

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 5 月 27 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09716

研究課題名(和文) 糖尿病性腎症に対する新規パイオ医薬TGF- $\beta$ 1 PIポリアミドの抑制効果の検討

研究課題名(英文) Suppressive effects of pyrrole-imidazole polyamides targeting TGF-beta1 as novel biomedicines on the diabetic nephropathy

研究代表者

阿部 雅紀 (ABE, Masanori)

日本大学・医学部・教授

研究者番号：70459890

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：今回の研究では腎メサンジウム細胞(MC)の高血糖培養でのTGF- $\beta$ 1上昇に伴い増殖する事を認め、ラットTGF- $\beta$ 1 PIポリアミドはこれらを抑制した。ストレプトゾトシンにて糖尿病ラット腎臓では1) 腎髄質上皮間葉化現象(EMT)、2) 糸球体内皮細胞の内皮間葉化現象(EndMT)、3) 足細胞傷害を認め、これら組織傷害に対しTGF- $\beta$ 1 PIポリアミドの腹腔内投与は、EMT、EndMT、足細胞傷害を改善した。さらに高糖状態で増加する転写因子USF1に対するPIポリアミドの分子設計、合成をし、USF1 PIポリアミドは腎MCにおいて高糖状態で上昇したTGF- $\beta$ 1 mRNA発現を抑制した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ピロール・イミダゾール(PI)ポリアミドは中分子ペプチド化合物で次世代の薬として期待されている。今回、分子設計、合成しTGF- $\beta$ 1 PIポリアミド、USF-1 PIポリアミドが糖尿病腎症を改善したことは、糖尿病腎症の進展悪化にTGF- $\beta$ 1とUSF-1が関与している事が分かり、今後の創薬に対し学術的意義は大きい。またTGF- $\beta$ 1やUSF-1 PIポリアミドが次回、霊長類サル類に糖尿病腎症を作成し、その効果を観、効果が確認されれば最終的にAMED、製薬会社との共同開発を行い臨床試験に移行し、透析患者を減らせる社会的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：In the current study, we developed pyrrole-imidazole polyamides on the diabetic nephropathy. The cultured renal mesangial cells (MCs) showed proliferation with increases in expression of TGF- $\beta$ 1, which was suppressed with PI polyamide targeting rat TGF- $\beta$ 1. In in vivo experiments, streptozotocin-induced diabetic nephropathy in rats showed 1) epithelial-mesenchymal transition (EMT), 2) endothelial-mesenchymal transition (EndMT) of glomerular endothelium, 3) podocyte injury. Intraperitoneal administration of PI polyamide targeting rat TGF- $\beta$ 1 improve the EMT, the EndMT and the podocyte injury in diabetic nephropathy in rats. Moreover, we designed and synthesized PI polyamide preventing binding of transcription factor USF-1 in TGF- $\beta$ 1 promoter inhibited increased expression of TGF- $\beta$ 1 that increased in MCs with high glucose condition.

研究分野：腎臓病学

キーワード：糖尿病性腎症 TGF- $\beta$ 1 USF1 PIポリアミド

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

糖尿病性腎症を含めた慢性腎臓病では、腎内組織アンジオテンシン II が糸球体メサンジウム細胞増殖、ECM 増生により糸球体硬化を起こす。一方、アンジオテンシン II により転写が増加した TGF- $\beta$  は、尿細管上皮を間葉化(EMT)をおこし、また TGF- $\beta$  の下流に位置する増殖因子 CTGF の発現亢進により、間質の線維化を起こす。これら全体で腎傷害が進行する。

糖尿病性腎症において、TGF- $\beta$  は高グルコースにより誘導されて細胞外マトリックスを産生し、繊維化を促進する。糸球体細胞中の高グルコースによって TGF- $\beta$  が過剰に発現すると、マトリックスタンパク質の沈着が増加し、糸球体硬化につながる。また、このような過剰発現が起こると、足細胞のアポトーシスが起こり、フィルターとしての腎臓の機能が低下してしまう。

