

令和 5 年 6 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：2020～2022

課題番号：20K08599

研究課題名(和文) 糖尿病性腎症進展におけるUSF1の関与とUSF1結合阻害PIポリアミドの創薬開発

研究課題名(英文) Contribution of USF1 on development of diabetic kidney disease and the drug discovery of PI polyamides to block the USF1 binding

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病性腎症(DKD)の治療薬としてTGF- $\beta$ 1遺伝子プロモーターへの転写因子USF1の結合阻害PIポリアミドを数種類、設計合成し、効果を検証した。ヒトメサンギウム細胞で高糖刺激はTGF- $\beta$ 1発現、osteopontin発現、細胞増殖を刺激した。これらはUSF1阻害PIポリアミドにより抑制され、リード化合物を決定した。ヒト尿細管細胞の高糖刺激によりTGF- $\beta$ 1、SMAが有意に上昇した。PIポリアミドによりSMA発現は抑制され、EMTの細胞形態の変化が抑制された。以上よりUSF1阻害PIポリアミドはTGF- $\beta$ 1及びEMT現象の抑制から糖尿病性腎症の新規治療薬になり得ると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病性腎症(DKD)は末期腎不全の主たる原因であるが未だに根治薬が無い。PIポリアミドは転写因子の遺伝子結合を抑制する中分子ペプチド医薬である。今回、DKDの進展に関わる転写因子USF1のTGF- $\beta$ 1遺伝子結合を抑制するPIポリアミドを設計合成し、創薬開発した。USF1 PIポリアミドが高糖条件でのメサンギウム(HMC)細胞のTGF- $\beta$ 1発現、増殖抑制を抑制し、近位尿細管細胞のEMT現象を抑制し、USF1 PIポリアミドがDKDでの腎線維化、進展を抑制した事は、DKDの新規治療薬として医療社会的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：We designed, synthesized and examined effects of PI polyamides to block a transcription factor USF1 bindings on human TGF- $\beta$ 1 promoter as a novel medicine on diabetic kidney disease. PI polyamides targeting USF1 binding significantly suppressed expressions of TGF- $\beta$ 1 and osteopontin in human mesangial cells stimulated with high glucose, by which a lead compound was determined. High glucose significantly increased expressions of TGF- $\beta$ 1 and SMA in human renal tubular cells. The lead PI polyamide significantly suppressed SMA expression and the cellular morphological changes as EMT. These findings indicate that the USF1 blocking PI polyamide inhibits expression of TGF- $\beta$ 1 and EMT phenomenon and will be a novel medicine for diabetic kidney disease.

研究分野：腎臓病学

キーワード：糖尿病性腎症 PIポリアミド 転写因子 USF1

## 1. 研究開始当初の背景

最近、糖尿病で転写因子 USF1 が TGF- $\beta$  の発現調節を行っている事が分かって来た。USF1 は 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 モチーフに結合する。USF1 はアルブミン尿、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。糖尿病性腎症では正常の糸球体に比べてメサンジウム細胞の増殖を伴う糸球体硬化を認める。最近、USF1 は高糖条件で核内に移行し、TGF- $\beta$ 1 プロモーターと同時にオステオポンチンプロモーターに結合し発現を刺激し、メサンジウム細胞を収縮型から合成型に形質変換することが分かってきた。

ピロール・イミダゾール(PI)ポリアミドは、ペプチド化合物で DNA 配列特異的に結合する minor groove binder である。ペプチド合成された PI ポリアミドは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 DDS なしに細胞の核に取り込まれ、様々な遺伝子をターゲットとして自由に分子設計できる。このように PI ポリアミドは新規遺伝子制御薬であり、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、転写活性抑制遺伝子制御薬として期待できる。

我々は科学研究費基盤研究 C(17K09716)「糖尿病性腎症に対する新規バイオ医薬 TGF- $\beta$ 1 に対する PI ポリアミドの抑制効果の検討」で糖尿病性腎症に TGF- $\beta$ 1 に対する PI ポリアミドが有効であることを確認した。また転写因子 USF1 は高糖条件にて腎メサンジウム細胞でのオステオポンチンの発現を亢進し、メサンジウム細胞を合成型に形質転換している事により糸球体硬化を起こしている事を見出した。そこでその成績を基に糖尿病性腎症の治療薬としてヒト USF1 結合阻害 PI ポリアミドを開発する。

