

令和 4 年 6 月 26 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09086

研究課題名(和文) 終末糖化産物受容体阻害アプタマーの敗血症への臨床応用

研究課題名(英文) Effects of DNA Aptamer Raised Against RAGE on Sepsis in Mice

研究代表者

古賀 義法 (Koga, Yoshinori)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：70569433

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)：本研究は敗血症に対する新規治療を開発するため、RAGEのリガンド結合部位を阻害する核酸医薬：RAGE-aptamerをLPS投与敗血症マウスに投与し、RAGEを標的とした障害の進展を抑制できるかどうかを検討した。その結果、RAGE-aptamerはHMGB1-RAGEの相互作用を阻害することにより、敗血症マウスの炎症反応と多臓器障害を一部抑制し、生存率を向上させることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

RAGEに結合する炎症性リガンドを、核酸医薬：RAGEアプタマーを用いてその結合を阻害することで、敗血症モデル動物の死亡率が抑えられることを明らかにした。敗血症により世界中で年間500万人以上が死亡していると推定されているが、有効性の高い治療法はまだ確立していない。今回の研究成果により、RAGEを標的とした重症感染症による敗血症に対して、RAGEアプタマーが新しい治療手段になる可能性を示唆することが出来た。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined whether and how RAGE-aptamer could improve survival rate and organ damage in LPS-injected septic mice. RAGE-aptamer significantly improved sepsis score at 8 hours after LPS injection and survival rate at 24 hours (70%) in septic mice compared with LPS+vehicle- or LPS+control-aptamer-treated mice. RAGE-aptamer treatment significantly decreased the expression of p-NF- κ B p65, an active form of redox-sensitive transcriptional factor, NF- κ B, and gene or protein expression of TNF- α , IL-1 β , IL-6, and HMGB1 in serum, peripheral monocytes, and kidneys of septic mice in association with the reduction of oxidative stress and improvement of metabolic acidosis, renal and liver damage. Our present study suggests that RAGE-aptamer could attenuate multiple organ damage in LPS-injected septic mice partly by inhibiting the inflammatory reactions via suppression of HMGB1-RAGE interaction.

研究分野：外科学

キーワード：RAGE 核酸医薬 RAGEアプタマー 敗血症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

小児の重症敗血症は、小児 ICU において有病率は 8.2%、院内死亡率は 25%と報告されており、極めて予後不良な疾患である。しかし、国内外において敗血症に関する様々なメディエーターに介入する大規模臨床試験が行われているが、重症敗血症の死亡率を改善させる有効な治療法はいまだ見つかっていない。近年、敗血症の重症化における遅発性の致死性メディエーターとして、high mobility group box 1(以下 HMGB1)が同定され、RAGE を介して炎症を惹起し広範な臓器障害を引き起こすことが知られている。さらに最近になって、敗血症では S100 蛋白や終末糖化産物 (Advanced Glycation End Products 以下 AGEs)などの HMGB1 以外の RAGE リガンドの血中レベルが上昇し、これらも敗血症の重症化に関与していることが報告されている。一方われわれはこれまでに、RAGE に対して抑制的に働くアンタゴニスティックアプタマーを世界で初めて開発し、慢性疾患である 1 型糖尿病ラットに投与することで、糖尿病性腎症の発症、進展を抑えることを見出した。さらに、動物モデルにおいて RAGE アプタマーが RAGE を抑制することで、悪性黒色腫や糖尿病性腎症、糖尿病性網膜症、バルーン障害後の血管再狭窄、血管内皮障害などに対して治療効果を示すことを報告してきた。その過程で、急性疾患である敗血症において、RAGE を標的として阻害できれば RAGE を介する炎症反応を抑制し、包括的に敗血症の重症化を抑制することによって、当該アプタマーを用いた新しい敗血症治療薬の開発にも道が開けるのではないかと着想するに至り、研究を開始した。