USF1 による TGF- $\beta$  の発現制御について、USF1 は普遍的に発現している転写因子であり、TGF- $\beta$  のプロモータ領域のグルコース応答因子である E-box モチーフ(CANNTG または CACGTG) に結合する。USF1 (Upstream Stimulatory Factor 1) はグルコースによる TGF- $\beta$  の発現をメサンジウム細胞にて調整することが分かってきた。実際、糖尿病に罹ったマウスで USF1 をノックアウトすると、アルブミン尿が減少し、メサンジウム細胞のマトリックスの増殖も減ることが実験で示されている。この時、ノックアウトマウスでは、TGF- $\beta$  およびレニン(renin) を減少した。次にマウスのメサンジウム細胞の培養細胞では高い濃度グルコースは AMPK の活性を低下させ、USF1 の核移行を促進することが確かめられた。このように、USF1 は糖尿病性腎症を調整する重要な転写因子であり、アルブミン尿、メサンジウム細胞のマトリックスの蓄積、TGF- $\beta$  およびレニンの誘導に関与していることが示唆されている。

ピロール・イミダゾール(PI)ポリアミドは、DNA 配列特異的に結合する分子である。合成された DNA 結合 PI ポリアミドは DNA に塩基特異的に結合し、ターゲット遺伝子プロモーターに結合するよう設計すると、転写因子の結合を阻害し遺伝子発現を抑制する。PI ポリアミドはこれまで治療薬の無かった疾患の責任因子に対しても自由に設計出来、核酸医薬の分解性の欠点がなく、疾病で活性化した転写活性を抑制するため病変のみを抑制し、副作用が少なく、世界初の転写活性抑制遺伝子制御薬として期待できる。

## 2. 研究の目的

糖尿病性腎症は現在の医療にても改善出来ないアンメットメディカルニーズであり、したがって糖尿病性腎症の進展を抑制する新規バイオ医薬 PI ポリアミドを臨床応用する事を目的とし、今回の研究では糖尿病性腎症の進展での TGF- $\beta$ 1 の関与を確認し、糖尿病性腎症発症後に改善出来る PI ポリアミドを開発する。まずは In vitro で糸球体メサンジウム細胞 (MC) の高血糖培養での TGF- $\beta$ 1 上昇とラット TGF- $\beta$ 1PI ポリアミド GB1203 の作用を検討する。In vivo 実験として、STZ にて糖尿病ラット腎臓での 1) 腎髄質上皮間葉化現象(EMT)、 2) 糸球体内皮細胞の内皮間葉化現象(EndMT)、 3) 足細胞傷害の評価を免疫組織学的に行い、これら組織傷害対し TGF- $\beta$ 1PI ポリアミド GB1203 の効果から、TGF- $\beta$ 1 の関与を確認する。さらに転写因子 USF1 に対する PI ポリアミドの分子設計、合成をし、USF1 の PI ポリアミドの効果も検討する。

## 3. 研究の方法

### In vitro 実験

#### (1) ラット腎メサンジウム細胞(MC)への糖負荷実験

糖負荷として培養液 Normal glucose (5.6 mM)、High glucose (25 mM) で 24 時間インキュベートし、TGF- $\beta$ 1 mRNA 発現を Real time PCR、TGF- $\beta$ 1 蛋白ウエスタンブロット、TGF- $\beta$ 1 免疫染色で評価した。これに対しラット TGF- $\beta$ 1 PI ポリアミド(GB1203)の作用を検討した。

また MC の細胞形質転換の評価として、合成型マーカー Osteopontin mRNA 発現、収縮型マーカー  $\alpha$ SMA mRNA 発現、 $\alpha$ SMA 免疫染色を行い、これに対し GB1203 の作用を検討した。MC の DNA 生合成の評価は MC を 0.2%FBS で細胞周期の同調後、BrdU の取り込みで評価し、これに対し GB1203 の作用を検討した。

- (2) ラット TGF- $\beta$ 1 プロモーター-USF1 結合領域に対し 8 塩基認識 PI ポリアミドを分子設計・合成した。PMA 存在下で TGF- $\beta$ 1 プロモーター活性を Luciferase で測定し USF1 PI ポリアミドの抑制効果を検討した。

