

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08729

研究課題名(和文) 糖尿病性腎症における糸球体内細胞間クロストークに作用する化合物の探索

研究課題名(英文) Investigating compounds that act on interglomerular crosstalk in diabetic nephropathy.

研究代表者

水本 輝彦 (Mizumoto, Teruhiko)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・助教

研究者番号：80749193

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：既存薬ライブラリからスクリーニングしたHSP-90阻害剤である化合物Xに着目し、糖尿病性腎症モデルであるストレプトゾシン(STZ)ラットに投与し、腎症の進行抑制の効果を検討した。その結果、STZラットにおける腎症の進行を優位に抑制することが分かりました。しかし、HSP-90阻害剤によるエクソソーム取り込みの抑制については十分な検証ができなかったため、scRNA-seqデータベースを用いて腎糸球体細胞におけるHSP-90の発現を調べたところ、メサンギウム細胞を含む糸球体構成細胞に強く発現していた。このことから、HSP90阻害剤は腎糸球体にも直接作用する可能性が考えられました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病性腎症による腎症進展は治療薬がレニン・アンジオテンシン系阻害薬、最近有効性が明らかになったSGLT2阻害薬などに限定されている。本研究のエクソソーム阻害による新たな機序は病態的意義を検討した報告は腎領域でも散見されるが、本機序をターゲットとした治療については報告が認められていない。既存薬ライブラリから選出した化合物Xは糖尿病性腎症ラットの腎症進展を抑制していたため、新しい機序の糖尿病性腎症の治療薬へ繋がる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We focused on Compound X, an HSP-90 inhibitor screened from the drug library, and administered it to streptozocin (STZ) rats, a model of diabetic nephropathy, to examine its efficacy in inhibiting the progression of nephropathy. The results showed that Compound X predominantly inhibited the progression of nephropathy in STZ rats. However, the inhibition of exosome uptake by HSP90 inhibitors could not be fully verified. Therefore, we investigated HSP-90 in renal glomerular cells using the crNA-seq database and found that HSP-90 is strongly expressed in glomerular component cells such as mesangial cells. This suggested that HSP90 inhibitors may also act directly on renal glomeruli.

研究分野：腎臓内科

キーワード：糖尿病性腎症 エクソソーム

1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓病 (CKD) の患者数は成人の約 8 人に一人が罹患し、末期腎不全から透析導入に至る患者数は年間約 4 万人である。透析導入原疾患としては糖尿病性腎症、腎硬化症などの生活習慣病を介した腎疾患、それに続くのが慢性腎炎である。治療については進行抑制効果のあるレニン・アンジオテンシン系阻害薬、最近有効性が明らかになった SGLT2 阻害薬があるが、今後も更なる治療法開発の促進が求められる。

肥満、糖尿

病において慢性炎症が重要であることが示唆されている。我々は肥満による ER ストレスがプロスタシンの発現を低下させ、切断を免れた TLR4 を増加させることを見出した。そして、TLR4 の

