

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670070

研究課題名(和文)新規インドール誘導体群による腎虚血改善剤の創薬

研究課題名(英文) Indole analog mitochonic acid-5 (MA-5) has novel therapeutic effects on kidney injury

研究代表者

阿部 高明 (ABE, Takaaki)

東北大学・医工学研究科・教授

研究者番号：80292209

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本邦では末期腎不全になり透析にいたる可能性が高い慢性腎臓病(CKD)の患者が増えている。現在までに腎機能を保護する薬剤はない。申請者は腎不全患者の血中メタボローム解析を行いエリスロポエチン(Epo)産生促進作用のある物質を発見した。そこでその化合物誘導体ライブラリーを合成しEpo産生能を指標にスクリーニングしたところ数種類の物質にEpo産生促進作用、細胞内ATP増加作用があることを見だし特許出願を行った。そこで本研究では我々の開発した新規化合物群を用いてこの薬物のin vitroでの細胞保護作用と各種動物腎症モデルに投与して化合物新たな腎臓病治療薬としての可能性を検討することを目的とする。

研究成果の概要(英文)：Chronic kidney disease (CKD) is a global health problem that carries a substantial risk for cardiovascular disease and death. We recently found that several indole-derivatives increased ATP levels in cells by screening of 41 newly synthesized indole derivatives. Among those compounds, we focused on the most potent indole derivative #5 (Mitochonic acid 5; MA-5) (Suzuki T et al. Tohoku journal Exp Med ;236:225-232:2015). The aim of this study was to clarify the effects of MA-5 in kidney injury to prevent CKD.

研究分野：腎臓内科

キーワード：CKD インドール MA=5 虚血再灌流

1. 研究開始当初の背景

本邦では末期腎不全になり透析にいたる可能性が高い慢性腎臓病 (CKD) の患者が増えており、透析にかかる費用は1兆5千億円を越え今後更に増加してゆく。また腎機能の悪化とともに腎性貧血が起こりエリスロポエチン(Epo)製剤が使用されるが薬価は高く医療費を押し上げている。現在までに腎機能を保護する薬剤は降圧剤である ACEi/ARB 以外上市されていない。また腎性貧血に対する治療薬剤も注射薬である Epo 製剤以外はない。

2. 研究の目的

申請者は腎不全患者の血中に100種類以上ある尿毒症物質のメタボローム解析を行い、その中から Epo 産生促進作用のある物質を発見した (JASN2009, HTN Res2010, CEN2011, JSAN2013)。

そこでその化合物をリード化合物として岡山理科大学と共同で化合物ライブラリーを合成し、その中の代表化合物41種類をさらにEpo産生能を指標にスクリーニングしたところ数種類の物質にEpo産生促進作用と細胞内ATP増加作用があることを見だし特許出願を行った (特願2012-258027: エリスロポエチン産生を促す化合物群、特願2013-209539腎機能障害の予防又は改善剤)。

一般に細胞内の ATP の増加は細胞ストレス増加に惹起された可能性が考えられるが、細胞増殖アッセイ等から本剤は細胞毒性が無いこと、ミトコンドリア機能低下状態でも細胞の生存率を上げる事が確認された。さらに LC/MS/MS を用いた血中濃度測定系を立ち上げ経口投与したところこれらの新規の化合物は有効血中濃度が確認された。そこで脳虚血・再灌流マウスに経口投与したところ、血中 Epo 濃度が上昇し脳内の虚血巣面積の減少が確認され、またミトコンドリアストレスが解除された。従って我々の合成した新規化合物群はミトコンドリアを介して臓器保護作用を有している可能性が示唆された。そこで本研究では我々の開発した新規化合物群を用いてこの薬物の *in vitro* の腎細胞保護作用と各種動物腎症モデルに投与して化合物新たな腎臓病治療薬としての可能性を検討する事を目的とした。

