

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：11301
研究種目：基盤研究(B)（一般）
研究期間：2020～2022
課題番号：20H04099
研究課題名（和文）糖質応答転写因子ChREBPを標的とした糖尿病性腎症の病態解明・新規創薬

研究課題名（英文）Innovation of a novel DN medication by 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） 7,700,000円

研究成果の概要（和文）：我々はHTSによりChREBP阻害薬D-532を同定したが、同薬剤は糖尿病性腎症（DN）モデルマウスに対して著明な腎保護作用を示した。CRISPR-Cas9法を用いてChREBP KOマウスを作成しDMを発症させたところ、KOマウスではDNの軽減が認められた。免疫沈降等による検討の結果、D-532とChREBPが直接結合することが明らかとなった。ChIPアッセイの結果、D-532はChREBPの標的遺伝子への結合を抑制することが明らかとなった。本研究成果から、ChREBPがDNの増悪因子であること、ならびにD-532はChREBPを直接抑制することにより腎保護効果を示すことが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題によりChREBPがDNの増悪因子であること、ならびにその阻害薬であるD-532が直接ChREBPを抑制することが明らかとなった。D-532はDNの新規治療薬たり得ると考えられることから、そのDNへの臨床応用・実用化はDN患者さんにとって大きな福音となることが期待される。

研究成果の概要（英文）：We have identified a novel ChREBP inhibitor D-532 which can ameliorate the progression of diabetic nephropathy (DN) in DN model mice. In the present study, we have demonstrated the involvement of ChREBP in the progression of DN by generating ChREBP KO mice by CRISPR-Cas9 system. We have also demonstrated the direct interaction of D-532 and ChREBP. Additionally, D-532 was shown to inhibit the ChREBP binding to its target gene by ChIP assay. Therefore, D-532 may be a novel therapeutic against DM.

研究分野：内分泌・代謝学

キーワード：糖尿病性腎症 ChREBP CRISPR-Cas9システム ChIPアッセイ 免疫沈降法

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、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

邦における糖尿病 (DM) 性腎症 (DN) 患者数は年々増加傾向にあり、2017 年では新規透析導入患者数の 42.5% (第一位) を占めるに至っている。しかしながら、ヒューマンサイエンス振興財団の調査結果にては、DN は「治療の満足度」「治療に対する薬剤の貢献度」ともに各種疾患中で下位にランクされており、透析導入患者数を減少させるためには DN の新規治療薬の開発が急務である。一方、DN の病態は非常に複雑であることから、創薬の有効な標的分子が未だ同定されていないのが実情である。従って、DN の病態解明・新規治療薬の開発は、国民の健康福利・医療経済の両面から喫緊の課題と言える。

2. 研究の目的

近年、高血糖刺激により活性化される糖質応答転写因子である carbohydrate-responsive element-binding protein (ChREBP) の DN への関与が示唆されていることから、我々は、ChREBP 活性の抑制を指標とし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、強力な ChREBP 活性阻害作用を有するヒット化合物 D-532 を同定した。D-532 は 1 型 DM 由来の DN モデルマウス (iNOS-TG マウス: J Biol Chem. 1998; 273: 2493-2496.) に対して著明な尿タンパク (アルブミン) 減少効果、腎機能 (血中クレアチニン) 改善効果、腎病理像改善効果を示し、2 型 DM 由来 DN モデルマウス (db/db マウス) でも同様の結果が認められた。以上の結果から ChREBP が DN の創薬標的たり得る可能性が強く示唆されたことから、本研究課題では 1) DN の発症・増悪における ChREBP の関与・作用機構の解明ならびに 2) D532 の DN 改善効果の機序解明を進める。

