● 総 説 ●

腎病態生理における ERK シグナルの制御機構と役割

漆原 真樹・香美 祥二

(受付日：平成19年8月1日 採用日：平成19年8月6日)

要 旨

MAPK 経路は、細胞増殖や分化などさまざまな生命現象において重要な役割を果たしている。これまでに古典的 MAPK である ERK1/2は増殖性腎炎や尿細管の成長への関与など多くの報告が見られる。しかし、ERK1/2に近縁の MAPK である ERK5 に関してはその腎における役割は近年になって少しずつ知られるようになった。そこで、これまでに明らかにされた ERK1/2に関する報告と ERK5 に関する新たな知見をもとに ERK シグナルの腎病態生理における制御機構と役割を考察し、腎疾患治療への応用を検討する。

序 言

生体を構成する細胞は、受精卵から発生分化し個々に成熟した後も恒常性を維持するために外的環境に応じて適切な細胞応答を引き起こしている。シグナル伝達経路はその情報を細胞内に伝達し遺伝子の発現を制御している。MAPK (mitogen activated protein kinase) カスケード (図1) は、生体内において細胞増殖、分化、誘導などの多彩な細胞動態に関与している細胞内シグナル伝達経路で増殖因子や環境ストレスといった細胞外からの刺激を受け核内に情報を伝達している。MAPK キナーゼキナーゼ (MAPKKK), MAPK キナーゼ (MAPKK), MAPK の順にリン酸化が起こりシグナル経路を活性化させる。現在までに extracellular signal regulated kinase 1/2 (ERK 1/2), c-Jun-amino-terminal kinase (JNK), p38, ERK5 の4

つの MAPK ファミリーが同定されている。本稿ではこの MAPK ファミリーの中でも古典的 MAPK である ERK 1/2およびその近縁の ERK5 の機能と制御機構についてその概要を述べるとともに、腎病態生理への関与を最近の知見をもとに考察した。

古典的 MAPK (ERK1/2) 経路

ERK1/2は古典的 MAPK で、血清、インスリン、EGF, PDGF, TPA などの多くの増殖刺激を受け活性化される。分子量44kD の ERK 1 と 42kD の ERK 2 の2つのアイソフォームがあり、それぞれを活性化する MAPK は MEK 1 と MEK 2 の2種類が存在する。これらの MAPKK 分子を活性化する MAPKKK として、Raf-1, B-Raf, Mos などが知られているが、これらの MAPKKK の詳細な活性化機構は不明な点が多い。Raf-1は Ras と、B-Raf は Ras および Rap 1 と直接結合し、低分子量 G タンパク質を介してレセプターからのシグナルを伝えている。そして、MEK1/2は ERK1/2のセリンとスレオニン残基をリン酸化することで活性化する。ERK1/2の基質としては、Elk-1や Sap-1, c-Myc などの転写因子、RSK や MAPKAPK-2, MNK 1, MNK 2 などのキナーゼなどが知られている。このように ERK1/2は多くの増殖刺激で活性化され、細胞増殖に重要な役割を果たすと考えられてきた¹⁾。ERK1/2のアンチセンスの導入や優勢不能型の導入により、インスリン、血清、FGF, トロンビンなどによる AP 1 の活性化と繊維芽細胞の増殖が抑制されていることが示されている。最近、古典的 MAPK が癌抑制遺伝子産物 Tob をリン酸化しその活性を抑制すること、それにより細胞周期の S 期への移行が可能になることが示されている²⁾。また、MEK 1 や MEK 2 の恒常的活性化型の導入により NIH 3 T 3 細胞の癌化やヌード

徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部
発生発達医学講座 小児医学分野
(〒770-8503 徳島市蔵本町3丁目18-15)
ERK signaling regulation and function in renal pathophysiology

Maki Urushihara, Shoji Kagami

Department of Pediatrics, The Institute of Health Bioscience,
The University of Tokushima Graduate School

Key words : ERK シグナル
MAP キナーゼ
腎病態生理
細胞外基質

図1 哺乳類の4つのMAPキナーゼカスケード

GPCR: G protein coupled receptor MLK: Mixed lineage kinase
DLK: Dual leucine zipper bearing kinase ASK: Apoptosis signal regulating kinase
Tpl2: Tumor progression locus 2

