

# 新規腎線維化制御因子を標的とした アンチセンス核酸医薬の創製

尾花理徳

大阪大学大学院薬学研究科臨床薬効解析学分野

key words : 慢性腎臓病, 腎線維化, 筋線維芽細胞, 転写因子 OASIS

## 要旨

腎線維化は、慢性腎臓病の治療標的と考えられているが、その制御機構には未だ不明な点が多い。本研究では、転写因子 old astrocyte specifically induced substance (OASIS) が、腎筋線維芽細胞の増殖や遊走を制御し、腎線維化の促進に関与していることが明らかとなった。今後さらなる検討が重ねられ、OASIS を標的とした、腎線維化抑制を介した CKD 治療薬の開発が期待される。

## 緒言

慢性腎臓病 (chronic kidney disease; CKD) は我が国の成人の 8 人に 1 人 (13%) が罹患していると言われ、新たな国民病として注目されている。言わずもがな、CKD は末期腎不全に繋がり、透析導入による患者の QOL の著しい低下を招く。また、CKD は心血管病のリスクファクターであるため、CKD の予防や治療は重要である<sup>1)</sup>。しかしながら、その治療薬はきわめて限られており、新規 CKD 治療法の開発が喫緊の課題である。腎線維化は、ほとんどすべての腎疾患の腎不全への進展における最終共通経路と考えられ、治療標的として捉えられている<sup>2)</sup>。組織線維化については、古くから盛んに研究がなされてきたが、依然として腎線維化制御機構には不明な点が多いのが現状である。よって、CKD 治療法の開発を目指し、新たな腎線維化制御機構を明らかにする必要がある。

old astrocyte specifically induced substance (OASIS)

(別名 : cAMP responsive element binding protein 3 like 1; CREB311) は転写因子であり、元来小胞体 (endoplasmic reticulum; ER) ストレスセンサーとして見出された分子である<sup>3)</sup>。細胞が ER ストレスに曝された際、OASIS は site1/2 protease により切断され、N 末端側が活性型として核内に移行し、様々な分子の発現を制御する<sup>4)</sup>。これまで、OASIS は骨形成<sup>5)</sup>や大腸炎の病態形成<sup>6)</sup>、癌抑制<sup>7~9)</sup>に関与することが報告されている。また、OASIS により転写制御を受ける因子として、glucose-regulated protein78 (GRP78)<sup>10)</sup>、collagen1a1<sup>5)</sup>、fibroblast growth factor binding protein 1 (FGFBP1)<sup>11)</sup>などが知られている。しかしながら、腎臓を含め、多くの臓器における OASIS の役割は報告されていない。

筆者は、マイクロアレイによるマウス線維化腎における遺伝子発現変動と、ヒト CKD 患者腎の遺伝子発現をまとめたデータベース (Nephroseq) の解析から、OASIS mRNA が腎線維化で発現上昇することを見出した。そこで、本研究では、腎線維化における OASIS の役割を明らかにし、治療標的としての可能性を追究することとした。

## 1 方法・結果・考察

### 1-1 ヒト腎不全患者の腎組織やマウス線維症腎で OASIS タンパク発現が上昇する

まず初めに、OASIS と腎線維化との関連性をより詳細に検討するべく、ヒト腎不全患者の腎組織における OASIS のタンパク発現を免疫組織化学的検討により評

価した。なお、ヒト腎不全患者の腎組織とヒト腎組織正常部位は、大阪大学薬学研究科のヒト組織・ヒト初代培養細胞研究審査の承認を経て、OriGene Technologies より購入した。

結果、ヒト不全腎において、顕著な OASIS タンパク陽性細胞の増加が認められた。また、マウスに片側尿管結紮術を施す (UUO モデル) ことで腎線維症を惹起させ、経時的 (0, 1, 3, 7 日) に OASIS タンパク発現を western blotting により検討した。その結果、線維化の進展に伴い、腎臓中の OASIS 発現 (特に活性型) が増加することが明らかとなった。また、葉酸誘発の急性腎障害後 14 日や虚血再灌流後 21 日の腎臓においても、線維化マーカーの発現上昇とともに、*Oasis* mRNA の発現上昇が確認された。さらに、UUO7 日目のマウス線維化腎における OASIS の発現局在を免疫組織学的に検討したところ、OASIS は主に、筋線維芽細胞マーカーである Actin, Alpha Skeletal Muscle ( $\alpha$ -SMA) 陽性細胞に発現していた。筋線維芽細胞は、過剰な細胞外マトリックスの産生を介し、組織線維化に中心的な役割を果たす細胞群である。

