

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06475

研究課題名(和文) 終末糖化産物阻害アプタマーによる老年病の包括的な制御

研究課題名(英文) Evaluation of DNA aptamer raised against advanced glycation end products on comprehensive prevention of aging-related disorders

研究代表者

山岸 昌一 (Yamagishi, Shoichi)

昭和大学・医学部・教授

研究者番号：40281026

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)：終末糖化産物(AGEs)は糖化蛋白で、加齢や糖尿病によって促進的に形成され、AGEs受容体(RAGE)への結合を介して酸化ストレスや炎症を惹起し、糖尿病合併症の発症と進展に関わることが明らかとなりつつある。糖尿病では健康寿命・寿命共に短縮することが報告されているが、AGEs-RAGE系が関わっているかどうかは明らかではない。本研究では、寿命が著しく短縮する高脂肪食負荷の肥満糖尿病モデルマウスを用い、RAGEを阻害するDNAアプタマーを投与する事で、糖尿病性腎症が抑制されるとともに、生存期間の向上がみられることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日本では、成人の6人に1人が糖尿病あるいはその予備軍であると報告されており、人口の高齢化によってこの割合はさらに増加していくと予想される。このため、糖尿病による寿命および健康寿命の短縮への対策は重要な問題である。DNAアプタマーは核酸医薬で、抗体医薬品に比べて安価で、大量に調整もできることから、次世代のバイオ医薬品として注目を集めている。DNAアプタマーを用いることで、これまでには不可能とされたAGEs-RAGE系の特異的な阻害を行うことが可能となった。本研究から、糖尿病における腎障害および寿命に対するRAGE阻害DNAアプタマーの有用性が示され、新たな治療法の開発につながると予想される。

研究成果の概要(英文)：Diabetes has been shown to be associated with decreased life and health life expectancy. Advanced glycation end products (AGEs) are formed through a non-enzymatic glycation reaction of proteins, the process of which can be accelerated by aging or diabetes. Many studies have revealed that AGEs are involved in the pathogenesis of diabetic complications. However, it remains unclear whether AGEs are associated with decreased life and health life expectancy in diabetes. Recently, we developed DNA aptamers that can inhibit toxic effects of AGEs through directly binding to AGEs or receptor for AGEs (RAGE). In this study, we administrated these aptamers to high fat-fed db/db mice, a model of obesity-induced diabetes with shortened life span. We found that, compared to control aptamer, RAGE inhibitory DNA aptamer prevented kidney damage and improved survival in this model.

研究分野：糖尿病

キーワード：終末糖化産物 RAGE 糖尿病 アプタマー

1. 研究開始当初の背景

近年、生活・食習慣の欧米化や高齢化に伴い、糖尿病や肥満、メタボリックシンドロームの患者が増加している。糖尿病患者では、大小血管合併症、癌、骨粗鬆症、アルツハイマー病、非アルコール性脂肪性肝炎などの老年疾患のリスクが上昇し、健康寿命だけでなく、実寿命も著しく短くなることが報告されている。未曾有の高齢化社会を迎えた我が国においては、健康寿命の延伸は国を挙げて取り組まなければならない喫緊の課題ではあるが、糖尿病とそれに伴う各種合併症の増加は、健康長寿社会の実現に対して大きな障壁となっている。しかし、発想を逆転させれば、糖尿病は老化を加速してしまう、いわばモデル疾患だとの考え方も成り立ち、糖尿病には、多岐にわたる老年疾患のリスクを同時に高めてしまう共通の分子基盤が存在するとも推察される。

