

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 22 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591216

研究課題名(和文)腎炎に対する新規遺伝子制御薬PIポリアミドの開発

研究課題名(英文)Development of PI polyamide targeting FcRg for nephritis

研究代表者

松本 紘一 (MATSUMOTO, Koichi)

日本大学・医学部・教授

研究者番号：00125064

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：Fc受容体鎖(Fcγ1g)はFc受容体共通ドメインを構成するサブユニットであり、自己免疫性疾患で主要な役割を担う。今回Fc受容体鎖発現を抑制するPIポリアミドの開発を試みた。培養細胞(J774A.1)においてPIポリアミドは濃度依存性Fcγ1g mRNA発現を抑制した。Fc受容体鎖に対するPIポリアミドはFcγ1gが関連するLupus腎炎などの疾患の治療薬として期待出来ることが示唆された。さらにループス腎炎モデルにSyc阻害剤R406およびFcR鎖PIポリアミドを経静脈投与し腎炎の抑制を認めた。今後FcR鎖に対するPIポリアミドを免疫性腎炎の治療薬としての創薬開発につなげる。

研究成果の概要(英文)：FcR chain (Fcγ1g) is a common intra cellular subunit of Fc receptors, which is involved in the autoimmune diseases. We synthesized a novel gene silencer PI polyamide targeting FcR chain for the immunological nephritis. In in vitro experiments, the PI polyamide targeting FcR chain inhibited expression of FcR chain mRNA and FcR chain promoter activity in cultured J774A.1 cells. In in vivo experiments, iv administered PI polyamide targeting FcR chain suppressed CD16/32 positive cells. Moreover, Syc inhibitor R406 suppressed glomerulonephritis in the anti-GBM antibody-induced nephritis and lupus nephropathy in SLE model mouse. We will further develop the PI polyamides targeting FcR chain as potential therapeutic agents for immunological nephritis.

研究分野：腎臓内科

キーワード：Fc受容体 ピロール・イミダゾールポリアミド 全身性エリテマトーデス 腎炎 遺伝子治療

## 1. 研究開始当初の背景

PI ポリアミドは抗生物質から発見された低分子有機化合物で、転写因子と同等の結合力で2本鎖DNAに塩基配列特異的に結合し、転写因子結合を阻害することで遺伝子の抑制効果を任意に調節することができる。また生体内投与においてDDSを必要とせず、新規医薬として期待される。日本大学では、PI ポリアミドを用いて、進行性腎障害の新規治療法開発の目的で遺伝子制御薬の開発を行っており、TGF- $\beta$ 1 に対するPI ポリアミドはターゲットDNAに特異的かつ強固に結合し、静脈投与で腎臓、肝臓、動脈、肺などの核に取り込まれた。また進行性腎障害モデルラットに長期に投与しても副作用も無く、腎内TGF- $\beta$ 1発現を著明に低下し、尿蛋白を減少し、腎機能を改善した(*J Pharmacol Exp Ther* 2005, *J Am Soc Nephrol* 2006, *Kidney Int* 2011)。

ループス腎炎、ANCA関連腎炎に対しての特異的で有効な治療法はない。最近、自己免疫疾患の発症に免疫グロブリンFc受容体が関与していることが明らかとなり、SLEの血管炎やループス腎炎の発症にFcR $\gamma$ 鎖が関与している事が確認された。したがってFcR $\gamma$ 鎖に対する新規治療薬の開発が期待された。

## 2. 研究の目的

FcR $\gamma$ 鎖に対するPI ポリアミドを分子設計、独自に合成し、in vitroでPI ポリアミドのFcR $\gamma$ 鎖遺伝子の発現抑制を確認する。次にin vivoで、免疫性腎炎モデルマウスでの腎障害への抑制効果、さらにFc受容体シグナルであるSycリン酸化阻害剤R406の免疫性腎炎への抑制作用との比較検討する。これらの結果を基に、FcR $\gamma$ 鎖に対するPI ポリアミドを免疫性腎炎の治療

薬としての創薬開発につなげる。

## 3. 研究の方法

### (1)FcR $\gamma$ 鎖に対するPI ポリアミドを設計と合成からIn vitro実験

Fc $\alpha$ 1 $\beta$  遺伝子プロモーター解析により、基本転写に影響する領域を選択し、この領域に対し結合するPI ポリアミドを設計し島津製ペプチド合成機PSSM-8にて合成し、ターゲットFc $\alpha$ 1 $\beta$  遺伝子プロモーターdsDNAに対しGel shift assayを行った。培養細胞(J774A.1)においてPI ポリアミドのFc $\alpha$ 1 $\beta$  mRNA発現に対する作用を検討した。

