

令和元年6月25日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07101

研究課題名(和文)色素上皮由来因子の機能的修飾ペプチドによる糖尿病腎症の新しい治療手段の開発

研究課題名(英文) Development of novel treatment for diabetic nephropathy originate from functional modified peptides of pigment epithelium-derived factor.

研究代表者

松井 孝憲 (Matsui, Takanori)

久留米大学・医学部・講師

研究者番号：10425233

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：全長のPEDFを分割する位置を検討した。各フラグメントについて、腎メサンギウム細胞を終末糖化産物(AGEs)で刺激した際の酸化ストレスレベルとMCP-1、VCAM-1、PAI-1遺伝子の発現抑制効果について解析をおこなった。その結果、全長PEDFと同様の酸化ストレス抑制作用を有するフラグメントが得られたため、該当フラグメントを6分割したペプチドを作成した。各ペプチドについて、in vitro解析をおこなったが、抑制効果は確認できなかった。そこで、ペプチドの分割位置を再検討し、4分割したペプチド(P1-P4)を作製した。その結果、全長PEDFと同様に酸化ストレス抑制効果を示すペプチドが得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病腎症は新規透析導入の原因疾患第一位であり、毎年1万6千人が透析導入に至っており、社会問題となっている。

今回得られたペプチドは、PEDFと同様に抗酸化ストレス、抗炎症作用を発揮した。このペプチドはAGE-RAGE系を抑えることで糖尿病腎症、動脈硬化症や糖尿病網膜症に対しても保護的に作用する可能性が見出された。PEDFは不安定なタンパク質であり、大量精製には費用も高額になるが、同等の機能を発揮するペプチドを用いることで、新規の糖尿病腎症治療法の開発に繋がることが期待される。

研究成果の概要(英文)：We examined a recombinant fragment of PEDF could inhibit reactive oxygen species generation and gene expression of MCP-1, ICAM-1, PAI-1 in AGEs-exposed renal mesangial cells. A PEDF-derived sythetic peptide exert anti-oxidative stress and inflammatory actions.

研究分野：細胞生物学

キーワード：糖尿病腎症 機能性ペプチド

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

我が国の糖尿病患者は、平成24年において約2,050万人と推定され、糖尿病腎症を原因として新規透析導入に至る患者数は15,837人/年（平成25年、日本透析医学会）と、多くの糖尿病患者のQOL低下を招いている。したがって糖尿病腎症の進展機構を明らかにし、治療のために新しい原理を見出すことは、緊急に取り組みねばならない重要課題のひとつと言える。

近年、糖尿病の高血糖状態で促進的に形成される終末糖化産物（Advanced glycation end-products;以下 AGE）が糖尿病腎症を始めとする糖尿病血管合併症の発症・増悪に関わっていることが明らかになっている。これまでに我々は、AGEと腎症の関わりについて、AGEが腎構成細胞に存在する受容体 RAGE によって認識され、細胞内酸化ストレスを惹起させる結果、腎糸球体上皮細胞（ポドサイト）や尿細管のアポトーシスを引き起こし VEGF や MCP-1 の発現亢進を介して、糸球体過剰濾過や微量アルブミン尿の出現に関与すること、メサンギウム細胞の肥大化と虚血性、線維性変化を引き起こすこと等を *in vitro*, *in vivo* で明らかにしてきた（Yamamoto et al. *J Clin Invest.* 2001;108:261-8, Yamagishi et al. *J Biol Chem.* 2002;277:20309-15, Yamagishi et al. *Kidney Int.* 2003;63:464-73, Fukami et al. *Kidney Int.* 2004;66:2137-47.）。