我々は、これまでに、糖尿病・加齢・肥満に伴って、生体内で促進的に生成される AGEs が、細胞表面受容体である RAGE を介して認識され、酸化ストレスや炎症反応を惹起することで、糖尿病血管合併症、癌の増殖・転移、骨粗鬆症、アルツハイマー病等の多くの老年病に関わることを培養細胞、モデル動物の実験系で明らかにしてきた (Nature 2000;404:787-90, J Clin Invest 2001;108:261-8, FASEB J 2002;1928-30, Kidney Int 2003;63:464-73, J Invest Dermatol 2004;122:461-7, J Biol Chem 2006;281:20213-20, Diabetologia 2006;49:3094-99.)。また、我々は世界で初めて簡易な AGEs 測定系の確立に成功し、糖尿病や食・生活習慣の歪みなどによって生成、蓄積された AGEs が、各種老年病の疾患活動度と相関し、将来の死亡リスクを予測するバイオマーカーにもなりうることも報告してきている (Diabetes Metab Res Rev 2008;24:109-14, Diabetes Care 2012;35:2618-25, Rejuvenation Res 2012;15:564-72, J Clin Endoc Metab 2015;100:E739-47, Int J Cardiology 2015;185:263-8.)。以上の事実は、(1)糖尿病では AGEs の生成、蓄積が亢進し、健康寿命が損なわれること、(2)AGEs とその受容体 RAGE を標的とすることで多岐にわたる老年病を包括的に制御、治療できる可能性があることを示唆している。

我々は、これまでに AGEs に特異的に結合する DNA アプタマーや RAGE に対して阻害的に作用する DNA アプタマーの開発に世界で初めて成功し、それぞれのアプタマーの投与により、糖尿病モデル動物の腎症、ヌードマウスにおけるメラノーマの増殖・転移、バルーン障害後の血管リモデリングなどが抑えることを見出してきた (Diabetes 2013;62:3241-50, Int J Cardiol 2014;171:443-6, Lab Invest 2014;94:422-9, Diabetes 2017;66:1683-95, Mol Med 2017;23:295-306.)。しかしながら、高脂肪食の負荷により老化が加速した肥満糖尿病マウス (db/db マウス) において、AGEs-RAGE 系の阻害が包括的に腎症やインスリン抵抗性を抑え、当該動物の寿命を延長できるかどうかは明らかでない。

2. 研究の目的

本研究は、老化が加速し寿命が短縮する糖尿病において、DNA アプタマーを用いた AGEs-RAGE 系の制御が糖尿病合併症を包括的に制御し、寿命を延長させる新しい治療手段となり得るかどうか、という学術的な問いに答えを出そうとするものである。そのために、本研究では、AGEs 中和 DNA アプタマーと RAGE 阻害 DNA アプタマーをモデル動物に投与し、腎障害が抑制され、生存期間の延長がみられるかどうか、そして、どのような分子機構を介するかについて包括的な検討を加えることを目的とする。

3. 研究の方法

db/db マウスは、レプチン受容体が欠損しているため、過食による高度肥満を呈し、糖尿病を発症することから、ヒトにおける 2 型糖尿病に類似した肥満糖尿病モデルとして広く用いられている。これまでの研究から、高脂肪食を負荷した db/db マウスは、肥満、糖尿病に加えてインスリン抵抗性、腎障害、動脈硬化症、骨量の減少など各種老年疾患を併発し、通常食の db/db マウスと比べて寿命が 1/3 以下に短縮 (12~14 週で半数が死亡) することが知られている。本研究では、通常食で飼育した db/db マウスをコントロールとして用い、高脂肪食 (日本クレア社 HFD3、総カロリー比で脂肪 60%) で飼育した db/db マウスを老化促進糖尿病マウスとして用いた。研究に用いた DNA アプタマーはこれまでに我々が開発し、細胞実験で有効性が確認されているものを用いた。オス db/db マウスが生後 10 週齢となった時点で、高脂肪食飼育を開始し、薬液徐放作用のある浸透圧ポンプを背側皮下に植え込むことで AGEs 中和アプタマー、RAGE 阻害 DNA アプタマー、もしくはコントロール DNA アプタマー (ランダム配列の一本鎖 DNA) を 2 pmol/g 体重/日で持続投与した。通常食飼育の db/db マウスにはコントロール DNA アプタマーを投与した。浸透圧ポンプは 4 週間ごとに交換した。DNA アプタマーが生存期間に及ぼす影響を評価するとともに、DNA アプタマー投与開始から 56 日と 84 日の時点で尿サンプルを採取し、98 日の時点で実験を終了して血液サンプルと組織サンプルの採取を行い、下記項目の解析を行った。

