とNephrin陽性領域の相関においても、 $r=-0.752$, $p<0.01$ と有意に負の相関性を示した (図4)。

3. メサンギウム細胞におけるアポトーシス経路

培養マウスメサンギウム細胞を用いてアポトーシスシグナルに関与するBMP4/p38経路について解析を行った。メサンギウム細胞において、BMP4刺激はp38およびSmad1のリン酸化を誘導し、Cleaved caspase3を増加させた。BMP4刺激下で添加したDorsomorphinはSmad1の活性化を抑制し、Cleaved caspase3を減少させた。SB242235およびSB202190添加によりp38のリン酸化抑制、SB203580, SB242235, SB202190添加によりSmad1のリン酸化抑制がみられたが、SB203580, SB242235, SB202190添加によりCaspase3の活性は抑制されなかった。(図5)。

考 察

ポドサイト障害は、糸球体濾過機構の破綻を招き、糸球体障害の重大な病因となる。しかし、複数の要因によりポドサイト障害が引き起こされるため、詳細な分子メカニズムおよび細胞間クロストークを解明することが課

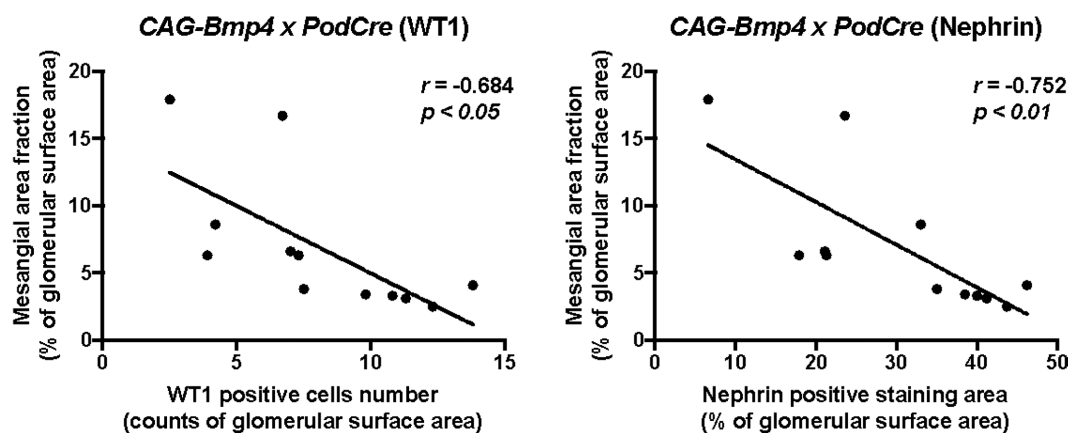


図4) ポドサイト特異的 *Bmp4* knockin マウスにおけるメサンギウム基質増生とポドサイト障害の関連性 (n=12) メサンギウム領域分画とWT1陽性細胞数の相関は、 $r=-0.684$, $p<0.01$ と負の相関があった。またメサンギウム領域分画とNephrin陽性領域の相関において、 $r=-0.752$, $p<0.01$ と有意に負の相関性を示した。

