

遺伝性腎疾患 Alport 症候群の新規治療法の確立に向けた薬理学的研究 - Metformin 及び新規 Nrf2 活性化薬の薬理と糸球体 single cell RNA-seq 解析 -

熊本大学大学院薬学教育部 創薬・生命薬科学専攻
HIGO プログラム専門コース 遺伝子機能応用学分野 加世田 将大

Alport 症候群は、腎糸球体基底膜を構成する IV 型コラーゲン遺伝子の変異により発症する難治性の糸球体硬化症である。本疾患は小児で 2 番目に多い遺伝性の腎疾患であり、重症例では 10 代後半から 20 代にかけて末期腎不全への移行を余儀なくされることから、若年透析導入の主因となっている。現在の治療法である Renin-Angiotensin-System (RAS) 阻害薬の早期治療介入により、予後は改善するものの、その治療効果は不十分であり、最終的に患者の半数以上は末期腎不全への移行を余儀なくされる。従って、現行の RAS 阻害薬に代わる、あるいは併用により相加効果をもたらす新規治療法の開発が急務である。そこで、本研究では Alport 症候群に対する新規治療法の確立を究極の目標に(1, 2) Alport 症候群モデルマウス (Col4a5-G5X) に対する新規治療候補薬の有効性評価試験と(3) 糸球体シングルセル解析による Alport 症候群の病態形成機構に基づく新規治療標的の探索を実施した。

(1) Alport 症候群モデルマウス, Adriamycin 腎症モデルマウスに対する抗糖尿病薬 metformin の効果

Metformin は 50 年以上にわたり臨床使用される 2 型糖尿病の治療薬であり、ミトコンドリアの呼吸鎖複合体 I を阻害することで、代謝の制御因子である AMPK の活性化を誘導する。興味深いことに、metformin は片側尿管閉塞やシスプラチン腎症、虚血再灌流障害等の非糖尿病性の急性腎疾患モデルに対して保護効果を発揮すること報告されているが、非糖尿病性の慢性腎臓病 (CKD)、特に糸球体障害モデルに対しても同様に効果を発揮するかは不明であった。このような背景の中、本研究室では進行性の糸球体硬化症と CKD 病態を呈する Alport 症候群モデルマウス (Alport マウス) を用いて metformin の効果を検証してきた。その結果、metformin は RAS 阻害薬 losartan と同程度、またはそれ以上に Alport マウスの腎機能の低下や糸球体障害、腎の炎症・線維化病態を改善することを明らかにした。そこで、本検討では metformin による腎病態改善機序の詳細を明らかにすることを目的に、Alport マウスの病態発症部位である糸球体を用いた microarray 解析を実施した。その結果、Alport マウスの糸球体で認められたポドサイト関連経路や MAPK, PPAR, TGF β , Insulin 等の代謝関連経路の異常に対して、losartan はポドサイト関連経路の異常を改善したのみであったが、metformin はポドサイト関連経路の異常に加えて、代謝関連経路の異常を改善した。続いて、metformin の臨床適用に向けた有効性を検討するため、Alport マウスの生存率に与える影響を検討した結果、metformin は losartan には劣るものの、有意に生存期間を延長させた。さらに興味深いことに、losartan と metformin の適切な濃度下での併用投与は、それぞれの単剤以上に生存期間を延長させた。最後に、他の糸球体硬化症モデル (Adriamycin 腎症) への効果を検討した結果、metformin は Adriamycin 誘発性のタンパク尿と糸球体硬化に対しても有意な改善効果を示した。以上より、metformin の単剤、あるいは RAS 阻害薬との併用が非糖尿病性の CKD に対して有効であることを示した。

(2) Alport 症候群モデルマウスに対する Keap1-Nrf2 protein-protein interaction 阻害薬の効果

Bardoxolone methyl は Keap1 のシステイン残基に不可逆的に共有結合することで Nrf2 の活性化を誘導する低分子化合物である。近年の臨床試験の結果から、bardoxolone methyl には CKD 患者の糸球体ろ過量 (GFR) を増加させる効果があることが発見され、「世界初の腎機能改善薬」として注目されている。しかしながら、bardoxolone methyl 等の共有結合型の Keap1 阻害薬は他のタンパク質に対しても非特異的に共有結合する可能性があり、オフターゲット効果による副作用が懸念されている。そこで、本研究では選