以上の結果より、OASIS は筋線維芽細胞で発現し、線維症形成に関与する可能性が示唆された。なお、動物実験は、大阪大学薬学研究科動物実験委員会の承認の下に行った。

#### 1-2 (筋) 線維芽細胞において OASIS は TGF- $\beta$ 1 により発現誘導され細胞の増殖や遊走に関与する

これまでの検討から、OASIS は筋線維芽細胞に発現し、腎線維化に関連する可能性が示唆された。そこで、OASIS の発現誘導機構を、培養 (筋) 線維芽細胞を用いて追究した。アストロサイトなどにおいて、OASIS は ER ストレスにより発現誘導されることが報告されているため<sup>3)</sup>、腎線維芽細胞 NRK-49F に ER ストレス誘導物質ツニカマイシンを処置し、OASIS の発現を western blotting により検討した。結果、ツニカマイシン処置により OASIS の発現変動は認められなかった。

次に、肺がん細胞において、OASIS は transforming growth factor-beta 1 (TGF- $\beta$ 1) により活性化制御を受けることが知られているため<sup>12)</sup>、NRK-49F 細胞に TGF- $\beta$ 1 を処置した。その結果、TGF- $\beta$ 1 の濃度依存的 (0, 1, 3, 10 ng/mL)、また時間依存的 (0, 1, 3, 6, 9, 24 時

間) に、OASIS (全長型、活性型) は発現上昇した。またこの時、TGF- $\beta$ 1 の処置により  $\alpha$ -SMA の発現上昇がみられ、線維芽細胞から筋線維芽細胞への分化が確認された。そこで、筋線維芽細胞の性質獲得が OASIS 発現に与える影響を考え、NRK-49F 細胞に angiotensin II を処置した。興味深いことに、angiotensin II は  $\alpha$ -SMA の発現を誘導するものの、OASIS 発現に大きな影響を与えなかった。

以上の結果より、(筋) 線維芽細胞において OASIS 発現は TGF- $\beta$ 1 により制御を受けることが明らかとなった。

#### 1-3 OASIS は TGF- $\beta$ 1 による筋線維芽細胞の増殖と遊走を促進させる

次に、筋線維芽細胞における OASIS の機能を解明するため、shRNA OASIS 発現レンチウイルスを用いて、NRK-49F 細胞の OASIS をノックダウンさせた。その細胞において、TGF- $\beta$ 1 による細胞の増殖能を評価したところ、コントロール細胞において認められた TGF- $\beta$ 1 による増殖能の上昇が、OASIS のノックダウンにより有意に抑制された。またスクラッチアッセイにより細胞の遊走能を評価したところ、OASIS ノックダウンは TGF- $\beta$ 1 による細胞遊走をほぼ完全に抑制した。また、OASIS ノックダウン細胞では、*fibronectin* mRNA の発現変動は認められなかったものの、*collagen1a1* mRNA の発現抑制が認められた。なお、OASIS ノックダウンは TGF- $\beta$ 1 による  $\alpha$ -SMA の発現誘導、すなわち筋線維芽細胞への分化には影響を与えなかった。他方、レンチウイルスによる OASIS の過剰発現も、NRK-49F 細胞の遊走能を減少させた。OASIS は HIF-1 $\alpha$  や Smad4 など複合体を形成して機能するという報告があることから、OASIS の発現レベルのみではその機能を説明することはできないと考えられた。また、病態によって、OASIS が多様な機能を示す可能性が考えられた。