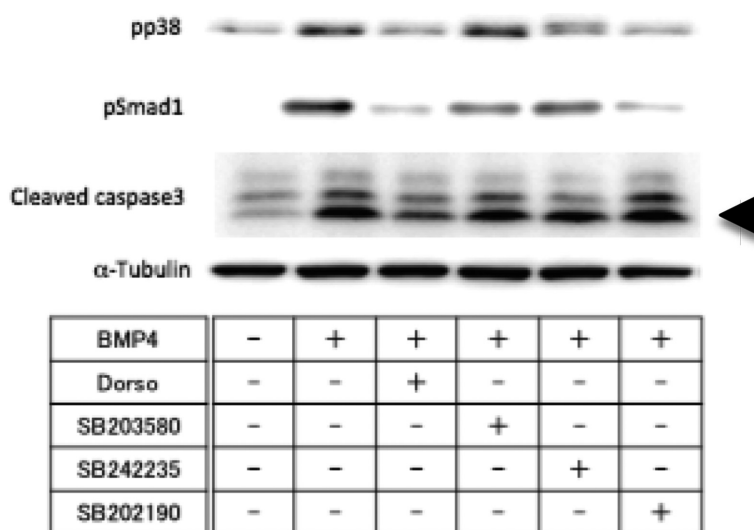


図5) メサンギウム細胞における BMP4/p38シグナルと抑制機構

培養マウスメサンギウム細胞に BMP4刺激後24時間後に蛋白抽出を実施した。Dorsomorphin (Dorso) および, SB203580, SB242235, SB202190の添加は BMP4と同時にを行った。BMP4刺激により, Smad1, p38のリン酸化, Caspase3の活性化がみられた。Dorsomorphin により, Smad1, p38のリン酸化抑制がみられたが, SB203580, SB242235, SB202190添加によりCaspase3の活性は抑制されなかった。

題である。糸球体障害は、腎臓の複雑な構造から毛細血管内皮細胞、メサンギウム細胞、およびポドサイト細胞の全ての細胞が関わる。ネフローゼ症候群モデルである NEP25マウスを用いた報告では、ポドサイト特異的な障害によりネフローゼを惹起させると、ポドサイト障害を認める糸球体で血栓形成および内皮細胞障害が起こる^{20, 21)}。また、PAN 腎症ラットにおいてポドサイト障害と血栓形成の関連が報告されており^{21, 22)}、血管内皮細胞とポドサイトは何らかの相互作用があると考えられている。糖尿病性腎症の病理学的所見は、糸球体のびまん性病変としてメサンギウム基質増生と糸球体毛細血管壁の肥厚（糸球体基底膜の肥厚）である。その本態は、メサンギウム領域における細胞外基質タンパクの過剰沈着であり、その大部分はIV型コラーゲンの発現増加である¹⁶⁾。腎生検にてメサンギウム基質増生が認められた病態は、それ以前の糖尿病初期段階で、すでにポドサイト障害は起こっていると考えられている。ポドサイト障害と糸球体硬化症の関連は、ポドサイト障害を本態とし、糸球体硬化へと至る巣状文節性糸球体硬化症（Focal segmental glomerulosclerosis, FSGS）の詳細な研究により以下のように考えられている。ポドサイト障害初期には、スリット膜の分子構造、足突起の細胞骨格変化が起きることで、

足突起は癒合、消失し、特徴的な噛み合わせ構造を失う。さらに進行すると、ポドサイトのアポトーシスにより糸球体基底膜から脱落する。この結果、糸球体基底膜が露出し、糸球体硬化病変が形成されると考えられている^{11, 12, 21)}。メサンギウム細胞が糸球体構造維持の役割を持つことから、糸球体障害におけるメサンギウム細胞とポドサイトの相互連携があることは明らかであるが、その詳細なメカニズムは不明である。BMP4発現は主に、メサンギウム細胞で観察されるが、一部ポドサイトでも観察された¹⁸⁾。培養ポドサイト細胞において、BMP4刺激によりリン酸化 p38が誘導され、それに伴い Nephrin の発現は減少する。Nephrin の発現低下は、ポドサイト足突起の結合破綻を意味し、タンパク尿の漏出を招く。また、p38の下流に位置するとされるアポトーシス誘導因子 Caspase3の活性化も BMP4により惹起されることがわかっている。このアポトーシス誘導シグナルは、p38阻害剤である SB242235, SB202190により阻害される¹⁸⁾。以上のことから、糖尿病では、この BMP4/p38シグナルによりフットプロセス崩壊およびポドサイト脱落が誘導され、糸球体構造の恒常性破綻をきたすと考えられる。さらに、培養メサンギウム細胞では、BMP4刺激により p38および Smad1, Caspase3の活性化はみられたが、3

種類の p38阻害剤では Caspase3の活性化は抑制されなかった。メサンギウム細胞においては、糖尿病状態で発現増加した BMP4が Smad1を活性化させ細胞外基質タンパクの産生を促し、糸球体の結節性病変を形成すると考えられる。