#### In vivo 実験

STZ 糖尿病ラットの腎障害に於ける EMT、EndMT の評価、STZ 投与後 8 週間にて、血糖値、HbA1C、Cre、BUN を測定。週 1 回尿採取 微量アルブミン、尿蛋白を測定した。尿中 TGF- $\beta$ 1 を R&D TGF- $\beta$ 1 ELISA キットにて測定した。組織染色は腎髄質 HE, Masson 染色、E-cadherin、 $\alpha$ SMA の免疫染色、E-cadherin、 $\alpha$ SMA、Snail を real time PCR で測定した。

GB1203 の STZ ラット糖尿病腎症での EMT への効果について、STZ 投与 4 週目から GB1203 1mg/kg/week を腹腔内に 4 回投与、2) 血糖値、HbA1c、クレアチニン、BUN チェック、3) 週 1 回尿採取 微量アルブミン、尿蛋白、3) 腎摘出：HE, Masson 染色、E-cadherin、 $\alpha$ SMA の免疫染色、E-cadherin、 $\alpha$ SMA、Snail real time PCR をおこなった。

STZ腎症に於ける糸球体内皮細胞とポドサイトクロストークの破綻とGB1203の効果（阿部、ポドサイトの電子顕微鏡所見により判定した。

#### 4 . 研究成果

in vitro の培養メサンギウム細胞(MCs)の実験では、25mM の高糖刺激により TGF- $\beta$ 1 のプロモーター活性の増加と mRNA 発現亢進を認めた。まず、4 種類の USF1 PI ポリアミドの抑制効果を検討し PI ポリアミド 3 でプロモーター活性及び mRNA の抑制効果を認めた。高糖刺激により TGF- $\beta$ 1 蛋白発現は有意に上昇し、 $10^{-10}$ M PI ポリアミド 3 投与で有意に抑制した。また高糖刺激で Osteopontin は有意に増加し、PI ポリアミド 3 は有意に抑制した。この結果から、高糖刺激による MCs の合成型形質転換に USF1 が関わっていることが確認された。MCs において、高糖刺激 24 時間後では核内における USF1 の蛍光免疫染色が増強し転写を促進させていることが示唆された。

in vivo の実験では、STZ 糖尿病ラットの病態に対する USF1 PI ポリアミドの薬剤効果を検討した。糖尿病ラットに対して 1mg/kgBW/週 2 回の USF1 PI ポリアミドの腹腔内投与を行った。その結果、16 週後の尿中アルブミン排泄量は有意に低下した。びまん性病変や間質線維化が認められ、USF1 PI ポリアミド投与により GIS、TIS が有意に低下した。免疫染色において TGF- $\beta$ 1 は糸球体や近位尿管に局在し、Western blot 法で腎組織内の TGF- $\beta$ 1 発現は USF1 PI ポリアミド投与により改善した。

以上の結果より、USF1 PI ポリアミド 3 は将来、糖尿病性腎症の治療薬となりうる事が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

|   |                    |
|---|--------------------|
| 1. 著者名<br>Abe M, Hamano T, Hoshino J, Wada A, Nakai S, Hanafusa N, Masakane I, Nitta K, Nakamoto H      | 4. 巻<br>Mar 8;9(1) |
| 2. 論文標題<br>Predictors of outcomes in patients on peritoneal dialysis: A 2-year nationwide cohort study. | 5. 発行年<br>2019年    |
| 3. 雑誌名<br>Sci Rep.  | 6. 最初と最後の頁<br>3967 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1038/s41598-019-40692-6.  | 査読の有無<br>有         |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>-          |

|  |                           |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名<br>Otsuki M, Fukuda N, Inoue T, Mineshige T, Otsuki T, Horikoshi S, Endo M, Abe M.  | 4. 巻<br>Sep 1;24(17)      |
| 2. 論文標題<br>Preclinical Study of DNA-Recognized Peptide Compound Pyrrole-Imidazole Polyamide Targeting Human TGF- $\beta$ 1 Promoter for Progressive Renal Diseases in the Common Marmoset. | 5. 発行年<br>2019年           |
| 3. 雑誌名<br>Molecules.   | 6. 最初と最後の頁<br>pii: E3178. |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.3390/molecules24173178   | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難   | 国際共著<br>-                 |

