

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19692

研究課題名（和文）ゲノムワイドCRISPRスクリーニング法を用いた糖尿病性腎症の新規創薬・病態解明

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

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） 4,500,000円

研究成果の概要（和文）：糖尿病性腎症（DN）の新薬の開発は、喫緊の課題である。我々は化合物ライブラリーのHTSにて新規化合物D-532を得たが、同化合物はDNモデルマウスに対して著明な腎保護効果を示したことから、同薬剤がDNの新規治療薬たり得る可能性が考えられた。DNモデルマウスにD-532を投与しRNAシーケンスを施行したところ、同マウスで発現が亢進しているアポトーシス関連遺伝子L-PK、TXNIPやFIS1の発現が、D-532投与により抑制されることが認められた。TXNIPは酸化ストレスの亢進に関与している遺伝子であることから、D-532によるTXNIPの抑制がDNの改善効果に関与している可能性が推測された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題により、我々が見出した新規化合物D-532の標的遺伝子が、高血糖誘導性の酸化ストレス亢進に関与するTXNIPである可能性が推定された。今後、D-532を基盤とした新規DN治療薬・治療法の開発を進めるが、本研究の遂行は国民の健康福利・医療経済に大きく貢献できるものを期待される。

研究成果の概要（英文）：We have previously identified D-532 by the high-throughput screening using the chemical library. D-532 protected kidney function in both type 1 and type 2 diabetic mice that express diabetic nephropathy (DN). In the present study, we have identified that TXNIP gene, which is a key molecule for the high-glucose induced ROS, is the target gene of D-532 by RNA sequencing using RNA extracted from kidney cortex of type 1 DN mice. D-532 may therefore be a potential therapeutic against DN in the near future.

研究分野：内分泌・代謝学

キーワード：糖尿病性腎症 TXNIP ChREBP 酸化ストレス RNAシーケンス

1. 研究開始当初の背景

本邦における糖尿病 (DM) 性腎症 (DN) 患者数は年々増加傾向にあり、2018 年末では新規透析導入患者数の 42.3% (第一位) を占めるに至っている。しかしながら、DN の病態制御遺伝子は未だ不明であり、DN 治療薬も現状ではレニン・アンジオテンシン系阻害薬のみと言っても過言ではない。さらに、過去 16 年間の同薬使用下でも DN 患者数は増加し有病率の改善が認められなかった (JAMA. 2016; 316: 602-610.) ことから、DN の病態制御遺伝子の解明ならびに既存薬とは異なる作用機序を持つ DN の新薬の開発は、国民の健康福利・医療経済の両面から喫緊の課題と考えられる。

2. 研究の目的

我々は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) にて新規化合物 D-532 を得たが、同化合物は、1 型・2 型 DN モデルマウスに対して著明な尿タンパク減少効果、腎機能改善効果、腎病理像改善効果を示したことから、同薬剤が DN の新規治療薬たり得る可能性が考えられた。本研究の目的は、D-532 の標的遺伝子を明らかにすることにより、D-532 の作用機序ならびに DN の病態制御遺伝子の解明を進める事である。

3. 研究の方法

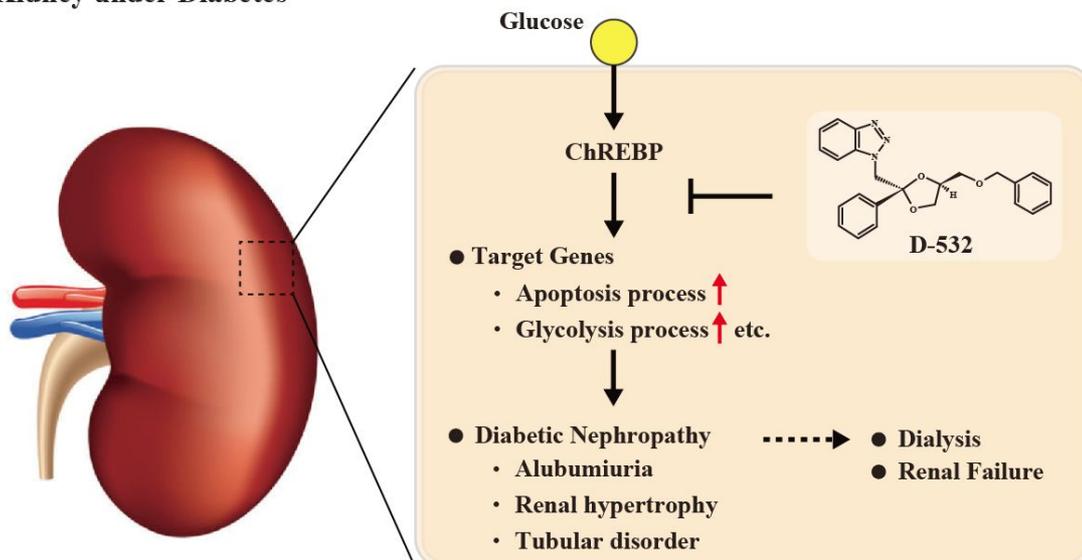
1 型 DN モデルマウスである iNOS-TG マウス (J Biol Chem. 1998; 273: 2493-2496.) に vehicle または D-532 を投与した後、腎皮質から RNA を抽出して RNA シークエンスに供した。得られた標的遺伝子の発現に対する D-532 の作用を、高血糖刺激条件下でのマウス腎近位尿細管上皮細胞 mProx24 を用いて定量 PCR で解析した。さらに、D-532 の同細胞における ROS 産生に対する効果も併せて検討した。

4. 研究成果

RNA シークエンスの結果、iNOS-TG マウスでは野生型マウスに比して高血糖により活性化される転写因子である carbohydrate-responsive element-binding protein (ChREBP) の標的アポトーシス関連遺伝子である L-PK、TXNIP や FIS1 の発現亢進が認められた一方で、D-532 投与によりこれらの遺伝子発現の抑制が認められた。DAVID による GO (gene ontology) enrichment analysis の結果、様々な経路が検出され、その中には ChREBP の機能としてよく知られている解糖系経路や ChREBP 活性化に重要なセリンのリン酸化経路、そしてアポトーシス経路などが含まれていた

D-532 投与による L-PK、TXNIP や FIS1 遺伝子発現の抑制は、高血糖刺激条件下でのマウス腎近位尿細管上皮細胞 mProx24 を用いた検討でも認められた。さらに、同細胞における高血糖による ROS 産生の増加も、D-532 投与により抑制された。特に TXNIP は高血糖誘導性の酸化ストレスの亢進に関与している遺伝子であることから、D-532 による TXNIP の抑制が DN の改善効果に関与している可能性が推測された。現在、我々は CRISPR-Cas9 法を用いての TXNIP KO マウスの作成に着手している。

Kidney under Diabetes



上記に、我々のデータから推定される D-532 の作用機序を示す。糖尿病に伴う高グルコース刺激により活性化した ChREBP は腎臓において TXNIP 等の標的遺伝子発現促進を介して酸化ストレスによるアポトーシス経路の亢進を引き起こすと考えられている。これに対して D-532

は ChREBP の転写活性阻害能を有するため、高グルコース下の腎臓において生じる ChREBP 活性化を介した TXNIP 等による障害が抑制され、腎保護作用を示したと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0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 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 -

〔学会発表〕 計6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

〔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
研究 分担 者	岩淵 好治 (Iwabuchi Yoshiharu) (20211766)	東北大学・薬学研究科・教授 (11301)	

6. 研究組織（つづき）

	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	横山 敦 (Yokoyama Atsushi) (20572332)	東北大学・医学系研究科・准教授 (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