発現増加が飽和脂肪酸や腸内細菌のエンドトキシンによる慢性炎症を引き起こし、耐糖能異常を

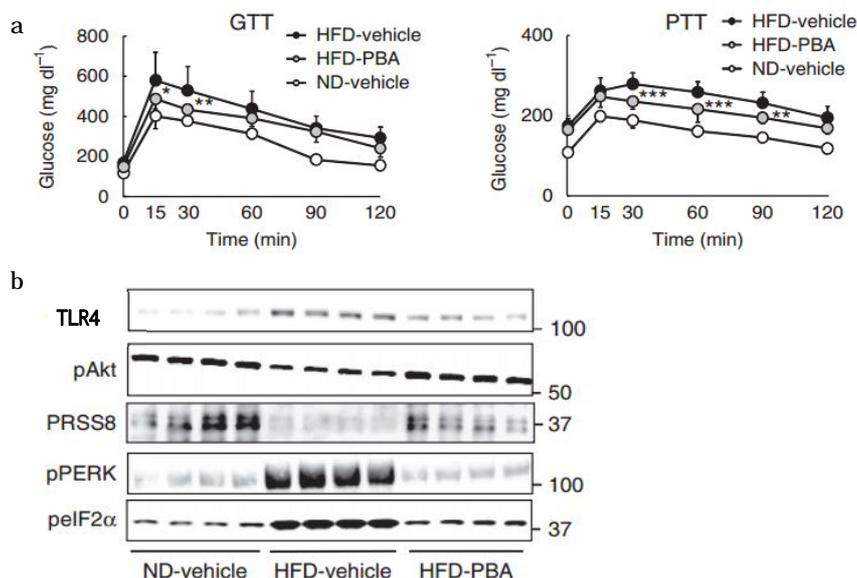


図 1. 高脂肪食(HFD)マウスに 4-phenyl butyric acid (PBA)投与
 a. HFD、HFD-PBA 投与マウスの GTT、PTT、b.HFD、HFD-PBA 投与マウスにインスリン投与後の肝臓 TLR4、pAKT、PRSS8、pPERK、pelF2 の発現
 a.HFD により悪化した血糖が PBA 投与による ER ストレス阻害で改善していた。
 b.HFD では ER ストレス(pPERK、pelF2α)が増加し、PRSS8(プロスタシン)が低下、TLR4 が増加し、インスリンシグナル(pAKT)を低下させたが、ER ストレス阻害薬はそれを改善し、インスリン抵抗性を改善した。

呈することを示した(Mizumoto T et al. *Nature Commun.* 2014)(図 1)。申請者らは糖尿病性腎症(DN)、肥満腎症(ORG)や糸球体腎炎(GN)においても慢性炎症、ER ストレスの関与について報告してきた(*Diabetologia* 2012, *CEN* 2014, *PLoS ONE* 2014, *FASEB J* 2020)。申請者はメタボリックシンドローム(Mets)モデルラットに高塩食(HS)を与え、セリンプロテアーゼ阻害薬、カモスタット(CM)を投与すると同程度にヒドララジン(Hyd)で降圧した群と比較して尿蛋白を改善させることを報告した。この研究において糸球体におけるマクロファージの浸潤を抗 ED-1 染色で確認すると HS でマクロファージの浸潤が悪化し、CM で改善しており、Mets や高血圧による糸球体障害にもマクロファージ浸潤が関与していることが示唆された。(Mizumoto T et al. *J Pharmacol Sci.* 2021) 炎症細胞の浸潤、メサンギウム細胞・基質の増生が認められ、病変の進展とともに蛋白尿の増加、糸球体濾過量の低下が認められる。そこで認められるメサンギウム細胞増生、炎症細胞浸潤の機序と役割について着目した。

2. 研究の目的

我々の予備検討では、高糖濃度に晒されたメサンギウム細胞由来液性因子の関与が示唆されている。病像やこれまでの検討結果を踏まえると、液性因子として全身性よりは腎系球体局所で作用する可能性を考慮し、paracrine に作用する因子としてエクソソームに着目、高糖濃度条件下メサンギウム細胞培養上清からエクソソーム(HG MC-exo)を抽出して検討を行った。BINDS 提供の既存薬スクリーニングを行う目的で、IRFとNFκBのレポーターを有する THP-1 dual reporter plate を作成、HG MC-exo による NFκB-SEAP, IRF-LUC 誘導活性を効率的かつ高感度で検出できるハイスループットスクリーニング系を確立した(図3)。exoのparacrine作用による液性因子としての重要性については主に腫瘍での解析が先行しているが、近年種々の腎疾患における役割についても報告が認められる(Erdbrügger U. *J Am Soc Nephrol.* 2016)。

図3に示した高糖濃度条件下メサンギウム細胞培養上清より抽出したエクソソーム(HG MC-exo)刺激によるマクロファージの炎症誘導を抑制する化合物を探索するため、創薬等先端技術支援基盤プラットフォーム(BINDS)に応募、研究計画が承認され、東京大学創薬機構より提供を受けた既存薬ライブラリの化合物のスクリーニングを行った。HG MC-exo による NFκB-SEAP 誘導の抑制率 40%以上が得られた 421 化合物を 2 次スクリーニングへと進めた。2 次スクリーニングでは濃度依存性および WST による生存率により細胞毒性を確認し、160 化合物まで絞りこんだ。次に 3 次スクリーニングとしてステロイドなど既知の抗炎症作用を有する化合物を除