なお、遺伝子組換え実験は、大阪大学遺伝子組換え実験安全委員会の承認の下、大阪大学遺伝子組換え実験実施規則に則り行った。

#### 1-4 Site1/2 protease 阻害薬 AEBSF は腎線維化を抑制する

上述のように、OASIS は site1/2 protease により N

末端側が切り出され、活性型となる。そして活性型 OASIS は核内移行し、様々な遺伝子の発現を調節する。フッ化 4 (2 アミノエチル) ベンゼンスルホン塩酸塩 (4-(2-aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride hydrochloride; AEBSF) は、site 1/2 protease 阻害活性を有することが報告されていることから<sup>4, 13, 14</sup>), AEBSF による OASIS 活性化阻害が腎線維化に与える影響を検討した。

まず、腎線維芽細胞において AEBSF が OASIS の活性化を抑制するか否かを検討するため、NRK-49F 細胞に AEBSF (250  $\mu$ M) を処置し、その後 TGF- $\beta$ 1 を添加した。その結果、AEBSF により OASIS の活性化が抑制されることを確認した。そこで、マウス UUO モデルを用いて、AEBSF を UUO 作製 2 日前より連日投与した。UUO7 日目にシリウスレッド染色やマッソントリクローム染色、ヒドロキシプロリン量の測定を行い、線維症の程度を評価した。その結果、AEBSF 投与により、有意な腎線維化の減少が認められた。一方で、AEBSF の投与プロトコールは、予防的プロトコールでもあるので、OASIS の治療標的としての可能性を検証するためにも、今後、腎障害後のみに AEBSF を投与する検討も必要である。

#### 1-5 OASIS ノックアウトマウスでは腎線維化が抑制される

腎線維化病態形成における OASIS の役割をより特異的に明らかにするため、OASIS ノックアウト (KO) マウスを用いた<sup>5</sup>)。KO マウスに UUO を施し、7 日後、シリウスレッド染色やマッソントリクローム染色、ヒドロキシプロリン量の測定を行った。その結果、KO マウスでは線維化領域の有意な減少が認められた。また、抗  $\alpha$ -SMA 抗体および増殖マーカーである抗 Ki-67 抗体を用いた蛍光免疫染色より、KO マウスでは増殖筋線維芽細胞割合が減少することが明らかとなった。加えて、KO マウスの腎臓では、*Tgfb1* や *Collagen1*, *matrix metalloprotease (Mmp) 2* などの線維化関連因子の mRNA 発現の有意な減少が認められた。他方、UUO 後の WT と KO マウスの腎臓において、マクロファージマーカーである CD11b や F4/80、炎症サイトカインマーカーである TNF- $\alpha$  や IL-1 $\beta$ , IL-6 の mRNA 発現に差はなかったことから、OASIS は炎症反応には大きな影響を与えないことが示唆された。さ

らに、腎虚血再灌流 (虚血 22 分) 3 週間後における腎線維化についても、KO マウスでは線維形成や筋線維芽細胞割合の減少が認められた。また、KO マウスでは、腎機能マーカーである血清クレアチニンの上昇も抑制された。

#### 1-6 bone marrow stromal antigen2 は腎線維化に関与する OASIS 下流候補分子である

OASIS による腎線維化促進メカニズムを明らかにするため、UUO を施した wild type (WT) マウスまたは OASIS KO マウスから筋線維芽細胞を単離した。OASIS により制御を受ける分子を、より特異的に捉えるため、これら筋線維芽細胞に TGF- $\beta$ 1 を処置し、マイクロアレイ解析を行った。その結果、 $P$  値 < .2 で 1.5 倍以上発現変動する分子を 98 遺伝子抽出した。そのうち、KO マウスで発現が減少し、癌細胞で細胞の増殖や遊走に関与する因子 bone marrow stromal antigen2 (Bst2) に着目した<sup>15, 16</sup>)。なお、Bst2 の組織線維化における役割については報告がなされていない。

