

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15492

研究課題名(和文) 糖質応答転写因子ChREBPをターゲットとした糖尿病性腎症の新規治療法の開発

研究課題名(英文) Innovation of novel therapeutics against diabetic nephropathy targeting ChREBP

研究代表者

菅原 明 (Sugawara, Akira)

東北大学・医学系研究科・教授

研究者番号：90270834

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：1) ChREBP欠損糖尿病性腎症モデルマウスの作成・病態解析：CRISPR/Cas9システムにて新規ChREBP欠損マウスを作成した。2) ChoREルシフェラーゼレポータープラスミドのMES13細胞安定発現株の作成・HTS化：MES13 ChoRE-Luc細胞を作成し、同細胞株の高血糖刺激時のZ値が0.5を超え、HTS化に成功した。3) 化合物ライブラリーのスクリーニング・構造最適化：上記細胞株を用いて東北大学化合物ライブラリーのHTSを施行したところ、13個のヒット化合物が得られた。4) リード化合物のIns-iNOS-TGマウスへの投与：現在、化合物の投与実験を遂行中である。

研究成果の概要(英文)：1) Generation of ChREBP KO mice. We have succeeded in generating ChREBP KO mice (C57BL/6J) using CRISPR/Cas9 system. 2) Generation of high throughput screening (HTS) system using MES13 ChoRE-Luc cells. We have succeeded in generating HTS system using the cell line by obtaining Z score above 0.5. 3) HTS of Tohoku University chemical library: We obtained 13 hit chemicals among 5,861 compounds. Among them, we selected 1 compound (X) for the further investigation. 4) Administration of chemical compounds to Ins-iNOS-transgenic mice: We are now administrating the compound X to the mice.

研究分野：内分泌代謝学

キーワード：CRISPR/Cas9システム ChREBP 糖尿病性腎症 ハイスループットスクリーニング 化合物ライブラリー

### 1. 研究開始当初の背景

本邦における糖尿病性腎症患者数は著増しているが、その有効な治療薬は ARB のみと言っても過言ではなく、その新規創薬・治療法の開発は、国民の健康福利・医療経済の両面から喫緊の課題である。

### 2. 研究の目的

本研究では糖尿病性腎症の創薬ターゲットとして糖質応答転写因子 ChREBP に着目し、1) ChREBP 欠損糖尿病性腎症モデルマウスを用いた検討にて ChREBP が糖尿病性腎症の増悪因子であることを明らかとし、2) メサンギウム細胞由来安定発現株から確立した HTS 系を用いて ChREBP 抑制薬の化合物スクリーニングを行い、3) 2) で得られたヒット化合物から合成したリード化合物を糖尿病性腎症モデルマウスに投与してその腎症改善効果を検証することを目的とする。

### 3. 研究の方法

1) ChREBP 欠損糖尿病性腎症モデルマウスの作成・病態解析: 既報のコンベンショナルノックアウトマウス作成論文 (Proc Natl Acad Sci U S A. 2004; 101: 7281.) の情報を基に、CRISPR/Cas9 システムにて新規 ChREBP 欠損マウスを作成する。作成した ChREBP ホモノックアウト (ChREBP<sup>-/-</sup>) マウスを徳島大学にて作成した後、東北大学に輸送し、当分野にて継代中の 1 型糖尿病モデルマウスである Ins-iNOS-トランスジェニック (TG) マウス (J Biol Chem. 1998; 273: 2493.) と交配して ChREBP 欠損 iNOS TG マウスを作成する。同マウスを解析することにより、糖尿病性腎症の発症・増悪における ChREBP の関与を検討する。2) ChoRE ルシフェラーゼレポータープラスミドの MES13 細胞安定発現株の作成・HTS 化: ACC ChoRE/PK-luc レポータープラスミド (J Biol Chem. 2004; 279: 15662.) のインサートを pGL4.15 ルシフェラーゼキメラ発現ベクターに組み込んだ後に、マウス由来メサンギウム培養細胞株である MES13 にトランスフェクションし、ハイグロマイシンにてセレクションを行い、安定発現株 (MES13 ChoRE-Luc 細胞) を得る。得られた安定発現株を用いて、ハイスループットスクリーニング (HTS) 系を確立する。3) 化合物ライブラリーのスクリーニング・構造最適化: MES13 ChoRE-Luc 細胞の HTS 化が完了した後に、高血糖 (450 mg/dL) 刺激と正常血糖 (100 mg/dL) 刺激の間でバリデーションの検討を行い、アッセイ系の精度の指標となる Z 値がスクリーニング開始の目安である 0.5 以上であることを確認する。その確認後に、東北大学化合物ライブラリー (5,861 化合物) のスクリーニングを行う。薬剤スクリーニングの指標としては、高血糖刺激にて亢進した ChoRE 活性の 50% 以上の抑制を目安とする。必要時は得られたヒット化合物の構