一方、色素上皮由来因子（Pigment epithelium-derived factor;以下 PEDF）は1989年にヒト網膜色素上皮細胞から単離された分子量約50kDaの分泌性蛋白質で、その後、酸化ストレスによる神経細胞傷害を抑制することや、脂肪組織から分泌されるアディポサイトカインの一つであり、各主要臓器をはじめとして血中等様々な組織に存在することが報告された（Tombran-Tink et al. *Exp Eye Res.* 1991;53:411-4, Steele et al. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90:1526-30, Goliath et al. *Mol Vis.* 1996;2:5）。我々はこれまでに、PEDFの各種疾患に対する効果について、PEDFがNADPH オキシダーゼの活性化を阻害し、酸化ストレスを抑制することで、肥満やインスリン抵抗性、心血管代謝病、癌の病態を改善することを様々な動物モデルで明らかにしてきた。また、AGEによる糖尿病腎症との関連についても *in vitro* において 1) PEDF が AGE による NADPH oxidase の活性化を抑え、細胞内酸化ストレスの産生亢進を抑制し、2) 腎糸球体基底膜を覆うポドサイト細胞のアポトーシスによる脱落を防ぐこと、3) 腎メサンギウム細胞において、MCP-1, VCAM-1, PAI-1 遺伝子発現の増悪を改善すること示してきている（松井ら *J Biol Chem.* 2006;281:20213-20, *Microvasc Res.* 2006;72:86-90, *Diabetologia.* 2003;46:284-7, *Brain Res.* 2007;1167:92-100, *Atherosclerosis.* 2008;197:25-33, *Am J Pathol.* 2011;178:591-8, *Am J Pathol.* 2014;184:1094-103, *Diabetes Metab Res Rev.* 2009;25:52-6, *J Mol Cell Cardiol.* 2004;37:497-506, *Microvasc Res.* 2010;80:227-32, *Microvasc Res.* 2013;85:54-8.）。以上の知見に基づき、「PEDFはAGEシグナルをブロックすることで、糖尿病腎症の発症・進展を阻止できるのではないか」と期待するものである。

しかしながら、PEDFはアミノ酸418残基からなる高分子タンパク質であり、精製に掛かる費用が高額になること、タンパク質として不安定であり失活し易いことから、drug deliveryの確立は現実出来ではない。そこで今回我々は、AGEシグナルをブロックしうる PEDF の機能性ドメインを突き止め、低分子で安定なペプチドを作成することで、糖尿病腎症の新たな治療手段を検討することとした。

2. 研究の目的

糖尿病腎症の発症・増悪には、高血糖状態により生体内で形成・蓄積が亢進する終末糖化産物(Advanced glycation end-products;以下 AGE)とそれに由来する酸化ストレスが関与していることが報告されている。アディポサイトカインの一つである色素上皮由来因子(Pigment epithelium-derived factor;以下 PEDF)は、腎臓の構成細胞を用いた *in vitro* の結果より、AGEの作用をブロックし、糖尿病腎症に抑制的に働くことが期待されている。しかしながら、PEDFタンパクをそのまま治療に用いるにはいくつかの問題がある。そこで、本研究では、AGEシグナルをブロックする PEDF の機能部位を突き止め、低分子で安価な機能性ペプチドを作製し、糖尿病モデル動物に投与し効果を検討することで、糖尿病腎症の新たな治療手段の開発を目的とする。

3. 研究の方法

(1) PEDF の機能部位の絞り込み: PEDF を段階的に分割し, AGE シグナル抑制部位を突き止め, 修飾を施しプロテアーゼ耐性を高めた修飾 PEDF ペプチドを作製する.

(2) PEDF ペプチドのシグナル伝達の解析: 修飾 PEDF ペプチドの AGE シグナルの抑制効果について, 抗酸化ストレス活性, 炎症性遺伝子発現および細胞接着性遺伝子発現の抑制効果により解析をおこなう.

(3) 体内動態の解析, 糖尿病腎症抑制効果の検討: 修飾 PEDF ペプチドの体内動態を 125I ラベルにより明らかにする. また, 修飾 PEDF ペプチドの AGE シグナル抑制効果が腎症の初期及び後期病変を改善するのか, ストレプトゾトシンによる糖尿病モデルラットを用いて検討する.