線維化腎における Bst2 の発現は、OASIS と同様に経時的に発現上昇し、KO マウス腎では Bst2 の発現減少がみられた。また ChIP アッセイから、Bst2 のプロモーター領域に OASIS の結合部位が少なくとも 4 カ所存在することも明らかとなった。これらの結果から、Bst2 は OASIS の直接的な制御を受ける可能性が示唆された。OASIS 欠損筋線維芽細胞では、ヒト線維芽細胞の遊走を亢進させる podoplanin<sup>17</sup>) の発現減少や、腎保護作用を有する growth and differentiation factor 15 (GDF15)<sup>18</sup>) の発現上昇が認められた。よって、OASIS は Bst2 のみならず、複数のカスケードを介して線維芽を促進的に制御していることが推察された。

#### 1-7 抗 Bst2 抗体の投与は UUO による腎線維化を抑制する

腎線維化に関与する OASIS 下流候補因子として Bst2 が見出されたが、Bst2 の腎線維症病態形成に与える影響は不明である。そこで、UUO 作製翌日に抗 Bst2 抗体 (100  $\mu$ g/body) を投与し、7 日後、腎線維化をシリウスレッド染色やマッソントリクローム染色、ヒドロキシプロリン量により評価した。その結果、抗 Bst2 抗体の投与は、腎線維化を有意に抑制した。また OASIS KO では、抗 Bst2 抗体とコントロール抗体



の投与群間で、線維化程度に差がなかったことから、Bst2 は OASIS の下流で腎線維化進展に関与する可能性が示唆された。なお、抗 Bst2 抗体は形質細胞様樹状細胞を欠失させることが知られているが<sup>19)</sup>、本検討で用いた用法・用量では、形質細胞様樹状細胞の発現に影響を与えないことを確認している。

#### 1-8 筋線維芽細胞特異的 OASIS 欠損マウスでは腎線維化が抑制される

これまでの検討より、OASIS は筋線維芽細胞の増殖や遊走を制御していること、また OASIS が腎線維化に促進的に働くことが明らかとなった。しかしながら、筋線維芽細胞における OASIS の腎線維形成への役割については不明であった。そこで筋線維芽細胞特異的ペリオスチンプロモーター下に Cre を有するマウス<sup>20)</sup>と OASIS の exon2 を flox で挟んだマウスを交配させ、Cre-loxP システムを用いて筋線維芽細胞特異的 OASIS 欠損 (cKO) マウスを作製した。

このマウスに UUO を施したところ、cKO マウスでは有意に腎線維化が抑制されることが明らかとなった。また、cKO マウスでは、筋線維芽細胞の増殖割合も減少した。加えて、KO マウスの腎臓では、*Tgfb1* や *Collagen1*, *Collagen3*, *Mmp2*, *Mmp9*, などの線維化関連因子の mRNA 発現の有意な減少が認められた。また、上述の腎線維化に関与する OASIS 下流候補因子 *Bst2* の mRNA 発現も減少することを確認した。

以上の結果より、筋線維芽細胞における OASIS は腎線維症病態形成に関与していることが明らかとなっ

た。

#### 1-9 アンチセンス核酸は静脈内投与により UUO 腎の線維化領域に分布する

上述の AEBSF は、site 1/2 protease 阻害活性を有するが、site 1/2 protease は OASIS と構造的類似性を有する他の ER ストレスセンサーの活性化も阻害することが知られている<sup>21~23)</sup>。実際に筆者は、NRK-49F 細胞において、AEBSF が OASIS のみならず activating transcription factor 6 (ATF6) や sterol regulatory element binding transcription factor 2 (SREBP2) の活性化も抑制することを確認している。そこで、OASIS 特異的阻害薬による腎線維化治療を開発するうえで、OASIS に対するアンチセンス核酸医薬の創製を目指す。

まず、腎線維化領域がアンチセンス核酸のターゲットとなりうるかを検討するため、蛍光標識アンチセンス核酸を UUO モデルに静脈内投与した。投与 24 時間後、腎組織切片を作製し、 $\alpha$ -SMA を蛍光免疫染色にて検出したところ、アンチセンス核酸医薬の一部は  $\alpha$ -SMA 陽性細胞領域にも分布することを見出した。よって、OASIS を標的としたアンチセンス核酸医薬による腎線維化治療開発の可能性が示唆された。

