

令和 5 年 5 月 22 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K08737

研究課題名(和文) 糖尿病と糖尿病性腎症の進展を抑制するプロテインSを増加させるPIポリアミドの開発

研究課題名(英文) Development of the novel gene modulator PI polyamide targeting protein S as a therapeutic agent for diabetes mellitus and diabetic nephropathy

研究代表者

常見 明子 (TSUNEMI, Akiko)

日本大学・医学部・研究員

研究者番号：90646035

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝子制御薬であるPIポリアミドをマウスプロテインSの転写調節領域において、負の転写調節領域であるAP-1の結合部位に、その結合をブロックするようにデザイン、合成して、培養細胞と糖尿病マウスにてその効果を検討した。マウス培養肝細胞(NCTC1469細胞)において、PIポリアミドは、プロテインSの発現を増加させた。糖尿病マウスの血糖値やグルコース負荷試験等では、十分な効果は認められなかったが、腎臓組織においては、糸球体でのメサンギウム細胞の増殖を抑制した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病性腎症は透析導入原因疾患の第一位を占め、多くの医療費が投じられているが、未だ有効な治療法は確立していない。今回、プロテインSの負の転写調節領域に、PIポリアミドを設計、合成し、実験を行ったところ、培養細胞での転写活性を上昇させ、マウス腎臓での線維化に関わる遺伝子や、糸球体でのメサンギウム細胞の増殖を抑制したことにより、新たな治療薬としての可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Pyrrole-imidazole polyamides (PI polyamides) are chemical compounds that specifically inhibit transcription factor binding. A PI polyamide that targets mouse protein S and increases protein S gene expression was designed. Treatment of NCTC1469 cell with 1nM PI polyamide significantly increased protein S mRNA and protein expression. Sufficient effects were not observed in the blood glucose level and glucose tolerance test of diabetic mice, but in kidney tissue, it suppressed the expression of *tgfb1* and *CTGF* mRNA, and suppressed the proliferation of mesangial cells in the glomerulus.

研究分野：腎臓病

キーワード：PI ポリアミド 糖尿病性腎症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

糖尿病性腎症の発症、進展を直接抑制する治療法はまだ確立されていない。活性型プロテイン C の補酵素である、肝臓や内皮細胞で産生されるプロテイン S はこれまでに知られている抗血液凝固因子としての働き以外に、炎症やアポトーシスを抑制し、さらに糖尿病と糖尿病性腎症の改善に重要な役割を担うことが近年、報告された。(Diabetes 2016,65:1940-1951) ヒトプロテイン S を過剰発現させたマウスにストレプトゾトシンにより糖尿病を発症させると、プロテイン S はマウスの膵細胞のアポトーシスを抑制し、血糖値の上昇を抑え、インスリン抵抗性を改善した。また、マウスの片腎モデルに糖尿病を発症させ、ヒトプロテイン S を持続的に投与すると腎臓の TGF β 発現を抑制し、ポドシンの発現低下を抑えて、ポドサイトのアポトーシスと腎臓組織の繊維化を抑制した。しかしながら、糖尿病患者においては、血中のプロテイン S 値が健常者より低下をしているという報告がある。これはプロテイン S の負の転写因子である AP-1 が関与していると考えられた。これらのことにより、プロテイン S の転写活性を上昇させることは、膵細胞の保護や糸球体機能の維持、線維化の抑制などに非常に重要であると考えられる。

2. 研究の目的

遺伝子発現制御薬である PI ポリアミドは、塩基配列特異的に二本鎖 DNA に結合するため、ターゲットとする特定の転写因子に、その結合を阻害するようにデザインする事により、転写因子による遺伝子発現調節をキャンセルする事ができる。プロテイン S の負の転写活性を行うプロモーターの AP-1 結合領域に対して PI ポリアミドをデザインし、培養肝細胞および内皮細胞においてプロテイン S の発現に対する効果を確認し、発現亢進したプロテイン S の培養膵細胞や内皮細胞のアポトーシス抑制作用を確認する。In vivo では、糖尿病モデルマウスの膵臓細胞に対する保護作用やインスリン抵抗性の改善、腎臓の組織所見の改善やマトリックスタンパク抑制について検討し、PI ポリアミドの効果を確認する。

3. 研究の方法

(1) プロテイン S 転写調節領域における PI ポリアミドの設計について

マウスプロテイン S の転写領域における AP-1 結合領域に、2 種類の PI ポリアミドをデザイン、合成し、ゲルシフトアッセイにてターゲット領域との結合を確認した。

(2) 培養細胞におけるプロテイン S 遺伝子とタンパク質の発現に対する PI ポリアミドの効果に関する検討

マウス培養肝細胞である NCTC1469 細胞の培地に、PI ポリアミドが $1\ \mu\text{M}$ ~ 1pM になるように添加して 24~48 時間培養後、細胞内のプロテイン S 遺伝子とタンパク質を測定した。

(3) ストレプトゾシン (STZ) 投与糖尿病モデルマウスに対する PI ポリアミドの効果に関する検討

8 週齢オス C57BL/6J マウスに、STZ を 40mg/kg を 5 日間連続で投与するのと並行して、PI ポリアミド (0.01% 酢酸で溶解、コントロール群は 0.01% 酢酸を投与) を週に 2 回、 2mg/kg となるように腹腔内投与を行い、4 週間飼育した。最終週に、グルコース負荷試験、インスリン負荷試験を