図3. IRFとNFκBのレポーターを有する THP-1 dual reporter 細胞に HG MC-exo を投与
a. HG MC-exo の濃度依存的に NFκB の増加を認めた。
b. HG MC-exo の濃度依存的に IRF の増加を認めた。

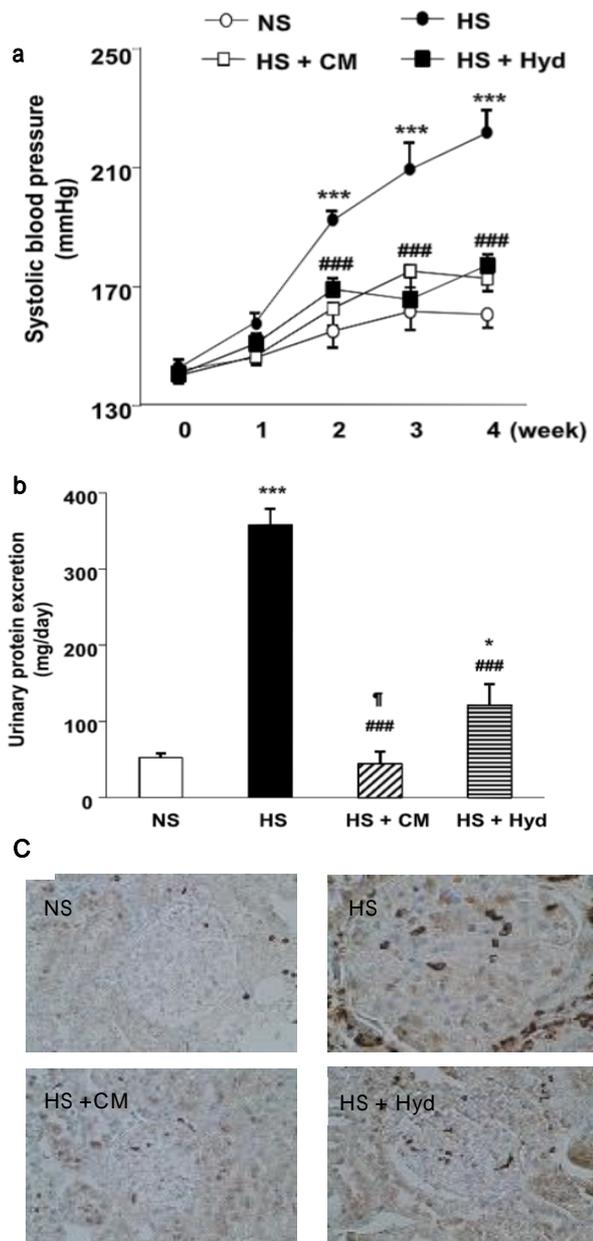
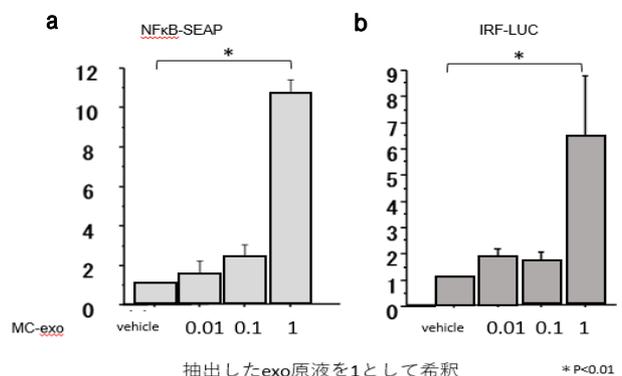


図2. Mets モデルラットに高塩食を与え、CMを投与
a. HSで上昇した血圧をCMとHydが同程度に降圧した。b. 尿蛋白はHSで増加し、Hydより優位にCMが改善した。c. 抗ED-1染色ではHSで増加し、CMはHydよりマクロファージ浸潤を抑制した。



