

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 9 日現在

機関番号： 35307  
 研究種目： 基盤研究 (C)  
 研究期間： 2009~2011  
 課題番号： 21590604  
 研究課題名 (和文) 内因性 AGE が引き起こす組織リモデリング病態の発症機序解明と根絶的治療法開発  
 研究課題名 (英文) Pathogenesis of tissue remodeling caused by endogenous AGE and advanced targeting 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

研究成果の概要 (和文)： 内因性 AGE が引き起こす組織リモデリング病態の発症機序を解明する目的で、内因性 AGE をプローブに用いたプロテインアレイ解析を行った。その結果、内因性 AGE に対して高親和性を示す複数の生体内微量因子を見出し、これらが炎症病巣局所でクラスターを形成していることが示唆された。また、組換え型の内因性 AGE および受容体 (RAGE) を用いた試験管内結合アッセイの確立ならびに NF- $\kappa$ B 活性化や炎症性サイトカイン産生能を指標にした細胞アッセイの確立に成功し、内因性 AGE 遮断薬開発のための創薬プラットフォームを構築することができた。

研究成果の概要 (英文)： The protein array analysis with endogenous AGE as specific probe showed some high affinity binding factors for endogenous AGE, suggesting the formation of pathophysiological cluster in the local site of inflammatory. In addition, we succeeded the establishment of in vitro binding assay between recombinant endogenous AGE and RAGE. Also, Cell-based assay upon NF- $\kappa$ B activation and proinflammatory cytokine production was developed, providing the convenient platform for exploration of specific antagonist to endogenous AGE.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学、応用薬理学

キーワード：臨床薬理学、組織リモデリング、分子標的薬

1. 研究開始当初の背景  
 心筋梗塞・糖尿病・気管支喘息などのいわゆ

る組織リモデリング病態は、超高齢化社会を迎えた我が国での死因の上位を占め、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。その一方で、これら疾患に対する有効な治療法は未だに確立せず、21世紀の医療が取り組むべき最重要課題と言える。

組織リモデリング病態は、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重要因子を同定・解明する事は、疾患の未然防止や新たな治療法開発に通じる重要な研究対象と考えられる。

申請者らは、重要な免疫細胞である単球 / マクロファージが、細胞接着因子の発現を通じて、リンパ球や内皮細胞などと相互作用し、組織再生や炎症惹起に重要な役割を担っている事を明らかにして来た。その過程で、組織リモデリング病態時（脳梗塞病態など）に病巣局所に新たに出現して来る 26kDa の因子（内因性 AGE）の存在を見出し、病態の増悪化に働いている事を発見した。驚くべき事に、本増悪因子（内因性 AGE）は、核転写因子として核内で機能を果たす一方で、細胞刺激に伴って核から細胞外へと局在移行し、サイトカイン様活性を示す極めてユニークな因子であった。更に、この内因性 AGE は白血球遊走や接着因子発現増大などの免疫亢進を招き、その過剰作用は典型的サイトカイン血症を惹起するものであった。

加えて、申請者は、内因性 AGE に対する単クローン抗体を開発し、ラット脳梗塞モデル（中大脳動脈の閉塞-再灌流モデル）に投与したところ、抗体は梗塞時の過剰応答を減弱し、梗塞巣エリアを劇的に縮小させる事を見出した。この脳保護効果は、既知のいかなる臨床治療薬よりも優れ、発症後に投与しても有効性を発揮し得る驚くべきものであった。この結果に基づき、脳梗塞などの組織リモデリング病態に対する新たな抗体医薬として既に特許を取得し（特許 第 3876325 号、第 3882090 号）、専門誌 (FASEB J 誌, 2007) にて発表するとともに日本薬学会および日本薬理学会にて2つのシンポジウム「抗体医薬が切り拓く先端医療」をオーガナイズした。更に、申請者は内因性 AGE の細胞受容体の探索にも着手し、現在、その同定 (RAGE) とクローニングにも成功している。これらの知見は、内因性 AGE による過剰シグナルを遮断する事が組織リモデリング病態の予防や治療に直結する事を示唆し、抗体以外の分子いわゆる低分子遮断薬を開発する事の重要性を裏付けるものであった。