- (1) 生理学的指標 (食餌量、飲水量、血圧、脈拍、体重)
- (2) 生化学的指標 (全血中のグリコヘモグロビン [HbA1c]、血清中のグルコース、インスリン、総コレステロール、中性脂肪、アディポネクチン、可溶性 VCAM-1、Pentraxin-3、尿タンパク

量)

- (3) 血清、組織中の AGEs、RAGE レベル(ELISA 法、免疫染色法)
- (4) 心臓、大動脈、腎臓大腿動脈、内臓脂肪
 - a. 組織学的変化：H&E 染色、Masson Trichrome 染色
 - b. Real-time RT-PCR 法：IL-1、IL-6、MCP-1、TNF、VCAM、ICAM、VEGF、PDGFs、TGF-1、osteopontin、MMPs、TIMPs、adiponectin などの発現
 - c. 免疫染色法：Ki-67、MOMA-2、TUNEL、酸化ストレス
- (5) インスリン抵抗性(ブドウ糖負荷試験)

4. 研究成果

本研究に用いた db/db マウスは、DNA アプタマーの投与を開始する時点で全てのマウスが著明な高血糖を呈していた。

アプタマー投与開始から 98 日間の観察を行ったが、この期間内には通常食飼育糖尿病マウスは死亡しなかった。高脂肪食負荷糖尿病マウスは 64 日目より死亡個体が出現しはじめ、平均生存日数は 87 日であった。AGEs 中和アプタマーを投与した高脂肪食負荷糖尿病マウスは 65 日目より死亡個体が出現しはじめ、平均生存日数は 79 日であった。RAGE 阻害アプタマーを投与した高脂肪食負荷糖尿病マウスは 82 日目より死亡個体が出現しはじめ、平均生存日数は 92 日であった。

体重について、通常食飼育糖尿病マウスでは、アプタマー投与開始 4 週後までは増加がみられたが、以後は同程度で推移した。高脂肪食負荷糖尿病マウスは、アプタマー投与開始 8 週後までは増加し続け、通常食飼育糖尿病マウスの 1.5 倍となったが、以後は急激に体重が減少していった。AGEs 中和アプタマーを投与した高脂肪食負荷糖尿病マウスも同様の変化を示したが、RAGE 阻害アプタマーを投与した高脂肪食負荷糖尿病マウスは 9 週以降も体重減少が出現せず、同程度で推移した。実験終了時(98 日目)の脈拍数、収縮期血圧、HbA1c 値、血中グルコース値は、4 群間で差を認めなかった。

アプタマー投与開始 8 週後の時点で、高脂肪食負荷糖尿病マウスの尿タンパク量は通常食飼育糖尿病マウスと比べて約 4 倍に増加しており、12 週後の時点でも同程度であった。RAGE 阻害アプタマーを投与した高脂肪食負荷糖尿病マウスでは 8 週・12 週の尿タンパク量の低下が認められた。