## 2. 研究の目的

- (1) 糖尿病性腎症での糸球体硬化および腎臓線維化に転写因子USF1がTGF- $\beta$ 1を介して関与している事を検討する。
- (2) ヒトUSF1阻害PIポリアミドを糖尿病性腎症の新規治療薬として開発する。

## 3. 研究の方法

- (1) ヒトUSF1結合阻害PIポリアミドの分子設計、合成：ヒトTGF- $\beta$ 1プロモーター構造においてUSF1結合E-box配列をDNA配列解析ソフトPROMOにより解析、PIポリアミドがE-box配列とヒトTGF- $\beta$ 1プロモーターに跨がるように複数分子設計、合成する。
- (2) PIポリアミドのゲルシフトアッセイ：PIポリアミド結合領域配列のオリゴDNAとPIポリアミドをインキュベーションした。ヒトUSF1蛋白に対するPIポリアミドの効果は、DNAとPIポリアミドをあらかじめインキュベートした後に、USF1蛋白を添加して泳動を行った。
- (3) PIポリアミドのリード化合物選定：ヒト培養メサンジウム細胞(HMC)での25mMの高糖条件でのTGF- $\beta$ 1 mRNA発現をreal time PCRで評価し、ヒトUSF1結合阻害PIポリアミドによる抑制効果からリード化合物を2~3選定した。
- (4) ヒトUSF1結合阻害PIポリアミドリード化合物について、25mMの高糖条件でのヒトメサンジウム増殖、オステオポンチン発現への抑制効果を検討した。
- (5) ヒト腎臓近位尿管上皮細胞 (RPTEC)で25mMの高糖条件TGF- $\beta$ 1 mRNAおよび蛋白発現、 $\alpha$ SMA発現を検討し、USF1阻害PIポリアミドの効果を検討した。
- (6) RPTECの25mMの高糖条件でのphalloidin染色、vimentin染色の形態変化に対するUSF1阻害PIポリアミドの効果を検討した。

## 4. 研究の成果

- (1) USF1 と PI ポリアミドのゲルシフトアッセイ：ターゲット DNA と USF1 が結合し(①②)、バンドが上方にシフトし(③④)、PI ポリアミド 2、3 添加すると、DNA と USF1 の結合が阻止された(⑤⑥)(図 1)。

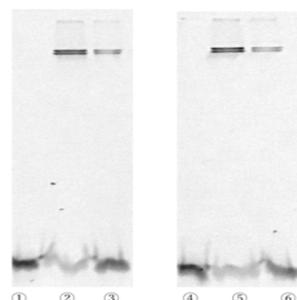


図1 ゲルシフトアッセイ

- (2) HMC で 24 時間の高糖刺激により TGF- $\beta$ 1 mRNA は有意に上昇し  $10^{-10}$  M PI ポリアミド 2, 3 投与下において TGF- $\beta$ 1 mRNA は有意 (\*:  $P < 0.05$ , \*\*:  $P < 0.01$ ) に低下を認めた (図 2)。

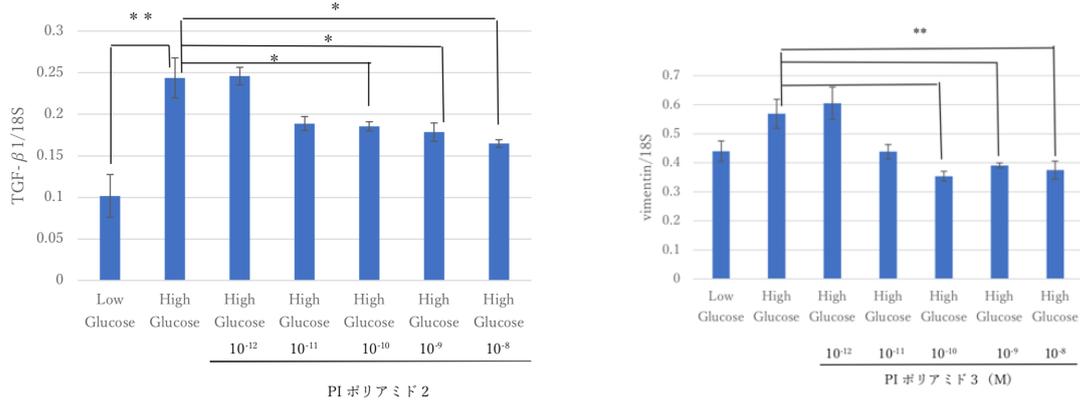


図 2 高糖刺激による TGF- $\beta$ 1 mRNA 発現

- (3) HMC で 24 時間の高糖刺激により TGF- $\beta$ 1 蛋白発現は有意に上昇し  $10^{-10}$  M PI ポリアミド 2, 3 投与下において TGF- $\beta$ 1 mRNA は有意 (\*:  $P < 0.05$ , \*\*:  $P < 0.01$ )に低下を認めた(図 3)。

