

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：35307

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06807

研究課題名(和文) 組織リモデリング増悪化分子としての内因性AGEの病態生理と根治的制御法の創成

研究課題名(英文) Study of the pathophysiological significance of endogenous AGE as an exacerbating factor for tissue remodeling, and the development of novel targeted therapy

研究代表者

森 秀治 (MORI, Shuji)

就実大学・薬学部・教授

研究者番号：50220009

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：パターン認識受容体刺激活性を持つDampsやAGEs分子について、結合因子の同定や起炎性複合体形成の有無、その病態生理学的意義について検討した。AGEsを特異リガンドに持った親和性担体を調製し、結合因子の探索を行ったところ、複数個の結合因子の存在が明らかとなった。その組換え体を調製し、炎症性サイトカイン発現応答や産生量への影響を検討したところ、結合因子はDamps誘導性の炎症応答に有意に影響を与えることが明らかとなった。本知見から、Damps複合体形成に伴う炎症応答制御機構が存在する可能性が見出され、炎症の遷延化を伴う組織リモデリング病態の分子理解と新たな創薬標的としての応用性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生活習慣病の増悪化因子としてDampsやAGEs分子による過剰な免疫応答に焦点をあて、それらの生体内活性制御機構の解析研究を実施した。特に、結合因子の同定、起炎性複合体の形成に着目して研究を進めたところ、複数個の結合因子の存在が明らかとなり、これらの結合因子はDamps刺激による炎症応答に対して有意に影響を与えることが明らかとなった。本知見は、Damps複合体形成に伴う炎症応答制御機構の存在の可能性を拓くとともに、組織リモデリング病態の分子理解と新たな治療標的としての応用性を示唆するものである。

研究成果の概要(英文)：We investigated the identification of novel binding factors for Damps or AGEs molecules with the pattern recognition receptors-stimulating activity, the formation of inflammatory complex and their pathophysiological significance. The chromatographic analysis using AGEs-immobilized affinity gel revealed the existence of some binding factors. Recombinant binding factor was shown to affect the damp-induced inflammatory response in macrophage cells. This finding suggests that there is the control mechanism by the complex formation with damp, suggesting the further understanding of tissue remodeling associated with chronic inflammation and its applicability as new drug discovery target.

研究分野：薬理学，応用薬理学

キーワード：炎症 組織リモデリング サイトカイン

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 組織リモデリング病態は、超高齢化社会を迎えた我が国において、心筋梗塞・糖尿病・気管支喘息などの生活習慣病の主要原因と位置付けられ、重度後遺症による介護などの医療損失も極めて甚大である。しかしながら、これら疾患に対する有効な治療法は未だに確立せず、現代医療が取り組むべき最重要課題といえる。組織リモデリング病態は、炎症の慢性化・遷延化に起因した病巣局所での病的な組織構造と機能障害を伴う重篤な難治性疾患であり、これらの発症や増悪化の鍵となる因子を同定し、その作用機構の詳細を解明する事は、これらの疾患の未然防止や新規治療法を開発する上で極めて重要であると考えられる。

(2) 我々は、自然免疫系に働き生体防御において重要な役割を果たすことが知られる単球/マクロファージ系細胞の機能制御研究の過程で、Damps と称される一連の分子群が生活習慣病に代表される様々な組織リモデリング病態の形成に深く関与していることを示す知見を得ていた。一般的に、Damps 分子は細胞膜上に発現しているパターン認識受容体を刺激することによって、起炎性を発揮する分子とされ、炎症惹起のみならず組織再生等にも重要な働きをしている分子である。しかしながら、Damps による過剰な炎症応答は、組織リモデリング病態の発症や増悪化を招く可能性があり、過去に我々は脳梗塞モデル動物を用いた組織リモデリング病態の解析研究において、病態発症時に病巣局所に代表的 Damps である HMGB1 が出現し、過剰な炎症応答を惹起することによって病態の増悪化に深く関わっている事を見出している。一方、Damps 受容体として知られるパターン認識受容体には RAGE や TLR 受容体などが知られ、作用リガンドとして HMGB1 以外にも糖尿病などの生活習慣病の際に糖化反応の増大に伴って高産生される終末糖化産物 (AGEs, advanced glycation end products) などが存在している。

(3) AGEs は、還元糖(または糖代謝物)による生体内糖化反応によって生成される起炎性因子であり、RAGE などのパターン認識受容体を刺激することによって炎症応答を引き起こし、生活習慣病などの慢性炎症性疾患の増悪化に関与することが示唆されている。しかしながら、病態局所において AGEs と相互作用し得る因子の存在に関してはほとんど不明であり、AGEs 誘導性炎症応答の制御機構、起炎性複合体の有無、その病態生理学的意義については、未だに詳細は不明である。従って、組織リモデリングに関わる Damps や AGEs と相互作用し得る生体因子の同定と機能制御の検討を行うことは、組織リモデリング病態に対する新規治療法を開発する上で極めて意義あるものであると考えられた。