去、53の化合物を残した。4次スクリーニングではexo取り込み阻害率を評価し、最終的に30化合物を選択した。30の化合物のうち、NFkB誘導抑制効果、exo取り込み抑制効果の両者に優れる化合物を最終候補とした。4次スクリーニングで残った30化合物には4つのHSP(Heat shock protein)-90が含まれており、HSP90阻害薬に共通した効果であることが推測された。HSP90阻害薬のうち、exo取り込み阻害効果が最も強かった化合物Xに注目して、糖尿病性腎症に対する効果を検討した。exoによる病態的意義を検討した報告は腎領域でも散見されるが、本機序をターゲットとした治療については報告が認められていない。本研究の目的は、HG MC-exoにより誘導される炎症をターゲットとした新しいDKD治療薬へ繋げること、さらにメサンギウム増殖性腎炎への応用や尿中exoの診断マーカーとしての可能性を探ることである。

3. 研究の方法

1) 化合物Xの糖尿病性腎症に対する投与効果および作用機序の検討

糖尿病性腎症抑制効果が期待される化合物Xについて、STZ誘発糖尿病ラットへの投与効果の検討を行い、さらにその作用機序を検証したSTZ誘発糖尿病ラットの腎臓におけるエクソソームの関連マーカーであるCD9、CD63、CD81などを蛋白質やmRNAレベルを検討した。また、血液や尿に含まれるエクソソームの検出を試みた。

2) 腎組織におけるHSP90の発現の確認

HSP90阻害薬のエクソソームの取り込み阻害に関する検討は十分な検証できなかったため、様々な細胞に発現しているHSP90の腎組織における発現を検討した。当科で行っているscRNA-seqデータベースで確認した。

4. 研究成果

1) 化合物Xの糖尿病性腎症に対する投与効果および作用機序の検討

16時間の絶食の後、STZ 50mg/kgの尾静脈から単回投与によりSTZ誘発糖尿病ラットを作成した。STZ投与3週後に血糖値 500mg/dl以上の上昇を確認した後、週2回、計6週間のHSP90阻害剤の投与を行い、腎症に対する効果を検討した。その結果、STZラットで認められる腎症進展の指標であるアルブミン尿の有意な抑制を認め、更に腎組織におけるメサンギウム領域の拡大を抑制する傾向を認めた(図4)。以上の結果より、HSP90阻害薬は糖尿病腎症の進行を抑制できる可能性が示唆された。HSP90はexoを構成する膜蛋白の一つであり、化合物Xの効果発現機序として、元細胞(今回はメサンギウム細胞)からのexo分泌、ターゲット(今回はマクロファージ)でのexo捕捉、取り込み、その後の蛋白・RNAなどを介した形質発現、への影響が想定される。

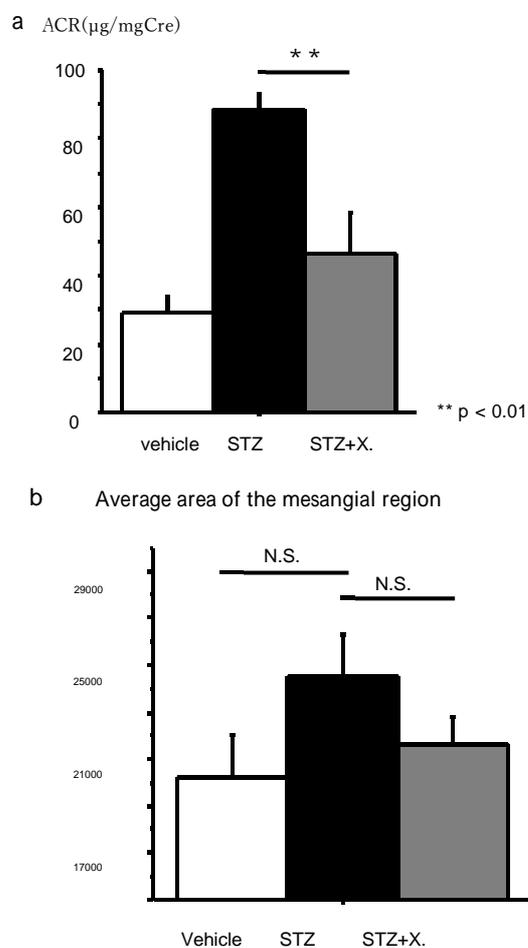


図4.STZ糖尿病性腎症ラットに化合物Xを投与
a.STZ糖尿病性腎症ラットに化合物Xを6週間投与し、尿中アルブミン(ACR).STZでACRは悪化し、化合物Xで優位に改善した。
b.STZ糖尿病性腎症ラットに化合物Xを6週間投与し、メサンギウム細胞面積.STZで悪化し、化合物Xで改善傾向を示した。

