

糖尿病性腎症の進展に対する転写因子 USF1

PI ポリアミドの効果

日本大学大学院医学研究科博士課程  
内科系腎臓内科学専攻

岡村 真喜誉

修了年 2020 年

指導教員 阿部 雅紀

糖尿病性腎症の進展に対する転写因子 USF1

PI ポリアミドの効果

日本大学大学院医学研究科博士課程  
内科系腎臓内科学専攻

岡村 真喜誉

修了年 2020 年

指導教員 阿部 雅紀

# 目次

【概要】 .....	1
【諸言】	
1. 糖尿病性腎症の発症、進展.....	4
2. 糖尿病性腎症の組織学的変化.....	5
3. 糖尿病性腎症への TGF- $\beta$ 1 の関与.....	6
4. 糖尿病性腎症における、糸球体内皮細胞と足細胞のクロストークの破綻.....	6
5. 糖尿病性腎症における転写因子 USF1 の役割 .....	7
6. ピロール・イミダゾール(Pyrrrole Imidazole: PI) ポリアミドについて.....	8
【研究目的】 .....	10
【対象と方法】	
1. ラット USF1 に対する PI ポリアミドの分子設計と合成.....	11
2. PI ポリアミドのゲルシフトアッセイ .....	11
3. メサンギウム細胞の培養.....	12
4. 高糖条件下でのラット TGF- $\beta$ 1 プロモーター活性の測定.....	12
5. 高糖条件下での培養メサンギウム細胞における TGF- $\beta$ 1 の発現に対する PI ポリアミドの効果の検討.....	13
6. リアルタイム RT-PCR 法による mRNA の発現測定 .....	14
7. Western blot 法による蛋白発現定量 .....	15
8. USF1 蛋白の細胞内局在性の検討.....	16
1) 蛍光免疫染色法.....	16
2) Western blot 法.....	17
9. 培養メサンギウム細胞の増殖能の評価.....	18
10. 実験動物.....	18
11. STZ による 1 型糖尿病モデルラットの作成及び、各種ラットの飼育・薬物投与.....	18

12. SD ラットの体重、尿中アルブミン量、血糖値、腎機能の測定 .....	19
13. 腎組織の組織染色 .....	20
14. 糸球体障害指数 (Glomerular Injury Scores: GIS) と尿細管間質障害指数 (Tubular Injury Scores: TIS) の評価 .....	20
15. ラット腎臓組織における TGF- $\beta$ 1 の免疫染色 (ImmPRESS Universal Polymer 法) .....	21
16. 糖尿病ラットの腎臓組織における USF1 PI ポリアミドの評価 .....	22
17. 統計解析 .....	23
<b>【研究結果】</b>	
1. PI ポリアミドのゲルシフトアッセイ .....	24
2. 高糖刺激による TGF- $\beta$ 1 プロモーター活性増加に対する PI ポリアミドの効果... 24	24
3. 高糖刺激による TGF- $\beta$ 1 mRNA の発現に対する PI ポリアミドの効果 .....	25
4. 高糖刺激による TGF- $\beta$ 1 蛋白発現に対する PI ポリアミド 3 の効果.....	25
5. 高糖刺激による細胞形質転換マーカーの発現と PI ポリアミド 3 の効果.....	25
6. 高糖刺激による USF1 mRNA 発現と PI ポリアミド 3 の効果.....	26
7. 高糖刺激による USF1 蛋白の細胞内局在性の検討.....	26
8. 高糖刺激による培養メサングウム細胞の細胞増殖能の増加と PI ポリアミド 3 の効果.....	26
9. STZ 糖尿病ラットにおける腎障害への PI ポリアミド 3 の効果 .....	26
<b>【考察】</b> .....	29
<b>【結論】</b> .....	35
<b>【謝辞】</b> .....	36
<b>【図】</b> .....	37
<b>【引用文献】</b> .....	62
研究業績.....	66

## 【概要】

糖尿病性腎症の病態には Transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) が深く関与し腎臓の線維化を促進することが知られている。本研究では、TGF- $\beta$ 1 遺伝子のプロモーターである Upstream stimulatory factor 1 (USF1) 結合領域に結合し TGF- $\beta$ 1 遺伝子の発現を抑制する USF1 Pyrrole Imidazole (PI) ポリアミドを用いて、糖尿病性腎症の抑制効果を検討した。

*in vitro* の培養メサンギウム細胞の実験では、25mM の高糖刺激により TGF- $\beta$ 1 のプロモーター活性の増加と mRNA 発現亢進を認めた。まず、4 種類の USF1 PI ポリアミド (PI ポリアミド 1~4) を設計・合成し抑制効果を検討した。 $10^{-10}$ M PI ポリアミド 3 においてのみプロモーター活性及び mRNA の抑制効果を認め、TGF- $\beta$ 1 遺伝子の転写を抑制する事が確認された。この結果から USF1 PI ポリアミド 3 を以降の実験で使用する事とした。

高糖刺激による TGF- $\beta$ 1 蛋白発現の増加と PI ポリアミドの効果 Western blot 法にて検討した。高糖刺激により TGF- $\beta$ 1 蛋白発現は有意に上昇し、 $10^{-10}$ M PI ポリアミド 3 投与で TGF- $\beta$ 1 蛋白発現を有意に抑制した。また高糖刺激における培養メサンギウム細胞の増殖能は有意に増加を認め、PI ポリアミド 3 は高糖刺激による増殖能の増加を有意に抑制した。高糖刺激による細胞形質転換マーカーの発現と PI ポリアミドの効果を検討した結果、間葉系細胞の合成型形質マーカーである Osteopontin は高糖刺激により有意に増加し、PI ポリアミド 3 の投与で有意に抑制した。一方、収縮型形質マーカーである *h-caldesmon* は有意に減少し、PI ポリアミド 3 の投与で有意に上昇した。この結果から、高糖刺激による培養メサンギウム細胞の合成型形質転換に USF1 が関わっていることが確認された。

次に、高糖刺激による培養メサンギウム細胞における USF1 の反応性を検討した。培養メサンギウム細胞において、高糖刺激により USF1 mRNA に有意な変化はみられなかった。しかし高糖刺激による USF1 蛋白の細胞内局在性について検討した結果、高糖刺激 24 時間後では核内における USF1 の蛍光免疫染色が増強し、USF1 が核へ移行した事が示された。また USF1 蛋白量について Western blot 法にて検討した結果、高糖刺激において細胞内より核内で USF1 蛋白量が多くみられた。この結果より、高糖刺激で USF1 が細胞質から核内へ移行し、転写を促進させていることが示唆された。

in vivo の実験では、ストレプトゾトシン (Streptozotocin: STZ) 投与により作成された糖尿病モデルラットの病態に対する USF1 PI ポリアミドの薬剤効果を検討した。糖尿病ラットにおいて尿中アルブミン (Albumin: Alb) 排泄量は、糖尿病発症 12 週目より増加傾向となり、16 週経過時には明らかな増加を認めた。腎重量も増加しており腎臓の肥大化がみられた。腎臓組織学的変化を Hematoxylin Eosin 染色・Masson Trichrome 染色で検討した。メサンギウム細胞増殖によるびまん性病変が目立ち、間質線維化や尿細管萎縮もみられ、腎臓組織傷害が進行していることが分かった。糸球体障害指数 (Glomerular injury scores: GIS)・尿細管間質障害指数 (Tubular injury scores: TIS) についても有意な障害が認められた。また Western blot 法と免疫染色法で、糖尿病ラット腎組織内の TGF- $\beta$ 1 発現が亢進していることが確認され、これらの組織学的変化は TGF- $\beta$ 1 が強く関与していると考えられた。

次に、糖尿病モデルラットに対しては糖尿病発症直後から 1mg/kgBW/週 2 回の USF1 PI ポリアミドの腹腔内投与を行った。その結果、16 週後の尿中アルブミン排泄量は糖尿病ラットと比較して低下していた。びまん性病変や間質線維化においても、糖尿病ラットと同様の所見は認められるものの程度は軽度であ

った。GIS、TISによる障害の程度も有意に低下していた。また免疫染色において TGF- $\beta$ 1 は糸球体や近位尿細管に局在していたが、糖尿病ラットと比較して程度は軽度であり発現亢進は抑制されていた。Western blot 法で腎組織内の TGF- $\beta$ 1 発現の有意な低下が認められた。

以上の結果より、高糖刺激による培養メサンギウム細胞での TGF- $\beta$ 1 発現増加、TGF- $\beta$ 1 プロモーター活性の増加、メサンギウム細胞増殖促進に対して、USF1 PI ポリアミド 3 の投与は抑制効果を示した。また、糖尿病モデルラットにおいても、糸球体病変及び間質病変を USF1 PI ポリアミド 3 は抑制した。USF1 PI ポリアミド 3 は将来、糖尿病性腎症の治療薬となりうる事が示唆された。

## 【緒言】

現在の高度医療においても進行性腎障害に対する有効治療薬は無く、毎年3万7千人が末期腎不全により透析導入になっている。現在、透析医療患者数は33万人を数え、透析医療費は1兆円を超えている。透析患者の内訳は糖尿病性腎症が約40%を占めており、本邦において糖尿病性腎症の根治的治療法の開発は喫緊の課題となっている<sup>(1)</sup>。

### 1. 糖尿病性腎症の発症、進展

糖尿病性腎症は、網膜症及び神経障害とともに糖尿病の三大細小血管障害の一つである。腎疾患のなかでは、代表的な二次性糸球体疾患に位置づけられている。糖尿病性腎症の発症初期には糸球体肥大と糸球体過剰濾過がみられ、糸球体過剰濾過の程度は、後に顕性腎症に進展するリスクと相関する。こうした患者に最も早期にみられる所見は、感度の高いラジオイムノアッセイによって検出される尿中アルブミンの増加である。30~299 mg/日の範囲にあるアルブミン尿を微量アルブミン尿 *microalbuminuria* といい、1型及び2型の糖尿病患者はともに糖尿病発症から5~10年で微量アルブミン尿が出現する。尿中アルブミン排泄量は微量アルブミン尿から徐々に増加していき、微量アルブミン尿発症後5~10年経過すると、尿試験紙法で陽性所見を示す顕性蛋白尿がみられるようになるのが典型的である。微量アルブミン尿は2型糖尿病患者の心血管イベント発生と強く相関する<sup>(2)</sup>。微量アルブミン尿を呈する2型糖尿病患者では、顕性蛋白尿や腎不全に至る前に心血管イベントを発症するケースが多い。他の糸球体疾患では通常、経過中に腎臓は萎縮することが多いが、糖尿病性腎症では腎症が進展しても腎臓のサイズは正常範囲のことが多いのも特徴である。500 mg/日以上の尿



蛋白が出現してからの腎機能は進行性に低下し、約 50 %の患者が 5～10 年で腎不全に至る。すなわち、微量アルブミン尿期の最も早期から末期腎不全に至るまでは 10～20 年であるとされる。

## 2. 糖尿病性腎症の組織学的変化

組織病変の形成には多くの因子の関与が示唆されている。糸球体内圧の上昇（糸球体高血圧）が腎機能低下や形態変化に重要な役割を担うことが、多くの臨床試験で示唆されている。持続する糸球体高血圧は細胞外マトリックスの増加をきたし、糸球体基底膜の構造変化を引き起こし、濾過機能に障害を与え、最終的に糸球体硬化を生じる。また細胞外マトリックスの産生を変化させる多くの因子も同定されており、蓄積した終末糖化産物に加え、成長ホルモン、IGF-1(Insulin-like growth factor-1)、アンジオテンシン(Angiotensin) II、結合組織増殖因子(Connective tissue growth factor: CTGF)、TGF- $\beta$ 1 (Transforming growth factor- $\beta$ 1)などの循環因子や、脂質異常症といった因子の関与が示唆されている<sup>(3)</sup>。

腎生検による糖尿病性腎症の組織像では、びまん性病変が最も多くメサンギウム基質の増生・拡大と糸球体毛細血管壁の肥厚が認められる。結節性病変は本症に特異性の高い病変である。典型的な結節は、大きさは様々だが円形で糸球体毛細血管係蹄の中心部に形成され、同部位の細胞は結節の周辺に局在する。進行例では、結節は大型となり糸球体毛細血管を閉塞する。浸出性病変では、糸球体内、ボウマン嚢上皮下ならびに輸入・輸出細動脈壁の硝子様沈着が認められる。糸球体毛細血管あるいは間質の小血管内に血漿蛋白、脂質およびムコ蛋白からなる成分の浸出がみられる。これはエオジン好性、PAS 染色陽性、鍍銀染色陰性で、マロリー染色で赤染する。浸出性病変は、比較的少ないが糖尿病性腎症の早い時期から認められる<sup>(4)</sup>。

糖尿病性腎症早期に糸球体過剰濾過と糸球体の肥大を認めるが、このとき糸球体係蹄にて新たな毛細血管の形成および血管新生が観察される。代表的血管新生因子である血管内皮増殖因子（Vascular Endothelial Growth Factor: VEGF）は血管内皮細胞の増殖・遊走を促進するが、一方で血管透過性を亢進させる。糸球体にて VEGF は主に足細胞にて発現するが、高血糖、TGF- $\beta$ 1、AngII により促進される<sup>(5)</sup>。また、VEGF は糸球体基底膜（Glomerular basement membrane: GBM）の構成要素であるIV型コラーゲン  $\alpha$ 3 鎖の足細胞における発現を TGF- $\beta$ 1 の下流にて促進する<sup>(6)</sup>。糖尿病性腎症において観察される GBM の肥厚ならびに糸球体濾過障壁障害に VEGF が関与する可能性が示唆される<sup>(7)</sup>。

### 3. 糖尿病性腎症への TGF- $\beta$ 1 の関与

糖尿病性腎症において、TGF- $\beta$ 1 は高グルコースにより誘導されて、腎臓の線維化を促進するマスター制御因子である。TGF- $\beta$ 1 は IV 型コラーゲン、フィブロネクチン(fibronectin)、ラミニン(laminin) といった細胞外マトリックスを構成し、糖尿病性腎症の腎臓に蓄積するタンパクの合成を促進することが知られている<sup>(8)</sup>。高グルコースにより糸球体内に TGF- $\beta$ 1 が過剰発現すると、マトリックスタンパクの沈着が増加し、糸球体硬化につながる。また、このような過剰発現が起こると、足細胞のアポトーシスが起こり、フィルターとしての腎臓の機能が低下してしまう<sup>(9)</sup>。

### 4. 糖尿病性腎症における、糸球体内皮細胞と足細胞のクロストークの破綻

最近、糸球体内皮細胞と足細胞がお互いクロストークしているとの報告<sup>(10)</sup>がある。足細胞は元来多くのサイトカインを含めた分子を産生し、VEGF、CXC chemokine receptor 4 (CXCR4)、Tie-2 などに作用し糸球体内皮細胞機能を維持し、

糸球体内皮細胞は Activated protein C を産生して糸球体内皮機能を維持している。つまり糸球体内皮細胞の内皮間葉移行 (Endothelial Mesenchymal Transition: EndMT) が起こると足細胞傷害がおこり、糸球体障害から蛋白尿が生じる。

## 5. 糖尿病性腎症における転写因子 USF1 の役割<sup>(11)</sup>

高血糖により細胞内において PKC・ポリオール経路が活性化され、活性酸素や終末糖化産物が蓄積される。それにより Upstream stimulatory factor 1 (USF1)、activator protein 1 (AP1)、cAMP response element binding protein (CREB) 等の転写因子が活性化されることで、細胞外マトリックスの蓄積、炎症、糸球体硬化を調節する遺伝子の発現が増える。これが糖尿病性腎症の進展におけるシグナル伝達経路である。

Sharma らの総説<sup>(12)</sup>によると、過剰なグルコースと脂肪酸の暴露は AMP/ATP 比の低下および 50-AMP 活性化プロテインキナーゼ (AMPK) 活性の低下を招く可能性がある。AMPK の減少は nuclear factor-kB (NF-kB) の活性増加および USF1 の核内移行に関連している。グルコースと脂肪酸を取り込むことで AMPK 活性が抑制され、それにより USF1 核移行が進み TGF-β1 転写が促進されることで、炎症や線維化が進行する。また NF-kB は NADPH オキシダーゼ系を刺激するのに対し、USF1 は高糖条件下で TGF-β1 遺伝子転写を刺激する。

メサンギウム細胞などの間葉系細胞は、収縮型または合成型の形質を示し、主に合成型マーカーとしては Osteopontin が、収縮型マーカーとしては αSMA、SM22α、h-caldesmon などが挙げられる。メサンギウム細胞は収縮型形質ではほとんど増殖しないが、培養系や疾病などに伴う合成型形質では細胞内小器官からのタンパク分解酵素が増加し、高い増殖を示す。Osteopontin は生物学的ストレスに応答して産生される骨基質タンパク質及び炎症性サイトカインであり、

発現の増加は糖尿病性腎症のアルブミン尿及び糸球体硬化症と強く相関する。USF1 は CCTCATGAC モチーフに結合する転写因子であるが、TGF- $\beta$ 1 プロモーターCCTCATGAC に結合すると腎髄質の線維化を起こし、Osteopontin プロモーターCCTCATGAC に結合すると、糸球体メサンギウム細胞の合成型形質と増殖を起こすので、糸球体径は増加し、メサンギウム増殖を起こすと考えられる。一方 *h-caldesmon* は平滑筋において収縮制御の中心的役割を担うタンパクである。そこで合成型マーカーである Osteopontin と、収縮型マーカーである *h-caldesmon* の増減をみることにより、メサンギウム細胞における細胞形質転換の評価をすることができる。

このように糖尿病では転写因子 USF1 発現が亢進し、TGF- $\beta$ 1 プロモーターに結合、TGF- $\beta$ 1 発現が促進される。この TGF- $\beta$ 1 発現の亢進は、糸球体細胞外マトリックスの増生、メサンギウム細胞増殖による糸球体の肥大、足細胞傷害によるアルブミン尿、糸球体内皮細胞の EndMT による足細胞・糸球体内皮細胞クロストークの破綻、腎尿細管上皮の上皮間葉転換 (Epithelial Mesenchymal Transition: EMT)、腎髄質の線維化を引き起こす。また同時に USF1 が Osteopontin 発現を亢進し、メサンギウム増殖を起こす。これらの機序が糖尿病性腎症を形成していると考えられる。

## 6. ピロール・イミダゾール(Pyrrole Imidazole: PI)ポリアミドについて

PI ポリアミドは、1996 年にカルフォルニア工科大学の Peter B. Dervan らにより DNA 認識抗生物質より見いだされた DNA 配列に特異的に結合する中分子ペプチド化合物である (図 1・A)。合成された DNA 結合 PI ポリアミドは、Py/Im ペアが CG、Py/Py ペアは AT または TA、Im/Py ペアは GC を認識し、これにより任意の DNA に塩基特異的に結合し、ターゲット遺伝子プロモーターに結合す

るよう設計すると、転写因子の結合を阻害し遺伝子発現を抑制する事が出来る(図1・B)。

PIポリアミドの特徴として、i) 転写因子より強力に2本鎖DNAの minor groove に結合し、遺伝子発現を抑制する遺伝子転写抑制化合物である。ii) 有機化合物であるため核酸医薬と違い核酸分解酵素に分解されず細胞や生体内で安定である。iii) Drug delivery system(DDS)なしに細胞の核に取り込まれる。iv) 様々な遺伝子をターゲットとして自由に分子設計できる。このようにPIポリアミドは、これまで治療薬の無かった疾患の責任因子に対しても自由に設計でき、疾病で活性化した転写活性を抑制するため、病変のみを抑制し、副作用の少ない転写活性抑制遺伝子制御薬として期待できる<sup>(14-16)</sup>。