4. 研究成果

全長の PEDF を当初に予定していた位置で 3 分割した結果, 得られたフラグメントをさらに分割したペプチドには, *in vitro* (腎メサンギウム細胞) における, 終末糖化産物 (AGEs) により惹起した酸化ストレスレベル及び, MCP-1, VCAM-1, PAI-1 遺伝子の発現を抑制する効果が得られなかった. そこで, 新たに PEDF を分割する位置を変更した. また新たなフラグメントの発現プラスミド作製に際して, His タグに加えて GST 融合型に変更した. 各フラグメントについて, *in vitro* における機能解析をおこなった. その結果, 全長 PEDF と同様の酸化ストレス抑制作用を有するフラグメントが得られたため (図 1), 該当フラグメントを 6 分割したペプチドを作成した. 各ペプチドについて, *in vitro* における酸化ストレスアッセイと qPCR による各種遺伝子の発現を定量したところ, これらを有意に抑制しうる効果はみられなかった. そこで, ペプチドの分割位置を再検討し, 4 分割したペプチド (P1~P4) を作製した. その結果, 全長 PEDF と同様に酸化ストレス抑制効果を示すペプチドが得られた (図 2). 該当ペプチドについて, プロテアーゼ耐性を付与するため, N 末端にメチル化を施し, *in vitro* アッセイを検討した結果, 酸化ストレス抑制効果が確認できなかった. そこで, N 末端のアルキル化, アセチル化, D 体化した修飾ペプチドをそれぞれ作製した. 修飾にともない, 溶解度の低下がみられたため, 溶解 buffer の変更により対応した. いずれの修飾ペプチドについても, 酸化ストレス抑制効果はみとめられなかった. 当該ペプチドの活性発現には N 末端アミノ酸残基が重要であると予想され

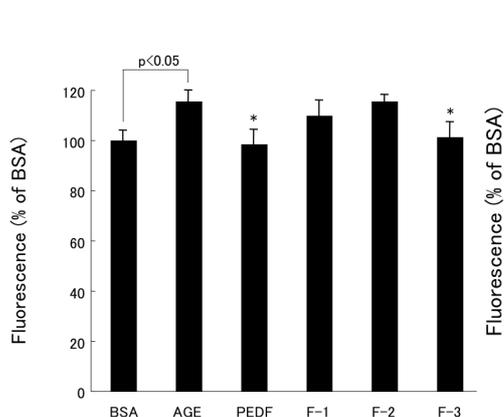


図 1 PEDF 分割フラグメントの ROS 抑制効果

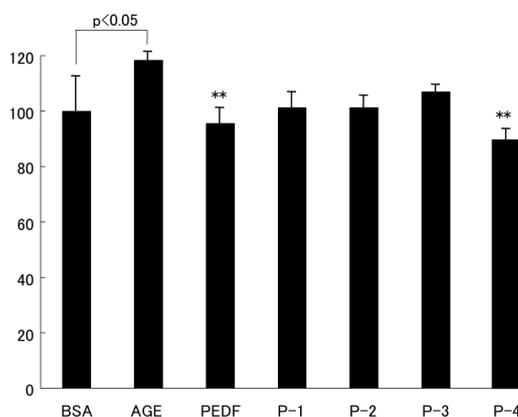


図 2 PEDF 分割ペプチドの ROS 抑制効果

た. ひきつづき, ペプチドの修飾方法を検討することにより, PEDF と同様の活性を維持し, かつ生体投与可能な機能性ペプチドの作製を目指している.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 17 件)

- (1) Ishibashi Y, Matsui T, Yamagishi S. Tofogliflozin, A Highly Selective Inhibitor of SGLT2 Blocks Proinflammatory and Proapoptotic Effects of Glucose Overload on Proximal Tubular Cells Partly by Suppressing Oxidative Stress Generation. *Horm Metab Res.* 48:191-195, 2016.
- (2) Higashimoto Y, Ojima A, Oda E, Matsui T, Yamagishi SI. AGE aptamer inhibits

neointimal hyperplasia in balloon-injured rat carotid arteries *J Pharmacol Sci.* 130:S246-, 2016.