2. 研究の目的

本研究は、RAGE のリガンド結合部位に作用する、RAGE 阻害活性アンタゴニスティックアプタマー (RAGE アプタマー) を LPS 投与敗血症モデル動物に投与し、臓器障害と予後を改善できるかを検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1)敗血症モデルマウスの作成：マウスに敗血症を引き起こす最適な LPS の投与量を決定するために、8 週齢の雄性 BALB/c に Lipopolysaccharides E.coli 0111:B4 (以下 LPS) を腹腔内投与 (15,20,30 $\mu\text{g/g-BW}$ 各群 $n=10$) し、敗血症スコアと生存率に及ぼす影響について検討した。LPS の注射後、マウスを 2 時間ごとに 24 時間観察し、動物用敗血症スコアリングシステムにより敗血症スコアを評価及び解析し投与量を決定した。

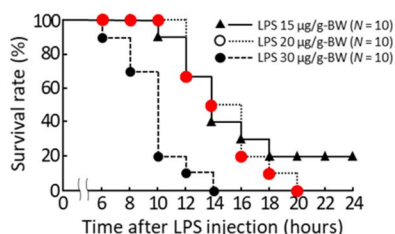
(2)敗血症モデルマウスに対する RAGE アプタマーの評価：敗血症マウスに対する RAGE アプタマーの効果を調べるため、8 週齢の雄性 BALB/c に LPS (20 $\mu\text{g/g-BW}$ $n=10$) 腹腔内投与し、その 5 分後に Control アプタマー (40 pmol/g-BW) または RAGE アプタマー (2,10,20,40 pmol/g-BW) を敗血症モデルマウスに腹腔内投与した。対照マウスには生理食塩水を 5 分間隔で 2 回投与した。評価として、敗血症スコアと生存率、血液ガス、血液生化学検査 (AST/ALT, BUN/Cr, LDH), NADPH oxidase, NF- κ B, Cytokine (HMGB1, TNF, IL-1, IL-6), 尿中 8-OHdG, 血中単核球と腎臓の遺伝子発現及び腎臓と肝臓の組織学的検討を行った。

(3)ヒト単球系細胞：THP-1 細胞に対する RAGE アプタマーの評価：THP1 細胞に対する RAGE アプタマーの効果を調べるため、5%FBS を添加した RPMI-1640 培地で培養された THP-1 細胞を 1×10^6 cell/ml の密度でプレートに播種し、RAGE アプタマー (2,20,200nM) または Control アプタマー (200nM) を添加後に LPS (100ng/ml) または生理食塩水で刺激した。評価として、NADPH oxidase, 8-OHdG, NF- κ B, Cytokine (HMGB1, TNF, IL-1, IL-6), ROS generation の測定及び MTT アッセイを行い、RAGE アプタマーの効果を検討した。

4. 研究成果

(1) 敗血症モデルマウス作成のための至適 LPS 投与量の決定：8 週齢の雄性 BALB/c に LPS を腹腔内投与 (15,20,30 $\mu\text{g/g-BW}$ 各群 $n=10$) し、敗血症スコアと生存率を評価した。その結果、8 時間時点の生存曲線 (図 1 A) と敗血症スコア (図 1 B) が最も負の相関となっている 20 $\mu\text{g/g-BW}$ を投与量として選択した。

図 1 A:カプランマイヤー生存曲線



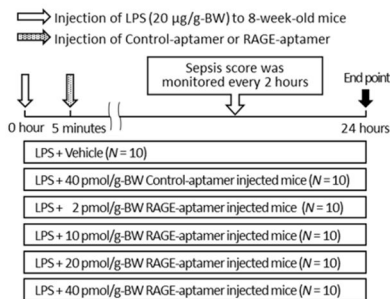
B:8時間時点の敗血症スコア

LPS dosage	8-week-old mice		
	15 $\mu\text{g/g-BW}$	20 $\mu\text{g/g-BW}$	30 $\mu\text{g/g-BW}$
Number	10	10	10
BW (g)	26.8 (0.9)	26.6 (0.9)	25.7 (1.4)
Sepsis score	10.0 (1.8)	9.5 (2.0)	17.4 (1.6)
HR	1.52	2.6	0.95
95% CI on HR	1.02, 2.52	1.37, 6.31	0.06, 13.92
P value	0.039	0.012	0.970

Data are presented as mean (standard deviation). LPS: lipopolysaccharide; BW: body weight; HR: hazard ratio; CI: confidence interval.