日本大学ではこれまで TGF-β1 に対する PI ポリアミドを分子設計し、ラットの腎症<sup>(17,18)</sup>、血管再狭窄<sup>(19)</sup>、腹膜硬化症<sup>(20)</sup>、角膜損傷<sup>(21)</sup>、皮膚瘢痕<sup>(22)</sup>を著明に抑制する事を報告した。さらに最近ヒト TGF-β1 への PI ポリアミドは前臨床試験として霊長類マーモセットのシクロスポリン A 腎症と一束尿管結紮水腎症モデルでの腎障害と腎線維化を抑制する事を報告した<sup>(23)</sup>。

糖尿病性腎症に関しては、TGF-β1 のプロモーター領域に結合する転写因子 AP1 に対する PI ポリアミドを設計・作製し効果を検討した先行実験がある。しかし腎組織傷害や尿蛋白において明らかな効果は認めなかった。これは、AP1 が高血糖以外の高血圧や虚血など他の病態によっても増加する可能性があり、高血糖にのみ特異的に反応する転写因子ではなかったことが影響していると考えられる。今回注目した転写因子 USF1 は糖尿病の高血糖で刺激されるため、これまで開発してきた TGF-β1 の PI ポリアミドよりも、糖尿病性腎症に特異的に反応することが期待される。

## 【研究目的】

本研究では、糖尿病性腎症の進展における転写因子 USF1 の発現亢進を確認し、TGF- $\beta$ 1 プロモーターへの USF1 の結合を抑制する遺伝子制御薬 PI ポリアミドの分子設計と合成を行い、USF1 に対する PI ポリアミドを糖尿病性腎症の治療薬として開発することを目的とした。

## 【対象と方法】

### 1. ラット USF1 に対する PI ポリアミドの分子設計と合成

本研究に使用した USF1 PI ポリアミドはラット TGF- $\beta$ 1 のプロモーター領域にある USF1 結合 E-box 配列 (図 2) に跨るように 4 種類設計しており (図 3)、それぞれの PI ポリアミドについて検討した<sup>(17)</sup>。これらの PI ポリアミドはペプチド合成機 PSSM-8 (Shimadzu, Kyoto, Japan) にて Fmoc 固相合成法で合成し、C18 カラム装着 High performance liquid chromatography(HPLC)にて精製した。

### 2. PI ポリアミドのゲルシフトアッセイ

PI ポリアミド 1、2 の結合領域として、sense; FITC-TGACTACTATGTGGAGT GGAT、antisense; FITC-ATCCACTCCACATAGTAGTCA を、同様に PI ポリアミド 3、4 に対して、sense; FITC-CACTGCCACCAGTCACCATCA、antisense; FITC-TGATGGTGACTGGTGGCAGTG の配列のオリゴを合成した。2 本のオリゴ DNA を  $10^{-5}$ M に調整し、95°C で 5 分加熱し変性させた後、徐々に温度を下げてアニーリングした。2 本鎖オリゴと dimethylsulfoxide(DMSO,07-4875-6, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)で溶解した等量の PI ポリアミドは、binding buffer(20% glycerol, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 2.5mM EDTA, 250mM NaCl, 50mM Tris-HCl (pH 7.5) )中で 2 時間インキュベートした。20%ポリアクリルアミドゲルは予め 4°C、300V で 15 分間泳動を行った後にサンプルをアプライして、0.5×TBE バッファーで電気泳動を行い(300V、3 時間、4°C)、LAS3000(Fuji Film, Tokyo, Japan)を使用してゲルを撮影した。

### 3. メサンギウム細胞の培養

ラット腎臓メサンギウム細胞は ATCC CRL-2573 株(Sprague-Dawley rat 由来)を使用した。培養は 10%ウシ胎児血清(FBS) を含む正常糖濃度 Dullbecco's Modified Eagle's Medium ( DMEM, D6046, glucose 5.6mM, Sigma-Aldrich )にペニシリン 100 単位/ml、ストレプトマイシン 100 µg/ml (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を添加し培養を行った。数日で細胞がフラスコ内でサブコンフルエントになっていることを確認し、培養液を除きリン酸緩衝液(Phosphate-buffered saline, PBS, Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA)で 2 回洗浄した後、Tryple Express (12605010,GIBCO,USA) で細胞を剥離・回収し、滅菌フラスコに約  $1.0 \times 10^4$  /cm<sup>2</sup>の密度で播種し継代培養した。培地の交換は週 2~3 回の頻度で行い、サブコンフルエントになる毎に継代培養を繰り返し、各実験に使用した。

### 4. 高糖条件下でのラット TGF-β1 プロモーター活性の測定

ラット TGF-β1 プロモータープラスミドは PGL3 basic (E1751,Promega, Madison , USA)の multiple cloning site にラット TGF-β1 の翻訳開始点から上流の -4784 塩基までを挿入して作成した。また内部コントロールレポーターには phRG-TK ベクター(E6241,promega)を使用した。HEK293 細胞を 96well plate に  $1 \times 10^4$  個を撒き、10%FBS 含有、正常糖濃度 DMEM でサブコンフルエントまで培養した。その後、Opti-MEM 培地(31985062, Invitrogen, USA)と Lipofectamin 3000 (L3000015, Invitrogen)を用いてラット TGF-β1 プロモーターをクローニングした PGL3 basic と phRG-TK を 50:1(100ng : 2ng)の割合で HEK293 細胞に導入した。トランスフェクション後、0.5%FBS 含正常糖濃度 DMEM で 24 時間 serum starvation を行い、serum starvation 終了 3 時間前に終濃度が  $10^{-10}$ M になるようにポリアミド 1~4 を培地に添加した。その後、コントロールとなる細胞は引



引き続き正常糖濃度の DMEM で培養し、それ以外の細胞は  $10^{-10}$ M のポリアミドを含む高糖濃度 DMEM(D6429, glucose 25mM, Sigma-Aldrich)で 24 時間培養した。TGF- $\beta$ 1 プロモーター活性は Dual-Glo luciferase kit (E2920, Promega) を使用し、Infinte M Plex マイクロプレートリーダー(TECAN, Männedorf, Switzerland)にて発光シグナルを測定した。さらに、プロモーター活性が抑制されたポリアミドにおいては、 $10^{-11}$ M $\sim$  $10^{-8}$ M において、同様に TGF- $\beta$ 1 プロモーター活性を測定した(日本大学遺伝子組換え実験計画承認番号 2017 医 16)。

#### 5. 高糖条件下での培養メサンギウム細胞における TGF- $\beta$ 1 の発現に対する PI ポリアミドの効果の検討

ATCC CRL-2573 株は、10%FBS を添加した正常糖濃度の DMEM で、6well plate に播種し 80%コンフレントになるまで培養した。次に 0.5%FBS 含 DMEM に交換して、serum starvation を 24 時間行った。serum starvation が終了する 3 時間前に、終濃度が  $10^{-10}$ M、 $10^{-9}$ M、 $10^{-8}$ M になるようにポリアミドを培地に添加した。Serum starvation 終了後、コントロールとなる細胞は引き続き正常糖濃度の DMEM で培養し、それ以外の細胞は高糖濃度 DMEM (各濃度のポリアミドを含む) で 24 時間培養した。以上を USF1 PI ポリアミド 1~4 の 4 種類で行い、各群は n=6 とした。24 時間後にプレートの細胞を回収しリアルタイム RT-PCR 法で TGF- $\beta$ 1 mRNA 発現を測定し PI ポリアミドの効果判定を行い、その中で最も効果のある USF1 PI ポリアミドをリード化合物とした。また効果の認められたポリアミドについては、上記と同様に細胞を培養し、Western blot 法で TGF- $\beta$ 1 蛋白の発現を検討した。さらに細胞形質転換を PI ポリアミドが抑制するかどうかの評価を、合成型マーカーである Osteopontin と収縮型マーカーである h-caldesmon で行った。

## 6. リアルタイム RT-PCR 法による mRNA の発現測定

実験を行った細胞の培養液を破棄し、PBS で洗浄後、TRIzol Reagent (1559608, Ambion, Waltham, USA) 1ml を加えピペッティングしエッペンチューブに移した。クロロホルム 200  $\mu$ l を加え転倒混和し室温で 2~3 分置いた後 4°C で 15000 回転 15 分間遠心分離をし、新しいエッペンチューブに上清 400  $\mu$ l を移した。上清に 2-プロパノール 500  $\mu$ l を加えて転倒混和し、5~10 分置いた後に 4°C で 15000 回転 10 分間遠心分離を行った。上清を捨て、沈殿物に 70%エタノールを加え、混和し 4°C で 10000 回転 5 分間遠心し total RNA の抽出を行った。抽出した total RNA より、混在する DNA を除去するために 1  $\mu$ g 相当の total RNA を DNase I (18068-015, Invitrogen, Carlsbad, USA) で処理を行ってから High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (4368814, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)を用いて cDNA を精製した。

TGF- $\beta$ 1、Osteopontin、*h*-caldesmon、USF1 のリアルタイム RT-PCR は、Premix Ex Taq (Probe qPCR) (RR390A, Takara, Tokyo, Japan) を用いたプローブ法で定量した。上記の方法によって得た cDNA を使用し、StepOne Plus real-time PCR system (Applied Biosystems) を用いて、95°C/20 秒で加温後、95°C/1 秒と 60°C/20 秒のサイクルを 40 サイクル行った。各遺伝子の発現はスタンダードを用いた相対定量で求め、Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を内部標準として発現量を補正した。リアルタイム Real-time PCR には以下のプローブを使用した。

TaqMan プローブ法のプライマーリスト (Thermo Fisher Scientific)

GAPDH	4351317
Osteopontin	Rn00681031_m1

SYBRGreen 法のプライマーリスト(Invitrogen, USA)

USF1	Probe	[6FAM]AGTAGCCACTGCACCTTCCTGAATCTG[TAM]
	Sense	5'-CAGCCGAAACCGAAGAGGG-3'
	antisense	5'-GGCGATAGCTACACTAGTTGGG-3'
TGF- $\beta$ 1	Probe	[6FAM]ACAGGGCTTTCGCTTCAGTGCTCACT[TAM]
	Sense	5'-GGCTGAACCAAGGAGACGG-3'
	antisense	5'-ACGTGGAGTACATTATCTTTGCTG-3'
<i>h</i> -caldesmon	Probe	[6FAM]CCTTTGCTTCCTGCCTCTCACTCCTTTGC[TAM]
	Sense	5'-GGAGGAGGCGAAGGCTAGG-3'
	antisense	5'-CTCTCTCCGCTCCCTTCTCC-3'

## 7. Western blot 法による蛋白発現定量

実験を行った細胞の培養液を破棄し、PBS で 2 回細胞を洗浄したのち、PIPA buffer 1ml で細胞を回収後、超音波破砕機 Bioruptor UCD-250(Cosmo Bio, Tokyo, Japan)を使用して可溶化した(200 W, 10 秒 ON/ 20 秒 OFF/ 25 cycle)。この抽出液は、Pierce BCA protein assay kit(#23225, Thermo Fisher Scientific)にて蛋白定量した。2-メルカプトエタノールを含むサンプルバッファーでタンパク質抽出液を 95°C、5 分間、熱変性処理を行った後に、20~40mA で、12.5%ポリアクリルアミドゲル SDS 電気泳動を行った。泳動したゲルは iBlot (IB1001, Thermo Fisher Scientific) を使用して PVDF 膜に転写し、Blocking One (03959-95, nacalai tesque, Kyoto, Japan)

にて 30 分間室温でブロッキングを行った。1 次抗体は 200 倍希釈の Rabbit Anti-TGF beta 1 antibody ( ab92486、abcam )を使用し 4°C、オーバーナイトでインキュベーションを行った。TBST で 5 分 4 回洗浄し、2 次抗体は 10000 倍希釈の Horseradish peroxidase (HRP) conjugated goat anti rabbit IgG (111-036-003, Jackson Immuno Reseach, west Grove, PA, USA)を使用して、室温で 1 時間インキュベーションした後、TBST で 5 分 4 回洗浄した。タンパクの検出は Chemi-Lumi One Super (02230-30 nacalai tesque)を使用し、Fusion Solo System ( VILBER LOURMAT, Collégien, France)で撮影した。尚、ローディングコントロールとして、2000 倍希釈の Rabbit Anti-GAPDH antibody (ab9486, abcam)を使用した。得られた画像は、Bio-1D softwear (VILBER LOURMAT)にて数値化を行った。

## 8. USF1 蛋白の細胞内局在性の検討

### 1) 蛍光免疫染色法

ATCC CRL-2573 株を 35mm glass base dish (IWAKI 3910-035, Tokyo,Japan)に播種し、10%FBS 含有正常糖濃度の DMEM で培養し、その後 0.5%FBS 含有、正常糖濃度の DMEM で 24 時間 serum starvation を行った。Serum stavation 後、コントロールとなる細胞は正常糖濃度 DMEM で培養し、もう一方の細胞は、高糖濃度 DMEM で 20 時間刺激した。刺激後、dish 内の培地を破棄して、PBS で 2 回洗浄後、4%パラホルムアルデヒドで 10 分間固定した。次に dish を PBS で 2 回洗浄し、0.25% Triton-X を含む PBS で 15 分間 permeabilization を行った。10%アルブミンを含む PBS で 20 分間ブロッキングを行った後に、1 次抗体として 100 倍希釈の Rabbit anti USF1 antibody (ab180717, Abcam, UK)を使用し、室温で 1 時間インキュベーションを行った。PBS で細胞を 5 分間、3 回洗浄した後、2 次抗体として 500 倍希釈の Alexa-594 Goat anti Rabbit IgG (A11072, invitrogen)を使用し、室

温で 30 分間インキュベーションを行った。終了後、PBS で 5 分 3 回洗浄し、1000 倍希釈の Hoechst 33342 (H1399, Invitrogen) で核染色を行い、FLOVIEW FV 10i (Olympus, Tokyo, Japan) で細胞を蛍光観察した。

## 2) Western blot 法

10cm dish に ATCC CRL-2573 株を播種し、免疫染色法による USF1 タンパクの細胞内局在性の検討と同様に細胞を刺激した。

細胞全体での USF1 タンパクの発現は、dish の培地を破棄後に、PBS で 2 回細胞を洗浄したのち、PIPA buffer 1ml で細胞を回収後、超音波破碎機 Bioruptor UCD-250 を使用して可溶化した(200 W, 10 秒 ON/ 20 秒 OFF/ 25 cycle)。細胞核内の USF1 タンパクは、dish の培地を破棄後に、PBS で 2 回細胞を洗浄したのち、スクレーパーで細胞を回収し、低張液(10mM HEPES (pH7.9, 10mM KCl, 0.1mM EGTA, 0.1mMEDTA, 1mMDTT 0.5mM PMSF ) 300 $\mu$ l に分散させ、氷上で 15 分インキュベーションした後、4 $^{\circ}$ C、3000 回転で 1 分間遠心分離を行い、上清を破棄した。核画分である沈殿を PIPA buffer 200 $\mu$ l で分散し、Bioruptor UCD-250 を使用して細胞核を破碎した(250 W, 30 秒 ON/ 30 秒 OFF/ 20 cycle)。その後、15000 回転で 15 分間遠心分離を行い、上清の核画分を得た。

これらの抽出液は、Pierce BCA protein assay kit にて蛋白定量し、95 $^{\circ}$ C、5 分間、熱変性処理を行った後に、10%ポリアクリルアミドゲル SDS 電気泳動を行った。泳動したゲルは PVDF 膜に転写し、ブロッキングを行なった。1 次抗体は 200 倍希釈の Rabbit Anti-USF1 antibody を使用し 4 $^{\circ}$ C、オーバーナイトでインキュベーションを行った。2 次抗体は 10000 倍希釈の Horseradish peroxidase (HRP) conjugated goat anti rabbit IgG を使用して、室温で 1 時間インキュベーションした。尚、ローディングコントロールとして、全細胞画分については

GAPDH を、核抽出画分については 1000 倍希釈の Rabbit Anti TATA box binding protein (22006-1-AP, Proteintech, Rosemont, USA) を使用した。

## 9. 培養メサンギウム細胞の増殖能の評価

96 well plate に  $1.0 \times 10^4$  個/well の密度で ATCC CRL-2573 株を播種し、70% コンフレントになるまで培養した。その後 0.5% FBS 含有正常糖濃度の DMEM で 24 時間 serum starvation を行った。serum starvation が終了する 3 時間前にポリアミドを濃度が  $10^{-11}$  M ~  $10^{-8}$  M になるように培地に添加した。Serum starvation 終了後、コントロールとなる細胞は引き続き正常糖濃度の DMEM で培養し、それ以外の細胞は高糖濃度 DMEM (各濃度のポリアミド含む) で 24 時間培養した。細胞の増殖能は Premix WST-1 アッセイ試薬 (MK400, Takara, Japan) を培地に添加して 1 時間培養し、マイクロプレートリーダーを用いて 420 nm (測定波長) と 650 nm (対照波長) の吸光度を測定して細胞の増殖能を評価した。

## 10. 実験動物

動物実験は、全て日本大学医学部動物実験委員会の指針に従って行った (日本大学動物実験計画承認番号: AP18MED056-1)。Sprague-Dawley (SD) ラットは日本チャールスリバー株式会社 (Yokohama, Japan) から購入して実験に使用した。

## 11. STZ による 1 型糖尿病モデルラットの作成及び、各種ラットの飼育・薬物投与

Makino らの実験<sup>(25)</sup>を参考とし、予め 12 時間絶食させておいた体重 200 ~ 250 g の SD ラットに対し、生理食塩水 0.3 ml に溶解したストレプトゾトシン (Streptozotocin: STZ) (195-15154, Wako, Osaka, Japan) 60 mg/kg を尾静脈内に単

回投与して1型糖尿病性ラットを作製した。STZを投与したラットにおいて、24時間後の血糖値をGLUCOCARD G Black (Panasonic, Tokyo, Japan)にて測定し、血糖値が300 mg/dl以上を示したラットをDM群 (n=7) とした。DM群にUSF1 PI ポリアミド投与したものをポリアミド群 (n=6)、7週齢のSDラットをコントロール群 (n=6) とし、3群とも普通餌にて飼育した。DM群には0.1%酢酸を1ml腹腔内投与し、ポリアミド群には0.1%酢酸1mlにUSF1 PI ポリアミドを溶解し腹腔内投与した。PIポリアミドの投与量は1回1mg/kg体重とし、週2回投与した。また週に1度、体重測定、代謝ケージを使用して24時間蓄尿を行った。4ヶ月間の飼育終了後、ラットはイソフルラン吸入麻酔 (2-5% in 100%酸素) 下で体表を消毒後に腹部を正中切開し、下大静脈から採血をして失血死とした後に、腎臓を摘出した。

## 12. SDラットの体重、尿中アルブミン量、血糖値、腎機能の測定

体重測定は小動物専用体重計 (SHINKO DENSHI, Tokyo, Japan) を用いた。尿中アルブミンは試薬としてオートワコーマイクロアルブミン (Wako, Osaka, Japan)を使用し、自動分析装置 (JCA-BM8000 シリーズ)にて週1回の測定を行った。

