

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：30108  
研究種目：基盤研究(C) (一般)  
研究期間：2020～2022  
課題番号：20K10434  
研究課題名(和文) 重金属毒性治療薬の開発を目指した糖尿病治療薬エパルレスタットの新規作用の解明  
  
研究課題名(英文) Elucidation of novel action of epalrestat for the development of therapeutic agents for heavy metal toxicity  
  
研究代表者  
立浪 良介 (Tatsunami, Ryosuke)  
  
北海道科学大学・薬学部・教授  
  
研究者番号：9028552  
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、糖尿病性神経障害治療薬であるエパルレスタットのカドミウム(Cd)誘導細胞毒性に対する影響を明らかにすることである。Cdによる細胞傷害をエパルレスタットが抑制し、その際に細胞内グルタチオン量が増大することを明らかにした。この抑制作用を転写因子Nrf2が制御していることを見出した。さらにエパルレスタットが、CdとCdトランスポーターZIP8、メタロチオネインの細胞内濃度に影響を与えることを明らかにした。以上の成果は、エパルレスタットによる転写因子Nrf2を介したグルタチオン、ZIP8、メタロチオネインの制御がCd中毒に対する有望な治療アプローチに繋がる可能性を示唆するものである。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、カドミウム誘導性の細胞傷害に対するエパルレスタットの抑制作用に検討した。今回の成果は、培養細胞による基礎研究の結果ではあるが、エパルレスタットが糖尿病性末梢神経障害のみならず、カドミウムなどの重金属中毒にも応用できる可能性を示唆している。臨床的にエパルレスタットの有用性を示すにはin vivo実験を含めたより詳細な検討が必要とされるが、本研究成果は、エパルレスタットのドラッグリパーバシングに繋がる基礎研究として、今後の適応拡大への可能性を示すものである。

研究成果の概要(英文)：Cadmium (Cd) is an environmental pollutant that targets the vascular endothelium. Recent studies have suggested a link between Cd and vascular disease, but the details of the mechanism are not clear. The aim of this study was to clarify the effect of epalrestat, a drug used in the treatment of diabetic neuropathy, on Cd-induced cytotoxicity. We revealed that epalrestat suppresses Cd-induced cell injury and increases intracellular glutathione levels. We also found that the transcription factor Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) regulates the above-mentioned inhibitory effect by using knockdown cells. Furthermore, this study revealed that epalrestat affects the intracellular concentrations of Cd and the Cd transporters ZIP8 and metallothionein. These results suggest that the regulation of glutathione, ZIP8, and metallothionein via the transcription factor Nrf2 by epalrestat may lead to a promising therapeutic approach for Cd poisoning.

研究分野：衛生薬学

キーワード：エパルレスタット カドミウム グルタチオン Nrf2

## 1. 研究開始当初の背景

カドミウム (Cd) は、土壌や水など環境中に広く存在している。米、野菜、畜産物、魚介類など多くの食品に含まれており、わが国では米から摂取する割合が最も多い。Cd は日本初の公害であるイタイタイ病の原因物質として知られている。現在の日本ではイタイタイ病患者はごく僅かであるが、中国やタイなどにおいて、産業汚水や環境汚染を原因とする Cd 中毒による健康への影響が懸念されている。特にタイでは、骨代謝異常や腎尿細管障害などの健康被害が判明している (Swaddiwudhipong, 2012)。しかしながら、Cd を含めた重金属毒性の治療には、特異的解毒薬が少なく対症療法が主に行われているのが現状である。解毒剤を利用した治療としては、EDTA によるキレート療法が中心となっているが EDTA には腎毒性が問題となっており、新規治療薬の開発が求められている。

Cd の毒性発現機構に関しては血管傷害が関与しており、特に血管内皮細胞の傷害を経て、臓器や組織に重篤な疾患を引き起こすことが明らかになってきている (Kaji, 2004 他)。一方、Cd 等の重金属毒性の抑制には、グルタチオン (GSH)、メタロチオネインおよび heme oxygenase-1 が重要であることが示されている (Ogasawara, 2014 他)。現在では、これらの抑制因子をターゲットとした新規治療薬の開発が期待されている。

