

氏名	すずき すずむ 鈴木 歩
学位の種類	博士 (保健学)
学位授与年月日	2022年3月25日
学位授与の条件	学位規則第4条第1項
研究科専攻	東北大学大学院医学系研究科 (博士後期3年の課程) 保健学専攻
学位論文題目	転写因子 ChREBP 活性阻害による糖尿病性腎症に対する新規治療薬の開発
論文審査委員	主査 教授 菅原 明 教授 正宗 淳 教授 片桐 秀樹

## 論文内容要旨

学籍番号 : B9MD4003

氏名 : 鈴木 歩

本文 :

糖尿病性腎症 **diabetic nephropathy (DN)** は本邦における腎不全および透析の主要な原因疾患として知られている。現在、DN に対する治療には原因疾患である糖尿病に対する血糖降下薬の他にも降圧薬であるアンジオテンシン変換酵素阻害薬・アンジオテンシン II 受容体拮抗薬や脂質降下薬が用いられているが、DN に対する既存薬の満足度・貢献度はいずれも低く、本症に対する有効な治療法の確立は喫緊の課題とされている。

本研究では、DN に対する新規治療薬開発の標的分子としてグルコース応答性転写因子である **carbohydrate response element binding protein (ChREBP)** に着目した。ChREBP はグルコース代謝産物によって活性化されて核内移行し、解糖系や脂質合成系の酵素を標的遺伝子として発現誘導する。主な発現臓器は肝臓、脂肪、膵臓、腎臓であり、肝臓や脂肪において余剰に摂取された炭水化物を脂質として蓄える役割がよく知られている。一方で、腎臓における ChREBP の生理的機能に関する研究は少ないのが現状である。

最近の私の研究から、腎臓での ChREBP は尿細管で優位に発現し、次いで糸球体にて発現が認められることが判明している。また近年、糖尿病の高血糖状態における腎臓での ChREBP の活性化が DN の発症・増悪に関与する可能性を示唆する研究がいくつか報告されていることから ChREBP の転写活性を標的とした新規 DN 治療薬の開発を着想した。

本研究ではまず、全身性の ChREBP knockout (KO) マウスを作製し、streptozotocin (STZ) 投与および食事負荷による DN 発症モデルを用いた検討を行った。その結果、STZ を投与した ChREBP KO マウスでは対照野生型マウスに比して尿タンパク排泄量や血中クレアチニン値が有意に低値を示したことから、ChREBP の転写活性が DN 治療薬の創薬標的として妥当であることを確認した。

そこで私は、マウスメサングウム細胞由来 SV40 MES13 細胞を用いて 25 mM グルコース刺激による ChREBP の転写活性を検出するアッセイ系を確立し、東北大学化合物ライブラリーから ChREBP 転写活性を特異的に抑制する化合物の high-throughput screening (HTS) を行った結果、新規化合物 1, 3-ジオキソラン誘導体 (D-532) の取得に成功した。

培養細胞を用いた D-532 結合タンパク質探索の結果、D-532 は ChREBP の DNA 結合部位である basic helix - loop - helix/leucine zipper (bHLH/ZIP) ドメインを結合標的とすることで、グルコー

(書式12)

ス依存的な ChREBP の標的遺伝子プロモーターへの結合を阻害する可能性が明らかとなった。

さらに、1 型糖尿病モデルマウスと 2 型糖尿病発症マウスへの投与実験の結果、D-532 はいずれのモデルマウスにおいても経口投与により尿タンパク増加や血中クレアチニン値増加を有意に抑制したことから、本化合物が DN に対して有効である可能性が示唆された。RNA-Sequence による D-532 の DN に対する作用機序解析の結果、D-532 はマウス腎臓において ChREBP 活性阻害による酸化ストレスを介したアポトーシス経路を抑制していることが確認された。加えて、D-532 による酸化ストレスの抑制はヒト腎近位尿細管由来初代培養細胞 RPTEC においても同様に確認され、ヒト細胞への有効性も期待される結果となった。

以上から高血糖に伴う ChREBP 活性化は DN 治療において有効な創薬標的であると考えられ、ChREBP 活性阻害能を有する新規化合物 D-532 は将来的な DN に対する新規治療薬たり得るものと期待される。一方で、本研究では D-532 の進行後の DN に対する有効性や腎臓以外の臓器への影響の検討が不十分であることから、今後さらなる検討を進めていく予定である。

## 審査結果の要旨

博士論文題目 転写因子 ChREBP 活性阻害による糖尿病性腎症に対する新規治療薬の開発

所属専攻・分野名 保健学専攻・分子内分泌学分野

学籍番号 B9MD4003 氏名 鈴木 歩

糖尿病性腎症 diabetic nephropathy (DN) は本邦における腎不全および透析の主要な原因疾患として知られている。本研究では、DN に対する新規治療薬開発の標的分子としてグルコース応答性転写因子である carbohydrate response element binding protein (ChREBP) に着目した。ChREBP はグルコース代謝産物によって活性化されて核内移行し、解糖系や脂質合成系の酵素を標的遺伝子として発現誘導する。近年、糖尿病の高血糖状態における腎臓での ChREBP の活性化が DN の発症・増悪に関与する可能性を示唆する研究がいくつか報告されていることから ChREBP の転写活性を標的とした新規 DN 治療薬の開発を着想した。本研究ではまず、全身性の ChREBP knockout (KO) マウスを作製し、streptozotocin (STZ) 投与および食事負荷による DN 発症モデルを用いた検討を行った。その結果、ChREBP KO マウスでは対照野生型マウスに比して尿タンパク増加や血中クレアチニン値増加が有意に抑制されたことから、ChREBP の転写活性が DN 治療薬の創薬標的として妥当であることを確認した。そこで、マウスメサンギウム細胞由来 SV40 MES13 細胞を用いて 25 mM グルコース刺激による ChREBP の転写活性を検出するアッセイ系を確立し、東北大学化合物ライブラリーから ChREBP 転写活性を特異的に抑制する化合物の high-throughput screening (HTS) を行った結果、新規化合物 1, 3-ジオキサラン誘導体 (D-532) の取得に成功した。培養細胞を用いた D-532 結合タンパク質探索の結果、D-532 は ChREBP の DNA 結合部位である basic helix-loop-helix/leucine zipper (bHLH/ZIP) ドメインを結合標的とすることで、グルコース依存的な ChREBP の標的遺伝子プロモーターへの結合を阻害する可能性が明らかとなった。さらに、1 型糖尿病モデルマウスと 2 型糖尿病発症マウスへの投与実験の結果、D-532 はいずれのモデルマウスにおいても経口投与により尿タンパク増加や血中クレアチニン値増加を有意に抑制したことから、本化合物が DN に対して有効である可能性が示唆された。RNA-Sequence による D-532 の DN に対する作用機序解析の結果、D-532 はマウス腎臓において ChREBP 活性阻害による酸化ストレスを介したアポトーシス経路を抑制していることが確認された。加えて、D-532 による酸化ストレスの抑制はヒト腎近位尿細管由来初代培養細胞 RPTEC においても同様に確認され、ヒト細胞への有効性も期待される結果となった。以上から高血糖に伴う ChREBP 活性化は DN 治療において有効な創薬標的であると考えられ、ChREBP 活性阻害能を有する新規化合物 D-532 は将来的な DN に対する新規治療薬たり得るものと期待された。よって、本論文は博士（保健学）の学位論文として合格と認める。