- (3) Ishibashi Y, Matsui T, Matsumoto T, Kato H, Yamagishi S. Ranirestat has a stronger inhibitory activity on aldose reductase and suppresses inflammatory reactions in high glucose-exposed endothelial cells. *Diabetes Vasc Dis Res.* 13:312-315, 2016.
- (4) Matsui T, Nakamura N, Ojima A, Nishino Y, Yamagishi SI. Sulforaphane reduces advanced glycation end products (AGEs)-induced inflammation in endothelial cells and rat aorta. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 26:797-807, 2016.
- (5) Ishibashi Y, Matsui T, Taira J, Higashimoto Y, Yamagishi S. Protective Role of PEDF-Derived Synthetic Peptide Against Experimental Diabetic Nephropathy. *Horm Metab Res.* 48:613-619, 2016.
- (6) Ishibashi Y, Matsui T, Yamagishi SI. Tofogliflozin, a selective inhibitor of sodium-glucose cotransporter 2, suppresses renal damage in KKAy/Ta mice, obese and type 2 diabetic animals. *Diabetes Vasc Dis Res.* 13:438-441, 2016.
- (7) Kajikawa M, Maruhashi T, Iwamoto Y, Iwamoto A, Oda N, Kishimoto S, Matsui S, Aibara Y, Hidaka T, Kihara Y, Chayama K, Goto C, Noma K, Nakashima A, Matsui T, Yamagishi SI, Higashi Y. Circulating level of pigment epithelium-derived factor is associated with vascular function and structure: A cross-sectional study. *Int J Cardiol.* 225:91-95, 2016.
- (8) Ishibashi Y, Matsui T, Nakamura N, Yamagishi SI. Combination of Irbesartan with Amlodipine Enhances Nitrate/Nitrite Generation by Angiotensin II-exposed Endothelial Cells *Lett Drug Des Discov.* 14:1060-1064, 2017.
- (9) Ishibashi Y, Matsui T, Isami F, Abe Y, Sakaguchi T, Higashimoto Y, Yamagishi SI. N-butanol extracts of *Morinda citrifolia* suppress advanced glycation end products (AGE)-induced inflammatory reactions in endothelial cells through its anti-oxidative properties. *BMC Complement Altern Med.* 17:137-, 2017.
- (10) Yoshida T, Akiba J, Matsui T, Nakamura K, Hisamoto T, Abe M, Ikezono Y, Wada F, Iwamoto H, Nakamura T, Koga H, Yamagishi SI, Torimura T. Pigment Epithelium-Derived Factor (PEDF) Prevents Hepatic Fat Storage, Inflammation, and Fibrosis in Dietary Steatohepatitis of Mice. *Dig Dis Sci.* 62:1527-1536, 2017.
- (11) Matsui T, Higashimoto Y, Nishino Y, Nakamura N, Fukami K, Yamagishi SI. RAGE-Aptamer Blocks the Development and Progression of Experimental Diabetic Nephropathy. *Diabetes.* 66:1683-1695, 2017.
- (12) Ishibashi Y, Matsui T, Nakamura N, Sotokawauchi A, Higashimoto Y, Yamagishi SI. Methylglyoxal-derived hydroimidazolone-1 evokes inflammatory reactions in endothelial cells via an interaction with receptor for advanced glycation end products. *Diabetes Vasc Dis Res.* 14:450-453, 2017.
- (13) Nakamura N, Matsui T, Ishibashi Y, Sotokawauchi A, Fukami K, Higashimoto Y, Yamagishi SI. RAGE-aptamer Attenuates the Growth and Liver Metastasis of Malignant Melanoma in Nude Mice. *Mol Med.* 23:295-306, 2017.
- (14) Sotokawauchi A, Ishibashi Y, Matsui T, Yamagishi SI. Aqueous Extract of Glucoraphanin-Rich Broccoli Sprouts Inhibits Formation of Advanced Glycation End Products and Attenuates Inflammatory Reactions in Endothelial Cells. *Evid Based Complement Altern Med.* 2018:9823141, 2018.
- (15) Taguchi K, Yamagishi SI, Yokoro M, Ito S, Kodama G, Kaida Y, Nakayama Y, Ando R, Yamada-Obara N, Asanuma K, Matsui T, Higashimoto Y, Brooks CR, Ueda S, Okuda S, Fukami K. RAGE-aptamer attenuates deoxycorticosterone acetate/salt-induced renal injury in mice. *Sci Rep.* 8:2686, 2018.
- (16) Kaifu K, Ueda S, Nakamura N, Matsui T, Yamada-Obara N, Ando R, Kaida Y, Nakata M, Matsukuma-Toyonaga M, Higashimoto Y, Fukami K, Suzuki Y, Okuda S, Yamagishi SI. Advanced glycation end products evoke inflammatory reactions in proximal tubular cells via autocrine production of dipeptidyl peptidase-4. *Microvasc*