### (2)NZB/W F1 マウスに対するSyk阻害薬のLupus腎炎に対する効果

NZB/W F1 マウスに対してSyk阻害薬(R406)を0.5%メチルセルロースに懸濁し5mg/kgの濃度で2週間、週6日、1日2回の経口投与を行った。2週間毎に24時間の畜尿を行い、1日尿蛋白量の測定を行った。20週後(36週齢)に心臓採血を行い、腎臓、脾臓の摘出を行った。IgG、C3の発現を検討するため、腎臓組織の凍結切片を薄切固定した。Mouse IgG、C3の免疫蛍光染色を行った。組織mRNA発現のリアルタイムRT-PCRにてMCP-1、TGF- $\beta$ 1、endothelin-1、nephricin、podocinを測定した。nephricin、podocin、FcRnの蛋白発現をWestern blotにて評価した。

### (3)3BP2のリン酸化の検討

凍結した脾臓組織からホスファターゼ阻害薬含むRIPA bufferを用いて白血球を抽出した。1次抗体として3BP2 antibodyを添加し、4℃で12時間インキュベートした。TBSTで5分3回、10分1回洗浄後、2次抗体としてrabbit anti-goat IgGを添加し、

室温で1時間インキュベートした。TBSTで5分3回、10分1回洗浄後、発色し撮影した。

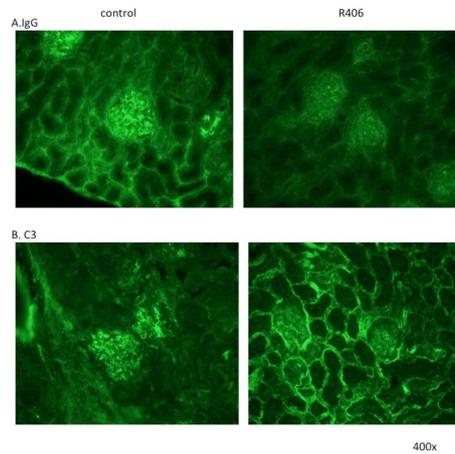
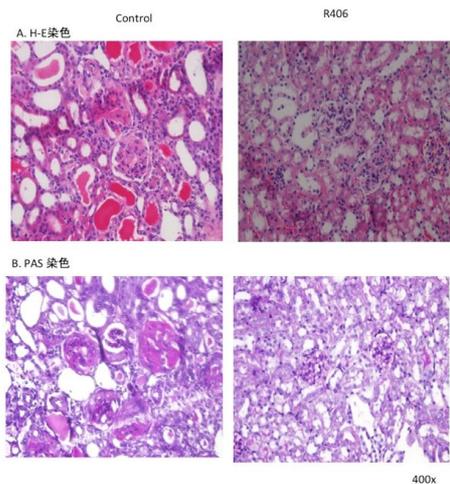
p-38MAPK のリン酸化について検討するため、12.5%ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動を施行し、一次抗体として rabbit phospho-p38 MAP kinase antibody を添加した。

#### 4. 研究成果

##### (1)FcR $\gamma$ 鎖に対する PI ポリアミドの In vitro 実験

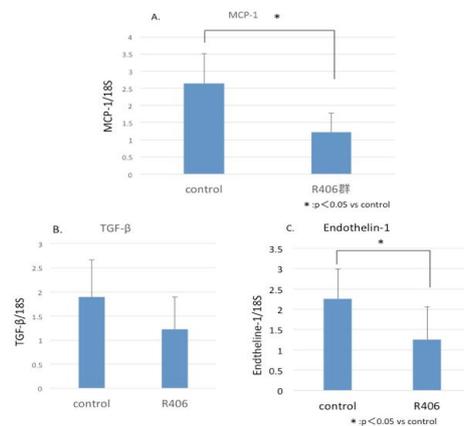
Gel shift assay にてターゲット Fc $\epsilon$ 1g 遺伝子プロモーターdsDNA への結合を確認した。培養細胞 (J774A.1) において PI ポリアミドは濃度依存性に Fc $\epsilon$ 1gmRNA 発現を抑制した (1 $\mu$ M で 51.8%)。