|   |                    |
|---|--------------------|
| 1. 著者名<br>Horikoshi S, Fukuda N, Tsunemi A, Okamura M, Otsuki, Endo M, Abe M.   | 4. 巻<br>25,        |
| 2. 論文標題<br>Contribution of TGF- $\beta$ 1 and Effects of Gene Silencer Pyrrole-Imidazole Polyamides Targeting TGF- $\beta$ 1 in Diabetic Nephropathy. | 5. 発行年<br>2020年    |
| 3. 雑誌名<br>Molecules.  | 6. 最初と最後の頁<br>950, |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.3390/molecules25040950  | 査読の有無<br>有         |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>-          |

〔学会発表〕 計16件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>堀越周、福田昇、森内正理、大月伯恭、上野高浩、遠藤守人、阿部雅紀             |
| 2. 発表標題<br>糖尿病性腎症へのTGF- $\beta$ 1抑制ペプチド化合物PIポリアミドの効果の検討 |
| 3. 学会等名<br>第22回日本心血管内分泌代謝学会学術総会                         |
| 4. 発表年<br>2018年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>堀越周、福田昇、森内正理、大月伯恭、上野高浩、遠藤守人、阿部雅紀             |
| 2. 発表標題<br>糖尿病性腎症へのTGF- $\beta$ 1抑制ペプチド化合物PIポリアミドの効果の検討 |
| 3. 学会等名<br>第61回日本腎臓学会学術総会                               |
| 4. 発表年<br>2018年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>岡村真喜誉、福田 昇、堀越 周、常見明子、深澤みゆき、阿部雅紀.           |
| 2. 発表標題<br>TGF- $\beta$ 1発現を抑制するUSF1に対するPIポリアミドの効果の検討 |
| 3. 学会等名<br>第61回日本腎臓学会学術総会                             |
| 4. 発表年<br>2018年                                       |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>堀越周、福田昇、遠藤守人、上野高浩、阿部雅紀                       |
| 2. 発表標題<br>糖尿病性腎症へのTGF- $\beta$ 1抑制ペプチド化合物PIポリアミドの効果の検討 |
| 3. 学会等名<br>第41回日本高血圧学会総会                                |
| 4. 発表年<br>2018年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>岡村真喜誉、福田 昇、堀越 周、常見明子、深澤みゆき、阿部雅紀                   |
| 2. 発表標題<br>TGF- $\beta$ 1発現を抑制するUSF1に対するペプチド化合物PIポリアミドの作用の検討 |
| 3. 学会等名<br>第41回日本高血圧学会総会                                     |
| 4. 発表年<br>2018年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>岡村真喜誉、福田 昇、堀越 周、常見明子、深澤みゆき、阿部雅紀                    |
| 2. 発表標題<br>高糖条件下TGF- $\beta$ 1発現を増加する転写因子USF1 に対するPI ポリアミドの開発 |
| 3. 学会等名<br>第30回日本糖尿病性腎症研究会                                    |
| 4. 発表年<br>2018年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>堀越 周、福田 昇、根岸英理子、森内正理、大月伯恭、上野高浩、遠藤守人、阿部雅紀          |
| 2. 発表標題<br>糖尿病性腎症におけるTGF- $\beta$ 1の関与と新規遺伝子制御薬PIポリアミドの高価の検討 |
| 3. 学会等名<br>第60回日本腎臓学会学術総会                                    |
| 4. 発表年<br>2017年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>森内正理、福田 昇、井上貴史、大月伯恭、堀越 周、常見明子、上野高浩、岡田一義、阿部雅紀            |
| 2. 発表標題<br>マームセット人選以下モデルの確立とヒトTGF- $\beta$ 1に対する新規遺伝子制御薬PIポリアミドの創薬 |
| 3. 学会等名<br>第60回日本腎臓学会学術総会  |
| 4. 発表年<br>2017年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>堀越 周、福田 昇、根岸英理子、森内正理、大月伯恭、上野高浩、菱木三佳乃、遠藤守人、阿部雅紀   |