この研究結果から、糖尿病における寿命短縮には AGEs-RAGE 系が関与しており、RAGE 阻害 DNA アプタマーによる AGEs-RAGE 系の阻害が有効な治療手段となりうることを示唆された。今後は、DNA アプタマーによる AGEs-RAGE 系の阻害がどのような分子機序を介して寿命の短縮を抑制したのかについて検討を進めていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Terasaki M, Shibata K, Mori Y, Saito T, Matsui T, Ohara M, Fukui T, Hasumi K, Higashimoto Y, Nobe K, Yamagishi SI.	4. 巻 30
2. 論文標題 SMTP-44D Inhibits Atherosclerotic Plaque Formation in Apolipoprotein-E Null Mice Partly by Suppressing the AGEs-RAGE Axis.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 6505
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms24076505	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 -
1. 著者名 Koga Y, Sotokawauchi A, Higashimoto Y, Nishino Y, Hashizume N, Kakuma T, Akiba J, Tanaka Y, Matsui T, Yagi M, Yamagishi SI.	4. 巻 1
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 9932311
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 -
1. 著者名 Tsuruhisa S, Matsui T, Koga Y, Sotokawauchi A, Yagi M, Yamagishi SI.	4. 巻 22
2. 論文標題 Pigment epithelium-derived factor inhibits advanced glycation end product-induced proliferation, VEGF and MMP-9 expression in breast cancer cells via interaction with laminin receptor.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 629
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ol.2021.12890	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 -
1. 著者名 Sotokawauchi A, Matsui T, Higashimoto Y, Nishino Y, Koga Y, Yagi M, Yamagishi SI.	4. 巻 18
2. 論文標題 DNA aptamer raised against receptor for advanced glycation end products suppresses renal tubular damage and improves insulin resistance in diabetic mice.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Diabetes and Vascular Disease Research	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/1479164121990533	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 -

1. 著者名 Yashima H, Terasaki M, Sotokawauchi A, Matsui T, Mori Y, Saito T, Osaka N, Kushima H, Hiromura M, Ohara M, Fukui T, Yamagishi SI.	4. 巻 21
2. 論文標題 AGE-RAGE Axis Stimulates Oxidized LDL Uptake into Macrophages through Cyclin-Dependent Kinase 5-CD36 Pathway via Oxidative Stress Generation.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 9263
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21239263	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 -