3. 研究の方法

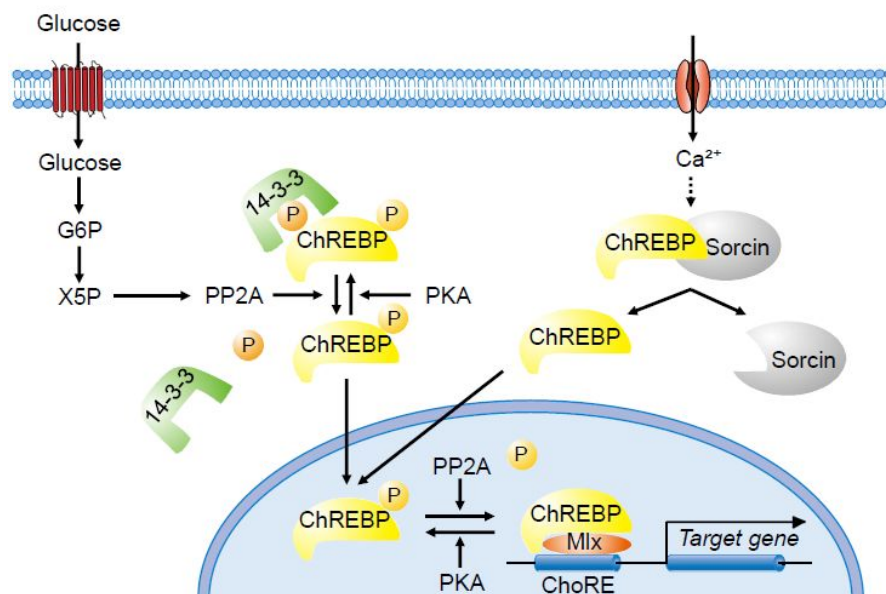
- 1) CRISPR-Cas9 システムを用いた ChREBP KO マウスの作成
- 2) ビオチン標識 D-532・免疫沈降法を用いた D-532 標的因子の同定
- 3) ChIP アッセイを用いた ChREBP と標的遺伝子の結合検討

4. 研究成果

1) 我々は CRISPR-Cas9 システムを用いて ChREBP KO マウスを作成した。同マウスにストレプトゾシンを投与することにより DM・DN を発症させたところ、ChREBP KO マウスはコントロールマウスに比して著明な腎保護作用が認められた。以上から、ChREBP が DN の発症・増悪に関与していることが明らかとなった。

2) ビオチンで標識した D-532 を使用し、ビオチンに対して高い親和性を持つと知られるアビジンを用いて D-532 結合タンパク質精製を施行したところ、D-532 の標的タンパク質として ChREBP が同定された。更に、免疫沈降法にて D-532 と ChREBP の直接結合が確認された。ChREBP の truncated mutants を用いた解析から、D-532 が N 末端部位の low-glucose inhibitory domain (LID) ならびに C 末端部位の basic helix-loop-helix/leucine zipper (bHLH/ZIP) に結合することが明らかとなった。

3) ChREBP の活性化には下図に示すように、ChREBP の核内移行ならびに標的 DNA との結合が重要である。我々の検討では、D-532 は高血糖誘導性の ChREBP 核内移行には影響を与えなかった。一方、ChIP アッセイを用いた検討では、D-532 は ChREBP の標的 DNA への結合



を抑制することが明らかとなった。本実験から、D-532 の ChREBP 活性抑制は、ChREBP の DNA への結合抑制による ChREBP 標的遺伝子の発現抑制であると考えられた。