- (17) Tahara N, Kojima R, Yoshida R, Bekki M, Sugiyama Y, Tahara A, Maeda S, Honda A, Igata S, Nakamura T, Sun J, Matsui T, Fukumoto Y, Matsui T, Yamagishi SI. Serum levels of protein-bound methylglyoxal-derived hydroimidazolone-1 are independently correlated with asymmetric dimethylarginine. Rejuvenation Res. In press(in press), 2019.

〔学会発表〕 (計 11 件)

- (1). 第 89 回日本生化学会大会「終末糖化産物受容体 (RAGE) の DNA アプタマーはラットの糖尿病腎症を改善する」2016 年、松井 孝憲、東元 祐一郎、山岸 昌一
- (2). 第 9 回日本健康医療学会「スルフォラファンとケルセチンの抗糖化作用」2016 年、松井 孝憲、山岸 昌一
- (3). 第 59 回日本糖尿病学会「HUVEC においてグリセルアルデヒド由来ピリジニウム (GLAP) は RAGE を介し酸化ストレスと炎症性・血栓性反応を惹起する」2016 年、松井 孝憲、東元 祐一郎、山岸 昌一
- (4). 第 38 回日本循環制御医学会「終末糖化産物受容体 (RAGE) アプタマーによるラットの糖尿病腎症治療効果」2017 年、松井 孝憲、東元 祐一郎、山岸 昌一
- (5). 第 60 回日本糖尿病学会「終末糖化産物受容体 (RAGE) アプタマーは、糖尿病ラット腎症の発症・進展を抑制する」2017 年松井 孝憲、東元 祐一郎、山岸 昌一
- (6). 第 32 回日本糖尿病合併症学会「終末糖化産物受容体 (RAGE) アプタマーによるラットの糖尿病腎症の阻止」2017 年 (シンポジウム)、松井 孝憲、東元 祐一郎、山岸 昌一
- (7). Cardio Renal Diabetes Conference 2018 「RAGE-aptamer attenuates experimental diabetic nephropathy and growth and metastasis of malignant melanoma.」2018 年、松井 孝憲
- (8). 第 41 回日本分子生物学会「終末糖化産物受容体 (RAGE) のアプタマーは動物の糖尿病腎症の発症・増悪と悪性黒色腫の増殖・転移を阻害する」2018 年、松井 孝憲、中村 信孝、東元 祐一郎、山岸 昌一
- (9). 第 61 回日本腎臓学会「終末糖化産物受容体 (RAGE) アプタマーはラットの糖尿病腎症の発症と進展を抑制する」2018 年、松井 孝憲、山岸 昌一
- (10). 第 61 回日本糖尿病学会「トログリフロジンは尿細管保護効果により 2 型糖尿病マウスの腎障害を改善する」2018 年、松井 孝憲、石橋 祐治、山岸 昌一
- (11). 日本核酸医薬学会第 4 回年会「終末糖化産物受容体 (RAGE) アプタマーは動物モデルの糖尿病腎症の発症・増悪、悪性黒色腫の増殖・転移を抑制する」2018 年、松井 孝憲、中村 信孝、東元 祐一郎、山岸 昌一

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称：RAGE アプタマーおよびその用途

発明者：山岸 昌一、深水 圭、東元 祐一郎、松井 孝憲

権利者：同上

種類：特許

番号：特開 2016-79184

出願年：平成 27 年 10 月 20 日

国内外の別：国内、国外

○取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：東元 祐一郎

ローマ字氏名：(Higashimoto Yuichiro)

所属研究機関名：久留米大学

部局名：医学部化学教室

職名：教授

研究者番号（8桁）：40352124

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：山岸 昌一

ローマ字氏名：(Yamagishi Shoichi)

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。