3. 研究の方法

そこで本研究は新規化合物の腎保護作用をメインに以下の検討を行なった。

- ヒト腎臓 Epo 産生 REPC 細胞を用いて Epo mRNA の増加・培地中 Epo 濃度の増加を確認する。
- 腎不全動物は主にラットのため、本化合物をラットに投与し腎臓での Epo 増加効果を再確認する。
- マイクロアレイ・リガンド結合ビーズを用いた結合蛋白質の網羅的探索

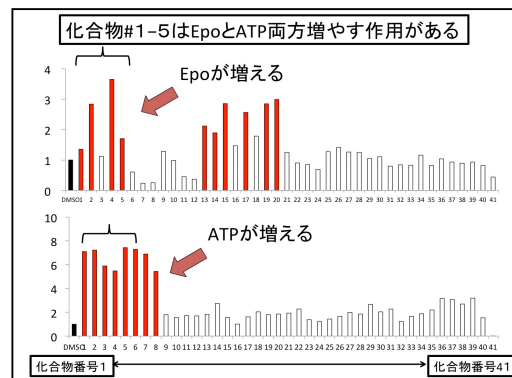
を通して化合物の作用機序、シグナル伝達経路、解毒遺伝子 (Cyp や解毒酵素) の誘導の有無の検討を行う。

- 糸球体・尿細管細胞に病因とされる負荷 (高血糖、低酸素、酸化・小胞体ストレス、尿毒素、シスプラチン、造影剤) を与え化合物による生存率、増殖率、修復能改善を検討する。
- 虚血・再灌流による急性腎不全ラットに化合物を投与し尿細管を主体とした病理所見と腎機能の比較検討を行う。
- 動物に投与された化合物の血中、組織中濃度を測定するために LC/MS/MS を用いて精密測定系を開発する。

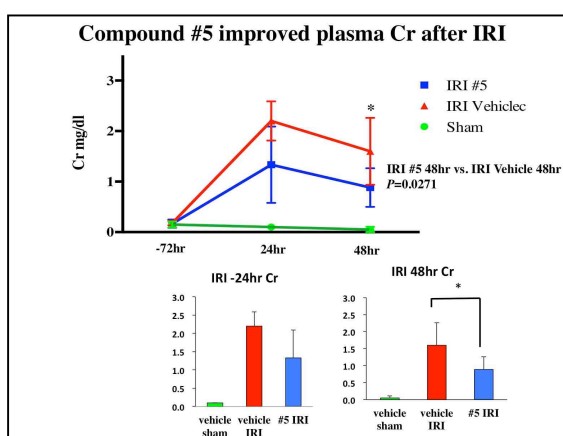
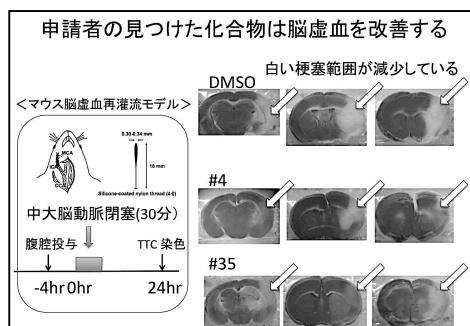
4. 研究成果

申請者は腎不全患者の血中尿毒症物質110種類の中から エリスロポエチン産生促進作用のある物質を見つけ、その物質をヒット化合物として岡山理科大学と共同で化合物ライブラリーを作成した。そのうち代表例41種類をスクリーニングしたところ数種類がエリスロポエチン産生促進作用と細胞の生存率を上げ ATP を増加させることを見いだした。これら化合物をミトコンドリア病患者の皮膚線維芽細胞に曝露し生存率を検討したところ化合物 #2, 4, 5 は生存率を有意に上昇させ、細胞内 ATP 濃度を上昇させるとともに腎不全マウスの腎機能を改善させた。その作用機序は EPI-743 とは異なりミトコンドリア結合蛋白質を介した新規作用機序であった。