本研究成果により、ChREBP が DN の増悪因子であること、ならびにその阻害薬である D-532 が直接 ChREBP を抑制すること

が明らかとなった。D-532 は DN の新規治療薬たり得ると考えられることから、その DN への臨床応用・実用化は DN 患者さんにとって大きな福音となることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 2件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sugawara A, Shimada H, Otsubo Y, Kouketsu T, Suzuki S, Yokoyama A.	4. 巻 44
2. 論文標題 The usefulness of angiotensin-(1-7) and des-Arg9-bradykinin as novel biomarkers for metabolic syndrome.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Hypertens Res.	6. 最初と最後の頁 1034-1036
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41440-021-00671-9.	査読の有無 有
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 -
1. 著者名 Shimada H, Yamazaki Y, Sugawara A, Sasano H, Nakamura Y.	4. 巻 9
2. 論文標題 Molecular Mechanisms of Functional Adrenocortical Adenoma and Carcinoma: Genetic Characterization and Intracellular Signaling Pathway.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biomedicines.	6. 最初と最後の頁 892
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/biomedicines9080892.	査読の有無 有
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 -
1. 著者名 Ito R, Shima H, Masuda K, Sato I, Shimada H, Yokoyama A, Shirahige K, Igarashi K, Sugawara A.	4. 巻 68
2. 論文標題 Comparative proteomic analysis to identify the novel target gene of angiotensin II in adrenocortical H295R cells.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Endocr J.	6. 最初と最後の頁 441-450
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1507/endocrj.EJ20-0144.	査読の有無 有
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 -
1. 著者名 Yokoyama A, Kouketsu T, Otsubo Y, Noro E, Sawatsubashi S, Shima H, Satoh I, Kawamura S, Suzuki T, Igarashi K, Sugawara A.	4. 巻 5
2. 論文標題 Identification and Functional Characterization of a Novel Androgen Receptor Coregulator, EAP1.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Endocr Soc.	6. 最初と最後の頁 bvab150
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1210/jendso/bvab150.	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 Ito S, Hashimoto A, Yamaguchi K, Kawamura S, Myoen S, Ogawa M, Sato I, Minato T, Miyabe S, Nakazato A, Fujii K, Mochizuki M, Fujimori H, Tamai K, Niihori T, Aoki Y, Sugawara A, Sasano H, Shima H, Yasuda J.	4. 巻 10
2. 論文標題 A novel 8.57-kb deletion of the upstream region of PRKAR1A in a family with Carney complex.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Mol Genet Genomic Med.	6. 最初と最後の頁 e1884
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/mgg3.1884.	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Suzuki Susumu, Yokoyama Atsushi, Noro Erika, Aoki Satoshi, Shimizu Kyoko, Shimada Hiroki, Sugawara Akira	4. 巻 67
2. 論文標題 Expression and pathophysiological significance of carbohydrate response element binding protein (ChREBP) in the renal tubules of diabetic kidney	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Endocrine Journal	6. 最初と最後の頁 335 ~ 345
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1507/endocrj.EJ19-0133	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Shimada Hiroki, Noro Erika, Suzuki Susumu, Sakamoto Jun, Sato Ikuko, Parvin Rehana, Yokoyama Atsushi, Sugawara Akira	4. 巻 13
2. 論文標題 Effects of Adipocyte-derived Factors on the Adrenal Cortex	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Current Molecular Pharmacology	6. 最初と最後の頁 2 ~ 6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2174/1874467212666191015161334	査読の有無 有
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 該当する

1. 著者名 Kagawa Y, Umaru BA, Shima H, Ito R, Zama R, Islam A, Kanno S, Yasui A, Sato S, Jozaki K, Shil SK, Miyazaki H, Kobayashi S, Yamamoto Y, Kogo H, Shimamoto-Mitsuyama C, Sugawara A, Sugino N, Kanamori M, Tominaga T, Yoshikawa T, Fukunaga K, Igarashi K, Owada Y	4. 巻 57
2. 論文標題 FABP7 Regulates Acetyl-CoA Metabolism Through the Interaction with ACLY in the Nucleus of Astrocytes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Neurobiology	6. 最初と最後の頁 4891 ~ 4910
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12035-020-02057-3	査読の有無 有
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 該当する