行い、飼育終了後に、血液、膵臓等を摘出した。

(4) ストレプトゾシン(STZ)投与糖尿病性腎症モデルマウスに対する PI ポリアミドの効果に関する検討

8週齢オス C57BL/6J マウスに、STZ を 40mg/kg を 5 日間連続で投与するのと並行して、PI ポリアミド(0.01%酢酸で溶解、コントロール群は 0.01%酢酸を投与)を週に 2 回、2mg/kg となるように腹腔内投与を行い、20 週間飼育し、終了時には血液、腎臓等を摘出した。

4. 研究成果

(1) プロテイン S 転写調節領域における PI ポリアミドについて

マウスプロテイン S の負の転写領域である AP-1 の結合部位に 2 種類の PI ポリアミドをデザイン、合成し、ゲルシフトアッセイにて FITC 修飾のターゲット DNA との結合を確認したところ、DNA との結合が確認できた。この結合は過剰量の非修飾の DNA によって阻害されたため、PI ポリアミドは塩基配列特異的に結合したと考えられた。

(2) 培養細胞におけるプロテイン S 遺伝子とタンパク質の発現に対する PI ポリアミドの効果

培養肝細胞である NCTC1469 細胞の培養液において、プロテイン S を増加させる PI ポリアミドは、細胞を 100nM の PMA で刺激を行った際、コントロールである配列ミスマッチな PI ポリアミドと比較して、有意にプロテイン S mRNA を増加させた。この細胞を、高グルコース刺激にて培養しても、同様にプロテイン S mRNA は増加し、たんぱくレベルでも上昇が認められた。

(3) ストレプトゾシン(STZ)投与糖尿病モデルマウスに対する PI ポリアミドの効果の検討

糖尿病マウスの血清プロテイン S 値に対する効果について

STZ 糖尿病マウスに対し、PI ポリアミドを 4 週間、腹腔内投与を行い、飼育終了後に ELISA にて血清プロテイン S 値を測定したところ、コントロール群と比較して、PI ポリアミド群で有意に増加が認められた。(コントロール群 278.23 ± 32.23 ng/ml、PI ポリアミド群 328.39 ± 14.17 ng/ml、 $p < 0.05$)

飼育期間中の体重、尿量、血糖値の変化について

実験期間中における体重、尿量、血糖値については、コントロール群と PI ポリアミド群において差は認められなかった。

グルコース負荷試験、インスリン負荷試験に対する PI ポリアミドの効果

12 時間絶食させたマウスの腹腔にブドウ糖を投与し、0, 15, 30, 60, 120 分と経時的変化を観察すると、血糖値はコントロール群よりも PI ポリアミド群において、血糖値の上昇が抑制傾向であったものの、有意な差は認められなかった。またインスリン負荷試験においても差は認められなかった。

(4) ストレプトゾシン(STZ)投与糖尿病性腎症モデルマウスに対する PI ポリアミドの効果の

検討

飼育期間中の体重等の変化について

実験開始時点では、コントロール群と PI ポリアミド群において体重の差はなかったが、中盤以降、PI ポリアミド群と比較して、コントロール群の体重は有意に減少した。また両群におい

て血糖値の差は認められなかった。

実験終了時のマウス腎臓におけるPI ポリアミドの効果

マウス腎臓組織の各種 mRNA の測定を行ったところ、コントロール群と比べて、PI ポリアミド群では、TGF 1 と CTGF mRNA が有意に低下していた。腎臓組織の PAS 染色を観察すると、糸球体の大きさに差は認められなかった。しかしコントロール群では、糸球体内のメサンギウム細胞の増殖が認められたが、PI ポリアミド群では抑制されていた。

以上の結果より、プロテイン S の転写活性を上げる PI ポリアミドは、培養細胞のプロテイン S を増加させ、糖尿病マウスにおいては、血清プロテイン S 値を増加させた。血糖値の上昇の抑制や、グルコース負荷試験、インスリン負荷試験においては、効果が認められなかったが、糖尿病マウスの腎臓においては、TGF 1 や CTGF の発現を抑制し、腎障害を抑制する効果が認められた。

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 Okamura Makiyo, Fukuda Noboru, Horikoshi Shu, Kobayashi Hiroki, Tsunemi Akiko, Akiya Yurie, Endo Morito, Matsumoto Taro, Abe Masanori	4. 巻 4
2. 論文標題 Transcriptional Suppression of Diabetic Nephropathy with Novel Gene Silencer Pyrrole-Imidazole Polyamides Preventing USF1 Binding to the TGF- β 1 Promoter	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 4741-4741
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms22094741	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

1. 著者名 Otsuki T, Fukuda N, Chen L, Tsunemi A, Abe M	4. 巻 17(8):e0272917
2. 論文標題 Twist-related protein 1 induces epithelial-mesenchymal transition and renal fibrosis through the upregulation of complement 3.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLoS One.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0272917	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

1. 著者名 Baba S, Fukuda N, Kobayashi H, Tsunemi A, Akiya Y, Matsumoto T, Abe M.	4. 巻 151
2. 論文標題 Development of gene silencer pyrrole-imidazole polyamides targeting GSK3 β for treatment of polycystic kidney diseases.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 J Pharmacol Sci.	6. 最初と最後の頁 148-155
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jphs.2023.01.001	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	上野 高浩 (UENO Takahiro) (40386008)	日本大学・医学部・兼任講師 (32665)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	阿部 雅紀 (ABE Masanori) (70459890)	日本大学・医学部・教授 (32665)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関