BMP4は細胞外分泌タンパクであり、パラクラインにさまざまな細胞に作用しうると考えられる。糖尿病では糸球体内に増加した BMP4の発現量は、メサンギウム基質拡大と正の相関を示すことが分かっている¹⁷⁾。従って、メサンギウム細胞とポドサイトの両細胞の BMP4シグナル伝達は、糖尿病性腎症におけるポドサイト障害、メサンギウム基質増生の中心的役割を持つと考えられる。今回の研究により、BMP4発現抑制系マウスおよび BMP4過剰発現系マウスの両方で、メサンギウム基質増生とポドサイト脱落およびフットプロセス崩壊との関連性が立証された。さまざまな報告で言われているように、糸球体硬化症の発症を止めるにはポドサイトの機能を保ち、細胞脱落を抑える必要がある。これらの知見は、BMP4シグナルを抑制することは糖尿病性腎症治療の標的になりうることを示唆している。

文 献

- Doi, T., Moriya, T., Fujita, Y., Tominaga, T., *et al.*: Urinary IgG4 and Smad1 Are Specific Biomarkers for Renal Structural and Functional Changes in Early Stages of Diabetic Nephropathy. *Diabetes.*, **67**(5) : 986-993, 2018
- Pavenstädt, H., Kriz, W., Kretzler, M.: Cell biology of the glomerular podocyte. *Physiol Rev.*, **83**(1) : 253-307, 2003
- Kanwar, Y. S., Liu, Z. Z., Kashihara, N., Wallner, E. I.: Current status of the structural and functional basis of glomerular filtration and proteinuria. *Semin Nephrol.*, **11**(4) : 390-413, 1991
- Kanwar, Y. S., Farquhar, M. G.: Presence of heparan sulfate in the glomerular basement membrane. *Proc Natl Acad Sci USA.*, **76**(3) : 1303-1307, 1979
- Kestilä, M., Lenkkeri, U., Männikkö, M., Tryggvason, K., *et al.*: Positionally cloned gene for a novel glomerular protein-nephrin-is mutated in congenital nephrotic syndrome. *Mol Cell.*, **1**(4) : 575-582, 1998
- Takeda, T.: Podocyte cytoskeleton is connected to the integral membrane protein podocalyxin through Na⁺/H⁺-exchanger regulatory factor 2 and ezrin. *Clin Exp Nephrol.*, **7**(4) : 260-269, 2003
- Kriz, W., Shirato, I., Nagata, M., Lemley, K. V., *et al.*: The podocyte's response to stress:the enigma of foot process effacement. *Am J Physiol Renal Physiol.*, **304**(4) : F333-347, 2013
- Nagata, M., Kriz, W.: Glomerular damage after uninephrectomy in young rats. II. Mechanical stress on podocytes as a pathway to sclerosis. *Kidney Int.*, **42**(1) : 148-160, 1992
- Kanwar, Y. S., Wada, J., Sun, L., Danesh, F. R., *et al.*: Diabetic nephropathy : mechanisms of renal disease progression. *Exp Biol Med (Maywood).*, **233**(1) : 4-11, 2008
- Mundel, P., Shankland, S. J.: Podocyte biology and response to injury. *J Am Soc Nephrol.*, **13**(12) : 3005-3015, 2002
- Asanuma, K., Yanagida-Asanuma, E., Takagi, M., Tomino, Y., *et al.*: The role of podocytes in proteinuria. *Nephrology (Carlton)*, **12**(Suppl 3):S15-20, 2007
- Kriz, W., Gretz, N., Lemley, K. V.: Progression of glomerular diseases :is the podocyte the culprit? *Kidney Int.*, **54**(3) : 687-97, 1998
- Faure, S., de Santa, Barbara, P., Roberts, D. J., Whitman, M.: Endogenous patterns of BMP signaling during early chick development. *Dev Biol.*, **244**(1) : 44-65, 2002
- Winnier, G., Blessing, M., Labosky, P. A., Hogan, B. L.: Bone morphogenetic protein-4 is required for mesoderm formation and patterning in the mouse. *Genes Dev.*, **9**(17) : 2105-2116, 1995
- Michos, O., Goncalves, A., Lopez-Rios, J., Zeller, R., *et al.*: Reduction of BMP4 activity by gremlin 1 enables ureteric bud outgrowth and GDNF/WNT11 feedback signalling during kidney branching morphogenesis. *Development.*, **134**(13) : 2397-2405, 2007
- Abe, H., Matsubara, T., Iehara, N., Doi, T., *et al.*: Type IV collagen is transcriptionally regulated by Smad1 under advanced glycation end product (AGE) stimulation. *J Bio Chem.*, **279**(14) : 14201-6, 2004
- Tominaga, T., Abe, H., Ueda, O., Doi, T., *et al.*:

