

令和 6 年 4 月 26 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08229

研究課題名（和文）オートファジーに着目した糖尿病性腎臓病治療薬の開発

研究課題名（英文）Development of therapeutic agents for diabetic kidney disease focusing on autophagy

研究代表者

山原 真子（Yamahara, Mako）

滋賀医科大学・医学部・特任講師

研究者番号：70731941

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）：糖尿病性腎臓病（DKD）患者は増加し、病態も多様化しており、新たな治療法の開発が必要である。糖尿病では、種々の細胞で細胞内恒常性維持機構であるオートファジーの活性が低下しており、これを活性化することが多様化したDKDの治療標的になると考えた。オートファジー関連蛋白の転写因子であるTFEBを活性化させる化合物Xを同定し、糖尿病モデルマウスに投与した。残念ながら動物実験では十分はオートファジー活性化を惹起せず、腎障害を改善させなかった。現在遺伝子改変マウスを用いてTFEBの活性化がDKDに及ぼす効果を検証中であり、今後の研究結果によりDKDの新たな治療標的となる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病性腎臓病（DKD）は、長らく我が国の透析導入原疾患の第1位であり、新たな治療法の確立が求められている。近年、DKDの病態は高齢化社会を背景に多様化しており、その治療標的も複雑になってきている。これまで我々は細胞内浄化機構の一つであるオートファジーが多様なDKDのいずれの病態においても重要であることを報告してきた。本研究では、より安全なオートファジー活性化薬として新たに化合物を同定し、治療法となり得るか検証を実施した。今後の研究結果により、オートファジー関連蛋白の転写因子であるTFEB活性化による治療効果が明らかになれば、治療抵抗性のDKDに対する新たな治療戦略になると考えられる。

研究成果の概要（英文）：The number of patients with diabetic kidney disease (DKD) is increasing and its pathogenesis is diversifying, requiring the development of new treatment strategies. It has been shown that autophagy is important for the maintenance of cellular homeostasis in many cells. In diabetes, autophagy activity is reduced in various cells, and activation of autophagy is considered a therapeutic target. In this study, we identified a compound X that activates TFEB, a transcription factor for autophagy-related proteins, and administered it to diabetic mouse models. Unfortunately, in animal experiments, it did not induce sufficient autophagy activation and did not improve renal damage. We are currently investigating the effects of TFEB activation on DKD using transgenic mice, and the results of future studies may lead to the establishment of a new therapeutic target for DKD.

研究分野：糖尿病性腎臓病

キーワード：糖尿病性腎臓病 オートファジー

1. 研究開始当初の背景

糖尿病性腎臓病は我が国の透析導入原疾患の第一位の疾患であり、新規治療法の開発が求められている。糖尿病性腎臓病の病態は、高齢化や肥満患者の増加を背景に多様化しており、ポドサイト障害に起因した高度蛋白尿、それに付随する尿細管障害、加齢や肥満を背景とする動脈硬化に起因した尿細管障害が、糖尿病患者の腎予後悪化に関わることが示唆されている。現在、このような多様な病態に共通した病態の探索、治療法の開発が望まれている。「オートファジー」は細胞内の浄化機構であり、細胞の飢餓時や障害ストレス時に活性化を受け、細胞内恒常性維持をもたらす。我々はこれまでに、上記の種々の病態進展にポドサイトや尿細管細胞でのオートファジー活性の減弱が関わること、その再活性化が新規治療となる可能性を見出してきた。

オートファジー機構は細胞内栄養シグナルによりその活性が調節されている。そのうちのひとつ mTORC1 シグナルはオートファジーを負に調節するリン酸化酵素複合体であり、糖尿病状態で異常活性化され、多くの臓器において細胞障害を来すことが報告されている。しかしながら、mTORC1 シグナルは元来、摂食時の細胞機能維持、増殖など多くの生命活動に関わるものであり、その過度な抑制もまた、細胞障害を引き起こすことが知られている。実際に mTORC1 抑制薬として働くラパマイシンの投与により、マウスならびにヒトにおけるポドサイト障害、蛋白尿の出現という副作用が報告されている。つまり、糖尿病状態での腎臓におけるオートファジーの活性化には mTORC1 の抑制が一つの治療標的となり得るが、その一方で、ポドサイト障害という副作用の懸念があり、mTORC1 抑制を介さないオートファジー活性化薬の開発が必要と考えられる。

