

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460098

研究課題名(和文)慢性腎臓病モデルにおけるp53およびMEF転写因子の役割の解明

研究課題名(英文)The role of transcription factors p53 and MEF in a mouse model of chronic kidney disease (CKD)

研究代表者

スイコ メリー・アン・ソテン (Suico, Mary Ann)

熊本大学・大学院生命科学研究部(薬)・助教

研究者番号：20363525

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：アルポート症候群(AS)は小児で最も頻度の高い遺伝性糸球体腎炎であり、患者はほぼ例外なく若年で末期腎不全に至る難治性の腎疾患である。これまで、本研究室ではpodocyteにおける癌抑制遺伝子p53がASの腎病態に対して、保護的に作用することを見出した(J Am Soc Nephrol. 2016)。本研究では、p53によっても調節を受けることで知られるミトコンドリアに着目し、ASに対するミトコンドリア機能補完による腎病態改善効果の検討を行った。その結果、ミトコンドリア機能補完薬 MitoQ は、ASの腎線維化や炎症性サイトカインの発現を有意に抑制した。

研究成果の概要(英文)：Alport syndrome (AS) is a progressive hereditary kidney disease caused by mutation in collagen Type 4A3, A4 or A5, which are some of the components of glomerular basement membrane. Effective treatment for AS has not been established, and development of novel therapy is required. Here, we treated AS mice with MitoQ, which is an anti-oxidant that normalizes mitochondrial dysfunction by protecting against oxidative stress, and determined whether the mitochondrial dysfunction in AS is due to oxidative stress. Treatment of 6-week-old AS mice for 2 months ameliorates AS phenotypes such as renal fibrosis and kidney injury and inflammatory cytokines expression. Further investigations will reveal the causative molecules and signaling pathways that mediate mitochondrial dysfunction in Alport mice.

研究分野：医歯薬学

キーワード：分子生物学 慢性腎臓病 p53 MEF ミトコンドリア

1. 研究開始当初の背景

慢性腎臓病 CKD (Chronic Kidney Disease) は、慢性的な腎機能低下を主徴とした腎臓病の総称であり、2002年に米国腎臓財団 (National Kidney Foundation; NKF) より提唱された疾患概念である。この概念は、従来、原因疾患別に考えられていた腎疾患を腎障害の存在と糸球体濾過値 (glomerular filtration rate: GFR) に基づいて包括的に1つの疾患として捉えなおすものであり、腎臓病の早期発見や末期腎不全への進行抑制を目的として提唱された。本邦においてもこの概念の普及が功を奏し、多くの腎疾患に共通した病態であるタンパク尿や炎症、線維化に対する理解が高まるとともに、病態進行抑制のための治療法や治療ガイドラインが確立されてきた。一方、それらによって生み出された治療法は対症療法が基本であり、ある程度の効果を示すものの、最終的に末期腎不全に至る患者は増加し続けている。そのような現在の対症療法の限界を省みると、改めて、原因疾患別の病態発症メカニズムの解明、および原因分子やその制御因子を標的とした根本治療薬の開発の必要性が考えられる。アルポート症候群 (Alport Syndrome; AS) は小児で最も頻度の高い遺伝性糸球体腎炎である。原因遺伝子は腎糸球体基底膜 (Glomerular basement membrane; GBM) を構成するIV型Collagen (COL4A3/COL4A4/COL4A5) であり、いずれかの遺伝子の変異で発症する。変異型は、常染色体上に位置するCOL4A3またはCOL4A4の変異による常染色体性劣性・優性型 (ARAS・ADAS)、X染色体上に位置するCOL4A5の変異によるX染色体連鎖型 (XLAS) に分類され、患者の約85%はXLASである。また、XLASであることから、男性の患者数が多く、病態も顕著であることが知られている。他のCKDと比較して末期腎不全への移行が早く、重症患者では10代後半から20代で末期腎不全に至る。また、ASは変異の種類により病態進行スピードが異なるものの、30歳代までにほぼ例外なく透析導入を要することから、若年透析導入の主因とされている。したがって、ASの効果的な治療法の開発は、小児CKDや若年透析患者の減少および患者のQOL向上に大きく貢献すると考えられる。現在、ASに対する治療はCKD治療において汎用されるレニン・アンジオテンシン系阻害薬等による腎機能維持療法が主体であるが、治療効果には限界があり、患者のほとんど人工透析や腎移植を余儀なくされている。ASは病態進行が早いことや早期診断、確定診断が可能であることから、