- Activation of bone morphogenetic protein 4 signaling leads to glomerulosclerosis that mimics diabetic nephropathy. *J Bio Chem.*, **286**(22) : 20109-20116, 2011
- 18) Fujita, Y., Tominaga, T., Abe, H., Doi, T., *et al.* : An adjustment in BMP4 function represents a treatment for diabetic nephropathy and podocyte injury. *Sci Rep.*, **8**(1) : 13011, 2018
- 19) Siddiqi, F. S., Advani, A. : Endothelial-podocyte crosstalk : the missing link between endothelial dysfunction and albuminuria in diabetes. *Diabetes*, **62** (11) : 3647-55, 2013
- 20) Matsusaka, T., Xin, J., Niwa, S., Ichikawa, I., *et al.* : Genetic engineering of glomerular sclerosis in the mouse via control of onset and severity of podocyte-specific injury. *J Am Soc Nephrol.*, **16**(4) : 1013-1023, 2005
- 21) 内藤正吉, 青山東五, 川島永子, 竹内康雄 他 : ポドサイト障害とネフローゼ症候群 北里医学, **46** : 1-12, 2016
- 22) Peti-Peterdi, J., Sipos, A. : A high-powered view of the filtration barrier. *J Am Soc Nephrol.*, **21**(11) : 1835-41, 2010

BMP4 regulates both podocyte injury and mesangial expansion in the diabetic nephropathy

Yui Fujita¹⁾, Tatsuya Tominaga²⁾, Yumi Kangawa²⁾, Kojiro Nagai¹⁾, Hideharu Abe¹⁾, and Toshio Doi³⁾

¹⁾Department of Nephrology, Graduate School of Medical Science, Tokushima University Graduate School, Tokushima, Japan

²⁾Department of Chronomedicine, Graduate School of Biomedical Sciences, Tokushima University Graduate School, Tokushima, Japan

³⁾Department of Nephrology, Tokushima University, Professor Emeritus, Tokushima, Japan

SUMMARY

Podocyte injury and loss have been indicated as constituting the crucial pathogenesis of glomerular injury; however, it remains necessary to elucidate the detailed molecular mechanisms and cell-to-cell response because multiple factors may cause podocyte injury. In the glomerulus, three kinds of cells (endothelial, mesangial, and parietal epithelial) react to podocyte injury. Endothelial and mesangial cells are connected with podocyte cells across the glomerular basement membrane. However, the detailed mechanisms regarding the interaction of the mesangium and podocyte injury are unclear.

Diabetic nephropathy is characterized by mesangial matrix expansion caused by an excessive deposition of extracellular matrix proteins in the mesangial area, which can be observed through the increased expression of type IV collagen. We have shown that bone morphogenetic protein 4 (BMP4) signaling leads to the glomerular changes characteristic of this disorder. To analyze the effect of BMP4 was investigated *in vitro* and *in vivo* using streptozotocin (STZ)-induced and Bmp4 heterozygous knockout (Bmp4+/-) diabetic mice or podocyte-specific Bmp4 knockout mice, and Bmp4-induced or podocyte-specific transgenic mice. BMP4 positive area and mesangial area fraction showed positively correlation. Furthermore, mesangial area fraction was significantly and negatively correlated with, WT1-positive cell number, and nephrin-positive area.

We also demonstrated that the induction of podocyte apoptosis by BMP4 may be mediated by p38 activation and that of caspase 3 through cleavage. In mesangial cells, BMP4 stimulation also induced phosphorylation of p38 and Smad1 and increased cleaved caspase 3, with similar significant inhibition of Smad1 activation and decreased cleaved caspase 3 mediated by dorsomorphin.

These data suggest that the BMP4 signaling pathway plays important roles for the development of both podocyte injury and mesangial expansion in diabetic nephropathy.

Key words : BMP4, diabetic nephropathy, podocyte, apoptosis, mesangial expansion