そこで申請者は共同研究者らとともに、mTORC1 非依存的なオートファジー活性化薬の探索に着手した。mTORC1 により負に制御される転写因子 TFEB がオートファジー活性化に必要な転写因子であることに着目し、mTORC1 抑制介さずに TFEB を活性化する薬剤のスクリーニングを、化合物ライブラリー (計 73,992 化合物) を用い以下の手順で探索した。

1) 培養細胞を用い、転写因子 TFEB の細胞質から核内移行 (活性化) を標的とした核内移行イメージング系の確立し、高い TFEB 移行作用をもつ 117 個の化合物を同定した。

2) 次に市販の mTORC1 活性 Assay Kit を使用し、117 個の化合物の中から、mTORC1 を抑制しない 67 個の化合物を同定した。

3) 培養細胞を用いたオートファジー活性化の評価、構造評価、並びに、マウス投与実験による血中濃度の評価から、治療薬として可能性のある化合物を一つ同定することに成功した。この化合物は生理活性やその作用など過去に報告がないため、ここでは『化合物 X』とする。

本研究では、糖尿病性腎臓病に対する新規治療薬の開発を目的に、化合物ライブラリーを用いた新規オートファジー活性化薬の探索を行い、その有効性と安全性を、動物モデルを用いた前臨床試験にて検証する。

2. 研究の目的

新規同定したオートファジー活性化剤 (化合物 X) が多様化する糖尿病性腎臓病に対する新規治療薬となりえるかを、各種動物モデルを用いて検証する。

3. 研究の方法

実験 1) 糖尿病性腎臓病におけるポドサイト障害、高度蛋白尿に対する化合物 X の効果

高度蛋白尿を伴う肥満 2 型糖尿病モデル動物として db/db マウスを使用する。この動物モデルでは、ポドサイトにおけるオートファジー不全と mTORC1 異常活性化が確認できている。

<目的> 化合物 X の投与が、db/db マウスにおいて、ポドサイトの mTORC1 活性を抑制することなく、オートファジー活性化を伴う蛋白尿の減少をもたらすかを検証する。

実験 2) 肥満 2 型糖尿病に伴う蛋白尿誘導性尿細管障害増悪に対する化合物 X の効果

高脂肪食肥満 2 型糖尿病マウスに対するアルブミン (BSA) 腹腔内投与モデルを用いる。本モデルでは、蛋白尿による尿細管障害が肥満 2 型糖尿病で増悪し、その背景に近位尿細管細胞の mTORC1 活性化亢進によるオートファジー不全があることを報告している (JASN 2013)。

<目的> 化合物 X の投与が、尿細管細胞の mTORC1 活性を抑制することなく、オートファジーの活性化をもたらす、蛋白尿による尿細管障害の増悪を予防しえるかを検証する。

実験 3) 肥満 2 型糖尿病・動脈硬化による尿細管障害、腎機能障害に対する化合物 X の効果

肥満糖尿病と動脈硬化を伴う腎障害モデルとして高脂肪食負荷 ApoE 欠損マウスを使用する。申請者らは、このモデルが肥満、高血糖、肥満を伴う動脈硬化関連腎障害を呈すること、この障害の背景に mTORC1 の亢進が関与していることを報告した (Cell Metabolism 2020)。更に、このモデルでの尿細管細胞オートファジー活性の低下も確認している。

<目的> 化合物 X の投与が、尿細管細胞の mTORC1 活性を抑制することなく、オートファジーの活性化をもたらす、動脈硬化関連腎障害を抑制しうるかを検証する。