ラットの血糖値、血清尿素窒素 (serum urea nitrogen: sUN)、血清クレアチニン (Cr)、HbA1cの測定は飼育終了後の解剖時に下大静脈より採血した血液を使用した。血清および血漿は、全血を3000回転で10分間遠心分離を行って得た。血糖値の測定は血漿に試薬としてクイックオートネオ GLU-HK (SHINO-TEST, Tokyo, Japan)を使用し自動分析装置 (7180, HITACHI)にて測定した。HbA1cは全血を用い、試薬としてラピディアオート HbA1c-1(Fujirebio, Tokyo, Japan)を使用し自動分析装置(JCA-BM8000 シリーズ: JEOL, Tokyo, Japan)にて測定した。sUN

は自動分析用試薬「生研」UN-S (DENKA SEIKEN, Tokyo, Japan)、血清クレアチニンはLタイプワコーCRE・M (Wako, Osaka, Japan)を使用し自動分析装置 (7180, HITACHI)を使用して測定を行った。

### 13. 腎組織の組織染色

腎臓の組織変化を確認するためにラットより摘出した腎臓をホルマリン固定しパラフィン化の処理を行った。パラフィンブロックにした腎臓組織を4~5 $\mu$ mの薄さに切り出しを行った。切り出した切片に対し New Hematoxylin Solution Type M (Muto Pure Chemicals, Tokyo, Japan)、1% Eosin Y Solution を使用し Hematoxylin Eosin (HE)染色を行った。ワイゲルト鉄ヘマトキシリン 1(4034-2, Muto Pure Chemicals)とワイゲルト鉄ヘマトキシリン 2 (4035-2, Muto Pure Chemicals)の混合液、第2媒染剤 (8141-1, Muto Pure Chemicals)、0.75%オレンジG液 (4023-2, Muto Pure Chemicals)、マッソン染色液 B (4035-2, Muto Pure Chemicals)、2.5%リタングステン酸液 (4018-1, Muto Pure Chemicals)、アニリン青液 (4020-2, Muto Pure Chemicals)を使用し Masson Trichrome 染色を行った。染色後に光学顕微鏡にて組織変化を確認した。

### 14. 糸球体障害指数(Glomerular Injury Scores: GIS)と尿細管間質障害指数(Tubular Injury Scores: TIS)の評価

Sabbatini らの研究<sup>(26)</sup>を参考に腎障害のスコア化を行った。スコアリングにあたって bias を排除するため、ブラインド下で腎臓組織の有識者によるスコアリングが行われた。ラット腎臓を Hematoxylin Eosin 染色及び Masson Trichrome 染色を行い、糸球体障害の定量化のために30個の糸球体をランダムに選出し、それぞれの糸球体の間質占拠率を評価し下記の通りにスコア化した。糸球体障害



指数 (Glomerular Injury Scores: GIS) は、 $[(0 \times n_0) + (1 \times n_1) + (2 \times n_2) + (3 \times n_3) + (4 \times n_4)] \div 30$  で計算した。尿細管間質傷害の定量化のために 20 領域をランダムに選出し、線維化の度合いを下記の通りスコア化した。尿細管間質障害指数 (Tubular Injury Scores: TIS) は、 $[(0 \times n_0) + (1 \times n_1) + (2 \times n_2) + (3 \times n_3) + (4 \times n_4)] \div 20$  で計算した。

1) GIS (a minimum of 30 glomeruli)

0: normal appearance

1: involvement of up to 25% of the glomerulus

2: involvement of 25 to 50% of the glomerulus

3: involvement of 50 to 75% of the glomerulus

4: involvement of 75 to 100% of the glomerulus

2) TIS (20 randomly selected cortical areas)

0: normal appearance

1: involvement of less than 10% of the area

2: involvement of 10 to 30% of the area

3: involvement of 30 to 50% of the area

4: involvement of more than 50% of the area

## 15. ラット腎臓組織における TGF- $\beta$ 1 の免疫染色 (ImmPRESS Universal Polymer 法)

腎臓の組織変化を確認するためにラットより摘出した腎臓をホルマリン固定しパラフィン化の処理を行った。パラフィンブロックにした腎臓を厚さ 5 $\mu$ m に切り出しし、MAS コートスライドガラス(MATUNAMI MAS-01)にのせて伸展器上で乾かしながら切片をスライドガラスに貼り付け、40°Cで一晩置いた。その後

切片はキシレン、エタノール等の溶媒を用いて脱パラフィンを行い、親水させた。次に切片を Sodium citrate buffer pH 6.0 中に入れ、pressure cooker を用いて 20 分反応させ、抗原の賦活化を行った。PBST で 5 分 2 回洗浄し、次に 0.3% $H_2O_2$ (過酸化水素水)/PBST 中に入れ、室温で 20 分反応させ、内因性 peroxidase 活性の除去を行った。PBST で 5 分 2 回洗浄し、Normal Horse Serum 2.5%を切片と室温で 20 分反応させ、一次抗体の非特異的反応の除去を行った。PBST で 5 分 2 回洗浄し、一次抗体の anti TGF- $\beta$ 1 serum と 4°C で一晩反応させた。PBST で 5 分 2 回洗浄し、二次抗体の ImmPRESS Universal Polymer Reagent と室温で 60 分反応させた。PBST で 5 分 2 回洗浄し、発色剤の ImmPACT DAB と室温で 2~10 分反応させた（発色；茶色）。顕微鏡下で反応が十分であることを確認し PBST に入れて反応を停止した。水道水で 5 分洗浄後、Hematoxylin TypeM と室温で 10 分反応させ、核染色を行った。核と細胞質の染色の状態を明確にするため、水道水で 20 分洗浄後、エタノールを用いて切片を脱水し、キシレンと置換後、Malinol 封入剤を用いてカバーガラスをかけ封入した。

## 16. 糖尿病ラットの腎臓組織における USF1 PI ポリアミドの評価

腎臓での TGF- $\beta$ 1 蛋白の発現を Western blot 法にて検討した。腎臓組織を RIPA buffer (08714-04, nacalai tesque, Tokyo, Japan) を用いてタンパク抽出し、Pierce BCA protein assay kit (#23225, Thermo Fisher Scientific) にて蛋白定量した。 $\beta$ -メルカプトエタノールを含むサンプルバッファーでタンパク質抽出液を 95°C、5 分間、熱変性処理を行った。12.5%ポリアクリルアミドゲルにサンプルを 1 レーンあたり蛋白量として 100 $\mu$ g アプライし、20~40mA の定電流で電気泳動を行った。その後、泳動したゲルは、iblot にて PVDF 膜に転写し、ブロッキングした。1 次抗体は 1000 倍希釈の TGF- $\beta$ 1 抗体(sc-146, Santa Cruz Biotechnology , Santa, Cruz,

CA, USA)を使用し、4°Cオーバーナイトでインキュベーションした。Tris Buffered Saline With Tween (TBST)で2分2回、15分1回、5分3回洗浄し、2次抗体は10000希釈の Horseradish peroxidase (HRP) conjugated goat anti rabbit IgG (111-036-003, Jackson Immune Reseach, West Grove, PA, USA) を用いて室温で1時間インキュベートした後、TBSTで2分2回、15分1回、5分3回洗浄した。蛋白質の検出は Chemi-Lumi One Super (02230-30, nacalai tesque) を使用し、Fusion Solo System で撮影した。また内部標準は GAPDH を用い、rabbit anti GAPDH (#G9545, Sigma-Aldrich) を使用した。

## 17. 統計解析

結果は平均値±標準誤差 (standard error: SE) として表記し、有意差検定は統計解析ソフトウェア SPSS version 26 (SPSS Inc, Chicago, USA) を用い統計学的解析を行った。USF1 蛋白質の細胞内局在性を検討する実験において、細胞内と核内の比較では Student's t-test を用い、その他の多群間比較では Turkey 法と Games-Howell 法で解析を行った。p<0.05 を統計学的有意差ありと判定した。

## 【研究結果】

### 1. PI ポリアミドのゲルシフトアッセイ

ラット TGF- $\beta$ 1 プロモーター配列の転写因子 USF1 結合配列に跨るように設計された 4 種類の USF1 PI ポリアミド 1~4 について、各々がターゲット 2 本鎖 DNA に結合するかをゲルシフトアッセイにて検討した。USF1 PI ポリアミドを、FITC 標識を有するターゲット配列のセンス鎖にアンチセンス鎖をアニーリングした 2 本鎖 DNA に添加することにより、DNA のバンドがシフトした (図 4 ②、⑥、⑩、⑭)。過剰の FITC 非標識 2 本鎖 DNA を加えることで、FITC 標識 2 本鎖 DNA のバンドと FITC 標識 2 本鎖 DNA+PI ポリアミドのバンドが認められ、ターゲット 2 本鎖 DNA への結合が確認された (図 4 ③、⑦、⑪、⑮)。

### 2. 高糖刺激による TGF- $\beta$ 1 プロモーター活性増加に対する PI ポリアミドの効果

TGF- $\beta$ 1 プロモータープラスミドを HEK293 細胞に導入し、高糖条件で TGF- $\beta$ 1 プロモーター活性増加をルシフェラーゼにて測定し、PI ポリアミド 1~4 の効果を検討した。高糖刺激において TGF- $\beta$ 1 プロモーター活性は有意 ( $P<0.05$ ) に上昇した。PI ポリアミド 3 の投与はプロモーター活性を抑制した (図 5)。PI ポリアミド 1、2、4 は抑制しなかった。さらに、TGF- $\beta$ 1 プロモーター活性が抑制された PI ポリアミド 3 において濃度別に抑制効果を検討したところ、高糖刺激で TGF- $\beta$ 1 プロモーター活性が有意 ( $P<0.01$ ) に上昇したのに対し、PI ポリアミド 3 の  $10^{-10}$ M 投与下において有意 ( $P<0.05$ ) にプロモーター活性を抑制した (図 6)。この結果から、USF1 PI ポリアミド 3 は高糖刺激で上昇した TGF- $\beta$ 1 遺伝子の転写を抑制する事が確認された。

### 3. 高糖刺激による TGF- $\beta$ 1 mRNA 発現に対する PI ポリアミドの効果

培養メサンギウム細胞での高糖条件下において、TGF- $\beta$ 1 mRNA 発現に対する PI ポリアミド 1~4 の効果を検討した。高糖刺激において、TGF- $\beta$ 1 mRNA の上昇が確認されたが、PI ポリアミド 1、2、4 投与下では TGF- $\beta$ 1 mRNA の上昇を抑制しなかった (図 7)。一方、高糖刺激で TGF- $\beta$ 1 mRNA が有意 ( $P<0.01$ ) に上昇したのに対し、PI ポリアミド 3 投与は TGF- $\beta$ 1 mRNA の上昇を有意 ( $P<0.01$ ) に抑制した (図 8)。したがって、TGF- $\beta$ 1 プロモーター活性の抑制と TGF- $\beta$ 1 mRNA の抑制の結果より、USF1 PI ポリアミド 3 を以降の実験で使用することとした。

### 4. 高糖刺激による TGF- $\beta$ 1 蛋白発現に対する PI ポリアミド 3 の効果

培養メサンギウム細胞での高糖条件下において、TGF- $\beta$ 1 蛋白発現に対する PI ポリアミド 3 の抑制効果を Western blot 法にて検討した。高糖刺激では TGF- $\beta$ 1 蛋白発現が有意 ( $P<0.01$ ) に上昇したのに対し、 $10^{-10}$ M PI ポリアミド 3 は、TGF- $\beta$ 1 蛋白発現を有意 ( $P<0.05$ ) に抑制した (図 9)。

### 5. 高糖刺激による細胞形質転換マーカーの発現と PI ポリアミドの効果

培養メサンギウム細胞で合成型形質転換マーカーである Osteopontin mRNA は、高糖刺激により有意 ( $P<0.01$ ) に上昇したのに対し、PI ポリアミド 3 ( $10^{-10}$ M) 投与下において有意 ( $P<0.01$ ) に抑制された (図 10)。また、収縮型形質転換マーカーである *h-caldesmon* mRNA は、高糖刺激により有意 ( $P<0.01$ ) に低下し、PI ポリアミド 3 の投与下においては有意 ( $P<0.01$ ) に上昇していた (図 11)。この結果から、高糖刺激による腎メサンギウム細胞の合成型形質転換に USF1 が関わっていることが確認された。

## 6. 高糖刺激による USF1 mRNA 発現と PI ポリアミドの効果

USF1 mRNA は、高糖刺激でも PI ポリアミド 3 の投与下でも有意な変化はみられなかった (図 12)。

## 7. 高糖刺激による USF1 蛋白の細胞内局在性の検討

USF1 蛋白の細胞内局在性について、蛍光免疫染色法と Western blot 法により検討した。蛍光免疫染色において、高糖刺激前はメサンギウム細胞の細胞質と核ともに USF1 が染色されているのに対し、高糖刺激 24 時間後では核内における USF1 の蛍光免疫染色が増強し、USF1 が核へ移行した事が示された (図 13)。

次に高糖刺激による USF1 蛋白量の変化を、Western blot 法により細胞内と核内で比較した。高糖刺激において細胞内 USF1 蛋白発現は増減を認めなかった。一方、核内のみの USF1 蛋白量を抽出したところ、高糖刺激において USF1 蛋白発現が多くみられた (図 14)。この結果から、高糖刺激で USF1 が細胞質から核内に移行し、転写を促進していることが示唆された。

## 8. 高糖刺激による培養メサンギウム細胞の細胞増殖能の増加と PI ポリアミド 3 の効果

培養メサンギウム細胞の細胞増殖能を測定した結果、高糖刺激により有意 ( $P<0.05$ ) に細胞増殖能は増加した。また、高糖刺激にて増加した増殖能に対し、PI ポリアミド 3 ( $10^{-11}$ M) 投与では抑制傾向を示した (図 15)。

## 9. STZ 糖尿病ラットにおける腎障害への PI ポリアミド 3 の効果

コントロール群 (n=6)、DM 群 (n=7)、ポリアミド群 (n=6) を飼育、週 1 回の体重測定・尿量測定・尿中アルブミン量測定を行い、16 週間後に血液検査・

腎臓重量測定・腎組織変化について検討した。途中でポリアミド群 (n=2) は腹膜炎を発症し死亡したため、最終的にはポリアミド群 (n=4) となっている。

体重推移に関しては、コントロール群と比較して DM 群とポリアミド群では有意 (P<0.01) に体重は減少していたが、DM 群とポリアミド群では有意な差は得られなかった (図 16)。

尿量推移に関しては、コントロール群と比較して DM 群とポリアミド群では有意 (P<0.01) に尿量は著明に増加していたが、DM 群とポリアミド群では有意な差は得られなかった (図 17)。

尿中アルブミン排泄量に関しては、コントロール群と比較して DM 群では STZ 投与 12 週後より上昇し、16 週後では有意 (P<0.01) に尿中アルブミン排泄量は高値であった。ポリアミド群では尿中アルブミン排泄量は DM 群より低値傾向を示したが、統計学的有意差は得られなかった (図 18)。

STZ 投与 16 週間後、ラットから摘出した腎臓重量に関しては、コントロール群と比較して DM 群とポリアミド群では有意 (P<0.01) に増加していたが、DM 群とポリアミド群では統計学的有意差は得られなかった (図 19)。

血液生化学データに関しては、sUN と HbA1c ではコントロール群と比較して DM 群とポリアミド群は有意 (P<0.01) に上昇し、DM 群と比較してポリアミド群は低値ではあるが統計学的有意差は得られなかった (図 20)。血糖値は、コントロール群と比較して DM 群とポリアミド群では有意 (P<0.01) に上昇していたが、DM 群とポリアミド群では統計学的有意差は得られなかった (図 20)。Cr は、コントロール群と比較して DM 群、ポリアミド群ともに上昇傾向ではあるが統計学的有意差は得られなかった (図 20)。

腎組織障害の評価として HE 染色、Masson Trichrome 染色を行い組織学的変化について比較した (図 21)。DM 群においては、全体的に糸球体径が大きく糸球

体が肥大しており、メサンギウム領域の拡大を認めるびまん性病変も多く、尿細管間質の線維化や尿細管萎縮もみられることから、糖尿病性腎症の病変が認められた。一方、ポリアミド群においては、同様の病変が認められたが DM 群と比較して糸球体膨化や間質線維化の程度が軽度であった。

また腎組織において GIS と TIS の評価をした。GIS では、コントロール群と比較して DM 群では障害指数が有意 ( $P<0.01$ ) に上昇し、ポリアミド群では有意 ( $P<0.05$ ) に低下していた (図 22)。同様に TIS でも、コントロール群と比較して DM 群では障害指数が有意 ( $P<0.01$ ) に上昇し、ポリアミド群では有意 ( $P<0.01$ ) に低下していた (図 22)。

腎組織における TGF- $\beta$ 1 の局在を免疫染色にて検討した (図 23)。コントロール群と比較して DM 群においては、TGF- $\beta$ 1 は糸球体領域と近位尿細管に局在しており発現亢進が認められた。一方、ポリアミド群では DM 群と比較して、糸球体領域と近位尿細管における TGF- $\beta$ 1 の局在はみられるものの、その程度は著明に低下していた。また腎組織内の TGF- $\beta$ 1 蛋白発現の比較を Western blot 法にて評価した。コントロール群と比較して DM 群では TGF- $\beta$ 1 蛋白発現が有意 ( $P<0.01$ ) に増加し、ポリアミド群では DM 群と比較して有意 ( $P<0.01$ ) に抑制されていた (図 24)。



## 【考察】

糖尿病性腎症の腎組織学的変化の特徴として、細胞外マトリックスの蓄積による糸球体メサンギウム基質の増生・拡大と糸球体毛細血管壁の肥厚が挙げられる。この変化に対し中心的な役割を担うのが TGF- $\beta$ 1 であり、糖尿病性腎症においてその発現が増強し、腎臓の線維化を促進することが知られている<sup>(27)</sup>。最近、USF1 は高糖刺激による TGF- $\beta$ 1 の発現をメサンギウム細胞にて調整することがわかってきている<sup>(11)</sup>。糖尿病性腎症においては、高血糖により PKC/ポリオール経路等が活性化されることで、USF1 の転写因子が活性化される。Sharma らは、過剰な血糖を細胞内に取り込むことで AMPK 活性が抑制され、USF1 の核移行が進み TGF- $\beta$ 1 転写が促進され、腎線維化が進行する事を報告した<sup>(13)</sup>。そのため糖尿病において、高糖刺激により USF1 が活性化されることで、細胞外マトリックスの蓄積、炎症、糸球体硬化を調節する TGF- $\beta$ 1 遺伝子の発現が亢進することが考えられる。このように糖尿病性腎症の腎障害の進展に転写因子 USF1 による TGF- $\beta$ 1 の発現亢進が深く関与していると考えられる。そこで本研究において、ラット TGF- $\beta$ 1 プロモーターにある USF1 結合部位に特異的に結合し、TGF- $\beta$ 1 発現を抑制するよう設計された PI ポリアミドを用いて、糖尿病性腎症の進展を抑制できるかを検証し、USF1 に対する PI ポリアミドを糖尿病性腎症の新規治療薬として創薬開発する為の基礎検討を行った。

*in vitro* の培養メサンギウム細胞の実験において、高糖刺激により TGF- $\beta$ 1 のプロモーター活性の増加と mRNA 発現亢進を認めた。また細胞増殖の実験において、高糖刺激により細胞増殖能 WST-1 の増加を認めたことから、高糖刺激は TGF- $\beta$ 1 の発現亢進を介してメサンギウム細胞の増殖に関与することが分かった。この高糖刺激による TGF- $\beta$ 1 mRNA の発現亢進に対し、4 種類の USF1 PI ポリア