腎臓におけるエクソソームの関連マーカーであるCD9、CD63、CD81などを蛋白質やmRNAレベルで検出しようとしたが優位な結果は得られなかった。また、血液や尿に含まれるエクソソームを直接検出しようとしたがこちらも優位な結果は得られていない。様々な既報に照らし合わせながら、in vivoでエクソソーム取り込みに関して直接確認することを試みているが十分な検出感度には至っていない。

2) 腎組織におけるHSP90の発現の確認

前年度の研究でHSP90阻害薬のエクソソームの取り込み阻害に関する検討は十分な検証でできなかったため、様々な細胞に発現しているHSP90の腎組織における発現を検討した。当科で行っているscRNA-seqデータベースで確認したところ、メサンギウム細胞を含む腎糸球体構成細胞において強い発現を確認できた(図5)。糖尿病におけるこのことからHSP90阻害薬は腎糸球体にも直接作用していることが期待できる。

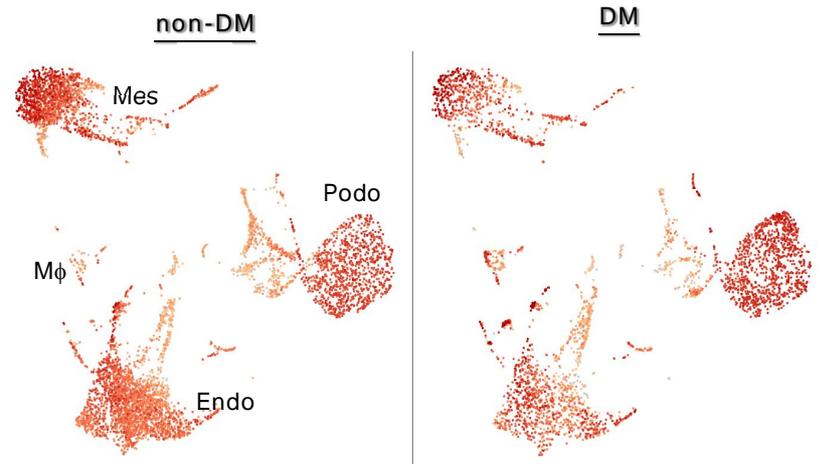


図 5. scRNA-seq データベースでの腎糸球体構成細胞における HSP-90 の発現
非糖尿病、糖尿病のどちらの腎糸球体構成細胞においても HSP-90 は強く発現を認めた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