(2) 敗血症モデルマウスに対する RAGE アプタマー投与後の敗血症スコアと生存率の評価：8 週齢の雄性 BALB/c に LPS (20 μ g/g-BW n=10) 腹腔内投与し, その 5 分後に Control アプタマー (40 pmol/g-BW) または RAGE アプタマー (2, 10, 20, 40 pmol/g-BW) を腹腔内投与した. 対照マウスには生理食塩水を 5 分間隔で 2 回投与した (図 2 A). その結果, 40 pmol/g-BW の RAGE-apptamer 投与群は, Control アプタマー群と比較し生存率と LPS 投与後 8 時間の敗血症スコアを有意に改善した (図 2 B).

図2 A:各群におけるRAGE-apptamer投与量



B:カプランマイヤー生存曲線と敗血症スコア

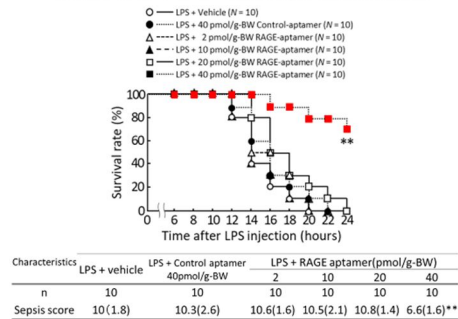


図3 血液ガス分析と血液生化学検査

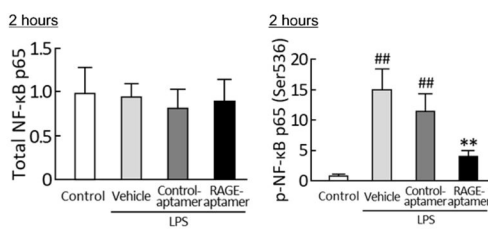
(3) 敗血症モデルマウスに対する RAGE アプタマーの投与後の血液ガス分析及び血液生化学検査の評価：RAGE アプタマーを投与した敗血症モデルマウスの動脈血と血清を採取し評価した. その結果, RAGE アプタマーを投与した敗血症モデルマウスでは, アシドーシスと腎機能(BUN/Cr)及び肝酵素(AST/ALT)の上昇を有意に改善した (図 3).

