

令和元年9月2日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09600

研究課題名(和文) ミネラルコルチコイド受容体コリプレッサーを標的にした糖尿病性腎症治療薬の創薬

研究課題名(英文) Innovative drug development of the diabetic nephropathy which targeted mineralocorticoid receptor's co-repressor

研究代表者

工藤 正孝 (Kudo, Masataka)

東北大学・大学病院・准教授

研究者番号：20509583

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：1型糖尿病性腎症モデル(iNOS/RAGEダブルTGマウス)を用いて、ミネラルコルチコイド受容体のコリプレッサーの発現制御により、糖尿病性腎症の進展抑制効果と、既存のMR拮抗薬との併用の有用性を検証することを目指した。GEMIN4-Luc安定発現株の作成に時間がかかり研究期間に実現が困難で、並行して作成して先に発現株が得られたChoRE-Luc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)を行い、2個のヒット化合物が得られ同化合物をiNOSトランスジェニック(TG)マウスに投与して、尿中アルブミン排泄量の検討を行い、その薬理効果や他薬剤との比較・検討するところまで至っている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病性腎症の治療薬は、これまでもレニン-アンジオテンシン-アルドステロン系(RAAS)阻害薬が使用されてきたが、アルドステロン・ブロックの腎保護作用の機序に関しては未だ十分には解明されていない。本研究ではGEMIN4といったMR受容体のCorepressorを標的にした新規創薬を目指したが、技術的に困難であった。しかし並行して進めていた、血糖に应答するChoREといった別の転写因子を制御する物質を絞り込み、1型糖尿病性腎症モデルへの投与で尿蛋白減少効果を確認でき、腎メサンギウム細胞に発現する転写因子の制御による糖尿病性腎症治療といった新たな可能性を提示できたという点で意義があったと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Using a type 1 diabetic nephropathy model (iNOS/RAGE double TG mouse), we aimed to develop a new drug which regulate the expression of mineral corticoid receptor's co-repressor and test the depression effect of diabetic nephropathy and a utility of the combination with the existing MR antagonist.

But the creation of the GEMIN4-Luc stable cell line was technically difficult, so we make ChoRE-Luc stable cell line in parallel, it was successful. Using these cell line, we proceeded high-throughput screening (HTS) using an onset of and finally two hit compounds are obtained. We delivered these compounds to iNOS transgenic (TG) mouse and examined the albumin urine output and compared pharmacological effect with other drugs.

研究分野：内分泌代謝学

キーワード：創薬 糖尿病性腎症 アルドステロン

1. 研究開始当初の背景

近年、本邦においては糖尿病(DM)患者が年々増加しており、現在の患者数は約 1,000 万人(予備軍を含めると 2,000 万人以上)と推定されている。それに伴い、糖尿病性腎症患者も増加しており、1998 年以降の本邦の新規透析導入患者数の 1 位は糖尿病性腎症となっている。糖尿病性腎症の発症・進展においては高血圧、特にレニン-アンジオテンシン-アルドステロン系(RAAS)が関与する事は良く知られており、その治療薬としてアンジオテンシン変換酵素阻害薬やアンジオテンシン(A)II 受容体拮抗薬(ARB)といった RAAS 抑制薬が頻用されている。申請者と研究分担者らはこれまで、pGL4.15 ルシフェラーゼキメラ発現ベクターに副腎皮質の球状層で産生される昇圧ホルモンでありアルドステロン合成酵素(CYP11B2)プロモーターを組み込んだ後、それをヒト副腎 H295R 細胞にトランスフェクションした後にハイグロマイシンでセレクションする事により、一過性発現系に比してアンジオテンシン II や塩化カリウム刺激に対して非常に反応性が鋭敏な安定発現株(CYP11B2-H295R)を作成する事に成功した(Mol Cell Endocrinol. 2014; 383: 60-68)。上記の CYP11B2-H295R を用いて「アルドステロン合成酵素遺伝子(CYP11B2)安定発現株を用いた新規降圧・抗動脈硬化薬の開発」というプロジェクトを進行中であり、糖尿病性腎症進展抑制効果の検証にも着手している。アルドステロンに関しては、腎組織において尿細管のみならず糸球体にも Mineralocorticoid 受容体(MR)が発現し糖尿病性腎症(DM 腎症)の病期の進行に寄与することやアルドステロン・ブロックが DM 腎症の進行抑制に有用という基礎的・臨床的研究はこれまでにいくつか報告されており(右図)、また MR のリン酸化や MR に結合する Coregulator が腎組織特異的なアルドステロンの作用に重要であることも判明している。特に MR に結合する GEMIN4 という Corepressor が注目されてきている(J Mol Endocrinol. 2015; 54: 149-160)。しかし本邦における臨床の現状として、DM 腎症患者の降圧治療に関しては従来の選択的 MR 拮抗薬(MRA)のエプレレノン(EPL)は、「微量アルブミン尿又は蛋白尿を伴う糖尿病患者には禁忌」とされている。最近 Nonsteroidal MRA が複数開発され臨床応用が着手され特に DM 患者に対する投与でアルブミン尿減少効果が報告されているが、DM 腎症におけるアルドステロン・ブロックの腎保護作用に関しては、さらなるエビデンスの確立が必要と考えられる。