択性・安全性の高い Nrf2 活性化薬の開発及び治療応用を目的に Keap1-Nrf2 protein-protein interaction (PPI) 阻害による可逆的 Keap1 阻害薬の開発と Alport マウスへの有効性評価試験を行った。蛍光偏光法にて取得した UBE-1099 はマウスへの単回投与試験で CDDO-Im (マウス用の Bardoxolone methyl 誘導体) 以上の Nrf2 活性化能を示した。臨床での bardoxolone methyl と同様に、UBE-1099 は投与開始後、一過性に Alport マウスのタンパク尿値を増加させた。GFR に関しては UBE-1099 投与により、わずかな改善が確認された程度であったが、血漿クレアチニン、血液尿素窒素に関しては有意な改善が認められた。加えて、UBE-1099 は Alport マウスで認められた糸球体障害、腎の炎症・線維化病変を一様に改善した。そこで、UBE-1099 による腎病態改善機序を明らかにすることを目的に、UBE-1099 投与後の Alport マウスから糸球体を単離し、RNA-seq 解析を実施した。その結果、UBE-1099 投与群では Nrf2 関連経路に加えて、細胞骨格や細胞周期に関連する遺伝子の発現増加が認められた。Bardoxolone methyl による GFR 増加効果には糸球体の構造変化の関与が示唆されていることを踏まえると、UBE-1099 による腎病態改善機序の一端にも同様の機序の関与が考えられる。最後に、臨床適用に向けた有効性を検討するため、Alport マウスの生存期間に与える影響を検討した結果、UBE-1099 は生存期間を有意に延長させた。以上の結果より、Alport 症候群及び慢性腎臓病への創薬に対する Keap1-Nrf2 PPI 阻害薬の有用性を初めて明らかにした。現在、より低濃度で、かつ、より高い Nrf2 活性化能を有する化合物 X を同定しており、Alport マウスに対する治療効果は UBE-1099 を上回ることも確認している。今後、化合物 X を基盤とした創薬展開が期待される。

(3) 糸球体 single cell RNA-seq 解析による Alport 症候群の病態形成機構の解明

Alport 症候群を含む CKD の病態進行は不可逆であることから、より早期からの治療介入により、如何に病態の進展を抑制するかが重要である。このような背景のもと、筆者らは早期の病態制御因子の探索と治療応用を目的に病態発症部位である糸球体に着目し、網羅的遺伝子発現解析と薬効評価試験を軸に Alport 症候群病態への関与を解明してきた。しかしながら、糸球体内においても種々の細胞が存在すること、糸球体間、糸球体内の部位によっても病態進行の不均一性が生じることを考慮すると、糸球体を用いた解析でさえ、多種多様な細胞集団の平均的な結果を得ているに過ぎず、Alport 症候群の病態形成の起点となる重要な細胞・異常は不明である。そこで、本検討では 1 細胞ごとの発現変動分子の解析が可能な single cell RNA-seq (scRNA-seq) に着目した。まず、病理所見が出現する週齢の同定を目的に電子顕微鏡解析を実施した結果、タンパク尿発症前の 5 週齢期の Alport マウスではほとんど異常が認められなかったのに対し、タンパク尿発症後の 8 週齢期の Alport マウスにおいては部分的な糸球体基底膜の肥厚化とそれに伴うポドサイトの足突起の形態異常を認めた。そこで、8 週齢期の WT, Alport マウスの糸球体を用いた scRNA-seq 解析を実施した結果、糸球体基底膜の両端に位置するポドサイトと血管内皮細胞における異常を同定した。ポドサイト集団を用いた解析の結果、極初期の異常を示す集団から発現変動を示す遺伝子を 30 種、血管内皮細胞集団を用いた解析の結果、細胞集団内において部分的・全体的に発現変動を示す遺伝子を 45 種同定した。加えて、糸球体基底膜の肥厚化所見と相関して、ポドサイト、血管内皮細胞において糸球体基底膜を構成する複数の遺伝子の発現増加を捉えた。今後、同定した遺伝子を標的とした解析を進めていく予定である。

以上、本研究は、抗糖尿病薬 metformin と Keap1-Nrf2 PPI 阻害薬の Alport マウスに対する有効性を示すとともに、Alport 症候群の病態形成機構に基づく新規治療標的候補を scRNA-seq 法を駆使することで明らかにした。本研究成果は、未だ有効な治療法が確立されていない Alport 症候群に対し、有望な新規治療薬候補を提示するとともに、次世代の医薬品開発に向けた有益な情報を提供する重要な知見である。