原因となる分子を標的とした根本的治療薬の開発が強く望まれている。さらに、AS病態進行の一連のメカニズムは、糖尿病性腎症や他の慢性糸球体腎炎等、原因の異なる他のCKDにおいて共通するものである。したがって、ASを基点とした糸球体原発性の病態制御分子および治療標的の探索は、ASだけにとどまらず、原因や合併症の多様さにより複雑化したCKD治療薬開発の抱える現状を打破できる可能性を有している。

2. 研究の目的

上記の背景のもと、本研究室では podocyte における癌抑制遺伝子 p53 が AS の腎病態に対して、保護的に作用することを見出した (Fukuda R., *et al.*, *J Am Soc Nephrol.* 2016)。また、p53 またはその調節因子である MEF によっても調節を受ける可能性があるミトコンドリアに着目し、種々の検討を行ったところ、AS 病態早期の糸球体においてミトコンドリア機能異常が引き起こされることを明らかにしてきた。しかしながら、ミトコンドリア機能異常が治療標的となりうるかについて、ミトコンドリア機能の補完による AS 病態への影響は不明である。そこで、本研究では、ミトコンドリア機能補完薬 MitoQ を AS モデルマウスに長期投与し、病態への影響を検討した。

3. 研究の方法

ミトコンドリア機能改善薬として、ミトコンドリアを標的とした抗酸化剤である MitoQ に着目した。MitoQ はミトコンドリアの呼吸鎖複合体 I と III 間の電子伝達の仲介を果たしているユビキノン (Coenzyme Q: CoQ) の誘導体であり、電子伝達系における活性酸素 (一電子還元酸素) 産生抑制やミトコンドリア膜外へのプロトン放出によるエネルギー産生亢進作用を有するとされている。

本研究で用いる MitoQ は Idebenone から合成した。また、合成した MitoQ は、マウス podocyte 細胞株 (MPC5) において、ミトコンドリア脱共役剤 CCCP (Carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazine) による膜電位の低下および過酸化水素による細胞内活性酸素種 (ROS) の増加を改善させることを確認した。

動物実験では、8週齢の AS モデルマウス (COL4A5 G5X) に対し、12週間 (20週齢まで) MitoQ 10 mg/kg/day を飲水投与した。なお MitoQ は、野生型マウスへの飲水投与、高濃度 (~500 μM)、長期間 (~28週間) において毒性がないことが確認されており、本研究での

投与量は、その 10 分の 1 以下であり、マウスの飲水量や体重に顕著な変化は認められなかった。

4. 研究成果

まず、MitoQ が AS モデルマウスの腎機能へ与える影響を検討するため、投与群と非投与群において、経時的な尿中タンパク質、血中尿素窒素 (BUN)、血中クレアチニンの測定を行った。その結果、投与群と非投与群におけるタンパク尿スコアに差はみられなかった。また、血中パラメータである、BUN および血中クレアチニンは病態後期において投与群での減少が一部みられた。投与群におけるタンパク尿の抑制がみられなかったことから、本研究条件では、MitoQ は AS モデルマウスのタンパク尿抑制効果がないことが示された。

次に、MitoQ による糸球体障害や線維化への影響について、詳細に検討を行った。投与 12 週間 (20 週齢) のマウスを解剖し、腎組織切片の組織病理解析を行った結果、投与群において糸球体障害スコアは抑制傾向を示し ($p=0.08$)、線維化領域については有意かつ顕著な抑制作用を示した。また、MitoQ 投与群において糸球体障害スコアの改善効果は弱いものの、組織学的な観察では、炎症性細胞の浸潤や尿細管障害が軽減される傾向がみられた。これらの結果から、MitoQ による効果は、間質の線維化抑制作用は明確であり、一部、炎症性細胞の浸潤や尿細管障害も抑制することが示された。