1. 著者名 Ito Ryo, Shima Hiroki, Masuda Koji, Sato Ikuko, Shimada Hiroki, Yokoyama Atsushi, Shirahige Katsuhiko, Igarashi Kazuhiko, Sugawara Akira	4. 巻 2020 Dec 26
2. 論文標題 Comparative proteomic analysis to identify the novel target gene of angiotensin II in adrenocortical H295R cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Endocrine Journal	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1507/endocrj.EJ20-0144	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Ito Ryo, Morita Masanobu, Nakano Taichi, Sato Ikuko, Yokoyama Atsushi, Sugawara Akira	4. 巻 534
2. 論文標題 The establishment of a novel high-throughput screening system using RNA-guided genome editing to identify chemicals that suppress aldosterone synthase expression	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 672 ~ 679
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.11.020	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Saijoh S, Nakamura-Shima M, Shibuya-Takahashi R, Ito R, Sugawara A, Yamazaki T, Imai T, Asada Y, Matsuura K, Iwai W, Wakui Y, Abue M, Kawamura S, Katayose Y, Fujimori H, Mochizuki M, Yasuda J, Yamaguchi K, Sugamura K, Satoh K, Katori Y, Tamai K	4. 巻 537
2. 論文標題 Discovery of a chemical compound that suppresses expression of BEX2, a dormant cancer stem cell-related protein	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 132 ~ 139
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.11.022	査読の有無 有
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10件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 高橋 馨、島田洋樹、佐藤郁子、横山 敦、菅原 明
2. 発表標題 未知の脂肪細胞由来因子による副腎CYP11B2発現誘導機序の解明
3. 学会等名 第94回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 五十嵐萌、星 啓太、横山 敦、尾坪優李、島田洋樹、菅原 明
2. 発表標題 CYP11B2とKCNJ5変異体を標的とした原発性アルドステロン症の新規創薬
3. 学会等名 第94回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鈴木 歩、横山 敦、岩淵 好治、菅原 明
2. 発表標題 糖質応答性転写因子ChREBPを標的とした糖尿病性腎症に対する新規治療薬の開発
3. 学会等名 第94回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 末松 涉、畠山慎治、横山 敦、菅原 明
2. 発表標題 オーファン核内受容体HNF4 を標的とした抗グルカゴン作用薬の開発
3. 学会等名 第94回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西澤翔輝、野呂英理香、鈴木 歩、横山 敦、岡本好司、菅原 明
2. 発表標題 糖尿病性腎症の発症・進展における腎近位尿細管ChREBPの機能解析
3. 学会等名 第94回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 瀧藤拓海、横山 敦、菅原 明
2. 発表標題 肝臓におけるHNF4 を介した糖新生遺伝子の転写制御メカニズムの解明
3. 学会等名 第94回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 坂本 純、島田洋樹、高橋 馨、横山 敦、菅原 明
2. 発表標題 未知の脂肪細胞由来因子による副腎アルドステロン合成酵素（CYP11B2）発現亢進機序の解明
3. 学会等名 第93回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 星 啓太、横山 敦、五十嵐萌、島田洋樹、菅原 明
2. 発表標題 CYP11B2・変異KCNJ5を標的とした 原発性アルドステロン症の新規創薬
3. 学会等名 第93回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 門間里奈、宮入優里、横山 敦、菅原 明
2. 発表標題 肝臓におけるHNF4 を介した糖新生遺伝子の転写機構の解明
3. 学会等名 第93回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鈴木 歩、横山 敦、岩淵好治、菅原 明
2. 発表標題 糖尿病性腎症に対する糖質応答性転写因子ChREBPを標的とした新規治療薬開発の試み
3. 学会等名 第63回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 菅原 明	4. 発行年 2020年
2. 出版社 南江堂	5. 総ページ数 438
3. 書名 シンプル生化学（改訂第7版）	

1. 著者名 菅原 明	4. 発行年 2020年
2. 出版社 医学書院	5. 総ページ数 1960
3. 書名 新臨床内科学（第10版）	

1. 著者名 菅原 明	4. 発行年 2020年
2. 出版社 金原出版	5. 総ページ数 2012
3. 書名 臨床検査法提要（改訂第35版）	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 1,3-ジオキソラン誘導体	発明者 菅原 明、横山 敦、鈴木 歩、岩淵 好治、土井 隆行	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、出願特許PCT/JP2020/005858	出願年 2020年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔その他〕

菅原研究室
<https://www.molendo.med.tohoku.ac.jp/>
ホルモン核内受容体の基礎研究を基盤とした内分泌代謝疾患・メタボリック症候群の病態解明ならびに新規創薬
<https://www.med.tohoku.ac.jp/about/laboratory/189.html>

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
研究分担者	岩淵 好治 (Iwabuchi Yoshiharu) (20211766)	東北大学・薬学研究科・教授 (11301)	
研究分担者	横山 敦 (Yokoyama Atsushi) (20572332)	東北大学・医学系研究科・准教授 (11301)	
研究分担者	岡本 好司 (Okamoto Koji) (80572247)	東北大学・大学病院・講師 (11301)	

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