近年、販売に至る新薬の数が年々減少しており、新薬開発の停滞を打開する方法として、ドラッグ・リポジショニングと呼ばれる研究概念がある。安全性が確認されている既存医薬品の新たな薬理作用を発見し、別の疾患治療に応用する研究手法である。エパルレストアット (EPS) は、日本で開発された糖尿病性末梢神経障害治療薬である。アルドース還元酵素を阻害することにより、糖尿病性末梢神経障害を改善する医薬品として 1992 年より発売使用されている。申請者らは、培養細胞において、EPS による転写因子 Nrf2 の活性化を介した GSH 生合成能の増大および heme oxygenase-1 の発現増大を見出している。この知見が、Cd 毒性の抑制に繋がることが期待される。

## 2. 研究の目的

申請者は、これまでにシュワン細胞や血管内皮細胞を用いて、糖尿病性末梢神経障害治療薬である EPS が、転写因子 Nrf2 の活性化を介して GSH 量を増大させ、酸化ストレス誘導性の細胞毒性を抑制することを明らかにしている。しかし、EPS による Cd などの重金属毒性に対する防御機構の詳細は明らかではない。本研究課題の目的は、EPS が Cd の毒性発現を防御できるか、さらに、その作用機序を解明することである。

前述したように、昨今の新薬開発の停滞を打開する方法として、ドラッグ・リポジショニングと呼ばれる新しい研究概念がある。ヒトで安全性と体内動態が確認されている既存医薬品の新規作用メカニズムを網羅的に解析して、新たな薬理作用を発見し別の疾患治療薬に応用する研究手法である。本研究テーマの特色・独創性は、既存の糖尿病治療薬を、重金属中毒の新規治療薬として役立てるという点にある。また、重金属中毒に応用できない場合に関しても、GSH は生体内の主要な抗酸化物質であり、酸化ストレスが発症・進展に関わる心疾患やがんなど多くの疾患の治療に対して、本研究の成果は有益であると考えている。

## 3. 研究の方法

### Cd 誘導性酸化ストレスに対する EPS の影響

Cd の毒性発現には、細胞内 GSH の枯渇と活性酸素の産生に起因する酸化ストレスが関与すると考えられている。最初に Cd による酸化ストレスを EPS が抑制するかどうかを明らかにする。具体的には、Cd による GSH の枯渇、活性酸素の産生に対する EPS の影響について調べる。細胞内 GSH 量は、DTNB 酵素リサイクリング法により測定し、活性酸素種レベルは、蛍光プローブを用いて共焦点レーザー顕微鏡およびフローサイトメーターにより測定する。

## EPS による細胞内への Cd 取り込みの抑制

血管内皮細胞が Cd に曝露されると、亜鉛トランスポーター (ZIP8) の発現誘導が起こり、ZIP8 を介して Cd が細胞内へ蓄積されることが実証されている。EPS が Cd による ZIP8 発現誘導を抑制するかどうかを明らかにする。また、細胞内 Cd 蓄積量を測定して検証する。ZIP8 の mRNA 発現量は real-time RT-PCR 法により、タンパク質発現量はウエスタンブロット法により測定する。細胞内 Cd 蓄積量は原子吸光光度法により測定する。

## EPS による細胞外への Cd の排出促進

細胞内において Cd は GSH と複合体を形成する。この複合体形成は GSH 転移酵素により触媒され、次いで GSH 抱合体を輸送する薬物トランスポーター MRP1 により細胞外へ排出される。GSH 転移酵素および MRP1 はいずれも Nrf2 制御タンパク質である。GSH 転移酵素および MRP1 に対する EPS の影響について検討する。GSH 転移酵素および MRP1 の mRNA 発現量は real-time RT-PCR 法により、タンパク質発現量はウエスタンブロット法により測定する。

## EPS による Cd 毒性抑制に対する Nrf2 の関与

上記 EPS の作用と Nrf2 との関連性について、Nrf2 ノックダウン細胞を用いて検討する。siRNA により Nrf2 をノックダウンする。mRNA 発現量は real-time RT-PCR 法により、タンパク質発現量はウエスタンブロット法により測定する。