造最適化を行い、より活性が高く毒性の低いリード化合物を得る。4) リード化合物の Ins-iNOS-TG マウスへの投与: 得られたリード化合物を糸球体病変が出現する 8 週齢から 12 週齢までの間投与し、投与群と非投与群との間で尿中アルブミン (クレアチニン補正值) 量ならびに腎病理組織像の検討を行う。それにより、新規化合物の尿中アルブミン減少効果や腎組織病変改善効果を解明する。

### 4. 研究成果

1) ChREBP 欠損糖尿病性腎症モデルマウスの作成・病態解析: CRISPR/Cas9 システムにて新規 ChREBP 欠損マウスを作成することに成功した。交配させる Ins-iNOS-TG マウスとのバックグラウンドが異なる (ChREBP 欠損マウス: C57BL/6J、Ins-iNOS-TG マウス: ICR) ことから、現在戻し交配を行っている。

2) ChoRE ルシフェラーゼレポータープラスミドの MES13 細胞安定発現株の作成・HTS 化: MES13 ChoRE-Luc 細胞を作成した後に、同細胞株に高血糖刺激を負荷した際の Z 値が 0.5 を超えることができ、HTS 化に成功した。

3) 化合物ライブラリーのスクリーニング・構造最適化: MES13 ChoRE-Luc 細胞を用いて東北大学化合物ライブラリーの HTS を施行したところ、13 個のヒット化合物が得られた。東北大学大学院薬学研究所の先生方を協議した結果、1 化合物 (X) が選択された。化合物 X は既に改良された化合物であり、更なる合成展開は不要であった。

4) リード化合物の Ins-iNOS-TG マウスへの投与: 現在、化合物 X の投与実験を遂行中である。

### 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 8 件)

1. Parvin R, Noro E, Saito-Hakoda A, Shimada H, Suzuki S, Shimizu K, Miyachi H, Yokoyama A, Sugawara A. Inhibitory Effects of a novel PPAR- $\gamma$  agonist MEKT1 on Pomc expression/ACTH secretion in AtT20 cells. PPAR Res. 2018; 2018: Article ID 5346272. doi.org/10.1155/2018/5346272. (査読有)

2. Matsuzawa T, Yoshikawa T, Iida T, Kárpáti A, Kitano H, Harada R, Nakamura T, Sugawara A, Yamaguchi Y, Yanai K. Heparan sulfate in pancreatic  $\beta$ -cells contributes to normal glucose homeostasis by regulating insulin secretion. Biochem Biophys Res Commun. 2018 May 15;499(3):688-695. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.03.213. Epub 2018 Apr 3. (査読有)

3. Aoki S, Saito-Hakoda A, Yoshikawa T, Shimizu K, Kisu K, Suzuki S, Takagi K, Mizumoto S, Yamada S, van Kuppevelt TH, Yokoyama A, Matsusaka T, Sato H, Ito S, Sugawara A. The reduction of heparan sulphate in the glomerular basement membrane does not augment urinary albumin excretion. *Nephrol Dial Transplant.* 2018; 33: 26-33. doi: 10.1093/ndt/gfx218. (査読有)
4. Yokoyama A, Katsura S, Sugawara A. Biochemical analysis of histone succinylation. *Biochem Res Int.* 2017; 2017: 8529404. (査読有)
5. Suzuki D, Saito-Hakoda A, Ito R, Shimizu K, Parvin R, Shimada H, Noro E, Suzuki S, Fujiwara I, Kagechika H, Rainey WE, Kure S, Ito S, Yokoyama A, Sugawara A. Suppressive effects of RXR agonist PA024 on adrenal CYP11B2 expression, aldosterone secretion and blood pressure. *PLoS One.* 2017; 12: e0181055. doi: 10.1371/journal.pone.0181055. eCollection 2017. (査読有)
6. Shimada H, Kogure N, Noro E, Kudo M, Sugawara K, Sato I, Shimizu K, Kobayashi M, Suzuki D, Parvin R, Saito-Ito T, Uruno A, Saito-Hakoda A, Rainey WE, Ito S, Yokoyama A, Sugawara A. High glucose stimulates expression of aldosterone synthase (CYP11B2) and secretion of aldosterone in human adrenal cells. *FEBS Open Bio.* 2017; 7: 1410-1421. doi: 10.1002/2211-5463.12277. eCollection 2017 Sep. (査読有)
7. Parvin R, Saito-Hakoda A, Suzuki S, Noro E, Shimada H, Yokoyama A, Sugawara A. Effects of retinoids on vasculatures. *J Endocrinol Thyroid Res.* 2017; 2: 555587. DOI: 10.19080/JETR.2017.02.555587. (査読有)
8. Ito R, Sato I, Tsujita T, Yokoyama A, Sugawara A. A ubiquitin-proteasome inhibitor bortezomib suppresses the expression of CYP11B2, a key enzyme of aldosterone synthesis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017; 489: 21-28. (査読有)