1. 著者名 Sotokawauchi A, Nakamura N, Matsui T, Higashimoto Y, Yamagishi SI.	4. 巻 21
2. 論文標題 Glyceraldehyde-Derived Pyridinium Evokes Renal Tubular Cell Damage via RAGE Interaction.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 2604
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21072604	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16件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Terasaki M, Mori Y, Yashima H, Saito T, Sotokawauchi A, Matsui T, Hiromura M, Osaka N, Kawakami R, Shiraga Y, Ohara M, Fukui T, Yamagishi SI.
2. 発表標題 DNA-aptamer raised against receptor for advanced glycaion end products inhibits atherosclerosis.
3. 学会等名 The 29th Scientific Meeting of the International Society of Hypertension. (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山岸 昌一
2. 発表標題 終末糖化産物(AGEs)とその受容体(RAGE)を標的とした心血管代謝老年病の包括的制御.
3. 学会等名 第22回日本抗加齢医学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松井 孝憲、東元祐一郎、山岸 昌一.
2. 発表標題 終末糖化産物 (AGEs) の阻害による老年病の包括的抑制.
3. 学会等名 第22回日本抗加齢医学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 外川内亜美、東元祐一郎、古賀 義法、西野 友梨、松井 孝憲、山岸 昌一.
2. 発表標題 DNA アプタマーによる終末糖化産物受容体の阻害は老年疾患を包括的に抑制する.
3. 学会等名 第22回日本抗加齢医学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 外川内亜美、東元祐一郎、松井 孝憲、山岸 昌一.
2. 発表標題 DNAアプタマーを用いた終末糖化産物 (AGE) および受容体 (RAGE) の阻害は糖尿病合併症を包括的に抑制する.
3. 学会等名 第65回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松井 孝憲、霧久土保利、古賀 義法、外川内亜美、八木 実、山岸 昌一.
2. 発表標題 色素上皮由来因子は、終末糖化産物 (AGEs) により惹起された乳癌細胞の増殖とVEGFおよびMMP-9の発現を抑制する.
3. 学会等名 第65回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 寺崎 道重, 森 雄作, 八島 広典, 松井 孝憲, 斎藤 智美, 大坂 直也, 広村 宗範, 高畑 洋, 藤川大輝, 川上 来知, 白神 佳枝, 外川内 亜美, 小原 信, 福井 智康, 山岸 昌一.
2. 発表標題 終末糖化産物受容体 (RAGE) 阻害アプタマーは動脈硬化進展を抑制する.
3. 学会等名 第22回日本抗加齢医学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 寺崎 道重, 森 雄作, 八島 広典, 外川内 亜美, 松井 孝憲, 斎藤 智美, 広村 宗範, 大坂 直也, 藤川 大輝, 川上 来知, 白神 佳枝, 小原 信, 福井 智康, 山岸 昌一.
2. 発表標題 終末糖化産物受容体 (RAGE) に対するDNAアプタマーは動脈硬化進展を抑制する ~動脈硬化モデルマウスによる検討~.
3. 学会等名 第65回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 寺崎 道重, 森 雄作, 八島 広典, 外川内 亜美, 松井 孝憲, 斎藤 智美, 九島 秀樹, 広村 宗範, 大坂 直也, 小原 信, 福井 智康, 山岸 昌一.
2. 発表標題 終末糖化産物受容体 (RAGE) 阻害アプタマーはApoE欠損マウスの動脈硬化進展を抑制する.
3. 学会等名 第64回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 八島 広典, 寺崎 道重, 外川内 亜美, 松井 孝憲, 齋藤 智美, 森 雄作, 大坂 直也, 九島 秀樹, 広村 宗範, 小原 信, 福井 智康, 山岸 昌一.
2. 発表標題 終末糖化産物-受容体系の活性化は酸化ストレスを誘導しCdk5-CD36を介してマクロファージ泡沫化を促進する.
3. 学会等名 第64回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松井孝憲, 外川内亜美, 東元祐一郎, 山岸昌一.
2. 発表標題 内皮細胞におけるグリセルアルデヒド由来AGEsのRAGEを介した炎症作用はDNAアプタマーにより抑制しうる.
3. 学会等名 第64回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 外川内亜美, 松井孝憲, 西野友梨, 東元祐一郎, 山岸昌一.
2. 発表標題 終末糖化産物受容体RAGEを阻害するDNAアプタマーは, 2型糖尿病マウスのインスリン抵抗性および腎尿細管障害を改善する.
3. 学会等名 第64回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 外川内亜美, 松井孝憲, 西野友梨, 東元裕一郎, 山岸昌一.
2. 発表標題 終末糖化産物受容体の阻害は2型糖尿病マウスのインスリン抵抗性および腎尿細管障害を改善する.
3. 学会等名 第21回日本抗加齢医学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 八島 広典, 寺崎 道重, 外川内 亜美, 斎藤 智美, 松井 孝憲, 森 雄作, 大坂 直也, 九島 秀樹, 広村 宗範, 小原 信, 福井 智康, 高橋 育克, 山岸 昌一.
2. 発表標題 AGE-RAGE Axisは酸化ストレスを誘導しCdk5-CD36を介しマクロファージ泡沫化を促進する.
3. 学会等名 第94回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 寺崎 道重, 八島 広典, 森 雄作, 斎藤 智美, 広村 宗範, 九島 秀樹, 小渋 正和, 大坂 直也, 小原 信, 福井 智康, 平野 勉, 山岸 昌一.
2. 発表標題 Teneiligtinは1型糖尿病マウスと1型糖尿病患者のマク ロファージ泡沫化をAGEs系の抑制により改善する.
3. 学会等名 第63回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 外川内亜美, 松井孝憲, 東元祐一郎, 山岸昌一.
2. 発表標題 フルクトースは終末糖化産物形成を介して内皮細胞を障害する.
3. 学会等名 第63回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2020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	広村 宗範 (Hiromura Munenori) (00773186)	昭和大学・医学部・講師 (32622)	
研究 分担者	森 雄作 (Yusaku Mori) (90595919)	昭和大学・医学部・准教授 (32622)	

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