| | |
|---|-----------------------------|
| 1. 著者名 Morinaga Jun, Kakuma Tatsuyuki, Fukami Hirota, Hayata Manabu, Uchimura Kohei, Mizumoto Teruhiko, et al. | 4. 巻 35 |
| 2. 論文標題 Circulating angiopoietin-like protein 2 levels and mortality risk in patients receiving maintenance hemodialysis: a prospective cohort study | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Nephrology Dialysis Transplantation | 6. 最初と最後の頁 854 ~ 860 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/ndt/gfz236 | 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 Fujimoto Daisuke, Kuwabara Takashige, Hata Yusuke, Umemoto Shuro, Kanki Tomoko, Nishiguchi Yoshihiko, Mizumoto Teruhiko, Hayata Manabu, Kakizoe Yutaka, Izumi Yuichiro, Takahashi Satoru, Mukoyama Masashi | 4. 巻 34 |
| 2. 論文標題 Suppressed ER associated degradation by intraglomerular cross talk between mesangial cells and podocytes causes podocyte injury in diabetic kidney disease | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 The FASEB Journal | 6. 最初と最後の頁 15577 ~ 15590 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.20200078RR | 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 Kanki Tomoko, Kuwabara Takashige, Morinaga Jun, Fukami Hirota, Umemoto Shuro, Fujimoto Daisuke, Mizumoto Teruhiko, Hayata Manabu, Kakizoe Yutaka, Izumi Yuichiro, Tajiri Saeko, Tajiri Tetsuya, Kitamura Kenichiro, Mukoyama Masashi | 4. 巻 21 |
| 2. 論文標題 The predictive role of serum calprotectin on mortality in hemodialysis patients with high phosphoremia | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 BMC Nephrology | 6. 最初と最後の頁 158 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12882-020-01812-x | 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 Mizumoto Teruhiko, Kakizoe Yutaka, Nakagawa Terumasa, Iwata Yasunobu, Miyasato Yoshikazu, Uchimura Kohei, Adachi Masataka, Deng Qinyuan, Hayata Manabu, Morinaga Jun, Miyoshi Taku, Izumi Yuichiro, Kuwabara Takashige, Sakai Yoshiki, Tomita Kimio, Kitamura Kenichiro, Mukoyama Masashi | 4. 巻 146 |
| 2. 論文標題 A serine protease inhibitor camostat mesilate prevents podocyte apoptosis and attenuates podocyte injury in metabolic syndrome model rats | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Pharmacological Sciences | 6. 最初と最後の頁 192 ~ 199 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jphs.2021.04.003 | 査読の有無 無 |
| 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 - |

〔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 藤本 大介, 桑原 孝成, 秦 雄介, 梅本 周朗, 神吉 智子, 西口 佳彦, 水本 輝彦, 早田 学, 泉 裕一郎, 柿添 豊, 向山 政志 |
| 2. 発表標題 糖尿病においてメサンギウム細胞との細胞連関がポドサイトの正常な小胞体関連分解を阻害し腎症を進展させる |
| 3. 学会等名 第63回日本腎臓学会学術集会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 藤本 大介, 桑原 孝成, 秦 雄介, 梅本 周朗, 神吉 智子, 西口 佳彦, 水本 輝彦, 早田 学, 泉 裕一郎, 柿添 豊, 向山 政志 |
| 2. 発表標題 糖尿病性腎臓病進展に果たすメサンギウム ポドサイト連関による小胞体関連分解(ERAD)不全の意義 |
| 3. 学会等名 第57回日本臨床分子医学会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 藤本 大介, 桑原 孝成, 秦 雄介, 梅本 周朗, 神吉 智子, 西口 佳彦, 水本 輝彦, 早田 学, 泉 裕一郎, 柿添 豊, 向山 政志 |
| 2. 発表標題 糖尿病においてメサンギウム細胞との細胞連関がポドサイトの正常な小胞体関連分解を阻害し腎症を悪化させる |
| 3. 学会等名 第62回日本腎臓学会学術集会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Daisuke Fujimoto, Takashige Kuwabara, Yusuke Hata, Shuro Umemoto, Tomoko Kanki, Yoshihiko Nishiguchi, Teruhiko Mizumoto, Manabu Hayata, Yuichiro Izumi, Yutaka Kakizoe, Masashi Mukoyama |
| 2. 発表標題 Intraglomerular Cross-Talk Between Mesangial Cells and Podocytes Inhibits Normal Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation Processes and Induces Podocyte Injury in Diabetes |
| 3. 学会等名 American Society of Nephrology, Kidney Week 2019 (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Tomoko Kanki, Takashige Kuwabara, Jun Morinaga, Hirotaka Fukami, Shuro Umemoto, Daisuke Fujimoto, Teruhiko Mizumoto, Manabu Hayata, Yutaka Kakizoe, Yuichiro Izumi, Masashi Mukoyama. |
| 2. 発表標題 The Predictive Role of Serum MRP8/14 (S100A8/A9) on Mortality in Hemodialysis Patients |
| 3. 学会等名 American Society of Nephrology, Kidney Week 2019 (国際学会) |
| 4. 発表年 2019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 |
|---------|---------|
|---------|---------|