## 2. 研究の目的

(1) 脳梗塞や糖尿病などの組織リモデリング病態は、我が国の死因上位を占め、いったん発症してしまうと再発リスクも極めて高く、医療的・社会的な損失も甚大であり、その治療法開発が切望されている。我々は組織リモデリング病巣局所に Damps などの起炎性分子が出現し、免疫系を過剰亢進させることによって病巣拡大・増悪化に大きく関与している事を見出しており、病巣局所での存在様式と機能制御機構の解明を通じた全体像を明らかにする事が新たな治療法に通じる極めて重要な研究課題であることを痛感している。

(2) この様な背景の下、本研究では、Damps や AGEs の存在様式の解明、すなわちこれら分子をコアとする細胞外複合体の形成分子群を同定し、複合体形成因子どうしの相互作用に基づいた炎症応答制御機構を解明し、組織リモデリング病態の治療法開発に有望な新規分子標的の解明を目指すことを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) AGEs 親和性に基づいた複合体形成因子の探索: 表面にアミノ基を持つ不溶性担体に糖代謝物を加え、無菌条件下で 37℃ で 7 日間懸濁することによって、担体表面に糖化反応を施し、AGEs 分子を特異リガンドとする親和性担体 (AGEs 化担体) を調製した。AGEs 化担体を組織抽出液に加え、4℃ で 12 時間反応させた。大容量 PBS による洗浄によって非結合因子を除いた後、高塩濃度溶液を用いて段階的溶出を行う事で、AGEs 結合因子画分を回収した。この画分を SDS-PAGE ゲル電気泳動で分離した後、銀染色ならびに染色部分のゲル切り出しを行い、質量分析にかけて AGEs 結合因子の同定を行った。

(2) ゲノム編集を用いたパターン認識受容体欠損細胞株の作製：マクロファージ系細胞株が発現している3種類の代表的なパターン認識受容体 (TLR-4, TLR-2, RAGE) の crRNA をあらかじめ作製し, TracrRNA ならびに Cas9 と混合して, 細胞株にエレクトロポレーション法にて細胞導入を行った。上記受容体の遺伝子発現を失った細胞株を選別し, 最終的に3種の受容体を欠損させた細胞株を確立した。この欠損株を Damps, AGEs や AGEs 結合因子で刺激し, その細胞応答の変化を検討した。

(3) 複合体形成ならびに相互作用に基づいた炎症応答制御機構の解明：Damps, AGEs, AGEs 結合因子による複合体形成を明らかにし, 複合体形成に伴う炎症応答の変化について解析を進めた。実際には, マクロファージ系細胞株ならびにパターン認識受容体欠損株を用いて, 種々の細胞応答 (炎症性サイトカイン発現応答など) について検討し, その病態生理学的意義を明らかにした。

#### 4. 研究成果

(1) AGEs 化担体を用いた親和性クロマトグラフィーの結果, 複数個の結合因子の存在が明らかとなった。一次配列に基づいて, これら因子群の組換え体 (LPS フリー体) を調製し, 機能解析に供した。

(2) ゲノム編集技術を用いて, RAGE をはじめとする複数個のパターン認識受容体を欠損させた細胞株を構築することに成功した。これらの受容体を欠損させることによって, 炎症性サイトカイン発現を指標にした Damps 等に対する応答性は消失 (もしくは低下) することも明らかとなった。