ミドを設計・合成した。4種類のPIポリアミドを設計した時点ではどれが2本鎖DNAのminor grooveに結合するものかは検証されていないため、プロモーター活性、TGF- $\beta$ 1発現、細胞増殖における抑制効果を検討し、最も効果的なPIポリアミド3を本研究でのリード化合物とした。

一方、今回の実験で、高糖刺激により間葉系細胞の合成型形質マーカーであるOsteopontinは増加し、収縮型形質マーカーである*h-caldesmon*は減少した。このメカニズムとしてTGF- $\beta$ 1の細胞増殖に対する作用は、ほとんどの細胞には増殖抑制に働くが、形質が合成型になった間葉細胞においては増殖促進に働くことが知られている。このように、メサンギウム細胞への高糖刺激はUSF1によるTGF- $\beta$ 1プロモーター活性化により、メサンギウム細胞を合成型に形質変換し、Osteopontinの発現を増加させ、*h-caldesmon*の発現を抑制し、細胞増殖を促進させていると考えられた。またUSF1 PIポリアミド3の投与は、TGF- $\beta$ 1遺伝子の転写を抑制し、メサンギウム細胞の形質を収縮型に戻し、細胞増殖を抑制していると考えられる。よってUSF1 PIポリアミド3は糖尿病性腎症でUSF1によるTGF- $\beta$ 1の発現亢進を抑制し、メサンギウム細胞の形質を収縮型にすることで増殖を抑制し、糸球体障害に効果があると示唆された。また、Osteopontin発現の増加は糖尿病性腎症のアルブミン尿及び糸球体硬化症やメサンギウム増殖と強く相関する。USF1はTGF- $\beta$ 1プロモーター領域のE-boxモチーフに結合する転写因子だが、同様のモチーフがOsteopontinのプロモーター領域にも存在する。そのためOsteopontinプロモーター領域にも結合し、糸球体メサンギウム細胞の増殖を引き起こす。今回使用したUSF1 PIポリアミド3はOsteopontinプロモーター領域にも同様に作用したため、その発現を抑制したと考えられる。一方で、高糖刺激に対してUSF1の発現の絶対量は変化を示さなかったが、細胞内と核内でUSF1蛋白量は核内発現が多いことが分かった。これは高糖刺激により転写因

子 USF1 が細胞質から核内移行し、TGF- $\beta$ 1 遺伝子のプロモーターに結合し転写を促進していることが示唆された (図 25)。

また、高糖刺激による TGF- $\beta$ 1 プロモーター活性に対する PI ポリアミドの効果を検討した結果、 $10^{-10}$ M PI ポリアミドが最も抑制効果を示したが、高濃度では抑制効果が消失し、PI ポリアミドに濃度依存性抑制効果が観られなかった。高糖刺激による Osteopontin mRNA 発現に対する PI ポリアミドの効果を検討した際も同様の結果となっている。これは、PI ポリアミドは濃度依存性ではなく効果がある濃度は非常に狭い領域であり、それ以上濃度が上昇すると、PI ポリアミド自体が USF1 結合部位に結合した際、TGF- $\beta$ 1 プロモーターの転写活性をあげている可能性が考えられる。この高濃度 PI ポリアミドの転写活性刺激については、当研究室で検証している。しかし、*in vivo* で生体に投与する際の血中濃度は *in vitro* より極めて低容量にて、転写活性刺激作用は観られないことも確認している。

次に *in vivo* の実験では、STZ 投与により作成された糖尿病モデルラットの病態に対する USF1 PI ポリアミドの薬剤効果の検討を行った。糖尿病ラットでは糖尿病発症直後から、高血糖による飲水量・尿量の増加を認め、体重増加は著しく減少した。糖尿病発症 9 週目より白内障も出現した。尿中アルブミン排泄量は、糖尿病発症 12 週目より増加傾向となり、16 週経過時には明らかな増加を認めた。腎重量も増加しており明らかな糸球体の肥大化が認められた。血液データではコントロール群と比較して sUN、Cr ともそれほど差はなかったが、体重補正をすると上昇しており、腎機能低下を示唆する所見であった。これは糖尿病による代謝異常が生じ、体格に差が出たことが影響していると考えられた。HE 染色や Masson Trichrome 染色の結果では、メサンギウム細胞増殖による糸球体肥大化、間質線維化、尿細管萎縮がみられ、腎臓組織障害が進行していることが分

かった。間質線維化や尿細管萎縮の出現部位としては、動脈硬化血管周囲や障害糸球体周囲に多くみられた。GIS、TIS についても糸球体障害、尿細管間質障害ともに障害の程度は増悪していた。また、糖尿病ラット腎組織内の TGF- $\beta$ 1 発現については亢進していることが Western blot 法と免疫染色法で確認され、これらの組織学的変化は TGF- $\beta$ 1 が強く関与しているものと考えられる。

さらに糖尿病性腎症では TGF- $\beta$ 1 発現亢進により糸球体内皮細胞が EndMT により間葉化することが知られている<sup>(28)</sup>。糖尿病性腎症ではこの EndMT により足細胞・糸球体内皮細胞クロストークの破綻<sup>(29)</sup>が生じ足細胞の傷害が起こり、前述したように尿中アルブミン排泄量が増加したと考えられる。以上より、糖尿病発症 16 週において腎機能低下や組織学的変化がみられる糖尿病性腎症が発症している可能性が示唆された。

次に、糖尿病ラットに USF1 PI ポリアミド 3 を投与し、腎機能障害や組織学的変化への効果について検討した。以前我々の研究班では、PI ポリアミドの尾静脈投与を試みたが、糖尿病による著明な脱水や血管系の変性により血管虚脱が著しく困難を極めた。また PI ポリアミドの核内移行は 3 日後にピークを迎え 7 日後に排出されることから、本研究では週 2 回腹腔内投与とした。

ポリアミド群は DM 群と比較して、体重や体格に差は認めなかった。しかし DM 群では全例白内障を発症していたが、ポリアミド群では白内障の発症を認めない個体も存在した。また血液データでは明らかな腎機能障害の改善はみられなかったが、16 週後の尿中アルブミン排泄量は DM 群と比較して有意に低下していた。免疫染色にて TGF- $\beta$ 1 は糸球体や近位尿細管に局在していたが、糖尿病ラットと比較して程度は軽度であり発現亢進は抑制されていた。Western blot 法にて TGF- $\beta$ 1 蛋白発現を確認したところ、DM 群と比較して有意に発現量の低下を認めた。組織学的変化においても、メサンギウム細胞増殖や糸球体の肥大、間

質線維化や尿細管萎縮はみられたものの、DM 群よりも程度は軽度であった。GIS、TIS による障害の程度も DM 群と比較して軽度であることが分かった。以上のことから、糖尿病ラットに対する USF1 PI ポリアミド 3 の投与は、TGF- $\beta$ 1 の抑制効果を示し、腎機能障害や組織学的変化に対しても糖尿性腎症の進行抑制に寄与していると考えられる。

糖尿病性腎症の成因として様々な転写因子が深く関与しているが、本研究において USF1 がメサングウム細胞にて TGF- $\beta$ 1 の発現を調整することがわかり、また USF1 に対する PI ポリアミドを使用することで糖尿病性腎症の腎機能障害に抑制効果があるということが示唆された。今回は 16 週間の実験であったが、組織学的変化は尿中アルブミン排泄量ほど著明なものではなく、最大限効果を検討するのであれば糖尿病罹患期間をさらに長期にするべきであると考え。今回は TGF- $\beta$ 1、USF1 に注目したが、糖尿病性腎症においては様々な代謝経路や遺伝子、それに関わる数多くの転写因子が複雑に絡み相互作用している。病勢に対して明確な効果を示し、より特異的で副作用の少ない薬を開発するには、様々な物質に注目し実験を重ね検討していく必要がある。

PI ポリアミドのターゲット遺伝子に対する特異性について、福田らは過去に、TGF- $\beta$ 1 のプロモーター領域に結合する AP1 に対する PI ポリアミドにおける、腎障害ラットへの全身投与による効果を検討し、DNA アレイにて PI ポリアミドのターゲット分子への特異性を証明している<sup>(24)</sup>。このように PI ポリアミドは静止状態の遺伝子に結合してもその発現には影響せず、疾病状態で増加した遺伝子転写活性のみを抑制することを示している。

今回の USF1 PI ポリアミドについても、TGF- $\beta$ 1 プロモーターの 8 塩基に結合するよう設計しているが、多くの遺伝子の同じ配列に結合するため、ほかの遺伝子発現を抑制する off targeting 効果が問題になる。しかし、PI ポリアミドは静止

状態の遺伝子に結合してもその発現には影響せず、疾病状態で増加した遺伝子転写活性を抑制するため off targeting 効果は少ないとされている<sup>(30)</sup>。また転写因子 USF1 は糖尿病の高血糖で刺激されるため、これまで開発してきた TGF- $\beta$ 1 の PI ポリアミドよりより糖尿病性腎症への特異性は発揮されると期待される。しかし今回の実験において、USF1 に特異的に設計した PI ポリアミドだったが、同様のモチーフを有する Osteopontin にも効果がみられた。結果的には、Osteopontin によるメサンギウム細胞増殖に対して抑制効果が認められたが、逆に USF1 への特異性という観点では唯一無二というわけにはいかなかったのが現状である。このように同様のモチーフをもつ遺伝子は他にも存在する可能性が十分に考えられ、また今回のようにメリットではなくデメリットとして多臓器にも作用してしまう可能性も否定はできず、8 塩基での特異性の限界が考えられる。

今後は、ヒト USF1 PI ポリアミドを分子設計しヒトメサンギウム細胞への作用を検討すると共に、ヒトゲノムと相同性の高い霊長類マーモセットを用いて前臨床試験を行い、PI ポリアミドの効果を検証する計画である。その後、非臨床 GLP 試験を経てヒトの糖尿病性腎症の治療薬として PI ポリアミドの開発を目指していく。その際、最終的にヒト USF1 PI ポリアミドのリード化合物が決定された時点にて、霊長類マーモセットに投与後の DNA アレイによる PI ポリアミドの特異性・off targeting の検証が必要である。難治性疾患に対する有効な薬剤の開発において、先駆的な研究を臨床応用という実践的研究に結び付けることができれば極めて意義深い。臨床的に貢献できるよう広い視野を持って、さらなる可能性が秘められた PI ポリアミド開発に取り組んでいきたい。

## 【結論】

本研究において、高糖刺激による培養メサンギウム細胞からの TGF- $\beta$ 1 発現増加、TGF- $\beta$ 1 プロモーター活性の増加、メサンギウム細胞増殖促進に対して、USF1 PI ポリアミド 3 の投与は抑制効果を示した。また、糖尿病モデルラットにおいても、糸球体病変及び間質病変を USF1 PI ポリアミド 3 は抑制した。USF1 PI ポリアミド 3 は将来、糖尿病性腎症の治療薬となる可能性が考えられた。

## 【謝辞】

本研究にあたり、研究全般において御指導、御鞭撻いただきました日本大学総合科学研究所、福田昇教授、日本大学医学部内科学系腎臓高血圧内分泌内科学分野、阿部雅紀教授に心から感謝致します。そして、研究全般を支えていただきました日本大学医学部内科学系総合内科・総合診療分野、相馬正義前教授、日本大学医学部内科学系腎臓高血圧内分泌内科学分野、上野高浩先生にも深謝いたします。

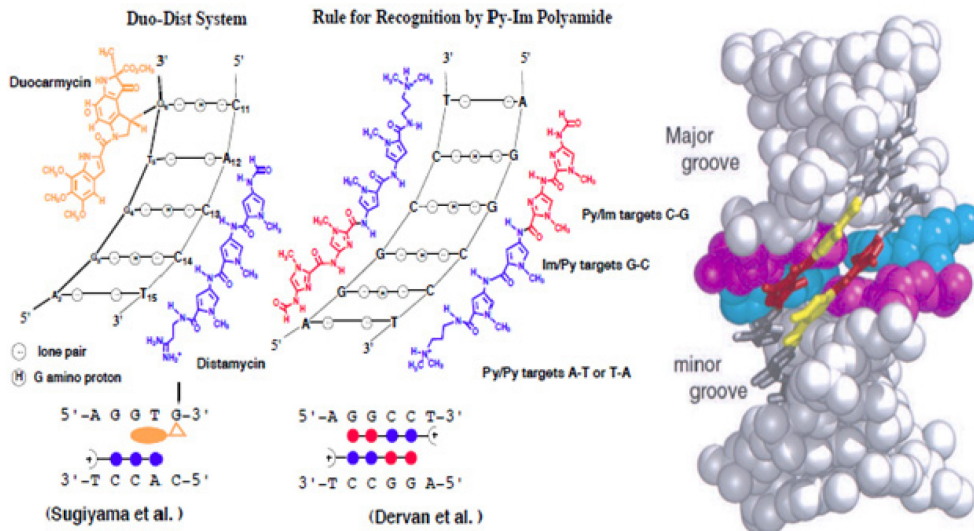
組織の評価にあたりご協力頂きました八戸学院大学健康医療学部人間健康学科、遠藤守人教授に心より感謝申し上げます。また、研究全般を献身的に支え多くの御援助をいただきました日本大学医学部内科学系腎臓高血圧内分泌内科学分野、常見明子様にも深く感謝致します。研究全般にわたりご協力いただいた深澤みゆき様、片川まゆみ様、中井茂樹様、ほか御協力いただきました皆様に深く感謝いたします。

本研究を遂行するにあたり協力し支えていただいた母、祖母、叔父、いつも傍で惜しみない愛情と共に支え励ましてくれた夫と息子、応援し協力して下さった義父、義母、義兄、義姉に心より深く感謝申し上げます。



【図】

【A】



【B】

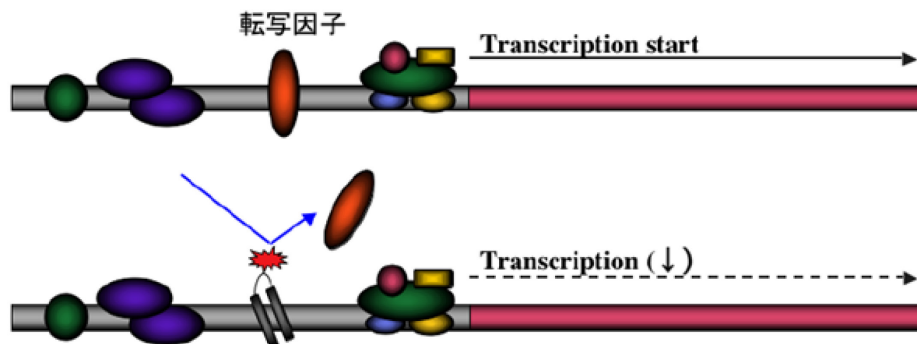


図 1. PI ポリアミドによる遺伝子発現抑制の原理

【A】 PI ポリアミドの構造：ヘアピン型構造を有しており、二重らせんの minor groove に結合する。

【B】 PI ポリアミドによる転写因子阻害の原理：PI ポリアミドは、USF1 より強力に TGF-β1 プロモーターに水素結合することで、USF1 の結合を阻害し TGF-β1 の遺伝子発現を抑制する。

ラットTGF- $\beta$ 1プロモーター配列とUSF1結合領域

```

TTTGTACTGTGGCACAGGGGAGCCATGGATGGGTTTTGAGCAAGAGGGTAATGTGGATTT
CTATAGATCCCTGTGACTACTATGTGGAGTGGATGGGAGATGAGAACACAGAGAGGAAAT
-1200 TAAGGCAATAATCCAACGTAAAAGGGCTGTACCTTAGTCTCTACTGGTTTTCAAGGAGATG
GGAACCCAGGGGCAGGTCTGCCTCCTTTGTCTTTTTTCTGACCCCTCTTGTCTGCAGG
TTGGCCTCGACTTCATCTCCAGGTGTGGTCCCAGGACAGCTTTGGCCGCTGCCAGCTTGC
TGGCTATGGCTTTTGCCATGTGCCTAGCAGCCCAGGCACTCACCAGCTGGACTGCCCTAC
ATGGAGGCCCTGGGTAGTTGGAGGGAGCAGCTAGCACGGGCTTTCGTGGGTGGCGGGCC
ACAGCTGCTGCACGCAGACACCATCTACAGCGGGGCCGACCGCTACCGCTGCACACGGC
CGCGGGTGGCACAGTGCACCTTGGTATCGGTCTGCTGCTGCGCCACTTTGATCGCTACGG
TGTGGAGTGTGAGGGACTTCACTGCCACAGTACCATCATCCACAGCCCTGCGCACAC
GACGGCACAGCAGTGAACAGGCACATAGACTCTGGAGACTGTCAGTCTGATCTCACC
-600 AAGTCATGGCCCTTATGCCATGGACTGCAAGGCCAGGAATACCCCTGTGGCCCATGCTC
CACTGAATTACCGGGTAAAAGTCTGTGAGTTGGAGGGACTTGAGGAGAGCATGCTGTTTG
GCACTGTCAGGGGCACCTAATAAAAAGCATGCATTTCTCATAGGTAAGGTGTCCCCTCGTA
CCCGCTATCAGTCTCAGTGGTGATGTCCGTCCTTCTAATTTAAATCCTCCTTGACACTT
TCATCAGCAAACCCAAAGTCTGCCCTACCTTTCGCTCTATGCCTCCTAGGCCCTCTAAT
ATAGACCCTGTTTTTACAAGTCGGCAATTTCCCTTTGACCTTCAACAACCTCCAC
AAAACACGGGGGGCGTTCTGTTGGTCACCAGCTCTAGTAGTGTCCGCGCCAGGAGGCA
GCACCGCCTGGAGGTGGCGGGCCGGGGTGCCCGCCCCCTCCCCGCAGGGCTGAAGAGACC
CCCCTCGGAGCCCGCCACGCTAGATGAAGACAGTGGCCCCCCCATGCCCTCCCCTGGG
GCTGCCCGCCCGCGTGCCTTCTGGGTGGGGCCGGGGCGGCTTCAAACCCCGCC
GCCAGCCGGTCCCGCCCGCCGCGCCTTCCGCGCCCAGGCCGTCCCCTCCTCCTCC
CCCGGGATCCTCCAGACAGCTAGGCCCGCGCGGGGCAGGGGGACGCCCTCGGGG

