

糖尿病性腎症へのヒト USF1 阻害
ピロール・イミダゾール(PI)ポリアミドの開発
(要約)

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

秋谷 友里恵

修了年 2023 年

指導教員 阿部 雅紀

【緒言】

糖尿病性腎症

日本透析医学会の全国調査では 2020 年時点で約 35 万人の患者が慢性透析療法を受けており、毎年約 4 万人が末期腎不全に対して新規に透析療法導入となっている。透析患者の原疾患は糖尿病性腎症が約 40%と最多¹であり、糖尿病性腎症への根治的治療法の開発は喫緊の課題である。

糖尿病性腎症への進展にサイトカインである TGF- β 1 が中心的役割を担っている。TGF- β 1 は高グルコースにより誘導され、細胞外マトリックスを増生し糸球体硬化を起こし^{2,3}、また上皮間葉化現象 epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) により腎線維化を引き起こす⁴。そして転写因子 Upstream Transcription Factor1 (USF1) が TGF- β 1 の発現制御調節を行っている事が分かっており、USF1 は TGF- β 1 のプロモーター領域の E-box (CACGTG)または E-box モチーフ (CANNTG) に結合し、TGF- β 1 発現を亢進させる⁵。さらに USF1 は TGF- β 1 プロモーターと同時に osteopontin プロモーターに結合し発現を刺激することで、メサンギウム細胞を収縮型から合成型に形質変換し、メサンギウム細胞の増殖を伴う糸球体肥大を引き起こす^{6,7}。

中分子ペプチド化合物ピロール・イミダゾール(PI)ポリアミド

PIポリアミドは、ペプチド化合物でDNA配列に特異的に結合する minor groove binder である。PIポリアミドを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ことができる新規遺伝子制御薬である。PIポリアミドの特徴として、特別な Drug delivery system を必要としないこと、核酸分解酵素やタンパク質分解酵素の影響を受けず生体内で安定して存在することが挙げられる⁸。多様な遺伝子に対して自由に設計することができるため、様々な疾患の新規の治療薬として期待される分子である。

糖尿病性腎症に対しては、転写因子 USF1 が高糖条件で TGF- β 1 を上昇させ、ストレプトゾトシン誘発糖尿病性腎症ラットにおける、TGF- β 1 遺伝子発現亢進転写因子 USF1 を阻害する PIポリアミドの全身投与により、TGF- β 1 発現の抑制、尿中アルブミン排泄量の低下、腎組織障害の抑制効果が報告されている⁹。

【研究目的】

ヒトの糖尿病性腎症の新規治療薬として、転写因子 USF1 がヒトの TGF- β 1 遺伝子へ結合することを阻害する PI ポリアミドを創薬開発することを目的とした。

【対象と方法】

1. ヒトUSF1阻害PIポリアミドの分子設計、合成
ヒトTGF- β 1プロモーター構造においてUSF1結合E-box配列をDNA配列解析ソフトPROMOにより解析し、PIポリアミドがE-box配列とヒトTGF- β 1プロモーターに覆うように分子設計、合成する。
2. PIポリアミドのゲルシフトアッセイ
設計したPIポリアミドとターゲット2本鎖DNAとの結合をゲルシフトアッセイにて確認する。
3. ヒトメサギウム細胞 (HRMC) でのPIポリアミドの効果の検討
HRMCを培養し、25 mM glucoseで高糖刺激を行い、リアルタイムPCRでTGF- β 1 mRNA発現を評価する。PIポリアミド1、2、3、4を投与しTGF- β 1 mRNA発現、またWestern blot法でTGF- β 1蛋白発現量を評価し、USF1結合阻害PIポリアミドによるTGF- β 1発現抑制効果の強さからリード化合物を選定する。
4. PIポリアミドリード化合物について、高糖条件でのosteopontin発現への抑制効果を評価する。
5. リコンビナントヒトUSF1蛋白とPIポリアミドのDNA結合アッセイ
選定した PI ポリアミドについて、オリゴ DNA とリコンビナントヒトUSF1 蛋白による DNA 結合アッセイを行う。
6. ヒト腎臓近位尿細管細胞(RPTEC)でのEMTに対するPIポリアミドの効果の検討
RPTECを培養し、高糖刺激時間、高糖条件濃度の違いによるTGF- β 1 mRNA発現を評価し、高糖刺激の条件を決定する。上記で決定した条件でRPTECを高糖刺激し、3.で選定したPIポリアミドを添加した際のTGF- β 1、EMT現象のマーカー (α SMA、vimentin、E-cadherin) の抑制効果についてリアルタイムPCR、Western blot法、免疫蛍光染色で評価する。またEMTに

特徴的な細胞形質転換を評価しPIポリアミドによるEMT抑制効果を検討する。

6. 統計解析

EZR (Saitama Medical Center, Jichi Medical University, Saitama, Japan¹⁰)を用い統計学的解析を行った。Low Glucose 群と High Glucose 群の二群間比較は Student's t-test、その他の多群間比較では Turkey 法、Dunnett 法で行い、 $p < 0.05$ を統計学的有意差ありと判定した。

【結果】

ゲルシフトアッセイにてポリアミド 1、2、3、4 いずれもターゲット 2 本鎖 DNA への結合が確認された。HRMC を高糖刺激 (25 mM) することで、有意に TGF- β 1 mRNA 発現が上昇し、PI ポリアミド 1、2 添加により有意に TGF- β 1 mRNA 発現は抑制された。以上より、PI ポリアミド 1、2 をリード化合物として選定した。Osteopontin mRNA については PI ポリアミド 1 で有意に発現抑制効果を認め、また高糖刺激で上昇した TGF- β 1 蛋白発現についても PI ポリアミド 1 添加により有意に抑制された。