(3) 結合因子の組換え体 (LPS フリー体) を調製し, 上記細胞株における炎症性サイトカインの遺伝子発現応答や産生量変化などを検討したところ, 結合因子は Damps や AGEs 誘導性の炎症応答に対して有意に影響を与えることが見出された。加えて, この現象には直接的結合に伴う相互作用, すなわち Daps-AGEs - 結合因子からなる機能的複合体の形成が関与していることも明らかとなった。本知見から, 複合体形成に伴う炎症応答制御機構が存在する可能性が見出され, このことより組織リモデリング病態における新たな創薬標的としての応用性が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Watanabe M, Toyomura T, Wake H, Liu K, Teshigawara K, Takahashi H, Nishibori M, Mori S	4. 巻 66
2. 論文標題 The C-terminal region of tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis is required for interaction with advanced glycation end products	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biotechnol Appl Biochem	6. 最初と最後の頁 254-260
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/bab.1706	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Watanabe M, Toyomura T, Tomiyama M, Wake H, Liu K, Teshigawara K, Takahashi H, Nishibori M, Mori S	4. 巻 47
2. 論文標題 Advanced glycation end products (AGEs) synergistically potentiated the proinflammatory action of lipopoly- saccharide (LPS) and high mobility group box-1 (HMGB1) through their direct interactions	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Mol Biol Rep	6. 最初と最後の頁 7153-7159
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11033-020-05783-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nishinaka T, Mori S, Yamazaki Y, Niwa A, Wake H, Yoshino T, Nishibori M, Takahashi H	4. 巻 17
2. 論文標題 A comparative study of sulphated polysaccharide effects on advanced glycation end-product uptake and scavenger receptor class A level in macrophages	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Diab Vasc Dis Res	6. 最初と最後の頁 14791
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/1479164119896975	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Watanabe M, Toyomura T, Wake H, Liu K, Teshigawara K, Takahashi H, Nishibori M, Mori S	4. 巻 67
2. 論文標題 Differential contribution of possible pattern-recognition receptors to advanced glycation end product-induced cellular responses in macrophage-like RAW264.7 cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biotechnol Appl Biochem	6. 最初と最後の頁 265-272
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/bab.1843	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nishibori M, Mori S, Takahashi HK	4. 巻 140
2. 論文標題 Anti-HMGB1 monoclonal antibody therapy for a wide range of CNS and PNS diseases	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Pharmacol Sci	6. 最初と最後の頁 94-101
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jphs.2019.04.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Okuma Y, Wake H, Teshigawara K, Takahashi Y, Hishikawa T, Yasuhara T, Mori S, Takahashi HK, Date I, Nishibori M	4. 巻 122
2. 論文標題 Anti-High Mobility Group Box 1 Antibody Therapy May Prevent Cognitive Dysfunction After Traumatic Brain Injury	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 World Neurosurg	6. 最初と最後の頁 e864-e871
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.wneu.2018.10.164	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hamasaki S, Kobori T, Yamazaki Y, Kitaura A, Niwa A, Nishinaka T, Nishibori M, Mori S, Nakao S, Takahashi H	4. 巻 8
2. 論文標題 Effects of scavenger receptors-1 class A stimulation on macrophage morphology and highly modified advanced glycation end product- protein phagocytosis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 5091
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-24325-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 森 秀治, 渡邊政博, 和氣秀徳, 劉克約, 勅使川原匡, 高橋英夫, 西堀正洋, 豊村隆男
2. 発表標題 AGEs結合因子の単離とAGEs-RAGE結合抑制領域の同定
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 森 秀治, 渡邊政博, 和氣秀徳, 劉克約, 勅使川原匡, 高橋英夫, 西堀正洋, 豊村隆男
2. 発表標題 AGEs結合因子の単離と受容体遮断領域の探索研究
3. 学会等名 第41回日本炎症・再生医学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 豊村隆男, 渡邊政博, 和氣秀徳, 勅使川原匡, 劉克約, 高橋英夫, 西堀正洋, 森 秀治
2. 発表標題 AGEsによるマクロファージの増殖亢進効果
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Mori S, Watanabe M, Wake H, Teshigawara K, Liu K, Takahashi H, Nishibori M, Toyomura T
2. 発表標題 Advanced glycation end products interact with lactoferrin, and change the lactoferrin- stimulated proinflammatory cytokine response
3. 学会等名 9th International DAMPs and Alarmins symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 豊村隆男, 渡邊政博, 和氣秀徳, 勅使川原匡, 劉克約, 高橋英夫, 西堀正洋, 森 秀治
2. 発表標題 終末糖化産物による炎症応答と細胞増殖反応
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渡邊政博, 豊村隆男, 和氣秀徳, 劉克約, 勅使川原匡, 高橋英夫, 西堀正洋, 森 秀治
2. 発表標題 AGEs と炎症関連分子の共存が炎症反応に与える変化の検討
3. 学会等名 第136回日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 豊村隆男, 渡邊政博, 和氣秀徳, 勅使川原匡, 劉克約, 高橋英夫, 西堀正洋, 森 秀治
2. 発表標題 終末糖化産物AGE2による細胞増殖効果と遺伝子発現解析
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森 秀治, 渡邊政博, 和氣秀徳, 勅使川原匡, 劉克約, 高橋英夫, 西堀正洋, 豊村隆男
2. 発表標題 AGEs - Lf相互作用に基づく炎症性サイトカイン応答の変化
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渡邊政博, 豊村隆男, 和氣秀徳, 劉克約, 勅使川原匡, 高橋英夫, 西堀正洋, 森 秀治
2. 発表標題 AGEsとDAMPsの協調作用の検討
3. 学会等名 第58回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森 秀治, 渡邊政博, 和氣秀徳, 勅使川原匡, 劉克約, 高橋英夫, 西堀正洋, 豊村隆男
2. 発表標題 AGEs結合因子の分子同定と炎症性サイトカイン発現応答への影響
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	豊村 隆男  (TOYOMURA Takao)  (40425137)	就実大学・薬学部・講師   (35307)	
研究分担者	渡邊 政博  (WATANABE Masahiro)  (10758246)	就実大学・薬学部・講師   (35307)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------