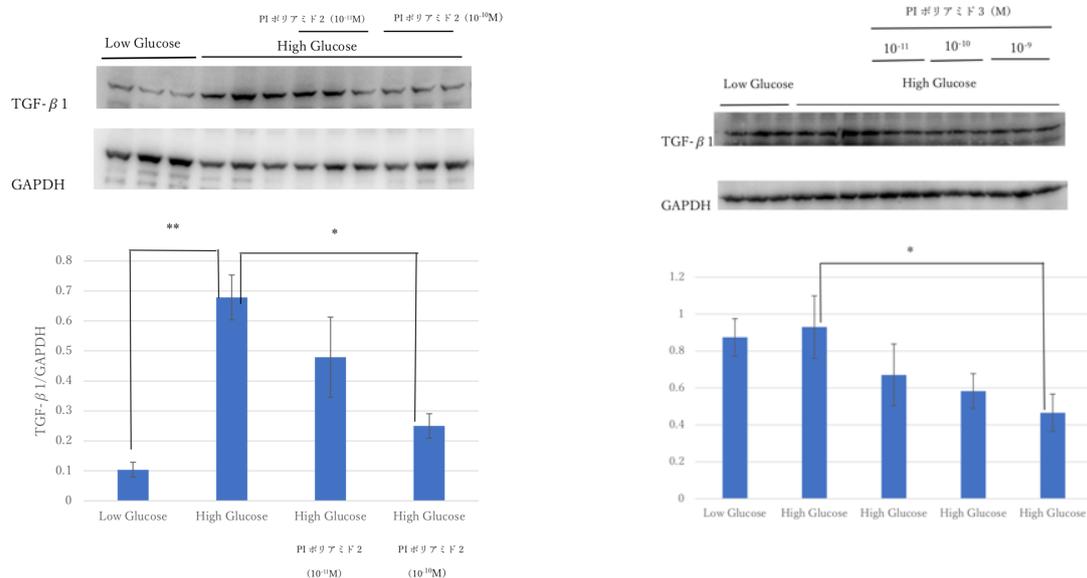


図 3 高糖刺激による TGF- $\beta$ 1 蛋白発現へのポリアミドの作用

- (4) HMC において高糖刺激により osteopontin は有意に上昇し  $10^{-12}$ ~ $10^{-9}$  M PI ポリアミドは有意に osteopontin mRNA の低下を認めた (図 4)。また WST-1 による増殖が増加し、 $10^{-8}$  M PI ポリアミドは有意 (\*:  $P < 0.05$ , \*\*:  $P < 0.01$ )に抑制した (図 5)。

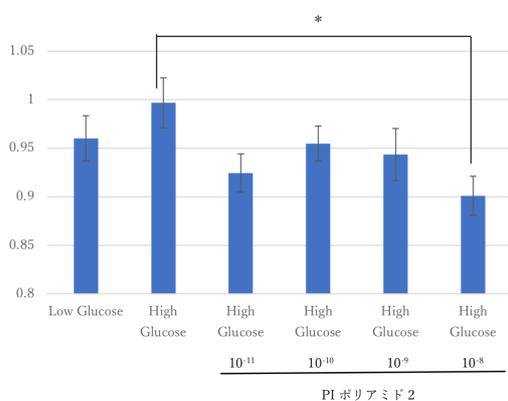


図 4 高糖刺激による osteopontin mRNA 発現へのポリアミドの作用

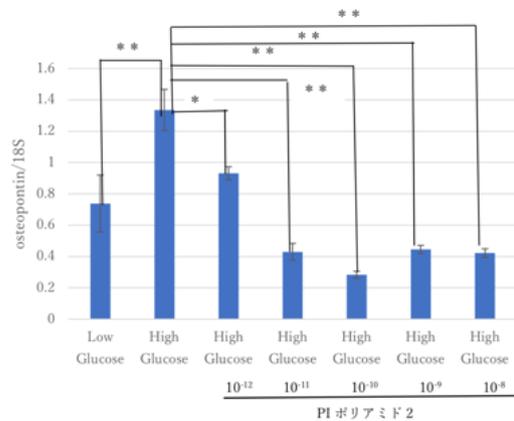


図 5 ポリアミドの細胞増殖への作用

- (5) PRTEC において高糖刺激により aSMA 発現が増加し、 $10^{-12}$ ~ $10^{-8}$  M PI ポリアミドは有意 (\*\*:  $P < 0.01$ ) に抑制した(図 6)。