マウスへの腫瘍形成がみられた。逆に、MEKの優勢不能型はRas, Raf, Mosなどによる細胞癌化を抑制した。さらにPC12細胞はNGF刺激により突起伸長し神経細胞様に分化することが知られているが、この分化誘導にも古典的MAPKが必須であることが示されている。この時に神経細胞の突起伸長に重要な役割を担っているCDK5の活性化サブユニットp35の発現が誘導されることが報告されている³⁾。また、ERK1のノックアウトマウスは正常に発生するが胸腺細胞の成熟過程に影響がみられること、MEK1のノックアウトマウスは胎生期10.5日致死となり、胎盤における血管形成に異常がみられることが報告されている。

近年になり腎病態でのERK1/2の機能も解明されつつある。Bokemeyerらは、ラットに抗Thy-1.1抗体を投与してメサングウム増殖性腎炎モデルを作成し単離糸球体におけるERK1/2の活性を検討した。するとERK1/2はメサングウム細胞の反応性増殖期に最も活性化され以後は低下していた⁴⁾。さらにERK1/2の活性を阻害すると腎炎の進展を阻止することを明らかにした⁵⁾。そして、ヒト腎症組織においてもERK1/2は細胞増殖に関連していることも報告された⁶⁾。また、尿管上皮、間質線維芽細胞や増殖した嚢胞性の尿管にも発現していることが報告されている^{7)~9)}。われわれは $\alpha 1 \beta 1$ インテグリンより発動するERK1/2/AP-1シグナル経路がメサングウム細胞のコラーゲン基質のリモデリングに関わ

ており、PDGF刺激による亢進作用もこの経路を増幅することを報告した¹⁰⁾¹¹⁾。このことからERK1/2を介するシグナル経路は進行性腎炎に特徴的なメサングウム基質のリモデリングにも関与することが考えられた。

このMAPKカスケードを阻害剤としてPD98059やU0126といった分子が見出されている。これらはMEK1/2を阻害することによってMAPKの機能を研究するツールとして用いられるだけでなく、臨床への応用も期待されている。しかし、MEK5~ERK5経路も阻害することも明らかになっていることから、これらの阻害剤を用いた結果の解釈には注意が必要である¹²⁾。

ERK5/BMK1

ERK5は、MAPKKと相同性の高い遺伝子としてクローニングされたMEK5に結合する分子として同定された。ERK5は古典的MAPKであるERK1/2と同様にリン酸化サイトとしてTEY配列をもつMAPKである。このキナーゼはキナーゼドメイン以外にかなり長いC末端領域をもち、他のファミリー分子の2倍ほどの大きさがあることからBig Map Kinase 1 (BMK1)ともよばれる¹³⁾¹⁴⁾。現在までにERK5を活性化するMAPKKとしてはMEK5のみが同定されており、同じTEY配列を持つERK1/2のようにMEK1/2によっては活性化されない。MEK5はMAPKKKであるMEKK2, MEKK3によりリン酸化される。このようにして活性化されたERK5は

図2 慢性進行性腎炎における ERK シグナルの役割

MEF 2 C などの転写因子をリン酸化することで、遺伝子発現を制御する¹⁵⁾。ERK 5 は、当初は酸化ストレスや高浸透圧などにより活性化するキナーゼとして報告された¹⁶⁾。しかしながら、その後の研究により、ERK1/2と同様に血清刺激や NGF, EGF などの増殖因子によっても活性化されること、S 期への進行を制御することで細胞増殖をコントロールすることが明らかとなっている¹²⁾¹⁵⁾¹⁷⁾。ERK 5 の基質の多くは転写因子であるため、核局在の制御はシグナルを伝達するうえで非常に重要である。細胞に発現させた ERK 5 は静止期において細胞質に局在するが、活性型 MEK 5 との共発現により核へと局在が変化することが示されている¹⁵⁾。細胞外からの刺激に適切にตอบสนองし核に情報を伝達するために、ERK 5 の細胞内局在は厳密に制御されている。また、ERK 5 の *in vivo* の機能においては、ノックアウトマウスが心臓形成や血管新生に異常を示し、10.5 日前後で致死になることが報告されている¹⁸⁾。線虫においては身体のサイズを制御することが知られている *sma 5* が ERK 5 のオルソログであることが明らかにされている¹⁹⁾。さらにアフリカツメガエル胚において ERK 5 は神経分化を制御することも見出された²⁰⁾。