また、MitoQ 投与群と非投与群における炎症性サイトカインおよび腎障害マーカーの mRNA 発現を比較した。その結果、AS モデルマウスの腎臓において発現が増加する炎症性サイトカイン IL-6 や KC (IL-8 マウスホモログ) の発現が MitoQ 投与により減少することが明らかとなった。一方、腎障害マーカーの発現に有意な差は認められなかった。このことから、本条件による MitoQ は、腎障害を抑制するまでの十分な効果は認められなかったものの、炎症性サイトカインの発現を有意に低下させることがわかった。

最後に、MitoQ の投与が、ROS の産生に与える影響について検討した。そこで、酸化ストレスマーカーとして、腎臓で高発現し、ミトコンドリアにおいて ROS の産生を担う NADPH oxidase である Nox4 および ROS の除去を担う抗酸化酵素である Mn-SOD の発現を評価した。その結果、予想に反し、AS モデルマウス腎臓において、Nox4 の発現が減少していることが明らかとなり、MitoQ 投与によりその発現が増加することが明らかとなった。また、同様に Mn-SOD の発現も減少することが明らかとなったが、MitoQ の投与による発現の変動はみられなかった。

以上、本研究は、既存の AS モデルマウスを用いて、CKD 病態形成機構の一端にミトコンドリア機能異常が関与することを示唆するものであり、今後、これまで見出した p53 との関連、またはその調節因子である MEF との関連について、さらに検討する予定である。

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 10 件)

1. Omachi K, Miyakita R, Fukuda R, Kai Y, Suico MA, Yokota T, Kamura M, Shuto T, Kai H. Long-term treatment with EGFR inhibitor erlotinib attenuates renal inflammatory cytokines but not nephropathy in Alport syndrome mouse model. *Clin Exp Nephrol*. 2017. doi: 10.1007/s10157-017-1386-9. 査読有
2. Suico MA, Shuto T, Kai H. Roles and regulations of the ETS transcription factor ELF4/MEF. *J Mol Cell Biol*. 2017. pii: mjjw051. [Epub ahead of print] Review. 査読有
3. Kondo T, Goto R, Ono K, Kitano S, Suico MA, Sato M, Igata M, Kawashima J, Motoshima H, Matsumura T, Kai H, Araki E. Activation of heat shock response to treat obese subjects with type 2 diabetes: a prospective, frequency-escalating, randomized, open-label, triple-arm trial. *Sci Rep*. 2016;6:35690. 査読有
4. Suico MA, Taura M, Kudo E, Gotoh K, Shuto T, Okada S, Kai H. The ETS Factor Myeloid Elf-1-Like Factor (MEF)/Elf4 Is Transcriptionally and Functionally Activated by Hypoxia. *Biol Pharm Bull*. 2016;39(4):641-7. doi: 10.1248/bpb.b15-00796. 査読有
5. Kai Y, Tsurekawa Y, Fukuda R, Omachi K, Piruzyan M, Okamoto Y, Motomura K, Suico MA, Shuto T, Kondo T, Araki E, Kai H. The effect of mild electrical stimulation with heat shock on diabetic KKAY mice. *Integr Mol Med*. 2015; 3: DOI: 10.15761/IMM.1000190. 査読有
6. Koga T, Suico MA, Shimasaki S, Watanabe E, Kai Y, Koyama K, Omachi K, Morino-Koga S, Sato T, Shuto T, Mori K, Hino S, Nakao M, Kai H. Endoplasmic Reticulum (ER) Stress Induces Sirtuin 1 (SIRT1) Expression via the PI3K-Akt-GSK3 β Signaling Pathway and Promotes Hepatocellular Injury. *J Biol Chem*. 2015 ; 290(51):30366-74. doi: 10.1074/jbc.M115.664169. 査読有