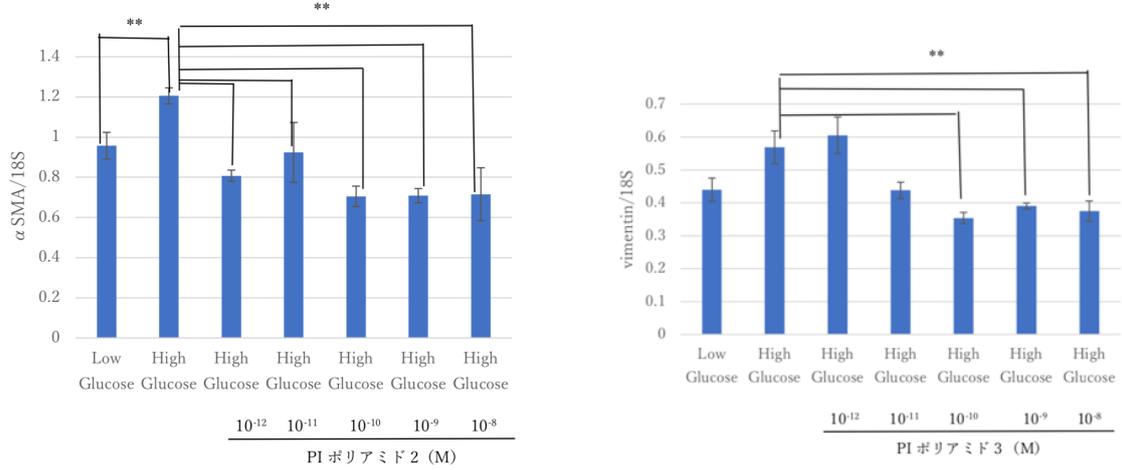


図6 高糖刺激による aSMA, vimentin mRNA 発現に対するポリアミドの作用

- (6) PRTEC において高糖刺激により TGF- $\beta$ 1, Vimentin mRNA 発現が増加し、 $10^{-10}$ ~ $10^{-8}$  M PI ポリアミド 3 は有意 (\*\*:  $P < 0.01$ ) に抑制した(図 7)。

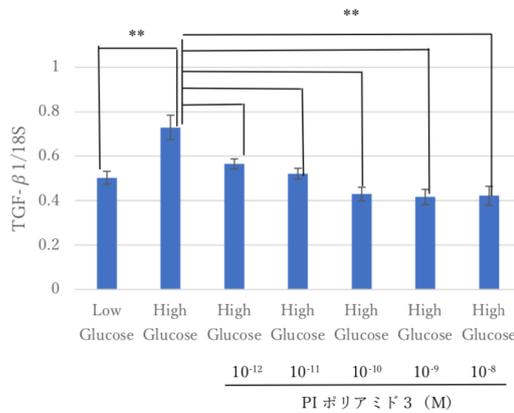


図7 高糖刺激による TGF- $\beta$ 1, Vimentin mRNA 発現に対するポリアミドの作用

- (7) 正常糖濃度で RPTEC は敷石状の形態であったが、高糖刺激した RPTEC は紡錘状の形態変化が観察された。PI ポリアミド 1、2 では敷石状の形態となった (図 8)。  
 (8) RPTEC の高糖刺激下で vimentin の染色性は増強され、PI ポリアミド 1、2 は vimentin の染色性の低下が認められた (図 9)。