Characteristics	Control		8-week-old mice			
	9	9	LPS+vehicle 9	LPS-control aptamer 9	LPS-RAGE-apptamer 9	LPS-RAGE-apptamer 9
Number	9	9	154.9 (34.3)**	145.8 (32.6)**	115.0 (35.7)	115.0 (35.7)
PaO ₂ (Torr)	83.7 (10.5)	83.7 (10.5)	154.9 (34.3)**	145.8 (32.6)**	115.0 (35.7)	115.0 (35.7)
PaCO ₂ (Torr)	31.9 (3.5)	31.9 (3.5)	34.1 (8.9)	34.4 (6.3)	34.4 (6.9)	34.4 (6.9)
HCO ₃ ⁻ (mmol/l)	17.6 (0.9)	17.6 (0.9)	10.3 (1.7)**	10.7 (1.4)**	12.4 (0.9)**	12.4 (0.9)**
pH	7.32 (0.02)	7.32 (0.02)	7.08 (0.05)**	7.08 (0.05)**	7.14 (0.03)**	7.14 (0.03)**
Base excess (mEq/l)	-8.9 (1.2)	-8.9 (1.2)	-19.9 (3.2)**	-19.3 (2.5)**	-16.2 (1.5)*	-16.2 (1.5)*
Lactate (mmol/l)	1.7 (0.2)	1.7 (0.2)	3.6 (0.8)**	3.6 (0.9)**	2.2 (0.4)**	2.2 (0.4)**
Anion gap	21.7 (3.0)	21.7 (3.0)	34.1 (2.3)**	29.6 (2.2)**	24.2 (2.9)**	24.2 (2.9)**
Sodium (mEq/l)	149.2 (2.3)	149.2 (2.3)	152.0 (5.8)	150.6 (3.0)	149.6 (1.8)	149.6 (1.8)
Potassium (mEq/l)	4.7 (0.5)	4.7 (0.5)	6.1 (0.8)	6.0 (0.9)	6.4 (1.2)	6.4 (1.2)
Chloride (mEq/l)	109.9 (3.5)	109.9 (3.5)	107.6 (4.5)	110.2 (2.6)	112.9 (3.5)	112.9 (3.5)
Number	7	7	7	7	7	7
RBC ($\times 10^7/l$)	10.4 (0.4)	10.4 (0.4)	11.5 (0.4)**	11.2 (1.0)**	11.0 (0.3)	11.0 (0.3)
WBC ($\times 10^6/l$)	4.4 (1.6)	4.4 (1.6)	2.3 (0.6)**	2.1 (0.8)**	1.7 (0.6)	1.7 (0.6)
Hemoglobin (mg/dl)	15.4 (1.0)	15.4 (1.0)	17.4 (0.7)**	17.3 (1.4)**	16.4 (0.4)	16.4 (0.4)
Platelets ($10^7/mm^3$)	39.0 (5.3)	39.0 (5.3)	20.7 (2.1)**	20.0 (4.5)**	27.7 (5.8)**	27.7 (5.8)**
BUN (mg/dl)	23.1 (1.3)	23.1 (1.3)	60.2 (5.9)**	65.7 (6.3)**	33.9 (13.3)**	33.9 (13.3)**
Creatinine (mg/dl)	0.26 (0.06)	0.26 (0.06)	0.70 (0.23)**	0.73 (0.27)**	0.32 (0.11)**	0.32 (0.11)**
AST (U/l)	38.1 (4.0)	38.1 (4.0)	165.6 (59.8)**	180.9 (55.1)**	89.7 (26.6)**	89.7 (26.6)**
ALT (U/l)	58.7 (18.8)	58.7 (18.8)	123.0 (10.6)**	143.0 (25.2)**	77.1 (29.7)**	77.1 (29.7)**
LDH (U/l)	1201.7 (561.7)	1201.7 (561.7)	1583.4 (1028.9)	1249.1 (326.6)	1088.0 (398.4)	1088.0 (398.4)

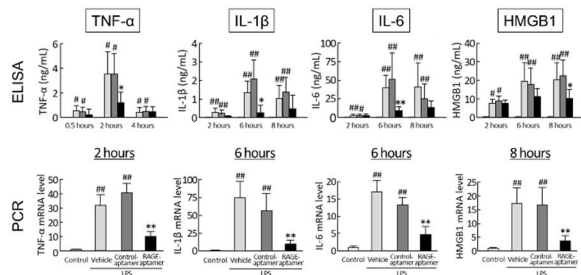
Data are presented as mean (SD). # and ##, $P < 0.05$ and $P < 0.01$ compared with Control mice, respectively. * and **, $P < 0.05$ and $P < 0.01$ compared with mice received LPS+Control-apptamer, respectively. †, $P < 0.05$ compared with mice received LPS+Vehicle.

(4) 敗血症モデルマウスに対する RAGE アプタマー投与後の末梢血単核球における NF- κ B のリン酸化と血中サイトカインの評価：末梢血から単核球を分離し, NF- κ B のリン酸化を定量した結果, RAGE アプタマーは, 敗血症モデルマウスの末梢血単核球における 2 時間時点の NF- κ B のリン酸化を抑制した (図 4 A). 次に血中サイトカインの定量と分離単核球における遺伝子発現を評価し, RAGE-アプタマーは敗血症モデルマウスの TNF (2 時間), IL1- (6 時間), IL-6 (6 時間), HMGB1 (8 時間)の血中レベルと, 末梢血単核球における遺伝子発現を改善した (図 4 B).