近年になってわれわれは、ERK 5 が糖尿病性腎症ラットモデルでの発現が上昇し、高血糖によるメサンギウム細胞の増殖を促すことを報告した²¹⁾。2 型糖尿病のモデルである OLETF ラットの腎組織において ERK 5 の発現は糸球体細胞外基質 (Extracellular matrix: ECM) の蓄積増加に比例して増強し、培養メサンギウム細胞にグルコース負荷を与えると ERK 5 の活性が増強された。さ

らに、ERK 5 を活性化する MAPKK である MEK 5 の優勢不能型を培養メサンギウム細胞に導入すると細胞増殖能が低下した。

そこで、われわれは、ERK 5 の腎炎進展における役割を明らかにするためにラット慢性進行性腎炎モデルと培養メサンギウム細胞を用いて検討した。ラットの片腎を摘出後、抗 Thy1.1 抗体を投与して腎炎を惹起し進行性メサンギウム増殖性糸球体腎炎モデルを作成した。免疫染色により組織での ERK 5 の発現変化を観察し、糸球体 ECM の蓄積と比較検討したところ、腎炎ラット組織では 1～2 週をピークとしたメサンギウム細胞の反応性増殖期後に週数に伴い糸球体の ECM の蓄積増加がみられ、同部位における ERK 5 の発現が増加していた。一方、ERK1/2 は既報⁴⁾と同様に反応性増殖期のピークである 1 週目に強い発現がみられた。そして培養メサンギウム細胞に ERK 5 を標的にした siRNA を導入し WST-1 アッセイを用いて細胞生存能力を検討すると、培養メサンギウム細胞は siRNA の濃度依存性に細胞生存能力が低下していた²²⁾。以上のことからラット慢性進行性腎炎モデルにおいて ERK 5 を介するシグナルは反応性に増殖したメサンギウム細胞の生存を促しさらに ECM の蓄積に関与することが示唆された。また、ERK1/2 は反応性増殖期に発現しており既報と同様に本モデルでも急性期の病態であるメサンギウム細胞の増殖に関与すると考えられた。これらの結果から ERK 5 シグナルを制御することによって腎炎の慢性病変形成を阻止する新たな治療法の開発が期待できると考えられた (図 2)。

結 び

このように ERK シグナルによる腎病態での制御機構は明らかにされつつある。しかしながら、その役割については不明な点も多く残されており、ERK シグナルの多機能性を考慮すると腎病態でのさらに多様な局面での関与が推察される。今後はその分子機構のさらなる研究と ERK シグナル分子標的薬剤による治療法の開発などが課題と思われる。