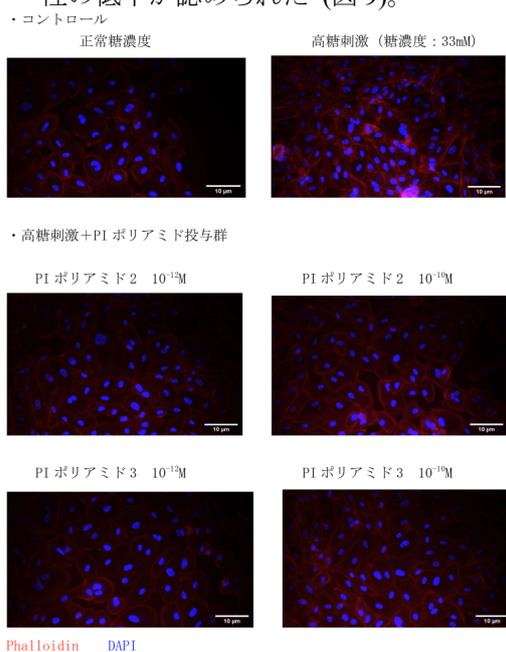


図8 正常糖濃度における RPTEC

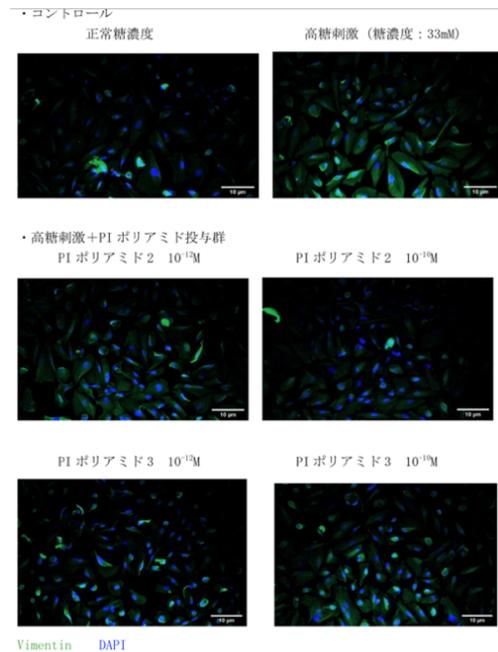


図9 高糖刺激における PRTEC

## 結論

糖尿病性腎症での糸球体硬化および腎臓線維化に転写因子USF1がTGF- $\beta$ 1を介して関与している事が証明された。さらにヒトUSF1阻害PIポリアミドは糖尿病性腎症の新規治療薬としての可能性が示された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4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 22
2. 論文標題 Transcriptional Suppression of Diabetic Nephropathy with Novel Gene Silencer Pyrrole-Imidazole Polyamides Preventing USF1 Binding to the TGF- $\beta$ 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
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 オープンアクセスとしている（また、その予定である）	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 オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Utsunomiya K, Maruyama T, Shimizu S, Matsumoto T, Endo M, Kobayashi H, Kano K, Abe M, Fukuda N	4. 巻 13; 319
2. 論文標題 Implantation of dedifferentiated fat cells ameliorated antineutrophil cytoplasmic antibody glomerulonephritis by immunosuppression and increases in tumor necrosis factor-stimulated gene-6	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Stem Cell Res Ther.	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） 10.1186/s13287-022-03014-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	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 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 オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 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 糖尿病性腎症に対する新規バイオ医薬USF1 PIポリアミドの効果
3. 学会等名 第63回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 秋谷友里恵、福田 昇、小林洋輝、常見明子、大野迪子、阿部雅紀
2. 発表標題 ヒト腎臓オルガノイドから糖尿病性腎症モデルの作成の試み
3. 学会等名 第65回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 秋谷友里恵、福田 昇、小林洋輝、常見明子、大野迪子、阿部雅紀
2. 発表標題 ヒト腎臓オルガノイドから糖尿病性腎症モデルの作成の試み
3. 学会等名 第65回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 福田 昇、大野迪子、常見明子、阿部雅紀、松本太郎
2. 発表標題 常染色体優性多発性嚢胞腎患者の疾患特異的iPS細胞からの腎臓オルガノイドを用いた嚢胞形成の評価
3. 学会等名 第20回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大野迪子、福田 昇、常見明子、Chen Lan、深澤みゆき、阿部雅紀
2. 発表標題 常染色体多発性嚢胞腎(ADPKD)疾患特異的iPS細胞からの腎臓オルガノイドを用いた嚢胞形成の評価
3. 学会等名 第64回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 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 糖尿病性腎症に対する新規バイオ医薬USF1 PIポリアミドの効果
3. 学会等名 第63回日本腎臓学会学術総会
4. 発表年 2020年

〔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	松本 宜明  (MATSUMOTO Yoshiaki)  (10199896)	日本大学・薬学部・教授   (32665)	
研究 分担者	福田 昇  (FUKUDA Noboru)  (40267050)	日本大学・総合科学研究所・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
---------	---------