7. Fukuda R, Suico MA, Kai Y, Omachi K, Motomura K, Koga T, Komohara Y, Koyama K, Yokota T, Taura M, Shuto T, Kai H. Podocyte p53 Limits the Severity of Experimental Alport Syndrome. *J Am Soc Nephrol*. 2016 ;27(1):144-57. doi: 10.1681/ASN.2014111109. 査読有
8. Kondo T, Ono K, Kitano S, Matsuyama R, Goto R, Suico MA, Kawasaki S, Igata M, Kawashima J, Motoshima H, Matsumura T, Kai H, Araki E Mild Electrical Stimulation with Heat Shock Reduces Visceral Adiposity and Improves Metabolic Abnormalities in Subjects with Metabolic Syndrome or Type 2 Diabetes: Randomized Crossover Trials *EBioMedicine*.2014 ;1(1):80-89.doi:10.1016/j.ebiom.2014.11.001 査読有
9. Suico MA, Fukuda R, Miyakita R, Koyama K, Taura M, Shuto T, Kai H. The transcription factor MEF/Elf4 is dually modulated by p53-MDM2 axis and MEF-MDM2 autoregulatory mechanism. *J Biol Chem*. 2014 ;289(38):26143-54. doi: 10.1074/jbc.M114.580209. 査読有
10. Matsuyama S, Moriuchi M, Suico MA, Yano S, Morino-Koga S, Shuto T, Yamanaka K, Kondo T, Araki E, Kai H. Mild electrical stimulation increases stress resistance and suppresses fat accumulation via activation of LKB1-AMPK signaling pathway in *C. elegans*. *PLoS One*.2014;9(12):e114690. doi: 10.1371/journal.pone.0114690. 査読有

〔学会発表〕(計 7 件)

1. 甲斐 広文, 大町 紘平, Mary Ann Suico, 首藤 剛. タンパク質フォールディングは遺伝性腎炎アルポート症候群の新たな標的となり得るか. 第 90 回日本薬理学会年会 2017.3.15-17. 長崎ブリックホール(長崎)
2. Mary Ann Suico, Manabu Taura, Eriko Kudo, Kumiko Gotoh, Tsuyoshi Shuto, Seiji Okada, Hirofumi Kai「HIF-1 α activates the ETS factor myeloid elf-1-like factor (MEF)/ELF4」第 69 回日本薬理学会西南部会 2016.11.26. 松山大学(愛媛)
3. Tomoaki Koga, Mary Ann Suico, Shogo Shimasaki, Eriko Watanabe, Yukari Kai, Kosuke Koyama, Kohei Omachi, Saori Morino-Koga, Takashi Sato, Tsuyoshi Shuto, Kazutoshi Mori, Shinjiro Hino, Mitsuyoshi Nakao, Hirofumi Kai 「SIRT1 IS UP-REGULATED BY ER STRESS VIA THE PI3K-AKT-GSK3 β PATHWAY AND MEDIATES ER STRESS-INDUCED HEPATOCELLULAR INJURY」第 89 回日本薬理学会年会 2016.3.9-11 パシフィコ横浜(神奈川県)

4. M.A. Suico, R. Fukuda, Y. Kai, K. Omachi, K. Motomura, T. Koga, K. Koyama, T. Yokota, M. Taura, T. Shuto, H. Kai. Podocyte p53 limits the severity of experimental Alport syndrome. International Symposium on Chronic Inflammatory Diseases, Kumamoto (ISCIDK2015). 2015.10.16-17. Kumamoto Univ., Kumamoto, Japan
5. Mary Ann Suico, Manabu Taura, Eriko Kudo, Tsuyoshi Shuto, Seiji Okada, Hirofumi Kai. Myeloid Elf-1-like Factor (MEF)/Elf-4 is Induced by HIF1/Hypoxia and contributes to VEGF regulation. The 74th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. 2015.10.8-10. Nagoya Congress Center, Nagoya, Japan
6. Mary Ann Suico, 福田 亮介, 首藤 剛, 甲斐 広文. 「遺伝性腎疾患の発症機構に関わる新たな分子標的」. 第 88 回日本薬理学会. 2015.3.18-20. 名古屋国際会議場(名古屋)
7. Mary Ann Suico, Rui Miyakita, Kosuke Koyama, Ryosuke Fukuda, Manabu Taura, Tsuyoshi Shuto, Hirofumi Kai. The ETS transcription factor Myeloid Elf-1-like Factor (MEF)/Elf-4 is suppressed by E3 ligase MDM2. 第 73 回日本癌学会学術総会.2014.9.25-27. パシフィコ横浜(神奈川県)

〔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

<http://molmed730.org/index.html>

6. 研究組織
 (1)研究代表者

スイコ メリー・アン・ソテン (SUICO, Mary
Ann Soten)
熊本大学・大学院生命科学研究部 (薬学系) ・
助教
研究者番号 : 20363525

(2)研究分担者
()

研究者番号 :

(3)連携研究者
()

研究者番号 :