##### (2)腎臓の組織変化を確認するために HE および PAS 染色を行った。

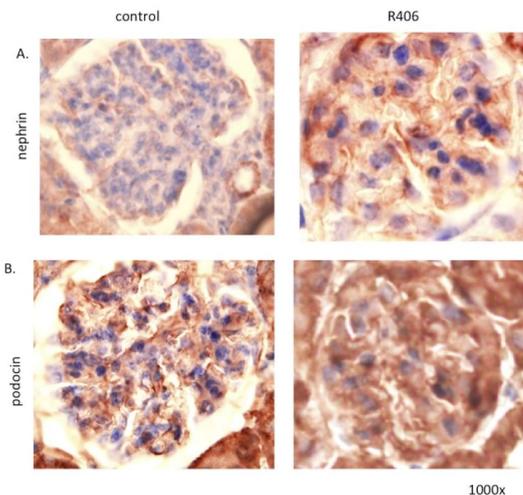


NZB/W F1 マウスは 36 週齢において糸球体メサンギウム領域を中心に IgG、C3 の沈着を認めたが、R406 投与群では群で沈着が抑制されていた。

R406 投与群ではコントロール群に比べて、MCP-1、TGF- $\beta$ 、Endothelin-1 の mRNA が有意に抑制されていた。



(3)R406 投与群ではコントロール群に比べて、ネフリン mRNA は有意に抑制されていた。ポドシン mRNA も R406 群でコントロール群と比べ低下傾向は認められたが有意差は認めなかった。ネフリンは R406 群ではコントロール群と比べタンパク量の増加傾向を認めた。ポドシンにおいても R406 群でコントロール群と比べタンパク量の増加を認めた。また、腎臓組織の免疫染色を行いネフリン、ポドシンの発現を検討したところ、ネフリンポドシン共にコントロール群と比べ R406 群において良好な染色性を認め、Western blotting と同様の傾向であった。



(4)3BP2 は Syk によりリン酸化されエフェクタータンパクへシグナルを伝える、このため 3BP2 のリン酸化について検討した。脾臓組織から抽出し白血球よりタンパクを抽出し抗リン酸化抗体を用いて Western blotting にてコントロール群に比べて、R406 群では脾臓白血球における 3BP2 のリン酸化は抑制されていた。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

遠藤守人、松本紘一、福田昇、丸山高史、北井真貴、上野高浩、松本太郎. 慢性腎臓病に対する新たな治療戦略. 八戸大学紀要. 45,79-87,2012. (査読なし)

〔学会発表〕(計 4 件)

1. 丸山高史、福田昇、渡辺めぐみ、阿部雅紀、上野高浩、松本太郎、遠藤守人、岡田一義、松本紘一、相馬正義、河内裕. 脱分化脂肪細胞(DFAT)の全身投与は TSG-6 を介して免疫性糸球体腎炎を改善した. 第 37 回日本高血圧学会、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)2014.10.17

2. 丸山高史、福田昇、松本太郎、渡辺め

ぐみ、阿部雅紀、上野高浩、遠藤守人、岡田一義、松本紘一、相馬正義、河内裕.

免疫性腎炎、非免疫性腎炎への DFAT 細胞移植の効果. 第 13 回日本再生医療学会、国立京都国際会館(京都府・京都市)2014.3.5

3. 北井真貴、梶原麻実子、上野高浩、福田昇、羅智靖、松本紘一、相馬正義. Fcεr1g 遺伝子抑制 PI ポリアミドの Maus への静脈投与による検討. 第 49 回高血圧関連疾患モデル学会、日本大学会館(東京都・千代田区)2013.9.7

4. 北井真貴、梶原麻実子、上野高浩、福田昇、羅智靖、松本紘一、相馬正義. 免疫性腎炎治療薬としての FcR 遺伝子制御 PI ポリアミドの Maus への静脈投与の効果. 第 56 回日本腎臓学会、東京国際フォーラム(東京都・千代田区)2013.5.12

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

松本 紘一 (MATSUMOTO, Koichi)  
日本大学・医学部・教授  
研究者番号: 00125064

##### (2)研究分担者

福田 昇 (FUKUDA, Noboru)  
日本大学・総合科学研究科・教授  
研究者番号: 40267050