図4 A:末梢血単核球におけるNF- κ Bの定量

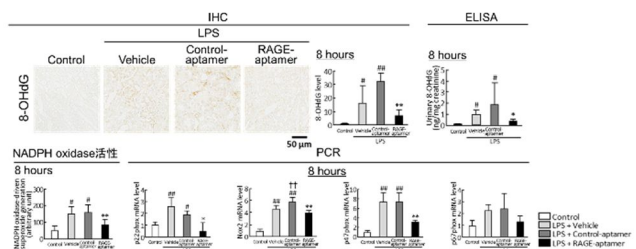


B:血中サイトカインの定量と単核球における遺伝子発現



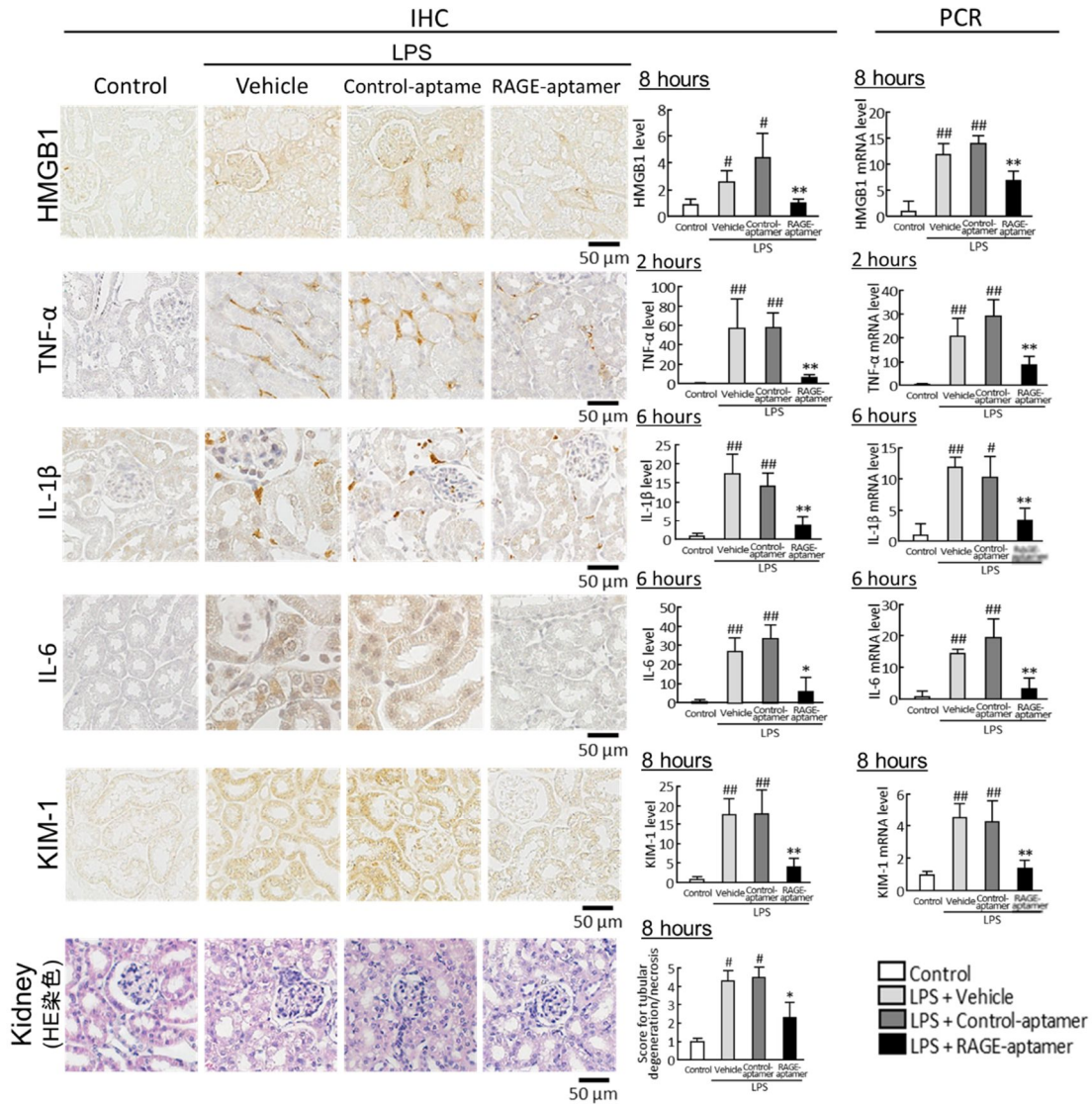
(5) 敗血症モデルマウスに対する RAGE アプタマーの腎臓における酸化ストレスの改善効果：敗血症モデルマウスに RAGE アプタマーを投与し腎臓における酸化ストレスの評価を行った. 結果, 腎臓における 8 時間時点の 8-OHdG や NADPH オキシターゼ活性などの酸化ストレスの増悪を改善し, 関連遺伝子である p22phox, Nox2, p47phox の発現を抑制していた (図 5).