細胞内の ATP の増加は細胞ストレス増加に惹起された可能性が考えられるが、細胞増殖アッセイ等から本剤は細胞毒性が無いこと、ミトコンドリア機能低下状態でも細胞の生存率を上げること及びシスプラチン等の薬剤による腎毒性を軽減させる効果がある事が確認された。さらに LC/MS/MS を用いた血中濃度測定系を立ち上げ経口投与したところこれらの新規の化合物は有効血中濃度が確認された。



そこで脳虚血・再灌流マウスに経口投与したところ、血中 Epo 濃度が上昇し脳内の虚血巣面積（下図の白矢印部分）の減少が確認され、またミトコンドリアストレスが解除。従って我々の合成した新規化合物群はミトコンドリアを介して臓器保護作用を有している可能性が示唆された。



ヒト腎臓由来細胞 HK-2 は ATCC から入手し、DMEM/F12 培地に 10% 牛胎児血清とペニシリン・ストレプトマイシンを添加して培養した。HK-2 細胞を 96 穴プレートに 5000 個/ウェルでまいて一晩静置した。コントロールを除いた全ての培地にはシスプラチン 30 μM （入っており、更に各ウェルに化合物を 10 mM から 0.03 mM まで希釈して添加して更に 2 4 時間 5 % CO_2 、37 度でインキュベートした。その後生細胞の割合を同仁化学研究所の Cell counting kit (W8) を用いて測定した。その結果、化合物は 0.03 μM から 10 μM までの濃度でシスプラチンによる細胞死を有意に抑制した。このことは化合物は薬物による腎毒性を解除する働きがあると考えられた。また我々はすでに本薬剤が脳虚血モデル、急性腎不全モデルや側索硬化症モデル、アトピー性皮膚炎モデル動物で臓器障害が回復することも確認、特許申請の中に含めており本化合物の用途の裾野は広いと考えられた。

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 14 件)

1. Mishima E., Jinno D., Akiyama Y., Itoh K., Nankumo S., Shima H., Kikuchi K., Takeuchi Y., Suzuki T., Elkordy A., Niizuma K., Ito S., Tomioka Y. and **Abe T.** Immuno-northern blotting: Detection of RNA modifications by using antibodies against modified nucleosides. *Plos One* 10 :e0143756, 2015 doi: 10.1371/journal.pone.0143756. (査読有り)
2. Suzuki T., Yamaguchi H., Kikusato M., Hashizume O., Nagatoishi S., Matsuo A., Sato T., Kudo T., Matsushashi T., Murayama K., Ohba Y., Watanabe S., Kanno S.-I., Minaki D., Saigusa D., Shinbo H., Mori N., Yuri A., Yokoro M., Mishima E., Shima H., Akiyama Y., Takeuchi Y., Kikuchi K., Toyohara T., Suzuki C., Ichimura T., Anzai J., Kohzuki M., Mano N., Kure S., Yanagisawa T., Tomioka Y., Tohyomizu M., Tsumoto K., Kazuto Nakata K., Bonventre J.V., Ito S., Osaka H., Hayashi K. and **Abe T.** Mitochondrial acid MA-5 binds to mitochondria and ameliorates renal tubular and cardiac myocyte damages. *J Am Soc Nephrol.* 2015 Nov 25. pii: ASN.2015060623.(DOI未だなし) (査読有り)
3. Suzuki T., Yamaguchi H., Kikusato M., Matsushashi T., Matsuo A., Sato T., Oba Y., Watanabe S., Minaki D., Saigusa D., Shimbo H., Mori N., Mishima E., Shima H., Akiyama Y., Takeuchi Y., Yuri A., Kikuchi K., Toyohara T., Suzuki C., Kohzuki M., Anzai J., Mano N., Kure S., Yanagisawa T., Tomioka Y., Toyomizu M., Ito S., Osaka H., Hayashi K. and **Abe T.**