RPTEC での高糖刺激は糖濃度 33 mM、刺激時間 36 時間で行うこととし、EMT 現象について検証した。RPTEC は高糖刺激により TGF- β 1 の発現が上昇し、それに伴い EMT のマーカーである α SMA 発現が有意に上昇し、E-cadherin 発現低下が認められた。また免疫蛍光染色で高糖刺激した RPTEC において、非刺激群と比較し細胞形態が敷石状から紡錘状へと変化、vimentin 染色性の増強が確認された。PI ポリアミド 1 添加により TGF- β 1、 α SMA 発現が有意に抑制され、また E-cadherin の蛋白発現低下が有意に抑制された。PI ポリアミド 2 の添加で、TGF- β 1、 α SMA の発現が有意に抑制され、有意差はなかったが E-cadherin 蛋白発現低下の抑制傾向が認められた。細胞骨格については PI ポリアミド 1、2 添加により EMT 現象に特徴的な敷石状から紡錘状への細胞形態変化が抑制された。Vimentin の免疫蛍光染色では PI ポリアミド 1、2 添加により、vimentin の染色性の低下が認められた。

【考察】

PI ポリアミド 1、2 で HRMC における TGF- β 1 発現の抑制効果、さらに PI ポリアミド 1 では osteopontin 抑制効果も認められた。E-box モチーフが osteopontin にも存在するため、USF1 は osteopontin プロモーター領域にも結合したと考えられ、PI ポリアミド 1 は、USF1 の TGF- β 1、osteopontin との結合を阻害し、TGF- β 1 の発現抑制、かつメサンギウム細胞における合成型への形質転換の抑制効果があることが示唆された。

次に腎線維化に関与しているとされ、TGF- β 1 等のサイトカインによって誘導される EMT 現象に対する PI ポリアミドの効果について RPTEC を使用し検証した。PI ポリアミド 1、2 により α SMA、vimentin 発現は抑制され、E-cadherin 発現低下の抑制傾向、高糖刺激による細胞骨格変化の抑制効果が認められ、PI ポリアミド 1、2 は RPTEC における EMT 現象抑制効果があることが示唆された。よって糖尿病性腎症において発現亢進した TGF- β 1 を介した、尿細管上皮の間葉化による腎間質の線維化を抑制することができると考えられた。以上より PI ポリアミド 1、2 は将来、糖尿病性腎症治療薬となる可能性があるが、他の臓器への影響や副作用等を判定するには今回の実験の限界である。また今後、さらなるリード化合物の選定、有効血中濃度の検証、TGF- β 1 プロモーター領域に結合するように精製された PI ポリアミドであるが、同様のモチーフを有した遺伝子の存在の有無についても検索していく必要がある。そしてヒトのゲノムに相同性の高い、霊長類マーモセット等での糖尿病腎症に対する USF1 の結合阻害 PI ポリアミドの効果の前臨床試験とし創薬開発に繋げていきたい。

【まとめ】

本研究において、高糖刺激によるヒトメサンギウム細胞からの TGF- β 1 の発現増加、ヒト近位尿細管細胞での EMT 現象に対し、PI ポリアミド 1、2 の投与は抑制効果を示した。USF1 の結合を阻害する中分子ペプチド化合物 PI ポリアミドは将来、糖尿病性腎症治療薬となる可能性が考えられた。

【参考文献】

1. わが国の慢性透析療法の現況（2020年12月31日現在）．日本透析医学会．
2. Lee, H. S. , Song, C. Y. Differential role of mesangial cells and podocytes in TGF-beta-induced mesangial matrix synthesis in chronic glomerular disease. *Histol. Histopathol.* 24, 901–908 (2009).
3. Lee, H. S. Pathogenic role of TGF- β in the progression of podocyte diseases. *Histol. Histopathol.* 26, 107–116 (2011).
4. Loeffler, I. , Wolf, G. Transforming growth factor- β and the progression of renal disease. *Nephrol. Dial. Transplant.* 29, i37–i45 (2014).
5. Sharma, K. Obesity, oxidative stress, and fibrosis in chronic kidney disease. *Kidney Int. Suppl.* 4, 113–117 (2014).
6. Wan, J.-X., Fukuda, N. ,Endo, Morito., et al. Complement 3 is Involved in Changing the Phenotype of Human Glomerular Mesangial Cells. *J. Cell. Physiol.* 213, 495–501 (2007).
7. Lorenzen, J., Shah, R.,Biser, Alisha., et al. The Role of Osteopontin in the Development of Albuminuria. *J Am Soc Nephrol.* 19, 884–890 (2008).
8. Dervan, P. B. Molecular recognition of DNA by small molecules. *Bioorg. Med. Chem.* 9, 2215–2235 (2001).
9. Okamura, M., Fukuda, N. ,Horikoshi, S., et al. Transcriptional suppression of diabetic nephropathy with novel gene silencer pyrrole-imidazole polyamides preventing usf1 binding to the tgf- β 1 promoter. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 4741(2021).
10. Kanda, Y. Investigation of the freely available easy-to-use software &EZR’ for medical statistics. *Bone Marrow Transplant.* 48, 452–458 (2013).