図5 腎臓における酸化ストレスの評価



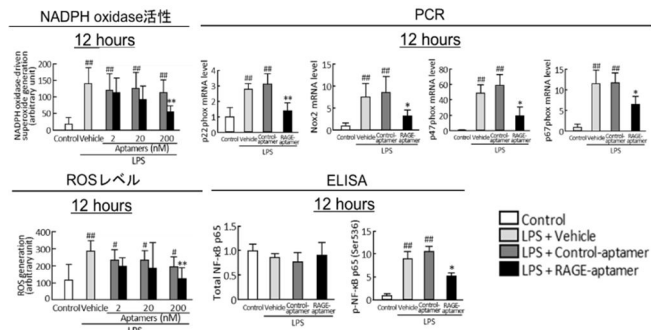
(6) 敗血症モデルマウスに対する RAGE アプタマー投与後の腎臓と肝臓における組織学的評価と遺伝子発現の評価：腎臓における HMGB1, TNF, IL-1, IL-6, KIM-1 の発現と近位尿細管の空胞化面積を評価した。結果, RAGE-apta- mer 投与群は, 腎臓における HMGB1 (8 時間), TNF (2 時間), IL-1 (6 時間), IL-6 (6 時間) と同時間における遺伝子発現の改善を有意に認めた。また RAGE アプタマー投与群は 8 時間時点の近位尿細管障害の程度を示す KIM-1 と近位尿細管の空胞化および肝臓のネクロシス面積の改善も有意に認めた (図 6)。

図6 腎臓における組織学的評価と遺伝子発現



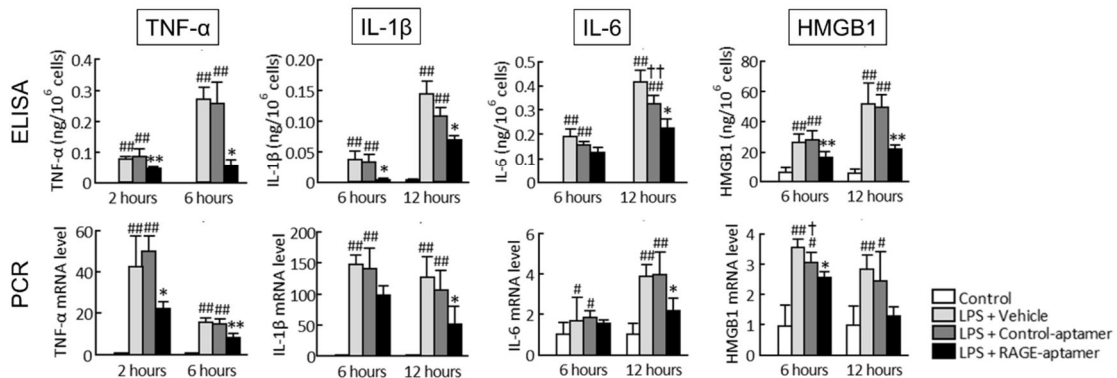
(7) LPS 刺激 THP-1 細胞に対する RAGE アプタマー投与後の酸化ストレスの改善と NF- κ B リン酸化の評価：LPS 刺激 THP1 細胞において RAGE アプタマーの評価を行った。その結果, RAGE アプタマーは 200nM において, ROS レベルや NADPH オキシターゼ活性などの酸化ストレスの増悪を有意に改善し, 関連遺伝子である p22phox, Nox2, p47phox, p67phox の発現を有意に抑制していた。また NF- κ B のリン酸化も有意に抑制した (図 7)。