- Mitochondrial Acid 5 (MA-5), a Derivative of the Plant Hormone Indole-3-Acetic Acid, Improves Survival of Fibroblasts from Patients with Mitochondrial Diseases. *Tohoku J Exp Med.* 236: 225-232, 2015 doi: 10.1620/tjem.236.225. (査読有り)
4. Mishima E., Hashimoto J., Akiyama Y., Shima H., Seiji K., Takase K., **Abe T.**, and Ito S. Impact of Small Renal Ischemia in Hypertension Development: Renovascular Hypertension Caused by Small Branch Artery Stenosis. *J Clin Hypertens* (Greenwich). 2015 Aug 21. doi: 10.1111/jch.12661. (査読有り)
 5. Ohmine K., Kawaguchi K., Ohtsuki S., Motoi F., Ohtsuka H., Kamiie J., **Abe T.**, Unno M. and Terasaki T. Quantitative Targeted Proteomics of Pancreatic Cancer: Deoxycytidine Kinase Protein Level Correlates to Progression-Free Survival of Patients Receiving Gemcitabine Treatment. *Mol Pharm.* 2015 Aug 25. doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.5b00282. (査読有り)
 6. Mishima E, Hashimoto J, Akiyama Y, Seiji K, Takase K, **Abe T.**, Ito S. Posterior reversible encephalopathy syndrome treated with renin-angiotensin system blockade. *J Neurol Sci.* 355: 219-21, 2015 doi: 10.1016/j.jns.2015.06.007. (査読有り)
 7. Mishima E., Fukuda S., Shima H., Hirayama A., Akiyama Y., Takeuchi Y., Fukuda N.N., Suzuki T., Suzuki C., Yuri A., Kikuchi K., Tomioka Y., Ito S., Soga T. and **Abe T.** Alteration of the Intestinal Environment by Lubiprostone Is Associated with Amelioration of Adenine-Induced CKD. *J Am Soc Nephrol.* 26: 1787-94, 2015 doi: 10.1681/ASN.2014060530. (査読有り)
 8. Takeuchi Y, Mishima E., Shima H., Akiyama Y., Suzuki C., Suzuki T., Kobayashi T., Suzuki Y., Nakayama T., Takeshima Y., Vazquez, N., Ito S., Gamba G. and **Abe T.** Exonic Mutations in the SLC12A3 Gene Cause Exon Skipping and Premature Termination in Gitelman's Syndrome. *J. Am. Soc. Nephrol.* 26: 271-279, 2015 doi: 10.1681/ASN.2013091013. (査読有り)
 9. Fujihara M, Yokoi Y., **Abe T.**, Soga Y., Yamashita T., Miyashita Y., Nakamura M., Yokoi H. and Ito S; J-RAS Study Investigators. Clinical Outcome of Renal Artery Stenting for Hypertension and Chronic Kidney Disease up to 12 Months in the J-RAS Study. *Circ J.* 79: 351-9, 2015 doi: 10.1253/circj.CJ-14-0908. (査読有り)
 10. Sato T., Yamaguchi H., Kogawa T., **Abe T.** and Mano N. Organic anion transporting polypeptides 1B1 and 1B3 play an important role in uremic toxin handling and drug-uremic toxin interactions in the liver. *J Pharm Pharm Sci.* 17: 475-84, 2014 (査読有り) (DOIなし)
 11. Masereeuw R., Mutsaers H.A., Toyohara T., **Abe T.**, Jhavar S., Sweet D.H. and Lowenstein J. The Kidney and Uremic Toxin Removal: Glomerulus or Tubule? *Semin Nephrol.* 34:191-208, 2014 doi: 10.1016/j.semnephrol.2014.02.010. (査読有り)
 12. Mullen W., Saigusa D., **Abe T.**, Adamski J. and Mischak H. Proteomics and Metabolomics as Tools to Unravel Novel Culprits and Mechanisms of Uremic Toxicity: Instrument or Hype? *Semin Nephrol.* 34:180-190, 2014 doi:

- 10.1016/j.semnephrol.2014.02.009. (査読有り)
13. Mishima E., Inoue C., Saigusa D., Inoue R., Ito K., Ito S., Tomioka Y., Itoh K. and Abe T. Conformational Change in tRNA is an Early Indicator of Acute Cellular Damage with Prognostic Significance. *J. Am. Soc. Nephrol.* 25: 2316-2326, 2014 doi: 10.1681/ASN.2013091001 (査読有り)
 14. Tanemoto M, **Abe T.**, Uchida S and Kawahara K. Mislocalization of K⁺ channels causes the renal salt wasting in EAST/SeSAME syndrome. *FEBS Lett.* 588: 899-905, 2014 doi: 10.1016/j.febslet.2014.02.024. (査読有り)

[学会発表] (計 9 件)

1. 第 19 回日本心血管内分泌代謝学会総会 2015 年 12 月 11 日 (神戸国際会議場・神戸) シンポジウム 2 「生体の代謝異常と心血管病」「腎不全時の腸内環境変化と治療応用」
発表者: 阿部高明
2. 第 30 回日本薬物動態学会 2015 年 11 月 12 日 (タワーホール船橋・東京) シンポジウム 2 「腎領域研究の最前線と薬物動態研究との接点」ミトコンドリア病治療薬の開発と問題
発表者: 阿部高明
3. 第 49 回日本栄養学会東北支部大会 2015 年 10 月 24 日 (東北大学農学部・仙台) 公開シンポジウム高血圧・腎臓病に関する最近の話題」腎不全時の腸内環境変化とその治療
発表者: 阿部高明
4. 第 5 回日本病院薬剤師会東北ブロック学術大会 2015 年 6 月 7 日 (山形テルサ・山形) 医薬品相互作用研究会特別シンポジウム
発表者: 阿部高明

5. 第 58 回日本腎臓学会 2015 年 6 月 5 日 (名古屋国際会議場・名古屋) シンポジウム 1 「腎臓領域の創薬の未来」ミトコンドリア病治療薬
発表者: 阿部高明
6. 第 120 回解剖生理学会 2015 年 3 月 21 日 (神戸国際会議場・神戸) シンポジウム 27 「細胞機能と膜輸送体・イオンチャネルの関連」
腎不全物質の除去はトランスポーターの悪性サイクルを解除する
発表者: 阿部高明
7. 第 88 回日本薬理学会 3 月 18 日 (名古屋国際会議場・名古屋) シンポジウム 59: 新たな視点からの腎発生と病態修飾分子; メタゲノムとメタボローム解析による腎不全時の腸内環境変化の検討
発表者: 阿部高明
8. 第 44 回日本腎臓学会東部学術大会 2014 年 10 月 24 日 (ベルサール新宿グランド・東京) シンポジウム 1 「動脈硬化と腎」虚血性腎症
発表者: 阿部高明
9. 第 111 回内科学会 2014 年 4 月 12 日 (東京国際フォーラム・東京) シンポジウム 2 「各種臓器の血管病変と治療の展望」慢性腎臓病の病態と新規治療
発表者: 阿部高明

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 5 件)

1. 名称: 腎機能障害予防又は改善剤
発明者: 阿部高明
権利者: 東北大学
種類: 国際特許
番号: PCT/JP2014/5049
出願年月日: 2014 年 10 月 3 日
国内外の別: 国外
2. 名称: ミトコンドリア局在蛍光化合物
発明者: 阿部高明
権利者: 東北大学
種類: 国内特許

- 番号：特願2015-152489
出願年月日：2015年7月31日
国内外の別：国内
3. 名称：臓器線維化疾患の治療剤
発明者：阿部高明、林謙一郎
権利者：東北大学、岡山理科大学
種類：国際特許
番号：PCT/JP2015/005455
出願年月日：2015年10月29日
国内外の別：国外

○取得状況（計0件）

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織
(1) 研究代表者
阿部 高明 (ABE, TAKAAKI)
東北大学・大学院医工学研究科・教授
研究者番号：80292209