〔学会発表〕(計 10件)

1. Noro E, Yokoyama A, Kogure N, Momma R, Shimizu K, Parvin R, Suzuki S, Shimada H, Shima H, Igarashi K, Sugawara A. Involvement of IKK complex in the regulation of a glucose-responsive transcriptional factor ChREBP in pancreatic  $\beta$ -cell. ENDO2018, 2018/3/17, Chicago
2. Yokoyama A, Noro E, Kobayashi M, Shimizu K, Shimada H, Suzuki S, Shima H, Igarashi K, Sugawara A. Identification of

novel AR coregulators via endogenous purification. ENDO2018, 2018/3/17, Chicago

3. Shimada H, Noro E, Sato I, Suzuki S, Parvin R, Sakamoto J, Yokoyama A, Sugawara A. Angiotensin II causes synergistic effects for the ligand activation of farnesoid X receptor (FXR). ENDO2018, 2018/3/17, Chicago
4. Parvin R, Saito-Hakoda A, Shimada H, Noro E, Suzuki S, Miyachi H, Yokoyama A, Sugawara A. MEKT1, a novel PPAR-gamma agonist, significantly suppressed Pomc expression/ACTH secretion in AtT20 cells. ENDO2018, 2018/3/17, Chicago
5. レハナ・パーピン、箱田明子、島田洋樹、清水恭子、野呂英理香、岩崎泰正、横山 敦、菅原 明。グルココルチコイドによる Pomc 遺伝子転写抑制における転写因子 NeuroD1 の作用。第 27 回日本間脳下垂体腫瘍学会、2017 年 2 月 24 日、東京
6. Suzuki S, Noro E, Aoki S, Parvin R, Shimada H, Yokoyama A, Sugawara A. Possible Involvement of ChREBP in the Progression of Diabetic Kidney Disease in the Renal Tubules. ISN Frontiers Meetings 2018, 2018/2/23, Tokyo
7. 青木 聡、箱田明子、吉川雄朗、松阪泰二、佐藤 博、伊藤貞嘉、菅原 明。系球体足細胞特異的 Extl3 欠損マウスを用いた系球体チャージバリアの検討。第 60 回日本腎臓学会学術総会、2017 年 5 月 27 日、仙台
8. 鈴木 歩、野呂英理香、清水恭子、横山 敦、菅原 明。炭水化物応答配列結合蛋白 (ChREBP) 関連遺伝子の探索。第 90 回日本内分泌学会学術総会、2017 年 4 月 22 日、京都
9. 野呂英理香、横山 敦、小暮直敬、鈴木 歩、清水恭子、島 弘季、五十嵐和彦、菅原 明。グルコース応答性転写因子 ChREBP の機能制御因子の探索。2017 年 4 月 22 日、第 90 回日本内分泌学会学術総会、京都
10. Noro E, Yokoyama A, Kogure N, Shimizu K, Shima H, Igarashi K, Sugawara A. Functional screening of transcriptional co-factors for a glucose-responsive transcriptional factor ChREBP. ENDO2016, 2016/4/3, Boston

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：

番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等  
[www.med.tohoku.ac.jp/about/laboratory/189.html](http://www.med.tohoku.ac.jp/about/laboratory/189.html)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

菅原 明 (SUGAWARA, Akira)  
東北大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：90270834

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

沢津橋 俊 (SAWATUBASHI, Shun)  
徳島大学・藤井節郎記念医科学センター・  
講師  
研究者番号：70535103

竹本 龍也 (TAKEMOTO, Tatsuya)  
徳島大学・藤井節郎記念医科学センター・  
助教  
研究者番号：30443899

山本 靖彦 (YAMAMOTO, Yasuhiko)  
金沢大学・大学院医歯薬保健学総合研究  
科・教授  
研究者番号：20313637

高木 清司 (TAKAGI, Kiyoshi)  
東北大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号：80595562

佐藤 博 (Sato, Horoshi)  
東北大学・大学院薬学研究科・教授  
研究者番号：60215829

横山 敦 (Yokoyama, Atsushi)  
東北大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号：20572332

伊藤 亮 (ITO, Ryo)  
東北大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号：80733815

土井 隆行 (DOI, Takayuki)  
東北大学・大学院薬学研究科・教授  
研究者番号：90212076

##### (4) 研究協力者

( )