図7 THP1における酸化ストレスとNF- κ Bの評価



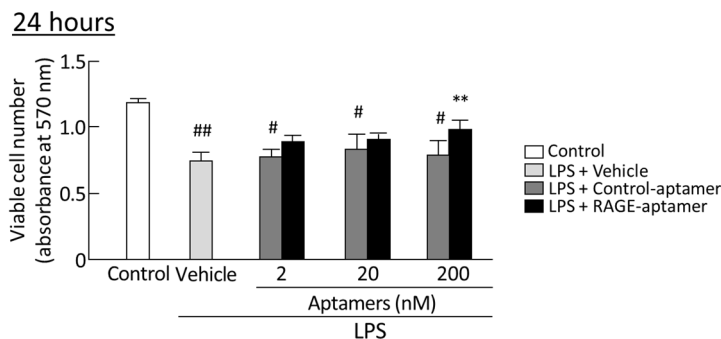
(8) LPS 刺激 THP-1 細胞に対する RAGE アプタマー投与後の炎症性サイトカインの定量と遺伝子発現の評価：LPS 刺激 THP-1 細胞に対して RAGE-aptamer は 200nM において、TNF (2 時間), IL1- (6・12 時間), IL-6 (12 時間), HMGB1(6・12 時間)のレベルの有意な抑制を認めた.また TNF (6・12 時間), IL1- (12 時間), IL-6 (12 時間), HMGB1(6 時間)における遺伝子発現の有意な抑制を認めた(図 8).

図8 THP1における炎症性サイトカインの定量と遺伝子発現



(9) LPS 刺激 THP-1 細胞に対する RAGE アプタマー投与後の細胞生存率の評価：LPS 刺激下 THP1 細胞の生存率を MTT アッセイで評価した.その結果,RAGE-aptamer は 200nM において,THP1 細胞の細胞死を有意に抑制した(図 9).

図9 THP1におけるLPS刺激下の細胞死の評価



(10)まとめと今後の展望

われわれは、極めて予後不良の疾患である敗血症を増悪させる終末糖化産物受容体に対するアンタゴニスティックアプタマーを敗血症に対する治療手段として作製し、敗血症モデル動物の予後を改善することを報告した。その過程で、RAGE アプタマーを投与された敗血症モデル動物では腎機能障害が改善されることを見出した。この結果から、RAGE アプタマーが RAGE を標的とした敗血症性急性腎障害の進展を抑制できることが予想される。今後は腎臓をターゲットに研究を継続し、敗血症モデル動物の敗血症性急性腎障害が抑制され予後が改善されれば、当該アプタマーを用いた新しい敗血症治療戦略に道が開けると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yoshinori Koga , Ami Sotokawauchi , Yuichiro Higashimoto , Yuri Nishino , Naoki Hashizume , Tatsuyuki Kakuma , Jun Akiba , Yoshiaki Tanaka , Takanori Matsui , Minoru Yagi , Sho-ichi Yamagishi	4. 巻 -
2. 論文標題 DNA-Aptamer Raised against Receptor for Advanced Glycation End Products Improves Survival Rate in Septic Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Oxidative Medicine and Cellular Longevity	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2021/9932311	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 古賀 義法、松井 孝憲、田中 芳明、八木 実、山岸 昌一
2. 発表標題 敗血症における終末糖化産物受容体阻害薬の臨床応用
3. 学会等名 第57回 日本小児外科学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 古賀 義法、松井 孝憲、田中 芳明、八木 実、山岸 昌一
2. 発表標題 終末糖化産物受容体阻害アプタマーの敗血症への臨床応用
3. 学会等名 日本外科代謝栄養学会第56回学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoshinori Koga , Ami Sotokawauchi , Yuichiro Higashimoto , Takanori Matsui , Minoru Yagi , Sho-ichi Yamagishi
2. 発表標題 Aptamer Raised Against Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE) Improves Survival Rate in Septic Mice
3. 学会等名 (International Symposium on Pediatric Surgical Research (国際学会))
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	松井 孝憲 (Matui Takanori) (10425233)	久留米大学・医学部・准教授 (37104)	

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
---------	---------