実験 4) 腎老化に対する化合物 X の効果の検証

腎老化進展にオートファジー活性低下が関与することを報告している (J Clin Invest. 2010)。
<目的> マウス 12 ヶ月齢から 1 年間の化合物 X の投与が、オートファジー活性化を伴い、腎老化を抑制しうるかを検証する。また、他臓器における長期投与の安全性評価も同時に行う。

実験 5) 化合物 X の腎保護機構におけるオートファジー、TFEB の関与の検証

<目的> 化合物 X が腎保護効果を示した場合、過去の実験で使用してきたポドサイト特異的オートファジー (Atg5) 欠損マウス、尿細管特異的オートファジー欠損マウス、また新たに作製中のポドサイト特異的 TFEB 欠損マウス、尿細管特異的 TFEB 欠損マウスを用い、化合物 X の腎保護効果が、これらオートファジー欠損、TFEB 欠損マウスで消失するかを検証する。

実験 6) カニクイザルを用いた安全性評価

<目的> よりヒトに近いカニクイザルへの化合物 X 投与を行い、行動・代謝評価、血液検査、尿検査による安全性評価を行う。

4. 研究成果

結果 1) 糖尿病性腎臓病におけるポドサイト障害、高度蛋白尿に対する化合物 X の効果

化合物ライブラリーより同定した化合物 X についてマウスへの投与と実験を実施した。まずは化合物 X の単回投与による血中濃度の推移や副作用についての評価をおこなった。その結果、化合物 X を 10mg/kg および 30mg/kg で経口投与すると投与後 1 時間で血中濃度のピークを認め、4 時間後には投与前濃度まで低下を認めた。単回投与において副作用は認めなかった。このため、化合物 X を 10mg/kg および 30mg/kg の用量で連日経口投与を行うこととした。

この化合物 X を糖尿病モデルマウスである db/db マウスに 16 週間投与を行い、腎組織評価および尿蛋白量について評価を行った。その結果、化合物 X の投与により尿蛋白量に変化は認めなかった。腎組織の染色により、化合物 X は db/db でみられるポドサイトでの mTORC1 亢進を抑制しなかったが、P62 染色によるオートファジー活性の評価において、オートファジーの活性も変化させていなかった。また、化合物 X の高容量 16 週間投与において、明らかな副作用などは認めなかった。

以上の結果から、化合物 X は、in vitro において mTORC1 抑制を介さずに TFEB およびオートファジーを活性化させたが、in vivo においては P62 の蓄積減少といった、十分なオートファジー活性化を認めず、尿アルブミン尿排泄量の改善に代表される腎保護効果を示さなかった (図 1、2)。現在、他の新たな候補化合物の検索を行っている。

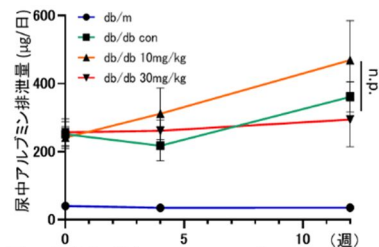


図1. 化合物X投与によるdb/dbマウスにおける尿中アルブミン排泄量の推移
化合物Xの投与により尿中アルブミン排泄量に改善を認めなかった。

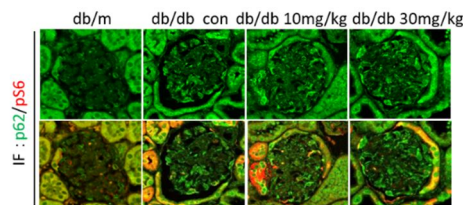


図2. 化合物X投与によるdb/dbマウスにおけるオートファジー活性とmTORC1活性
化合物Xの投与によりdb/dbマウス糸球体でのmTORC1活性化 (p56亢進)およびオートファジー活性低下 (P62蓄積)に変化を認めなかった。

この結果を受け、予定していた実験 2 ~ 6 について未実施となっている。その代わりに、オートファジー活性化が報告されている既存の化合物について、その活性化機序および腎保護効果について検証することとし、以下の研究を実施した。