## 4. 研究成果

血管内皮の機能障害や損傷は、標的臓器の実質細胞における毒性に影響を与えている。申請者は、EPS が Nrf2 の活性化を介して GCL をアップレギュレートすることにより、血管内皮細胞の GSH レベルを増加させることを見出している。本研究課題では、最初に血管内皮細胞を用い、Cd 誘発細胞毒性に対する EPS の効果を検討した。Cd による LDH 漏出は、EPS による前処理により、ほぼ完全に抑制された (図 1A)。ブチオニンスルホキシミン (BSO) による細胞内 GSH の枯渇は、Cd 毒性を悪化させた (図 1B)。これらの結果は、GSH が Cd による細胞毒性に対して保護的な役割を果たしていることを示している。

GCL は、GSH 合成の律速段階を触媒する酵素である。GCL mRNA と GSH レベルを測定したところ、EPS は細胞内 GSH レベルと GCL mRNA レベルを増加させた。GCL の mRNA レベルの増加は、Cd 曝露後の未処理細胞および EPS 処理細胞の両方で観察された。Cd 曝露は GSH レベルを有意に減少させた。GCL および GSH レベルに対する Cd の影響は、Cd 曝露による GSH 消費を反映している。Nrf2 siRNA を用いたノックダウン細胞においては、Cd 毒性に対する EPS の抑制作用が消失した (図 2A)。

次に細胞内 Cd レベルを測定したところ、図 3A に示すように EPS の前処理により、細胞内 Cd レベルが低下した。また、Cd の細胞内取り込みに関与する ZIP8 レベルに対する EPS の影響を検討したところ、EPS 前処理により Cd によって誘導された ZIP8 mRNA レベルの増加を抑制した (図 3B)。Cd などの重金属毒性の抑制に関わるメタロチオネイン (MT) に対する EPS の影響を検討したところ、EPS により MT の mRNA とタンパク質レベルが上昇した (図 4A および 4B)。また Cd と GSH による複合体形成に関わる GSH 転移酵素は EPS により増大したが、複合体排泄に関与する MRP1 に対しては EPS は影響を与えなかった。