```

赤：USF1結合配列

青：EXON1

図 2. ラット TGF- $\beta$ 1 プロモーター配列と USF1 結合領域

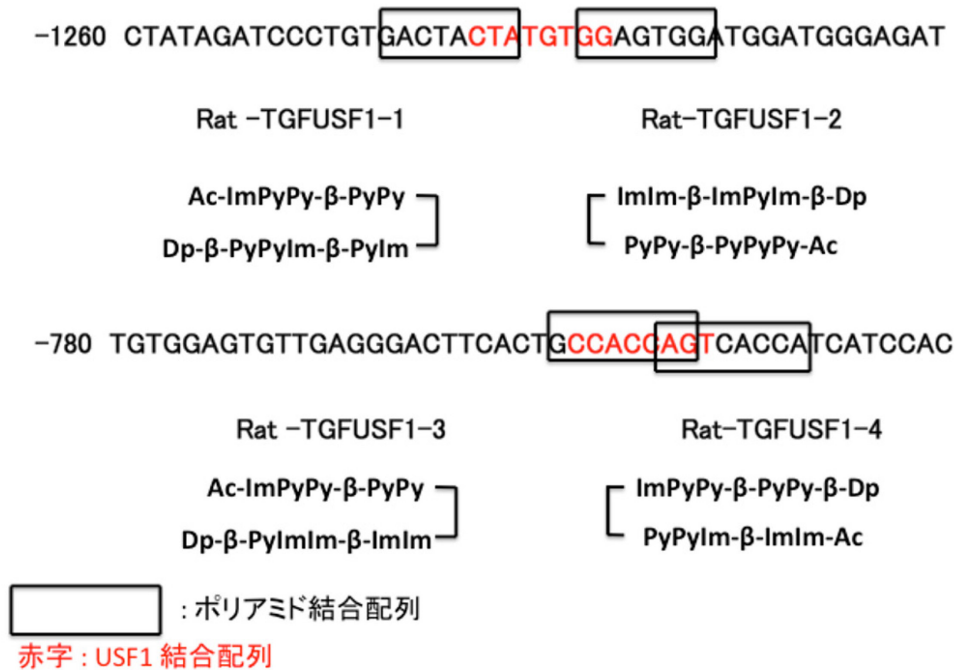
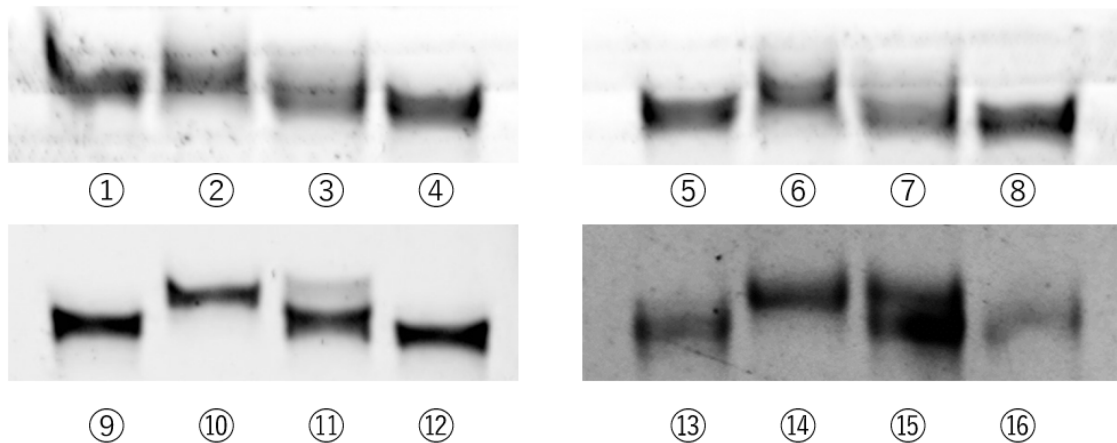


図 3. ラット TGF-β1 プロモーターを標的とする PI ポリアミドの設計

PI ポリアミドは TGF-β1 プロモーターである USF1 結合部位に結合するように設計された。また USF1 結合部位と少しずらしラット TGF-β1 プロモーター領域に跨るように設計することで、TGF-β1 への特異性を上げている。



- ① FITC-dsDNA
- ② FITC-dsDNA + USF1 PI polyamide 1
- ③ FITC-dsDNA + dsDNA (competitor) + USF1 PI polyamide 1
- ④ FITC-dsDNA (mismatch) + USF1 PI polyamide 1
- ⑤ FITC-dsDNA
- ⑥ FITC-dsDNA + USF1 PI polyamide 2
- ⑦ FITC-dsDNA + dsDNA (competitor) + USF1 PI polyamide 2
- ⑧ FITC-dsDNA (mismatch) + USF1 PI polyamide 2
- ⑨ FITC-dsDNA
- ⑩ FITC-dsDNA + USF1 PI polyamide 3
- ⑪ FITC-dsDNA + dsDNA (competitor) + USF1 PI polyamide 3
- ⑫ FITC-dsDNA (mismatch) + USF1 PI polyamide 3
- ⑬ FITC-dsDNA
- ⑭ FITC-dsDNA + USF1 PI polyamide 4
- ⑮ FITC-dsDNA + dsDNA (competitor) + USF1 PI polyamide 4
- ⑯ FITC-dsDNA (mismatch) + USF1 PI polyamide 4

#### 図 4. ゲルシフトアッセイ

FITC 標識 2 本鎖 DNA (①、⑤、⑨、⑬) に USF1 PI ポリアミドを添加することで、バンドが上方にシフトした (②、⑥、⑩、⑭)。そこに過剰の FITC 非標識 2 本鎖 DNA を加えることでバンドが二重になった (③、⑦、⑪、⑮)。

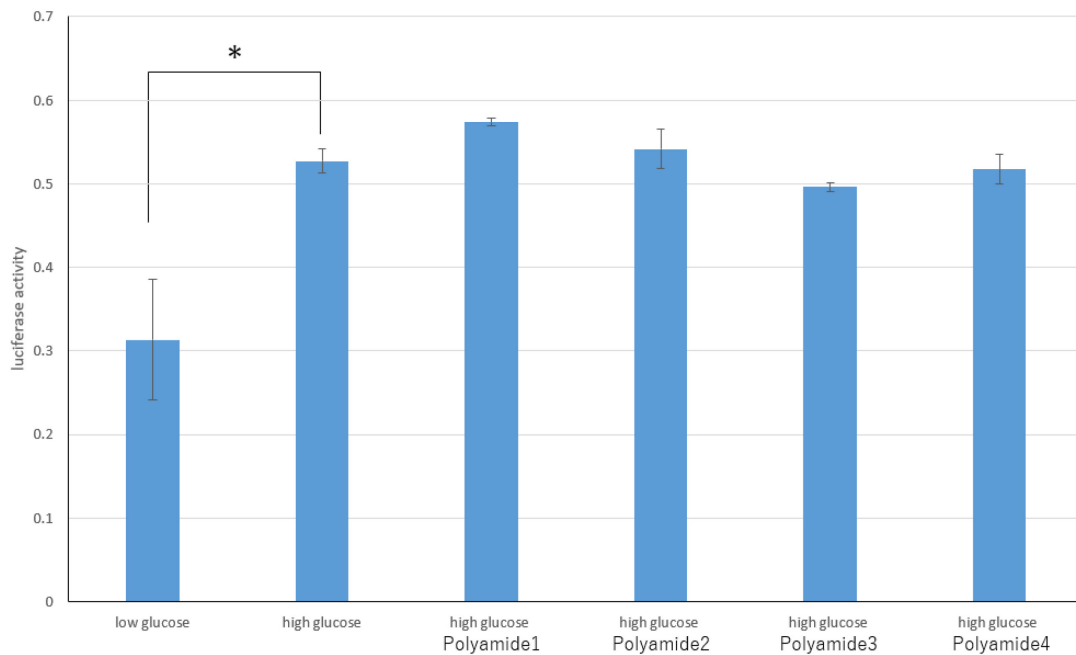


図 5. 高糖刺激による TGF-β1 プロモーター活性に対する PI ポリアミドの比較

高糖刺激による TGF-β1 プロモーター活性に対する効果を PI ポリアミド 1~4 ( $10^{-10}$ M) において比較した。高糖刺激により TGF-β1 プロモーター活性は有意に上昇し、PI ポリアミド 3 投与下において低下傾向を認めた。グラフは平均値±標準誤差 (n=6) で示している。(\*p<0.05)

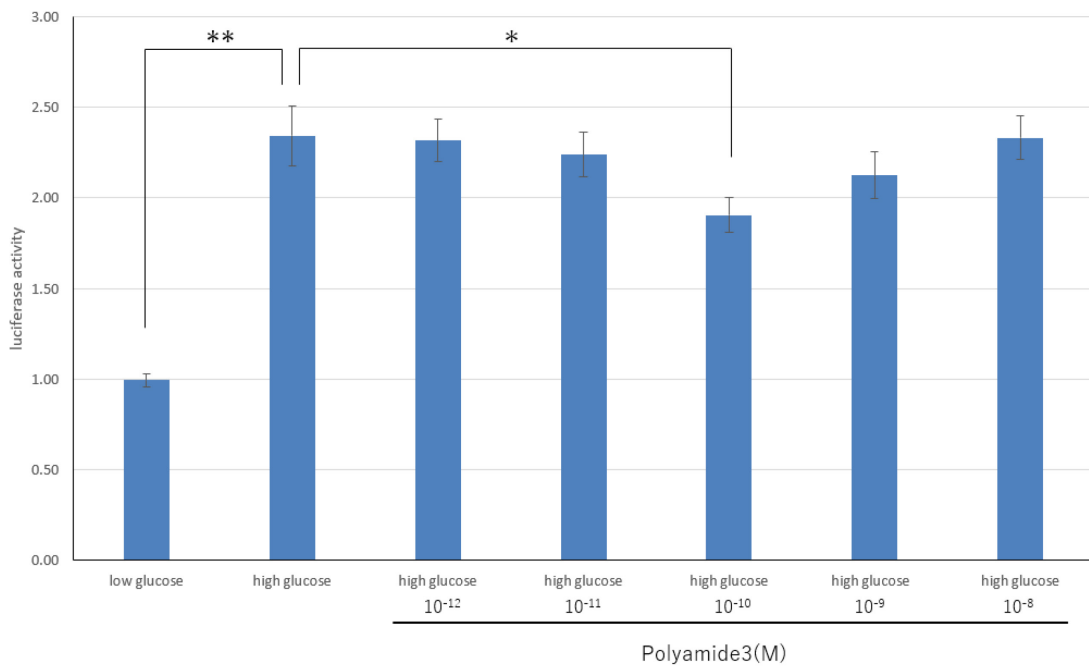


図 6. 高糖刺激による TGF- $\beta$ 1 プロモーター活性に対する PI ポリアミド 3 における濃度比較

TGF- $\beta$ 1 プロモーター活性を抑制傾向にあった PI ポリアミド 3 において、各濃度差 ( $10^{-12}$ M $\sim$  $10^{-8}$ M) で効果を比較した。高糖刺激により TGF- $\beta$ 1 プロモーター活性は有意に上昇し、PI ポリアミド 3 ( $10^{-10}$ M) 投与下において有意に低下を認めた。グラフは平均値 $\pm$ 標準誤差 (n=6) で示している。(\*p<0.05, \*\*p<0.01)

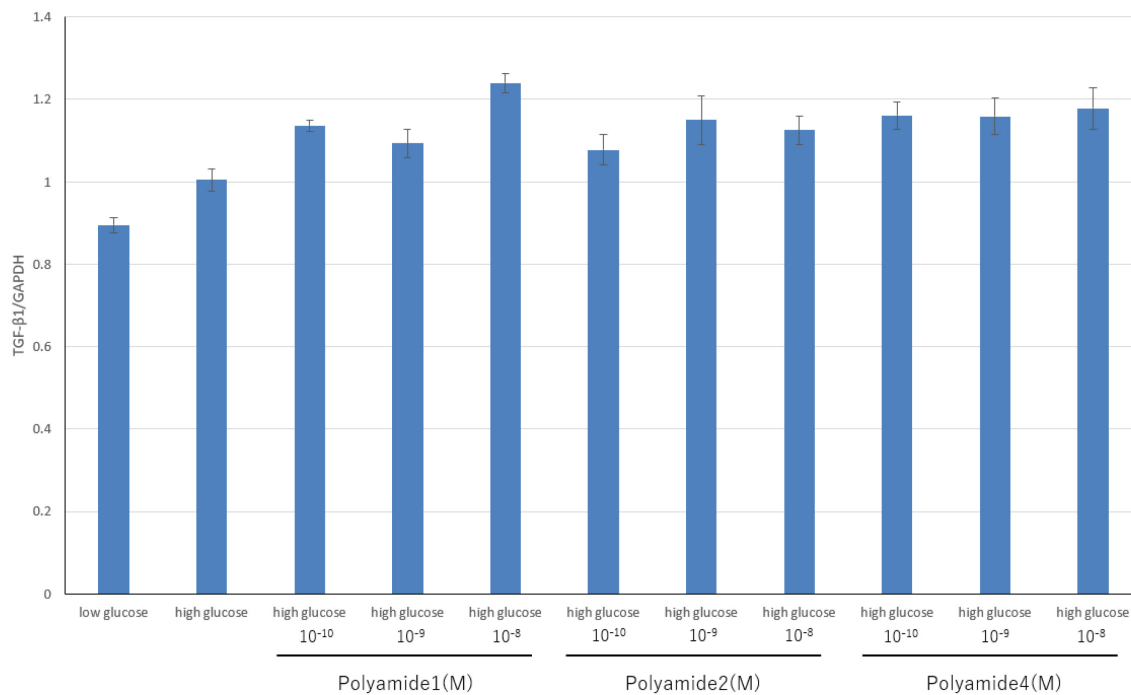


図7. 高糖刺激による TGF-β1 mRNA 発現に対する PI ポリアミド 1、2、4 の効果

高糖刺激により上昇した TGF-β1 mRNA に対して、PI ポリアミド 1、2、4 投与下ではどの濃度においても有意な低下は見られなかった。グラフは平均値±標準誤差 (n=6) で示している。

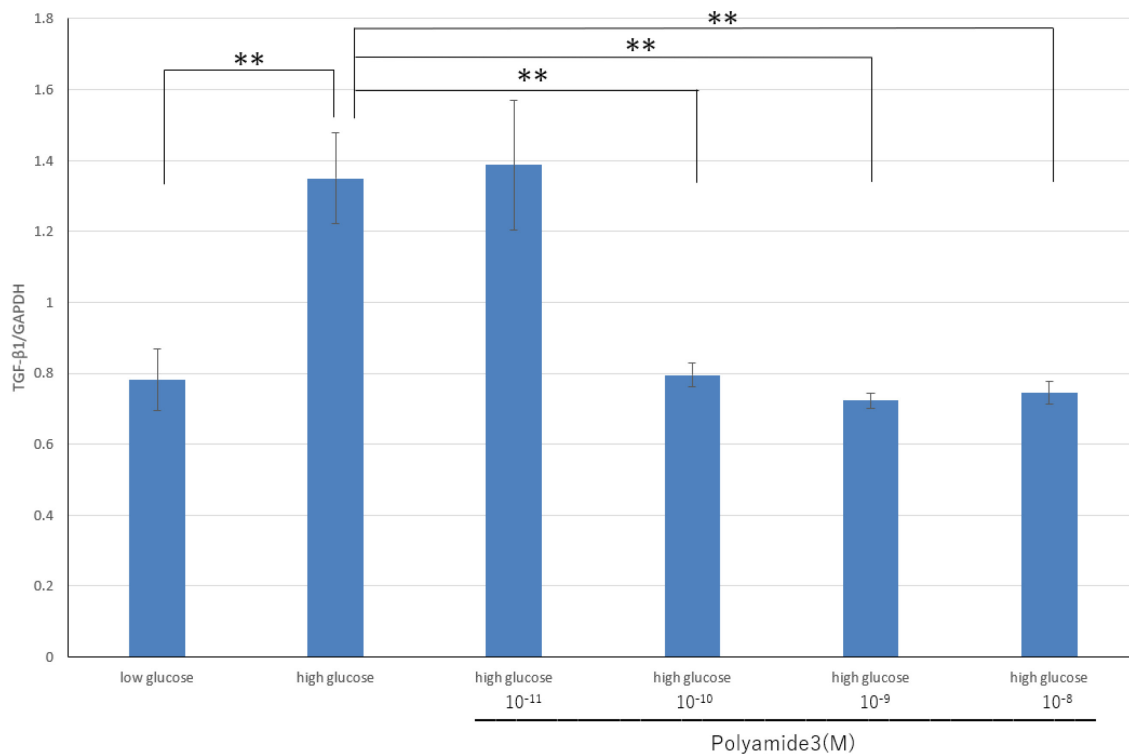


図 8. 高糖刺激による TGF-β1 mRNA 発現に対する PI ポリアミド 3 の効果

高糖刺激により TGF-β1 mRNA は有意に上昇し、PI ポリアミド 3 (10<sup>-10</sup>M~10<sup>-8</sup>M) 投与下において有意に低下を認めた。グラフは平均値±標準誤差 (n=6) で示している。 (\*\*p<0.01)



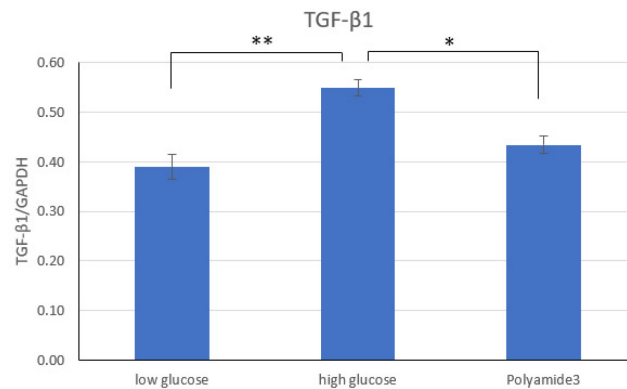
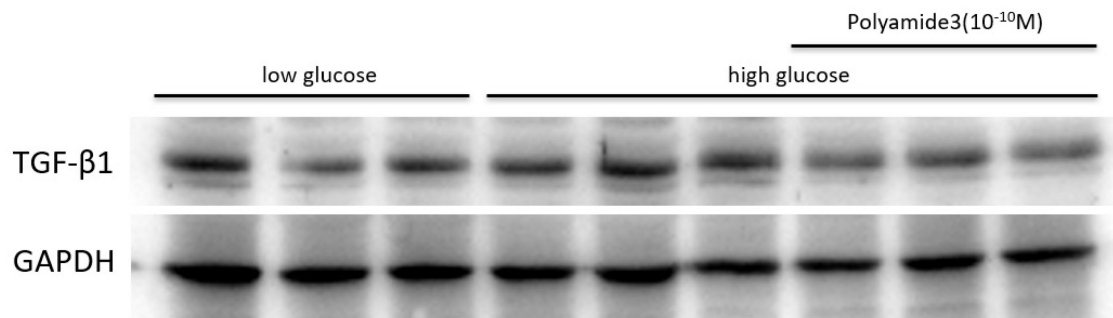


図 9. 高糖刺激による TGF-β1 蛋白発現に対する PI ポリアミド 3 の作用

高糖刺激による TGF-β1 蛋白発現に対する PI ポリアミド 3 の効果を Western blot 法にて確認した。高糖刺激により TGF-β1 蛋白発現は有意に増加しており、PI ポリアミド 3 (10<sup>-10</sup>M) 投与下で TGF-β1 蛋白発現が有意に低下していた。グラフは平均値±標準誤差 (n=6) で示している。(\*p<0.05, \*\*p<0.01)