## 2 結論

傷害を受けた腎臓では、筋線維芽細胞における OASIS が、TGF- $\beta$ 1 により誘導され、コラーゲンの産生、筋線維芽細胞の増殖性や運動性の向上を介し、腎線維化進展に関与することが明らかとなった (図 1)。

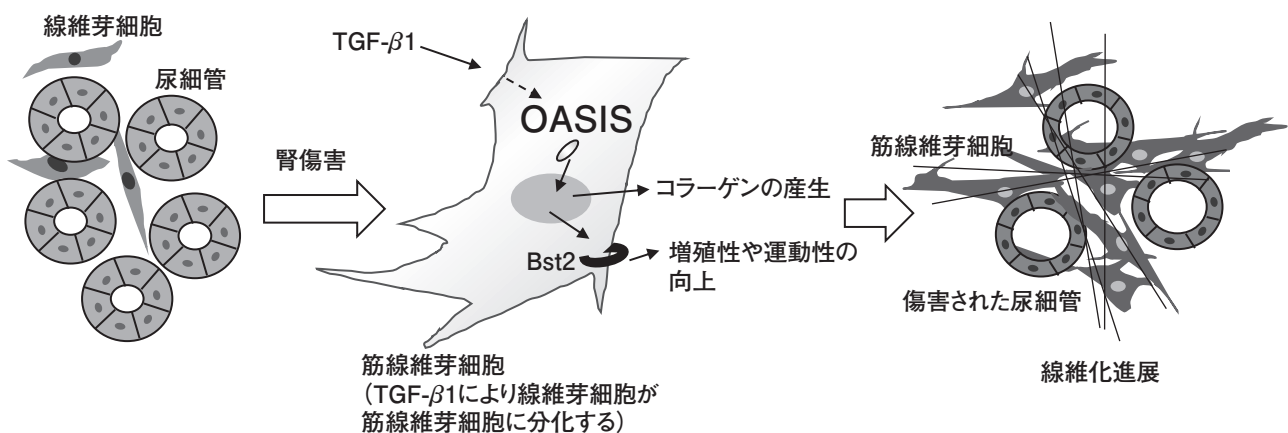


図 1 本研究の概略図

腎障害時の筋線維芽細胞において、OASIS は TGF- $\beta$ 1 により誘導され、Bst2 の発現制御を介し腎線維化進展に関与する。またそのメカニズムとして、コラーゲンの産生、筋線維芽細胞の増殖性や運動性の亢進が関与する。

また OASIS による線維化進展作用の一部は、膜タンパクである Bst2 を介することも示された。今後、OASIS を標的とする腎線維化抑制を介した CKD 治療薬の開発が期待される。

平成 30 年度日本透析医会公募研究助成により得られた成果の一部は、原著論文として『The FASEB Journal』に投稿したため、二重投稿となることを避け、本報告書ではその概要を総説的に記載した。なお、原著論文は、2021 年 2 月に下記論文として公表された。

FASEB J. 2021 Feb;35(2):e21158. doi: 10.1096/fj.202001820R.