我々は、高血糖刺激時のメサングウム細胞における GEMIN4 の活性化を指標として、新規の糖尿病性腎症治療薬のスクリーニングを行い、得られたヒット化合物の構造最適化を行った後、1 型糖尿病性腎症モデルとして非常に優れた iNOS/RAGE ダブルトランスジェニック(TG)マウスに投与を行い、新規薬剤の尿中アルブミン減少効果や腎組織病変改善効果を検証し、MRA と異なる機序で MR を抑制する糖尿病性腎症の新たな治療薬の開発を目指すことを計画した。

2. 研究の目的

糖尿病性腎症患者が著増しており、糖尿病性腎症の病期進行抑制のための治療法の確立が急務である。糖尿病性腎症進行にアルドステロンや Mineralocorticoid 受容体(MR)が関与すると示唆されているが、最近 MR に結合しその作用を抑制する蛋白(Corepressor) GEMIN4 が同定された。本研究の目的は、メサングウム培養細胞に GEMIN4 の promoter 配列を発現した GEMIN4-Luc 安定発現株を樹立し、同細胞を用いて GEMIN4 の作用を活性化する化合物のスクリーニングを網羅的に探索・特定した後、1 型糖尿病性腎症モデル(iNOS/RAGE ダブル TG マウス)に投与を行い、糖尿病性腎症の発症・進展抑制効果と、既存の MR 拮抗薬との併用の有用性を検証することである。以上より、糖尿病性腎症の進行予防のための創薬・新規治療法の確立を目指す。

3. 研究の方法

iNOS/RAGE ダブル TG マウス腎病変の検討、腎糸球体の単離と cDNA マイクロアレイ解析、高血糖刺激によるメサングウム細胞 GEMIN4 発現と活性化の有無の確認：本研究により、糖尿病性腎症の発症・進展における MR と GEMIN4 の関与と高血糖刺激に誘導される遺伝子群や疾患特異的パスウェイの特定が可能となる。GEMIN4-Luc 安定発現株の作成、薬剤スクリーニング：本研究により GEMIN4 の機能を活性化する新規薬剤が得られる。動物実験(in vivo)によるリード化合物の腎病変に対する効果の検証：本研究により、得られた薬剤が糖尿病性腎症の新規治療薬たる可能性と、MR 拮抗薬との併用の有用性を検証する

4. 研究成果

野生型(コントロール)マウス、iNOS/RAGE ダブル TG マウス EPL 投与 iNOS/RAGE ダブル TG マウスから糸球体のみを単離し、糸球体より RNA を抽出し、DNA の合成・cDNA マイクロアレイ解析を施行したが、糸球体の単離の手技の安定性の問題から十分な解析を行うことが出来なかった。その後、In Vitro 実験を集中的に進めてい GEMIN4 Luc 安定発現株の作成に予想より時間がかかり最終的には技術的に樹立が困難であった。並行して作成して先に発現株が得られた ChoRE-Luc 安定発現株を用いて、東北大学化合物ライブラリーのハイ

スループットスクリーニング (HTS) を行い、2 個のヒット化合物が得られた。現在、同化合物を、iNOS トランスジェニック (TG) 現在、同化合物を iNOS トランスジェニック (TG) マウスに投与して、尿中アルブミン排泄量の検討を行い、更にその薬理効果や他薬剤との比較・検討するところまで至っている。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

High glucose stimulates expression of aldosterone synthase (CYP11B2) and secretion of aldosterone in human adrenal cells.

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. FEBS Open Bio. 2017 Aug 29;7(9):1410-1421. doi: 10.1002/2211-5463.12277. eCollection 2017 Sep.

〔学会発表〕(計 2 件)

Effect of Autonomous Cortisol Secretion on Cerebrovasculature Events in Patients with Primary Aldosteronism

Masataka Kudo, Shunji Mugikura, Ryo Morimoto, Yuta Tezuka, Kei Omata, Beata Shiratori, Yasuhiro

Igarashi, Kazumasa Seiji, Kei Takase, Sadayoshi Ito and Fumitoshi Satoh

AHA Council on Hypertension American Society of Hypertension Joint Scientific Sessions 2018 (国際学会)

Cerebrovasculature Events in Patients with Primary Aldosteronism: Results of the PA Sendai Study registry

Masataka Kudo, Shunji Mugikura, Ryo Morimoto, Yuta Tezuka, Kei Omata, Mashiro Nezu, Yasuhiro Igarashi,

Kazumasa Seiji, Kei Takase, Sadayoshi Ito and Fumitoshi Satoh

AHA Council on Hypertension American Society of Hypertension Joint Scientific Sessions 2017 (国際学会)

〔図書〕(計 1 件)

糖尿病性腎症とミネラルコルチコイド受容体 **Bio Clinica 2017(p97-101)**

工藤正孝、菅原明

〔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 :

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 :

国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名 : 菅原 明

ローマ字氏名 : **Akira Sugawara**

所属研究機関名：東北大学

部局名：医学系研究科

職名：教授

研究者番号 (ID 桁): 90270834

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。