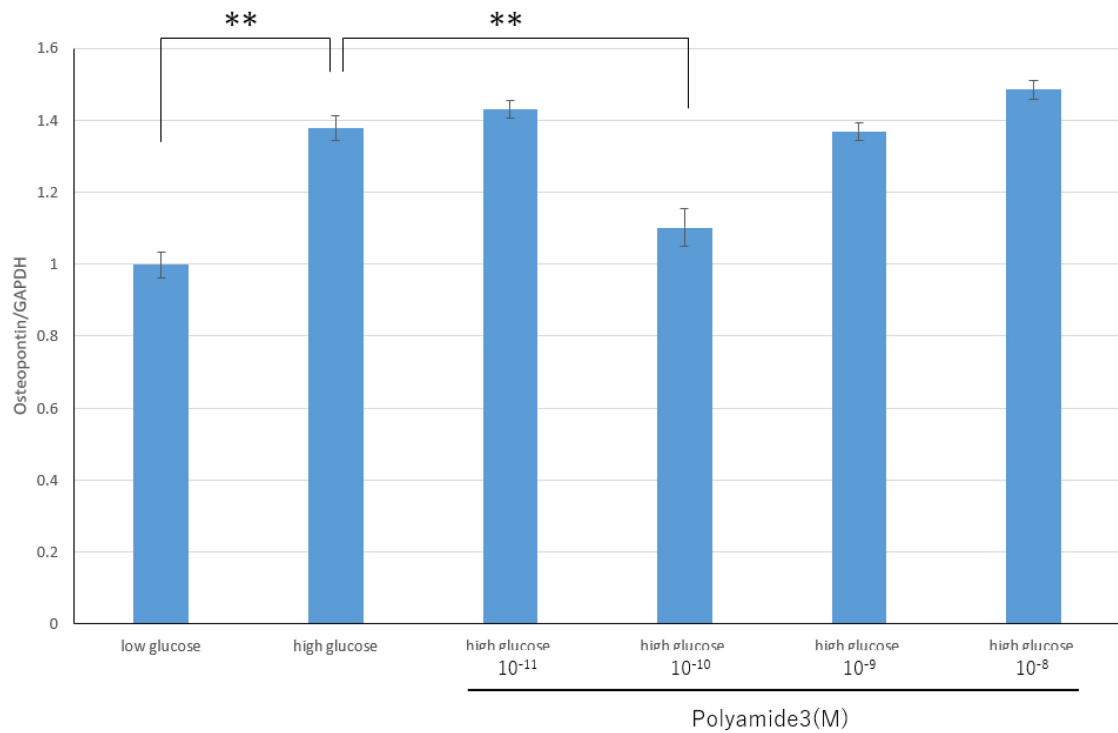


図 10. 高糖刺激による Osteopontin mRNA 発現に対する PI ポリアミド 3 の効果

高糖刺激による Osteopontin mRNA 発現に対する PI ポリアミド 3 の効果をリアルタイム RT-PCR 法で確認した。高糖刺激により合成型マーカーである Osteopontin mRNA は有意に上昇し、PI ポリアミド 3 (10<sup>-10</sup>M) 投与下において有意に低下を認めた。グラフは平均値±標準誤差 (n=6) で示している。(\*\*p<0.01)

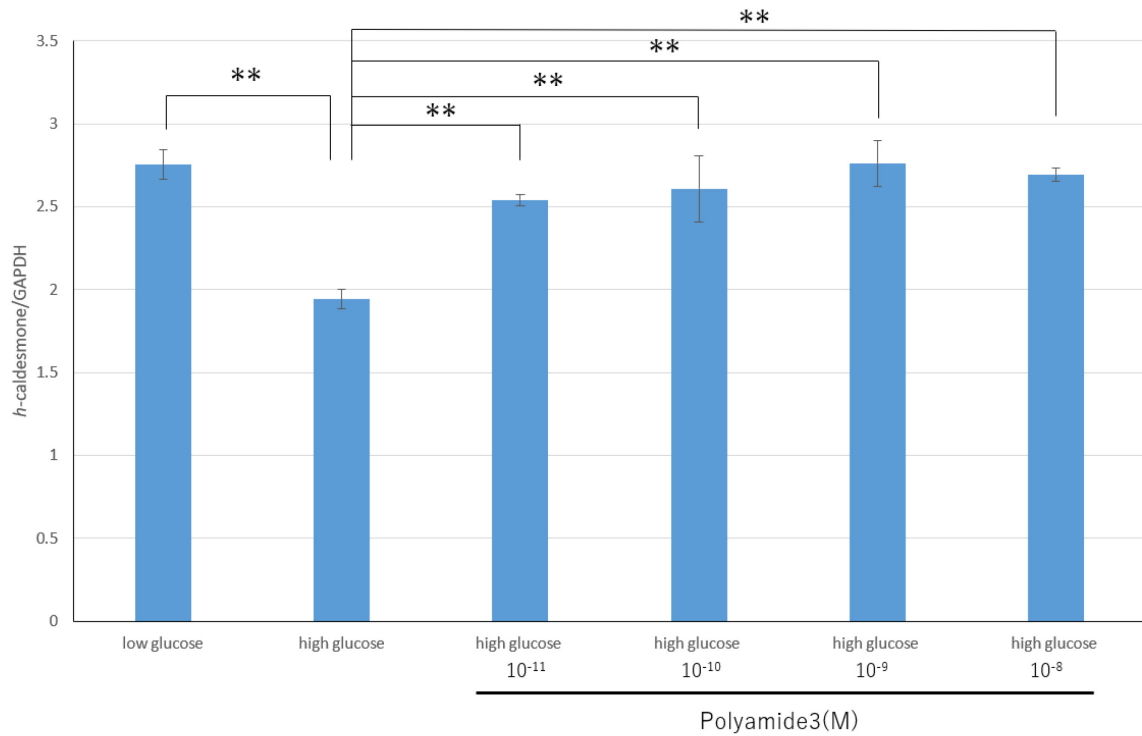


図 11. 高糖刺激による *h-caldesmon* mRNA 発現に対する PI ポリアミド 3 の効果

高糖刺激による *h-caldesmon* mRNA 発現に対する PI ポリアミド 3 の効果をリアルタイム RT-PCR 法で確認した。高糖刺激により収縮型マーカーである *h-caldesmon* mRNA は有意に低下し、PI ポリアミド 3 投与下においてどの濃度においても有意に上昇を認めた。グラフは平均値±標準誤差 (n=6) で示している。

(\*\*p<0.01)

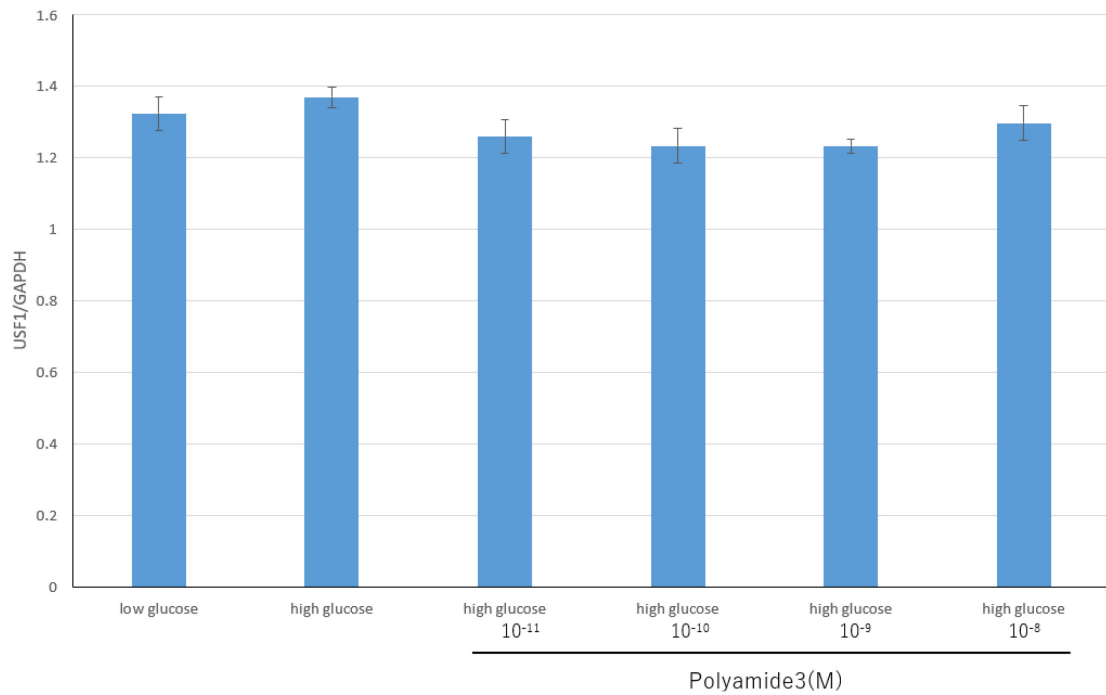
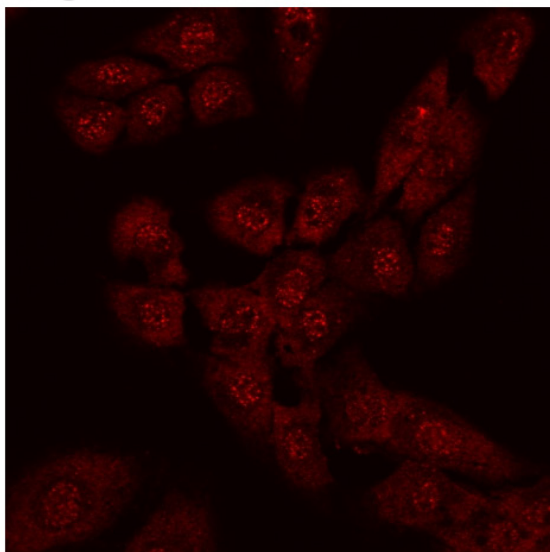


図 12. 高糖刺激による USF1 mRNA 発現に対する PI ポリアミド 3 の効果

高糖刺激により USF1 mRNA は有意な上昇は認めなかった。グラフは平均値±標準誤差 (n=6) で示している。

low glucose 24H



high glucose 24H

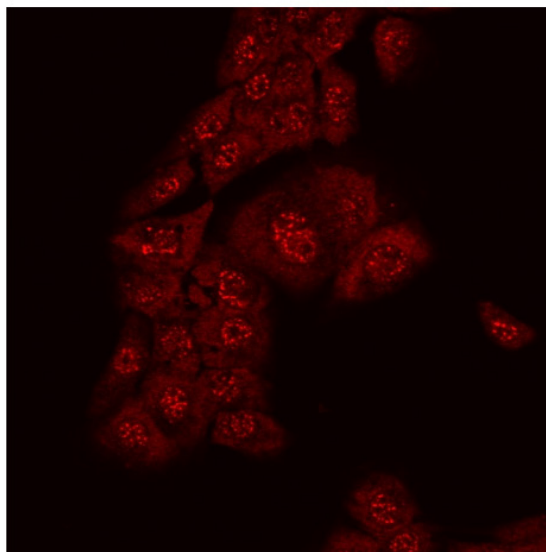


図 13. USF1 蛋白細胞内局在性の蛍光免疫染色による評価

蛍光免疫染色法により USF1 蛋白の細胞内局在性を検討した。高糖刺激 24 時間後では、核内における USF1 の蛍光免疫染色が増強していた。

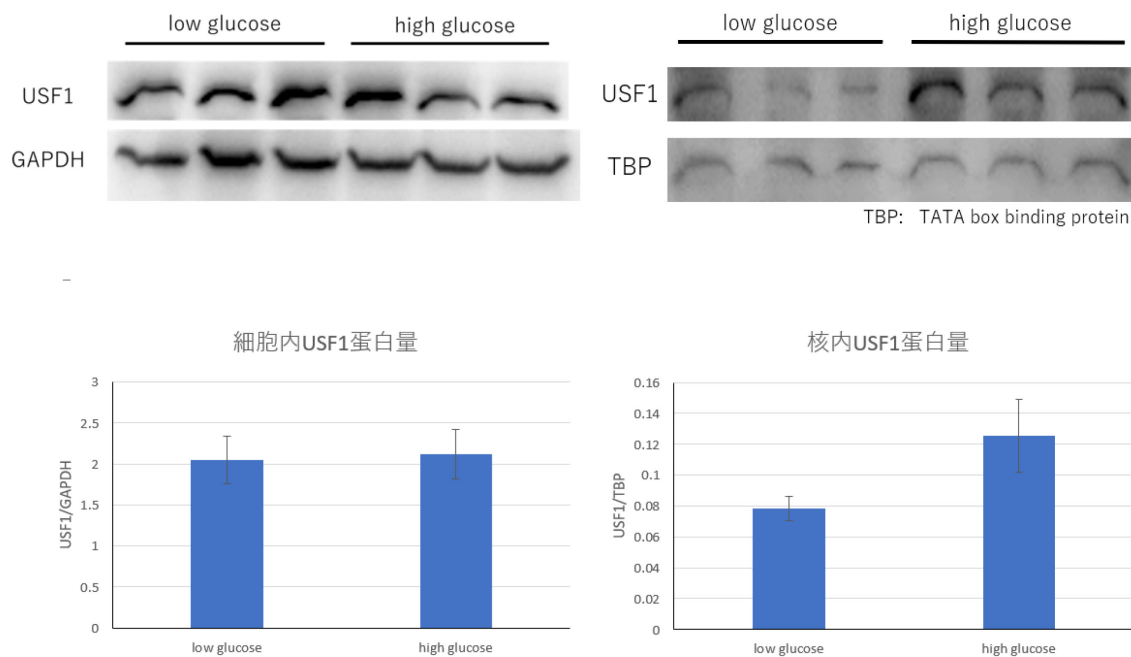


図 14. USF1 蛋白細胞内局在性の Western blot 法による評価

高糖刺激による USF1 蛋白量の変化を、Western blot 法を用いて細胞内と核内で比較した。細胞内 USF1 蛋白量は高糖刺激により変化は認めなかったが、一方で、核内 USF1 蛋白量は high glucose の方が増加していた。グラフは平均値±標準誤差 (n=3) で示している。

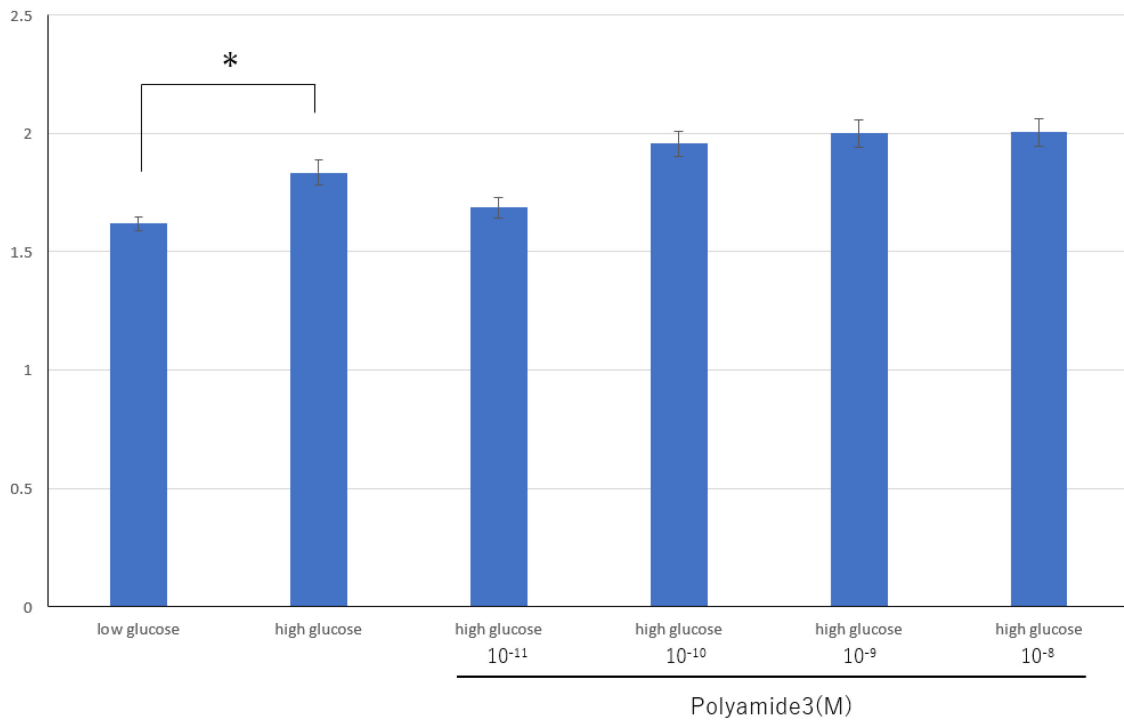


図 15. 高糖刺激による培養メサンギウム細胞の細胞増殖能と PI ポリアミドによる細胞増殖抑制の効果

高糖刺激によるメサンギウム細胞の増殖能の評価については Premix WST-1 Cell Proliferation Assay System を使用し検討した。高糖刺激により有意に細胞増殖は上昇し、PI ポリアミド 3 (10<sup>-11</sup>M) 投与で抑制傾向がみられた。グラフは平均値±標準誤差 (n=6) で示している。(\*p<0.05)

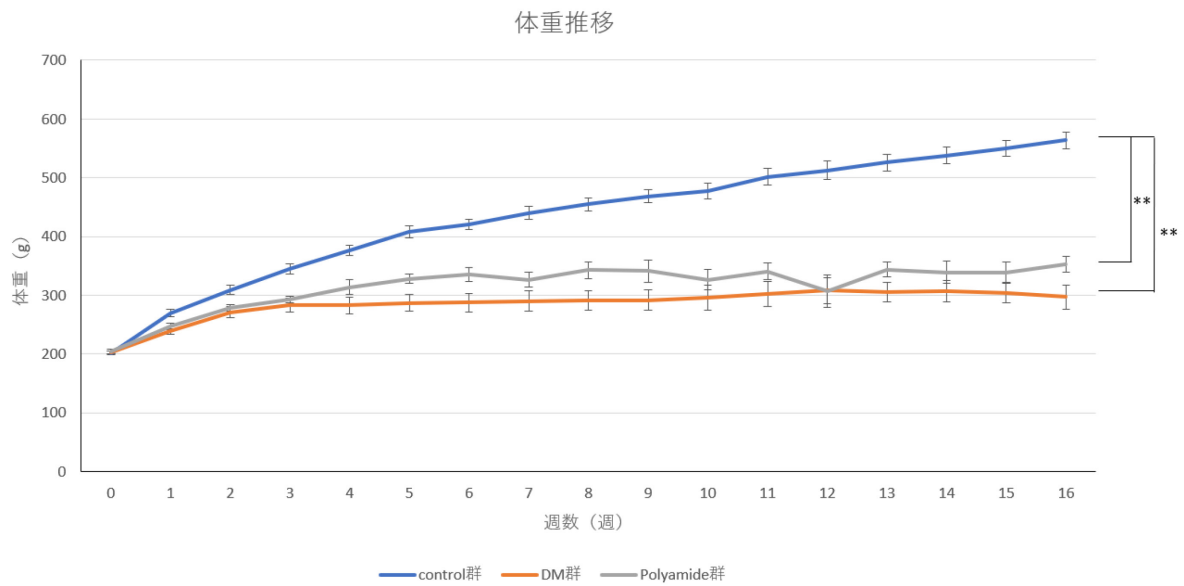


図 16. ラットの体重推移の比較

16 週間における各群ラットの体重推移を比較した。DM 群 (n=7)、Polyamide 群 (n=4) 共に control 群 (n=6) と比較して有意に体重は減少していた。DM 群と Polyamide 群では、Polyamide 群でやや体重減少が抑えられてはいるが有意な差は認めなかった。グラフは平均値±標準誤差で示している。(\*\*p<0.01)