## 2. 研究の目的

脳梗塞や糖尿病などの組織リモデリングを主徴とする疾病は、我が国での死因の上位を占め、重度後遺症に伴う医療負担も甚大であ

るにも係わらず有効な治療法は未だ確立していない。申請者らは、組織リモデリング病巣局所に出現し、過剰な免疫亢進作用によって病態の増悪化を招く因子を見出した。加えて、本因子（内因性 AGE）に対する抗体投与が、疾患動物モデル（脳梗塞モデル等）において著効性を示す事も明らかにし、内因性 AGE の遮断が組織リモデリング病態の治療・予防に直結している事を発見した。この様な背景の下、本研究では内因性 AGE の病態生理学的な機能の解明、更には *in vitro* 結合アッセイ系に基づいた内因性 AGE 遮断薬の探索研究を行う事によって、組織リモデリング病態の克服につなげて行く予定である。

## 3. 研究の方法

(1) 内因性 AGE および受容体ドメインの組換え体の発現・調製

①組織リモデリング惹起組織である脳梗塞病巣から内因性 AGE を同定し、その部分アミノ酸配列に基づいて内因性 AGE と受容体遺伝子の配列解析を完了し、既にクローニング済みの段階であった。従って、これらを常法に基づいてタグ付き大腸菌発現ベクターに入れ、組換え体タンパク質として発現させた。この際に、受容体については内因性 AGE との結合に関わる細胞外ドメインを発現させることとした。

②発現誘導されたタグ付き組換え体タンパク質をアフィニティ精製 (TALON 樹脂使用) し、高純度の可溶性標品を得た。

(2) タンパク質アレイ解析による内因性 AGE 結合因子の探索研究

①大腸菌発現系を用いて、組換え体内因性 AGE を調製し、アレイ解析用試料とした。この際の精製には、His タグ結合性を利用して TALON カラムを用いた。

②内因性 AGE 試料を二架橋試薬を用いてビオチン標識化を行った。

③ビオチン標識化内因性 AGE をプローブに用い、ヒトタンパク質アレイチップと反応させた。

④洗浄後、AlexaFluor 標識 2 次プローブを反応させた。

⑤洗浄後、蛍光スキャナーを用いて各アレイスポットの蛍光強度の大きさを測定し、バックグラウンドと比較して高い蛍光強度 (高 Z-score 値) を示す分子の同定を行った。

(3) ハイスループット *in vitro* 結合アッセイ系の構築

- ① 発現・精製した受容体ドメインをマイクロプレートに固相化した後に、ウシ血清アルブミンを用いてブロッッキングを施した。
- ② 事前に活性化 POD 試薬を用いて組換え体内因性 AGE に酵素標識を施し、これをプレートに加えてインキュベートさせた。
- ③ 洗浄後、発色基質 (ABTS+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) を加え、37°C で一定時間インキュベートした後の 405nm での吸光度の増加をプレートリーダーで見積る事によって、結合の指標とした。
- ④ 結合アッセイに用いる試料濃度や容量を変化させ、アッセイ系の構築に最適な条件を探った。

#### (4) 内因性 AGE の細胞アッセイの確立と病態生理学的機能の解明

- ① 細胞レベルでの評価系として、単球/マクロファージ系培養細胞を用いた解析、特に NF-κB 活性化解析とサイトカイン産生能について評価系の確立を行った。内因性 AGE 刺激による免疫・炎症反応の過剰応答や薬物による内因性 AGE の遮断作用を簡便にモニタリングする目的で、単球/マクロファージ系の免疫細胞を用いた NF-κB 活性化の評価系を事前に確立しておくことは極めて有用であると考えられ、NF-κB 遺伝子の下流にレポーター遺伝子を組み込むことによって、NF-κB の活性化応答を比色法によって評価することができる細胞アッセイ系の確立を行った。実際には、以下の手順で NF-κB 活性化応答を見積った。
- ② NF-κB 遺伝子の下流にレポーター (アルカリホスファターゼ) 遺伝子を組み込んだ免疫細胞を調製した。
- ③ レポーター細胞を内因性 AGE で刺激し、37°C で 20 時間培養 (DME 培地+10% FCS) した。この際、NF-κB 活性化にともなってアルカリホスファターゼが培養上清中に分泌されることとなる。
- ④ 細胞懸濁液を遠心し、培養上清採取した。
- ⑤ 採取した培養上清 (50 μL) に、基質液を加え 37°C で 0.5~6 時間反応させた。
- ⑥ 反応後に、620nm での吸光度変化を測定することにより、NF-κB の活性化を見積った。
- ⑦ 同時に、ELISA 法を用いて内因性 AGE 刺激した細胞からの炎症性サイトカインの産生を定量した。