引用文献

- 1) Lewis TS, Shapiro PS, Ahn NG: Signal transduction through MAP kinase cascades. *Adv Cancer Res* 74: 49-139, 1998.
- 2) Maekawa M, Nishida E, Tanoue T: Identification of the Anti-proliferative protein Tob as a MAPK substrate. *J Biol Chem* 277: 37783-37787, 2002.
- 3) Harada T, Morooka T, Ogawa S, Nishida E: ERK induces p35, a neuron-specific activator of Cdk5, through induction of Egr1. *Nat Cell Biol* 3: 453-459, 2001.
- 4) Bokemeyer D, Ostendorf T, Kunter U, Lindemann M, Kramer HJ, Floege J: Differential activation of mitogen-activated protein kinases in experimental mesangioproliferative glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 11: 232-240, 2000.
- 5) Bokemeyer D, Panek D, Kramer HJ, Lindemann M, Kitahara M, Boor P, Kerjaschki D, Trzaskos JM, Floege J, Ostendorf T: In vivo identification of the mitogen-activated protein kinase cascade as a central pathogenic pathway in experimental mesangioproliferative glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 13: 1473-1480, 2002.
- 6) Masaki T, Stambe C, Hill PA, Dowling J, Atkins RC, Nikolic-Paterson DJ: Activation of the extracellular-signal regulated protein kinase pathway in human glomerulopathies. *J Am Soc Nephrol* 15: 1835-1843, 2004.
- 7) Masaki T, Foti R, Hill PA, Ikezumi Y, Atkins RC, Nikolic-Paterson DJ: Activation of the ERK pathway precedes tubular proliferation in the obstructed rat kidney. *Kidney Int* 63: 1256-1264, 2003.
- 8) Nagao S, Yamaguchi T, Kusaka M, Maser RL, Takahashi H, Cowley BD, Grantham JJ: Renal activation of extracellular signal-regulated kinase in rats with autosomal-dominant polycystic kidney disease. *Kidney Int* 63: 427-437, 2003.
- 9) Fujita H, Omori S, Ishikura K, Hida M, Awazu M: ERK and p38 mediate high-glucose-induced hypertrophy and TGF-beta expression in renal tubular cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 286: F120-126, 2004.
- 10) Kagami S, Urushihara M, Kondo S, Loster K, Reutter W, Tamaki T, Yoshizumi M, Kuroda Y: Requirement for tyrosine kinase-ERK1/2 signaling in alpha 1 beta 1 integrin-mediated collagen matrix remodeling by rat mesangial cells. *Exp Cell Res* 268: 274-283, 2001.
- 11) Kagami S, Urushihara M, Kitamura A, Kondo S, Hisayama T, Kitamura M, Loster K, Reutter W, Kuroda Y: PDGF-BB enhances alpha1beta1 integrin-mediated activation of the ERK/AP-1 pathway involved in collagen matrix remodeling by rat mesangial cells. *J Cell Physiol* 198: 470-478, 2004.
- 12) Kamakura S, Moriguchi T, Nishida E: Activation of the protein kinase ERK5/BMK1 by receptor tyrosine kinases. Identification and characterization of a signaling pathway to the nucleus. *J Biol Chem* 274: 26563-26571, 1999.
- 13) Lee JD, Ulevitch RJ, Han J: Primary structure of BMK1: a new mammalian map kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 213: 715-724, 1995.
- 14) Zhou G, Bao ZQ, Dixon JE: Components of a new human protein kinase signal transduction pathway. *J Biol Chem* 270: 12665-12669, 1995.
- 15) Kato Y, Kravchenko VV, Tapping RI, Han J, Ulevitch RJ, Lee JD: BMK1/ERK5 regulates serum-induced early gene expression through transcription factor MEF2C. *Embo J* 16: 7054-7066, 1997.
- 16) Abe J, Kusuha M, Ulevitch RJ, Berk BC, Lee JD: Big mitogen-activated protein kinase 1 (BMK1) is a redox-sensitive kinase. *J Biol Chem* 271: 16586-16590, 1996.
- 17) Kato Y, Tapping RI, Huang S, Watson MH, Ulevitch RJ, Lee JD: Bmk1/Erk5 is required for cell proliferation induced by epidermal growth factor. *Nature* 395: 713-716, 1998.
- 18) Regan CP, Li W, Boucher DM, Spatz S, Su MS, Kuida K: Erk5 null mice display multiple extraembryonic vascular and embryonic cardiovascular defects. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 9248-9253, 2002.
- 19) Watanabe N, Nagamatsu Y, Gengyo-Ando K, Mitani S, Ohshima Y: Control of body size by SMA-5, a homolog of MAP kinase BMK1/ERK5, in *C. elegans*. *Development* 132: 3175-3184, 2005.
- 20) Nishimoto S, Kusakabe M, Nishida E: Requirement of the MEK5-ERK5 pathway for neural differentiation in *Xenopus* embryonic development. *EMBO Rep* 6: 1064-1069, 2005.
- 21) Suzaki Y, Yoshizumi M, Kagami S, Nishiyama A, Ozawa Y, Kyaw M, Izawa Y, Kanematsu Y, Tsuchiya K, Tamaki T: BMK1 is activated in glomeruli of diabetic rats and in mesangial cells by high glucose conditions. *Kidney Int* 65: 1749-1760, 2004.
- 22) Urushihara M, Takamatsu M, Shimizu M, Kondo S, Tamaki T, Kagami S: Extracellular signal regulated kinase 5 induced mesangial cell survival in rat progressive mesangioproliferative glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 16: 79A, 2006.

ERK signaling regulation and function in renal pathophysiology

Department of Pediatrics, The Institute of Health Bioscience,
The University of Tokushima Graduate School

Maki Urushihara, Shoji Kagami

Extracellular signal regulated kinase 1/2 (ERK1/2) and ERK5 are members of the mitogen activated protein kinase (MAPK) family and have the Thr-Glu-Tyr (TEY) activation motif. Both ERK5 and ERK1/2 are activated by growth factors and have an important role in the regulation of cell proliferation and cell differentiation. Despite these similarities, recent studies have revealed distinctive features of the ERK pathway in renal pathophysiology. We propose that controlled regulation of ERK signals could provide the basis for an effective therapeutic method for inhibition of kidney disease progression.

Key words : ERK, MAPK, Renal pathophysiology, Extracellular matrix