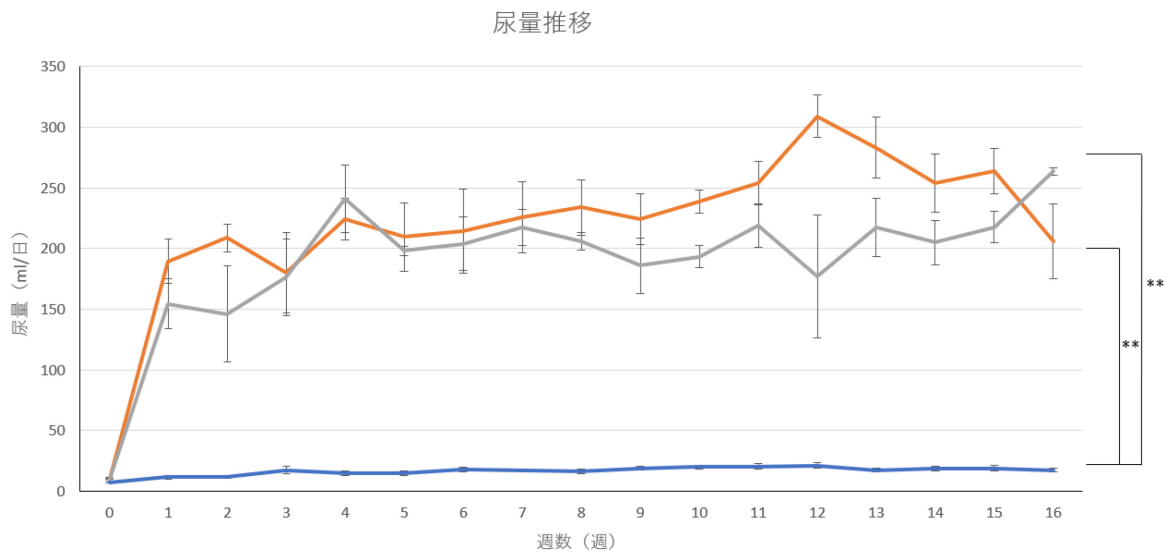


図 17. ラットの尿量推移の比較

16 週間における各群ラットの尿量推移を比較した。DM 群 (n=7)、Polyamide 群 (n=4) 共に control 群 (n=6) と比較して有意に尿量は増加していた。DM 群と Polyamide 群に差は認めなかった。グラフは平均値±標準誤差で示している。

(\*\*p<0.01)

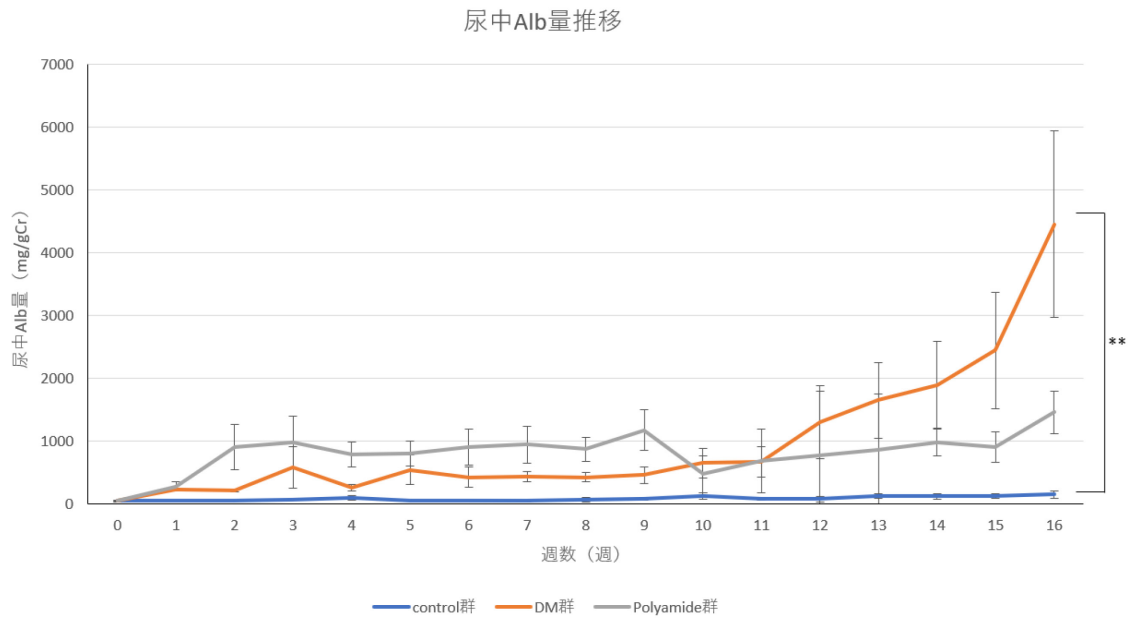


図 18. ラットの尿中アルブミン排泄量の比較

16 週間における各群ラットの尿中 Alb 量を比較した。DM 群 (n=7) において 12 週目以降から尿中 Alb は上昇傾向を認め、16 週目において control 群 (n=6) と比較して有意に尿中 Alb 量は増加していた。一方で Polyamide 群 (n=4) は DM 群と比較して低下傾向ではあるが有意差は認めなかった。グラフは平均値±標準誤差で示している。 (\*\*p<0.01)

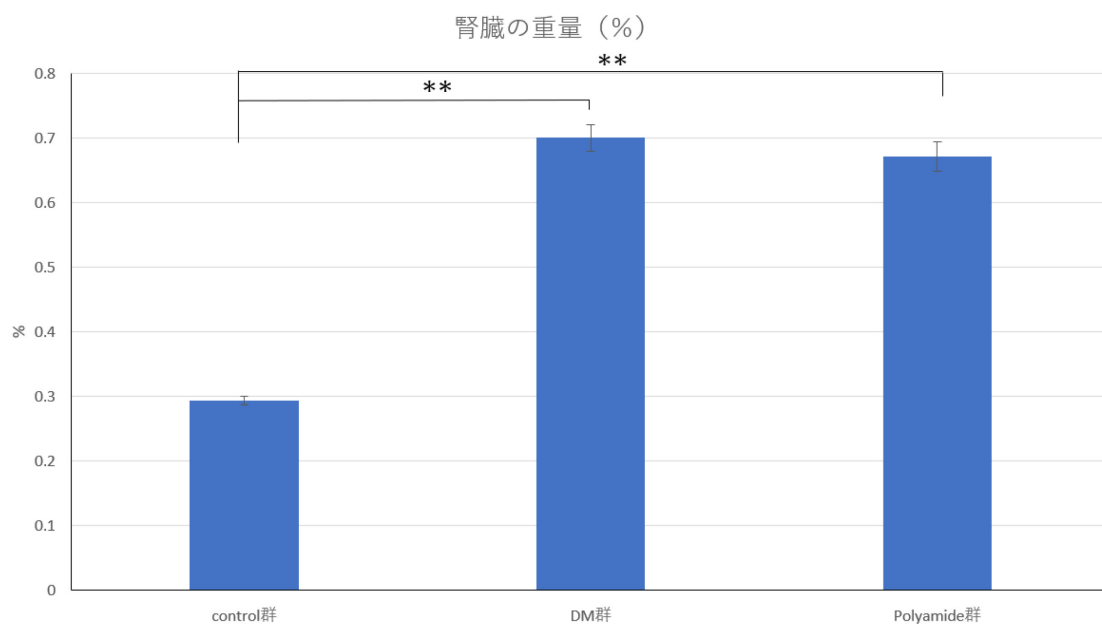


図 19. ラット腎臓重量の比較

16週解剖時の各群ラットの腎臓重量を比較した。DM群 (n=7)、Polyamide群 (n=4) 共に control群 (n=6) と比較して有意に腎重量は上昇していたが、DM群と Polyamide群に差は認めなかった。グラフは平均値±標準誤差で示している。

(\*\*p<0.01)

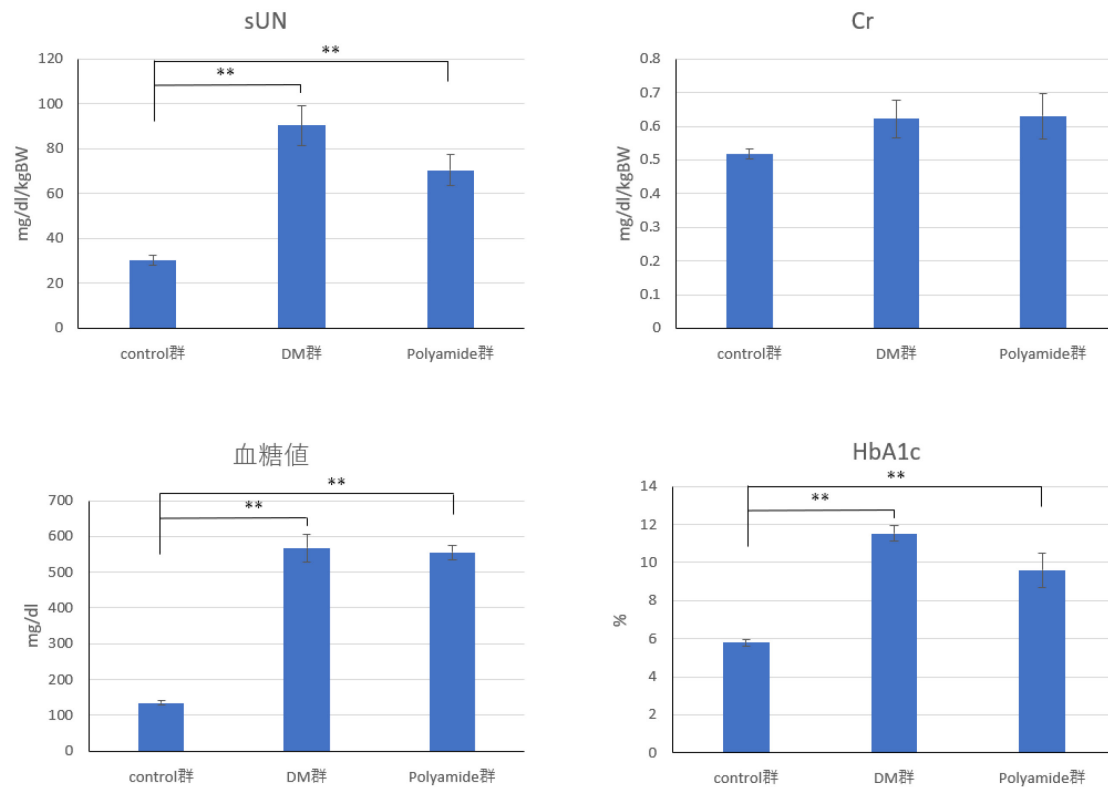


図 20. ラット血液検査データの比較

16週解剖時の血液検査データを比較した。sUN と HbA1c では、DM 群 (n=7)、Polyamide 群 (n=4) 共に control 群 (n=6) と比較して有意に上昇していたが、DM 群と比較して Polyamide 群は低下傾向ではあるが有意差は認めなかった。血糖値では、DM 群、Polyamide 群共に control 群と比較して有意に血糖値は上昇していたが、DM 群と比較して Polyamide 群は有意な低下はみられなかった。Cr では、DM 群、Polyamide 群共に control 群と比較して上昇傾向だったが有意差は認めなかった。グラフは平均値±標準誤差で示している。 (\*\*p<0.01)

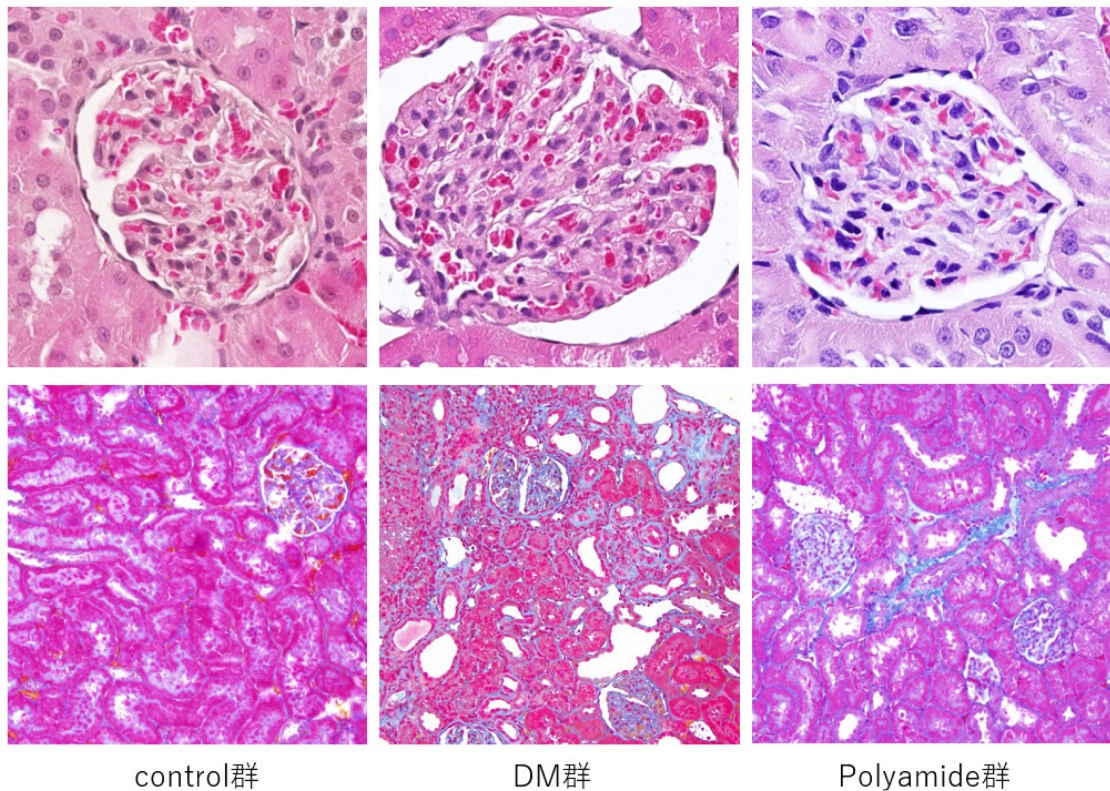


図 21. HE 染色・Masson Trichrome 染色による腎臓組織傷害の比較

上段は 400 倍の HE 染色画像で糸球体を、下段は 200 倍の Masson Trichrome 染色画像で尿細管間質を比較している。上段では、コントロール群と比較して DM 群においては、糸球体径が大きく糸球体が肥大しており、メサンギウム領域の拡大を認めるびまん性病変が多くみられた。ポリアミド群でも同様の所見は見られたが比較的軽度であった。下段では、コントロール群と比較して DM 群とポリアミド群では、尿細管間質の線維化や尿細管萎縮もみられた。ポリアミド群においては、DM 群と比較して糸球体膨化や間質線維化の程度が軽度であった。

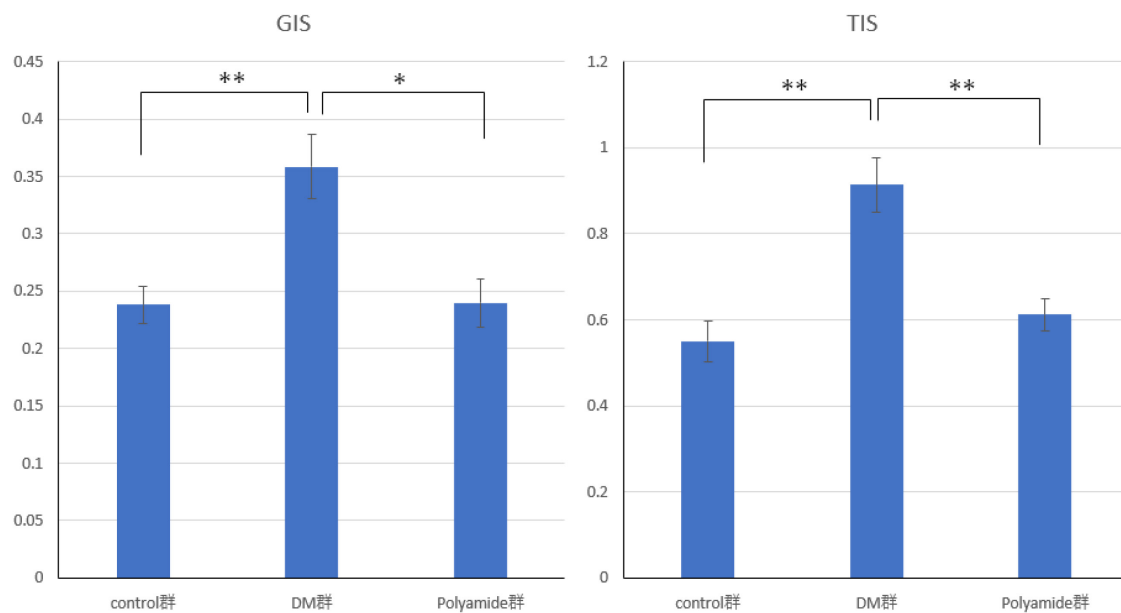


図 22. GIS（糸球体障害指数）と TIS（尿細管間質障害指数）の比較

16 週解剖時の腎組織において GIS・TIS を評価し比較した。コントロール群 (n=6) と比較して GIS、TIS 共に DM 群 (n=7) では障害指数が有意に上昇していた。また Polyamide 群 (n=4) では GIS、TIS 共に障害指数を有意に抑制していた。グラフは平均値±標準誤差で示している。(\*p<0.05, \*\*p<0.01)

GIS, Glomerular injury score; TIS, tubulointerstitial injury score.