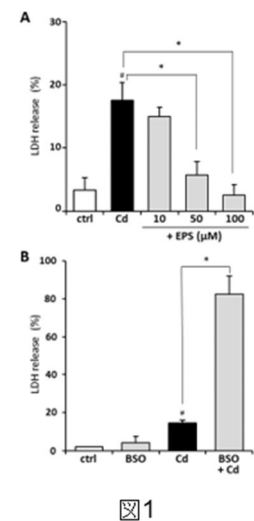


図 1

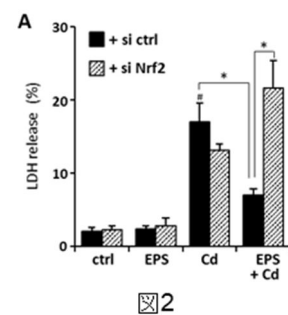


図 2

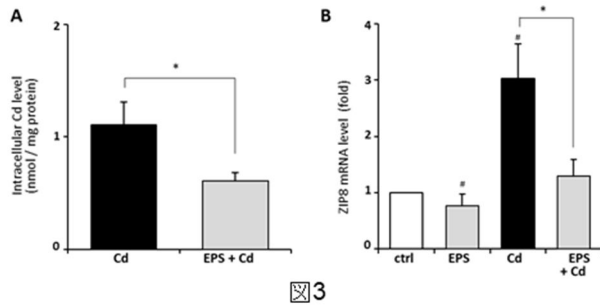


図3

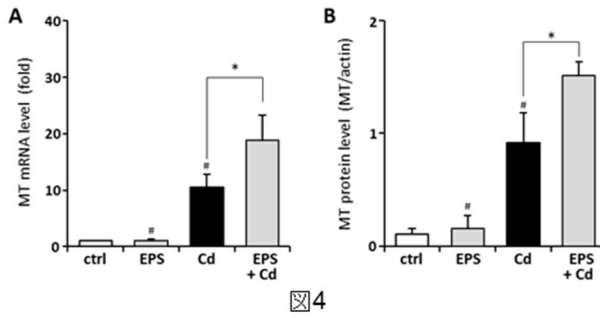


図4

本研究課題から、EPS が Cd 誘発細胞毒性を防御することが示された。GSH は Cd の細胞毒性に対して防御的な役割を果たしている。そのメカニズムには、Nrf2 を介した GSH のアップレギュレーションが関与していると考えられる。さらに、Nrf2 ノックダウン細胞を用いた検討から、Nrf2 が Cd 毒性に対する EPS の抑制作用に関与していることが示された。これらの結果から、EPS は Nrf2 を介して GSH レベルを増加させることで、Cd 毒性を抑制することが示唆される。Cd による細胞毒性は、細胞内の Cd レベルに依存することが知られている。EPS による前処理が細胞内の Cd 蓄積量を減少させたことから、EPS による Cd 毒性の抑制に関与していると考えられる。内皮細胞における ZIP8 発現が Cd 毒性に重要であることが知られており、本研究課題の結果は ZIP8 mRNA レベルに対する EPS の作用が Cd 細胞毒性の抑制に寄与している可能性を示している。GSH 以外に MT も、Cd などの重金属毒性に対する防御因子である。Cd 曝露は MT の mRNA およびタンパク質レベルを上昇させ、EPS 前処理は MT レベルをさらに上昇させた。

本研究課題において、EPS が Nrf2 経路と関連して Cd 誘発細胞毒性を抑制することが示された。EPS による細胞毒性抑制には、GSH のアップレギュレーションが関与している。これらの結果から、EPS による GSH、ZIP8、MT の制御が、Cd 中毒の治療法として有望であることが示唆された。

## 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 1件 / うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Sato Keisuke, Tatsunami Ryosuke, Wakame Koji	4. 巻 49
2. 論文標題 Epalrestat suppresses inflammatory response in LPS-stimulated RAW264.7 cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Allergologia et Immunopathologia	6. 最初と最後の頁 1~8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15586/aei.v49i5.102	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 Tatsunami Ryosuke, Murao Yu, Sato Keisuke	4. 巻 140
2. 論文標題 Protective Effect of Epalrestat against Oxidative Stress-induced Cytotoxicity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 YAKUGAKU ZASSHI	6. 最初と最後の頁 1381~1388
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/yakushi.20-00167	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 Tatsunami Ryosuke, Sato Keisuke, Murao Yu, Yama Kaori, Yu Yang, Ohno Shun, Tampo Yoshiko	4. 巻 21
2. 論文標題 Epalrestat suppresses cadmium-induced cytotoxicity through Nrf2 in endothelial cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Experimental and Therapeutic Medicine	6. 最初と最後の頁 393
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/etm.2021.9824	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 該当する
1. 著者名 Sato Keisuke, Tatsunami Ryosuke, Wakame Koji	4. 巻 in press
2. 論文標題 Epalrestat suppresses inflammatory response in LPS-stimulated RAW264.7 cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Allergologia et Immunopathologia	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 太田夏樹、遠藤翔也、渡部結容乃、佐藤恵亮、立浪良介
2. 発表標題 細胞内外におけるカドミウム毒性抑制機構の開発
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 熊野英里奈、佐藤恵亮、立浪良介
2. 発表標題 血管内皮細胞におけるカドミウム誘導細胞傷害に対する GGT 阻害剤の影響
3. 学会等名 フォーラム2020衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 立浪良介、菅原つばさ、佐藤恵亮
2. 発表標題 RAW264.7細胞におけるLPS誘導炎症反応に対するエパルレストットの影響
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤恵亮、伊藤麻菜絵、遠藤翔也、木藤壱真、立浪良介
2. 発表標題 抗がん剤による細胞障害に対するオートファジー阻害剤の影響
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021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	佐藤 恵亮  (Sato Keisuke)  (60733946)	北海道科学大学・薬学部・講師    (30108)	

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
---------	---------