| 2. 発表標題<br>糖尿病腎症の進展におけるTGF- $\beta$ 1の関与と新規遺伝子制御薬PIポリアミドの効果 |
| 3. 学会等名<br>第40回日本高血圧学会総会                                    |
| 4. 発表年<br>2017年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>森内正理、福田 昇、井上貴史、峰重隆幸、大月伯恭、堀越 周、常見明子、深澤みゆき、阿部雅紀       |
| 2. 発表標題<br>マームセットにおける腎線維化モデルの確立とヒトTGF- 1に対する新規遺伝子制御薬PIポリアミドの効果 |
| 3. 学会等名<br>第40回日本高血圧学会総会                                       |
| 4. 発表年<br>2017年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>森内正理、福田 昇、中井茂樹、井上貴史、峰重隆幸、大月伯恭、堀越 周、遠藤守人、阿部雅紀 |
| 2. 発表標題<br>マームセットでの腎線維化モデルの確立とヒトTGF- 1に対するPIポリアミドの創薬開発  |
| 3. 学会等名<br>第53回高血圧関連疾患モデル学会学術総会                         |
| 4. 発表年<br>2017年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>堀越 周、福田 昇、根岸英理子、森内正理、大月伯恭、常見明子、上野高浩、遠藤守人、阿部雅紀 |
| 2. 発表標題<br>糖尿病性腎症に於けるTGF- 1の関与と新規ペプチド医薬PIポリアミドの抑制効果      |
| 3. 学会等名<br>第53回高血圧関連疾患モデル学会学術総会                          |
| 4. 発表年<br>2017年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>堀越 周、福田 昇、遠藤守人、小林洋樹、森内正理、大月伯恭、上野高浩、阿部雅紀 |
| 2. 発表標題<br>糖尿病腎症におけるTGF- 1の関与と新規遺伝子制御薬PIポリアミドの抑制効果 |
| 3. 学会等名<br>心血管代謝週間CVMW2017 (第21回日本心血管内分泌代謝学会学術総会)  |
| 4. 発表年<br>2017年                                    |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>岡村真喜誉、福田昇、堀越周、常見明子、深澤みゆき、阿部雅紀    |
| 2. 発表標題<br>糖尿病性腎症に対する新規バイオ医薬USF1 PIポリアミドの開発 |
| 3. 学会等名<br>第62回日本腎臓学会学術総会                   |
| 4. 発表年<br>2019年                             |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>馬場晴志郎、福田昇、常見明子、岡村真喜誉、大野迪子、阿部雅紀         |
| 2. 発表標題<br>多発性嚢胞腎への新規バイオ医薬としてのGSK3 に対するPIポリアミドの開発 |
| 3. 学会等名<br>第62回日本腎臓学会学術総会                         |
| 4. 発表年<br>2019年                                   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>岡村真喜誉、福田昇、堀越周、常見明子、深澤みゆき、阿部雅紀    |
| 2. 発表標題<br>糖尿病性腎症に対する新規バイオ医薬USF1 PIポリアミドの開発 |
| 3. 学会等名<br>第42回日本高血圧学会総会                    |
| 4. 発表年<br>2019年                             |

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

|   |                               |               |
|---|-------------------------------|---------------|
| 産業財産権の名称<br>同時にHGF遺伝子発現を増加しTGF- 1遺伝子発現を抑制するピロール・イミダゾールポリ<br>アミド | 発明者<br>福田 昇、陳 欄、<br>上野高浩、阿部雅紀 | 権利者<br>同左     |
| 産業財産権の種類、番号<br>特許、出願中   | 出願年<br>2020年                  | 国内・外国の別<br>国内 |

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

## 6. 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                           | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)                  | 備考 |
|-------|---|--|----|
| 研究分担者 | 松本 宜明<br><br>(MATSUMOTO Yoshiaki)<br><br>(10199896) | 日本大学・薬学部・教授<br><br><br><br>(32665)     |    |
| 研究分担者 | 福田 昇<br><br>(FUKUDA Noboru)<br><br>(40267050)       | 日本大学・総合科学研究所・教授<br><br><br><br>(32665) |    |