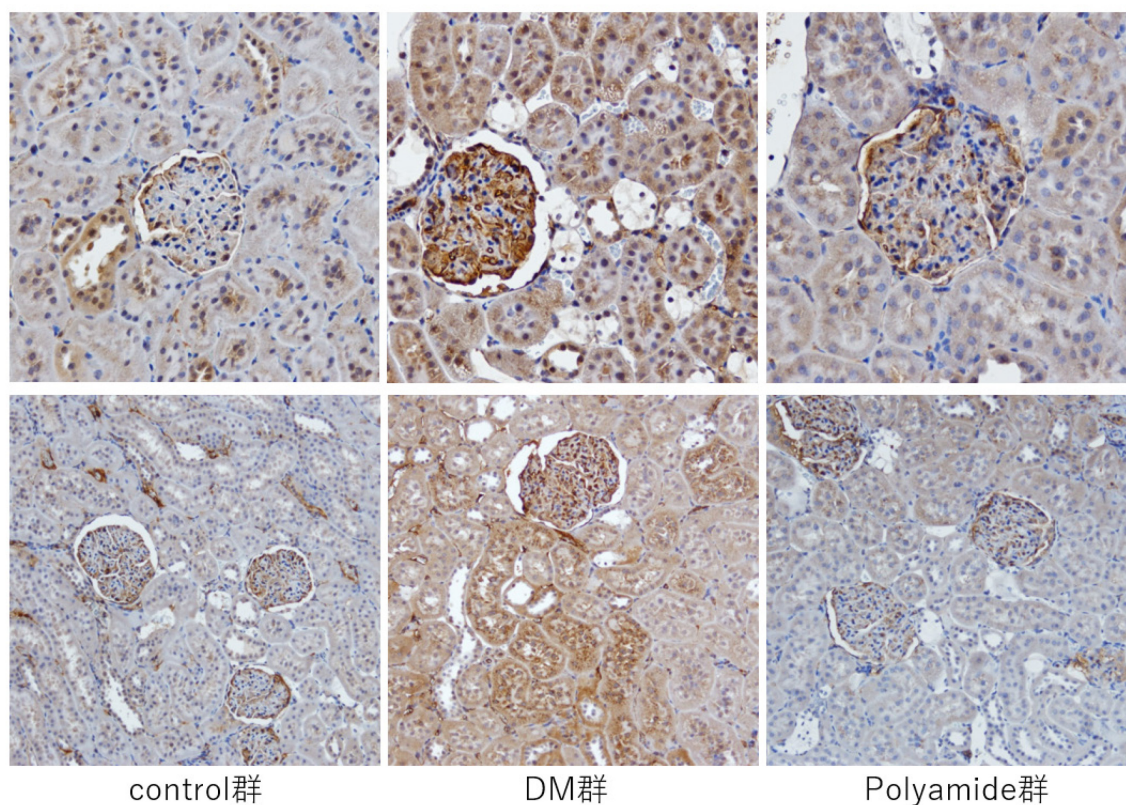


図 23. 免疫染色による腎臓組織における TGF-β1 の局在

上段は 200 倍、下段は 400 倍の TGF-β1 免疫染色画像である。コントロール群と比較して DM 群においては、TGF-β1 は糸球体領域と近位尿細管に局在しており発現亢進が認められた。一方、ポリアミド群では DM 群と比較して、糸球体領域と近位尿細管における TGF-β1 の局在はみられるものの、その程度は著明に低下していた。

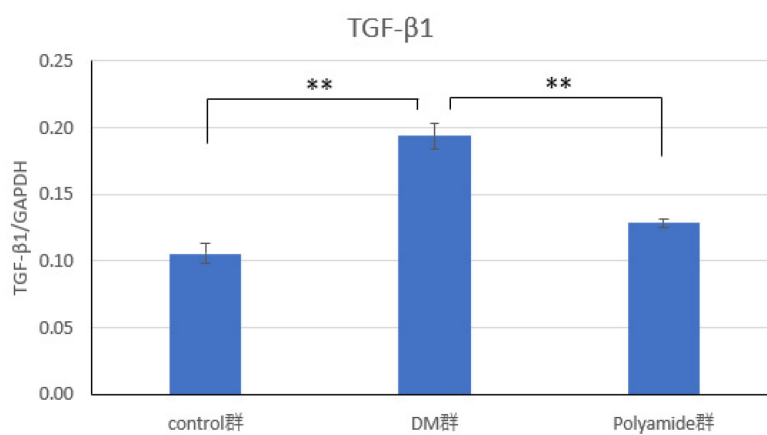
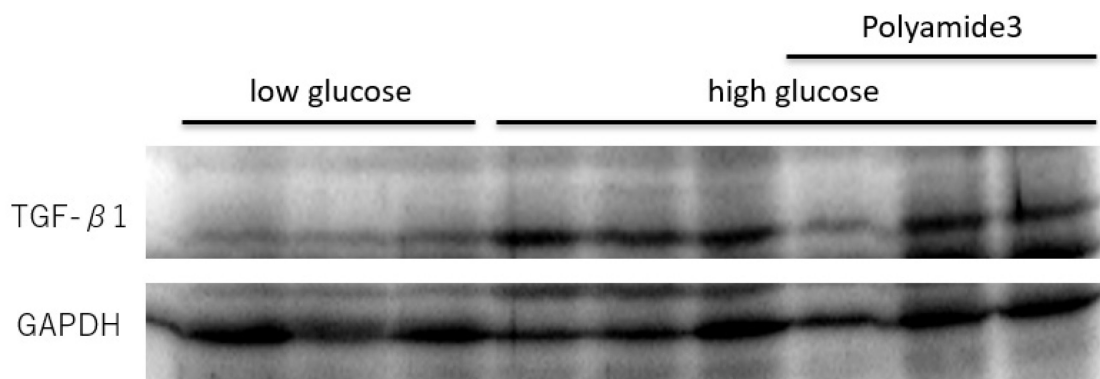


図 24. Western blot 法によるラット腎組織内 TGF-β1 蛋白発現の比較

16 週解剖時のラット腎組織において、Western blot 法により TGF-β1 蛋白発現の比較を行った。DM 群において TGF-β1 蛋白発現は有意に増加し、Polyamide 群では有意に抑制効果がみられた。グラフは平均値±標準誤差 (n=3) で示している。 (\*\*p<0.01)



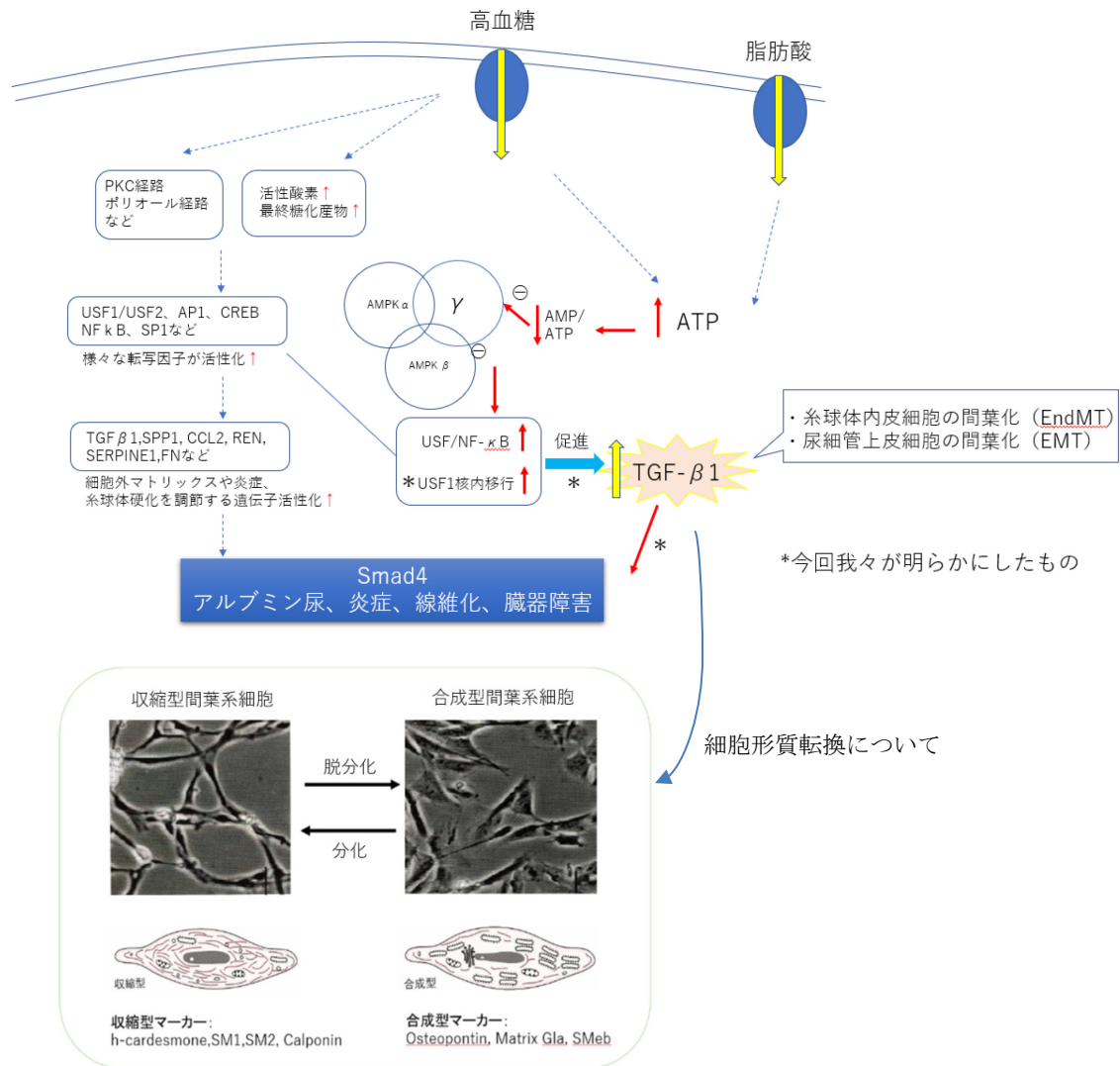


図 25. 糖尿病性腎症における USF1 と TGF-β1 の関係

## 【引用文献】

1. 2017年日本透析医学会報告書.
2. Gaede P, Vedel P, Larsen N, et al. Multifactorial intervention and cardiovascular disease in patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med*. 2003; 348: 383-393.
3. Lehmann R, Schleicher ED. Molecular mechanism of diabetic nephropathy. *Clin Chim Acta*. 2000; 297: 135-144.
4. 富野康日己. 糖尿病性腎症. 日腎会誌 2002; 44: 373-379.
5. Cohen MP, Ziyadeh FN, Hong SW, et al. Inhibiting albumin glycation in vivo ameliorates glomerular overexpression of TGF- $\beta$ 1. *Kidney Int*. 2002; 61: 2025-2032.
6. Chen S, Kasama Y, Lee JS, et al. Podocyte-derived vascular endothelial growth factor mediates the stimulation of  $\alpha$ 3 (IV) collagen production by transforming growth factor  $\beta$ 1 in mouse podocytes. *Diabetes*. 2004; 53: 2939-2949.
7. Cohen MP, Chen S, Ziyadeh FN, et al. Evidence linking glycated albumin to altered glomerular nephrin and VEGF expression, proteinuria, and diabetic nephropathy. *Kidney Int* 2005; 68: 1554-1561.
8. Diamond-Stanic MK, You YH, Sharma K. Sugar, sex, and TGF- $\beta$  in diabetic nephropathy. *Semin Nephrol*. 2012; 32: 261-268.
9. Wolf G, Chen S, Ziyadeh FN. From the periphery of the glomerular capillary wall toward the center of disease: podocyte injury comes of age in diabetic nephropathy. *Diabetes*. 2005; 54: 1626-1634.
10. Siddiqi FS, Advani A. Endothelial-Podocyte Crosstalk: The Missing Link Between Endothelial Dysfunction and Albuminuria in Diabetes. *Diabetes*, 2013; 62: 3647-3655.

11. Sanchez AP and Sharma K. Transcription factors in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Expert Rev Mol Med*. 2009; 11: e13.
12. Sharma K. Obesity, oxidative stress, and fibrosis in chronic kidney disease. *Int Soc Nephrol* 2014; 4: 113-117.
13. Sanchez AP, Zhao JH, You Y, et al. Role of the USF1 transcription factor in diabetic kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2011; 301: F271-F279.
14. Dervan PB. Molecular recognition of DNA by small molecules. *Bioorg Med Chem*. 2001; 9: 2215-2235.
15. Trauger JW, Baird EE, Dervan PB. Recognition of DNA by designed ligands at subnanomolar concentrations. *Nature*. 1996; 382: 559-561.
16. White S, Baird EE, Dervan PB. On the pairing rules for recognition in the minor groove of DNA by pyrrole-imidazole polyamides. *Chem Biol*. 1997; 4: 569-578.
17. Matsuda H, Fukuda N, Ueno T, et al. Development of gene silencing pyrrole-imidazole polyamide targeted to the TGF- $\beta$ 1 promoter for treatment of progressive renal diseases. *J Am Soc Nephrol*. 2006; 17: 422-432.
18. Matsuda H, Fukuda N, Ueno T, et al. Transcriptional regulation of progressive renal disease by the gene silencing pyrrole-imidazole polyamide targeted to the TGF- $\beta$ 1 promoter. *Kidney International*. 2011; 79: 46-56.
19. Yao E-H, Fukuda N, Ueno T, et al. A novel gene silencer pyrrole-imidazole polyamide targeting TGF- $\beta$ 1 inhibited restenosis and preserved endothelialization in the injured artery. *Cardiovasc Res*. 2009; 81: 797-804.
20. Serie K, Fukuda N, Nakai S, et al. Pyrrole-imidazole polyamide targeting transforming-growth factor  $\beta$ 1 ameliorates encapsulating peritoneal sclerosis. *Perit Dial Int*. 2012; 32: 462-472.

21. Chen M, Matsuda H, Wang L, et al. Pre-transcriptional regulation of TGF- $\beta$ 1 by PI polyamide prevents scarring and accelerates wound healing of the cornea after exposure to alkali. *Mol Ther.* 2010; 18: 519-527.
22. Washio H, Fukuda N, Matsuda H, et al. Transcriptional inhibition of hypertrophic scars by a gene silencer, pyrrole-imidazole polyamide, targeting the TGF- $\beta$ 1 promoter. *J Invest Dermatol.* 2011; 31: 1987-1995.
23. Otsuki M, Fukuda N, Inoue T, et al. Preclinical study of DNA-recognized peptide compound pyrrole-imidazole polyamide targeting human TGF- $\beta$ 1 promoter for progressive renal diseases in the common marmoset. *Molecule* 2019; 24: 3178.
24. Matsuda H, Fukuda N, Ueno T, et al. Transcriptional regulation of progressive renal disease by the gene silencing pyrrole-imidazole polyamide targeted to the TGF- $\beta$ 1 promoter. *Kidney Int* 2011; 79: 46-56.
25. Makino H, Tanaka I, Mukoyama M, et al. Prevention of Diabetic Nephropathy in Rats by Prostaglandin E Receptor EP1-Selective Antagonist. *J Am Soc Nephrol.* 2002; 13: 1757-1765.
26. Sabbatini M, Vitaioli L, Baldoni E, et al. Nephroprotective effect of treatment with calcium channel blockers in spontaneously hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 2000; 294: 948-954.
27. Chen S, Jim B, Ziyadeh FN. Diabetic nephropathy and transforming growth factor- $\beta$ : transforming our view of glomerulosclerosis and fibrosis build-up. *Semin Nephrol.* 2003; 23: 532-543.
28. Srivastava SP, Koya D, and Kanasaki K. MicroRNAs in Kidney Fibrosis and Diabetic Nephropathy: Roles on EMT and EndMT. *BioMed Res Int.* 2013, Article ID 125469, 10 pages.

29. Siddiqi FS and Advani A. Endothelial-Podocyte Crosstalk: The Missing Link Between Endothelial Dysfunction and Albuminuria in Diabetes. *Diabetes*. 2013; 62: 36-47.
30. Matsuda H, Fukuda N, Ueno T, et al. Transcriptional inhibition of progressive renal disease by gene silencing pyrrole-imidazole targeting of the transforming growth factor- $\beta$ 1 promoter. *Kidney Int*. 2011; 79: 46-56.

研究業績

岡村 真喜誉

I 発表	①一般発表	13 (共 6)
	②特別発表	なし
II 論文	①原著論文	2 (共 2)
	②症例報告	1 (共 1)
	③総説	1
III 著書		0

以上

# I 発表

## ① 一般発表

1. 宇都宮慧、及川治、堀越周、馬場晴志郎、鈴木紘子、小林洋輝、大月伯恭、林田迪子、小熊秀隆、中村吉宏、鈴木敏子、岡村真喜誉、阿部雅紀、岡田一義：両腎摘出後に内シャント感染から感染性心内膜炎を併発した HD 患者の 1 剖検例：第 61 回日本透析医学会学術集会・総会、大阪、2016 年 6 月
2. 岡村真喜誉：難治性頻回再発型ネフローゼ症候群におけるリツキシマブ投与による治療：第 203 回東京内科医会、2016 年 7 月
3. Masahiro Okamura, Takahiro Ueno, Akiko Tsunemi, Makiyo Okamura, Sho Tanaka, Eriko Negishi, Yusuke Murata, Takashi Maruyama, Kazuyoshi Okada, Morito Endo, Noboru Fukuda, Masayoshi Soma, Masanori Abe: Increased renal AcylCoA Oxidase2 (ACOX2) expression in SHR/Izm.: The 17th International SHR Symposium & The 52nd Annual Meeting of the Society for Hypertension Related Disease Model Research, Tokyo, 2016. 9.
4. 岡村真喜誉、馬場晴志郎、丸山高史、及川治、樋口輝美、岡田一義、阿部雅紀：維持透析患者の腎性貧血に対するレボカルニチン注射の有用性の検討：第 62 回日本透析医学会学術集会・総会、横浜、2017 年 6 月

5. 及川治、大月伯恭、森内正理、大野迪子、鈴木敏子、岡村真喜誉、岡村雅広、岡田一義、阿部雅紀、富田兵衛：オンライン HDF 患者における血中 FGF23 濃度の較差比較：第 62 回日本透析医学会学術集会・総会、横浜、2017 年 6 月
  
6. Seishiro Baba, Michiko Ohno, Makiyo Okamura, Toshiko Suzuki, Kei Utsunomiya, Hiroyuki Takashima, Kazusoshi Okada, Masanori Abe.: Levocarnitine Decreases the Need for Erythropoiesis Stimulating Agents and Erythropoiesis Resistance Index in Patients Undergoing Hemodialysis.: World Congress of Nephrology, Mexico City. 2017.4.
  
7. 岡村真喜誉、福田昇、堀越周、常見明子、深澤みゆき、阿部雅紀：TGF- $\beta$ 1 発現を抑制する USF1 に対する PI ポリアミドの効果の検討：第 61 回日本腎臓学会学術総会、新潟、2018 年 6 月
  
8. 馬場晴志郎、福田昇、常見明子、岡村真喜誉、大野迪子、阿部雅紀：多発性嚢胞腎への新規バイオ医薬としての GSK3 $\beta$  に対する PI ポリアミドの開発：第 61 回日本腎臓学会学術総会、新潟、2018 年 6 月
  
9. 岡村真喜誉、福田昇、堀越周、常見明子、深澤みゆき、阿部雅紀：TGF- $\beta$ 1 発現を抑制する USF1 に対するペプチド化合物 PI ポリアミドの作用の検討：第 41 回日本高血圧学会総会、旭川、2018 年 9 月



10. 岡村真喜蒼、福田昇、堀越周、常見明子、深澤みゆき、阿部雅紀：高糖条件下で TGF- $\beta$ 1 発現を増加する転写因子 USF1 に対する PI ポリアミドの開発  
発：第 30 回日本糖尿病性腎症研究会、東京、2018 年 12 月
11. 岡村真喜蒼、福田昇、堀越周、常見明子、深澤みゆき、阿部雅紀：糖尿病性腎症に対する新規バイオ医薬 USF1 PI ポリアミドの開発：第 62 回日本腎臓学会学術総会、名古屋、2019 年 6 月
12. 馬場晴志郎、福田昇、常見明子、岡村真喜蒼、大野迪子、阿部雅紀：多発性嚢胞腎への新規バイオ医薬としての GSK3 $\beta$  に対する PI ポリアミドの開発  
発：第 62 回日本腎臓学会学術総会、名古屋、2019 年 6 月
13. 岡村真喜蒼、福田昇、堀越周、常見明子、深澤みゆき、阿部雅紀：糖尿病性腎症に対する新規バイオ医薬 USF1 PI ポリアミドの開発：第 42 回日本高血圧学会総会、東京、2019 年 10 月

## ② 特別発表

なし

## II 論文

### ① 原著論文

1. 及川治、阿部雅紀、石黒真喜蒼、宇都宮慧、和田敏子、大月伯恭、小澤康

太、岡田一義、富田兵衛、久野勉：維持透析患者における深夜長時間オンライン HDF の効果、腎と透析（0385-2156）81 巻別冊 HDF 療法 '16 Page136-138(2016.09)

2. Tomoyasu Otsuki, Kei Utsunomiya, Masari, Moriuchi, Shu Horikoshi, Masahiro Okamura, Hiroko Suzuki, Makiyo Okamura, Noriaki Maruyama, Nami Shibahara, Masanori Abe. Effect of sucroferric oxyhydroxide on fibroblast growth factor 23 levels in hemodialysis patients, Nephron. 2018;140(3):161-168.

## ② 症例報告

宮里紘太、田中裕也、岡村真喜登、中村吉宏、鄭立晃、高島弘至、奈倉千苗美、阿部雅紀：腹膜透析カテーテル挿入術後早期に透析液の皮下リークを認めた一例：腹膜透析 2019

## ③ 総説

岡村真喜登、阿部雅紀：【透析医療と合併症 キュア&ケアガイドブック】糖尿病（CQ46）血糖コントロールが困難な糖尿病透析患者への対応・対策はどのように行いますか？：臨床透析 34 巻 7 号 872-876、2018 年 8 月

## III 著書

なし