本研究は、平成 30 年度日本透析医会公募研究助成や、日本学術振興会科学研究費補助事業等によって行われた。

利益相反自己申告：申告すべきものなし

#### 文 献

- 1) Go AS, Chertow GM, Fan D, et al. : Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. *N Engl J Med* 2004; 351 : 1296-1305.
- 2) Farris AB, Colvin RB : Renal interstitial fibrosis : mechanisms and evaluation. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2012; 21 : 289-300.
- 3) Kondo S, Murakami T, Tatsumi K, et al. : OASIS, a CREB/ATF-family member, modulates UPR signalling in astrocytes. *Nat Cell Biol* 2005; 7 : 186-194.
- 4) Murakami T, Kondo S, Ogata M, et al. : Cleavage of the membrane-bound transcription factor OASIS in response to endoplasmic reticulum stress. *J Neurochem* 2006; 96 : 1090-1100.
- 5) Murakami T, Saito A, Hino S, et al. : Signalling mediated by the endoplasmic reticulum stress transducer OASIS is involved in bone formation. *Nat Cell Biol* 2009; 11 : 1205-1211.
- 6) Hino K, Saito A, Asada R, et al. : Increased susceptibility to dextran sulfate sodium-induced colitis in the endoplasmic reticulum stress transducer OASIS deficient mice. *PLoS One* 2014; 9 : e88048.
- 7) Mellor P, Deibert L, Calvert B, et al. : CREB3L1 is a metastasis suppressor that represses expression of genes regulating metastasis, invasion, and angiogenesis. *Mol Cell Biol* 2013; 33 : 4985-4995.
- 8) Rose M, Schubert C, Dierichs L, et al. : OASIS/CREB3L1 is epigenetically silenced in human bladder cancer facilitating tumor cell spreading and migration in vitro. *Epigenetics* 2014; 9 : 1626-1640.
- 9) Ward AK, Mellor P, Smith SE, et al. : Epigenetic silencing of CREB3L1 by DNA methylation is associated with high-grade metastatic breast cancers with poor prognosis and is prevalent in triple negative breast cancers. *Breast Cancer Res* 2016; 18 : 12.
- 10) Vellanki RN, Zhang L, Volchuk A : OASIS/CREB3L1 is induced by endoplasmic reticulum stress in human glioma cell lines and contributes to the unfolded protein response, extracellular matrix production and cell migration. *PLoS One* 2013; 8 : e54060.
- 11) Zhu HY, Bai WD, Liu JQ, et al. : Up-regulation of FGFBP1 signaling contributes to miR-146a-induced angiogenesis in human umbilical vein endothelial cells. *Sci Rep* 2016; 6 : 25272.
- 12) Chen Q, Lee CE, Denard B, et al. : Sustained induction of collagen synthesis by TGF-beta requires regulated intramembrane proteolysis of CREB3L1. *PLoS One* 2014; 9, e108528.
- 13) Gorski JP, Huffman NT, Chittur S, et al. : Inhibition of pro-protein convertase SKI-1 blocks transcription of key extracellular matrix genes regulating osteoblastic mineralization. *J Biol Chem* 2011; 286 : 1836-1849.
- 14) Feng YX, Jin DX, Sokol ES, et al. : Cancer-specific PERK signaling drives invasion and metastasis through CREB3L1. *Nat Commun* 2017; 8 : 1079.
- 15) Gu G, Zhao D, Yin Z, et al. : BST-2 binding with cellular MT1-MMP blocks cell growth and migration via decreasing MMP2 activity. *J Cell Biochem* 2012; 113 : 1013-1021.
- 16) Liu W, Cao Y, Guan Y, et al. : BST2 promotes cell proliferation, migration and induces NF-kappaB activation in gastric cancer. *Biotechnol Lett* 2018; 40 : 1015-1027.
- 17) Suchanski J, Tejchman A, Zacharski M, et al. : Podoplanin increases the migration of human fibroblasts and affects the endothelial cell network formation : A possible role for cancer-associated fibroblasts in breast cancer progression. *PLoS One* 2017; 12 : e0184970.
- 18) Abulizi P, Loganathan N, Zhao D, et al. : Growth Differentiation Factor-15 Deficiency Augments Inflammatory Response and Exacerbates Septic Heart and Renal Injury Induced by Lipopolysaccharide. *Sci Rep* 2017; 7 : 1037.
- 19) Goubier A, Dubois B, Gheit H, et al. : Plasmacytoid dendritic cells mediate oral tolerance. *Immunity* 2008; 29 : 464-475.
- 20) Imaeda A, Tanaka S, Tonegawa K, et al. : Myofibroblast beta2 adrenergic signaling amplifies cardiac hypertrophy in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2019; 510 : 149-155.
- 21) Ye J, Rawson RB, Komuro R, et al. : ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs. *Mol Cell* 2000; 6 : 1355-1364.
- 22) Shen J, Chen X, Hendershot L, et al. : ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and

- unmasking of Golgi localization signals. *Dev Cell* 2002; 3 : 99-111.
- 23) Okada T, Haze K, Nakanaka S, et al. : A serine protease inhibitor prevents endoplasmic reticulum stress-induced cleavage but not transport of the membrane-bound transcription factor ATF6. *J Biol Chem* 2003; 278 : 31024-31032.