結果 2) 既存のオートファジー活性化薬スベルミジンの糖尿病モデルマウスへの腎保護効果

これまでにオートファジー活性が報告されているスベルミジンについて、db/db マウスへ投与する検討を行った。スベルミジンは内因性のポリアミンで、これまでにオートファジーを活性化させることや、線虫など下等動物での寿命延長効果が認められることなどが報告されている。また、スベルミジンは TFEB を活性化させるとの報告もある (Zhang H, et al. Mol Cell. 2019)。

そこで、まずは、スベルミジンの 4 週間経口投与により、オートファジーの活性化を認めるかを、オートファジー活性を評価する GFP-LC3 マウスを用いて検討を行った。その結果、スベルミジン投与により、ポドサイトにおける GFP ドットシグナルの数、すなわちオートファゴソームの増加を認め、オートファジーの活性化傾向を認めた。そこで、同量のスベルミジンを db/db マウスに投与することとした。投与開始後 4 週間においては db/db マウスにおける尿蛋白の軽減効果を認めしたが、投与を継続した 12 週による長期投与では、db/db マウスにお

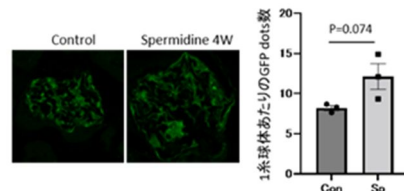


図3. スベルミジン投与によるオートファジー活性化
スベルミジン投与により糸球体でのオートファジー活性 (GFP dots数で示される)は上昇傾向にある。

いて肥満の増悪、尿蛋白の増悪などの影響を認めた。このため、現在これらの現象における機序解明を行っている。

また、スペルミジンによる TFEB の活性化について TFEB の核内移行を染色で評価した結果、スペルミジンによる TFEB の核内移行亢進は認めなかった。以上のことから、スペルミジンは短期的にはポドサイトのオートファジーを活性化させる可能性があるが、これは TFEB の活性化を介したものは不明であり、長期的なスペルミジン投与は、db/db マウスにとって腎保護効果を有さないことが明らかとなった。

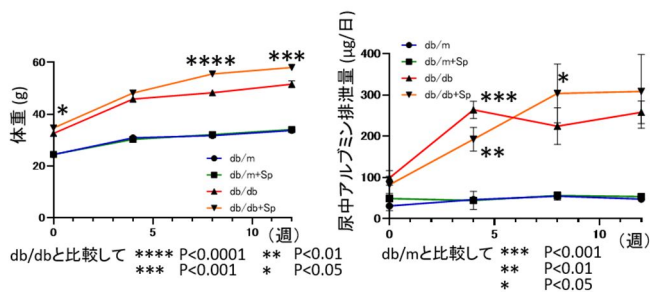


図4. スペルミジン投与によるdb/dbの体重と尿アルブミン排泄量の推移
 スペルミジン投与12週よりdb/dbの体重が有意に増加し、尿中アルブミン排泄量は4週では改善傾向にあったが、12週時には改善効果が消失した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Yasuada-Yamahara M.
2. 発表標題 Role of the lysosomal transcription factor TFEB in podocyte injury in diabetic kidney disease.
3. 学会等名 International Congress of Diabetes and Metabolism. (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山原 真子
2. 発表標題 『腎生100年』を目指した腎臓基礎研究の課題
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山原 真子、桑形 尚吾、山原 康佑、佐々木 裕紀、金崎 雅美、久米 真司、前川 聡
2. 発表標題 リソソーム転写因子TFEBの活性化は糖尿病性腎臓病のポドサイト障害を抑制する
3. 学会等名 第65回日本腎臓学会総会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yasuada-Yamahara M
2. 発表標題 Role of the lysosomal transcription factor TFEB in podocyte injury in diabetic kidney disease.
3. 学会等名 The 19th Japan-Korea Diabetic Nephropathy Seminar. (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山原 真子, 久米真司, 荒木信一, 前川聡
2. 発表標題 糖尿病性腎臓病でのポドサイト障害におけるリソソーム転写因子TFEBの役割
3. 学会等名 第32回日本糖尿病性腎症研究会
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
---------------------------	-----------------------	----

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