#### 4. 研究成果

- (1) 内因性 AGE および受容体ドメインの組換え体の発現・調製

内因性 AGE ならびに受容体 (RAGE) の細胞外ドメインをコードする DNA をクローニングし、

発現ベクターに組み入れた。これらの発現ベクターで形質転換した大腸菌株 (BL21 (DE3)) を、アンピシリン入り LB 培地中で 37°C で培養し、その後、テトラサイクリンを最終濃度 0.15 μg/mL となるように加えて内因性 AGE ならびに受容体 (RAGE) を発現誘導した。遠心後、採取した菌体を冷 PBS に懸濁した後に超音波破碎した。破碎液を遠心 (4°C, 25,000xg, 20 分) した後、上清を回収して粗抽出液とした。

PBS で平衡化したアフィニティ担体 (TALON 樹脂, 1.0mL) と粗抽出液 (50 mL) を 4°C で 1 時間混合した後にカラムに詰め、アフィニティ樹脂を、順に 30mM イミダゾール入り PBS (50mL), 1M NaCl 入り 10mM PB 50mL), PBS (50mL) で洗浄した。最後に、0.5M イミダゾール入り PBS を流し、アフィニティ樹脂に結合した発現タンパク質を溶出した。溶出画分の純度は SDS-PAGE にて確認した。その結果、両タンパク質ともに計算上の分子量に相当する位置のみに単一なバンドとして検出されることから、本法によって組換え体内因性 AGE ならびに受容体 (細胞外ドメイン) の高純度精製標品を得ることに成功した。

- (2) タンパク質アレイを用いた内因性 AGE 親和性因子の網羅的解析

組織リモデリング病態の増悪化の共通基盤分子と考えられる内因性 AGE が、病巣局所で単独で作用するのか、または他の因子と相互作用して複合体として働くのかについて明らかにすることは、疾患病態を理解して新たな治療法へとつなげていく上で極めて重要な問題であるが、現時点では全く不明であった。この点を解決するために内因性 AGE をプローブに用いたタンパク質アレイ解析を行った。

全反応の終了後、内因性 AGE に対する相対的親和性の目安として Z-factor 値を算出し、Z-factor 値の高い順からソートした。その結果、内因性 AGE に対して、レクチンファミリーや増殖因子ファミリーに属する因子が高い親和性を示す結果が得られ、内因性 AGE が単独ではなく、むしろこれらの生理活性因子と複合体を形成して、病態の進展に働いていることが示唆された。このことは、内因性 AGE の病態生理学的意義の解明のみならず内因性 AGE を分子標的にした遮断薬の創製を行う上で、標的因子の範囲拡充につながるものであった。

- (3) ハイスループット in vitro 結合アッセイ系の構築

調製した組換え体内因性 AGE と受容体 RAGE を用いて in vitro 結合アッセイ系の構築を行っ

たところ、結合依存性が認められ、内因性 AGE-受容体 RAGE 間結合アッセイの確立に成功した。本法は、固相法の原理に基づいたサンドイッチ型の結合アッセイであり、内因性 AGE-受容体 RAGE 間結合アッセイにおける結合様式を詳細に検討したところ、結合反応は両者の濃度や反応時間に依存的であり、Scatchard 解析から Kd 値は  $0.71 \mu\text{M}$  であることがわかった。Ca<sup>2+</sup> イオンや Mg<sup>2+</sup> イオンの共存ともなう結合変化は認められなかった。この *in vitro* 結合アッセイを用いることによって、極めて簡便かつ効率的 (約 1000 個/日) に探索が可能となった。

#### (4) 内因性 AGE の細胞アッセイの確立と病態生理学的機能の解明

単球/マクロファージの培養系を用いて、内因性 AGE 刺激ともなう細胞レベルでの解析評価系 (NF- $\kappa$ B 活性化解析, サイトカイン産生能) の確立にも成功した。

特に、NF- $\kappa$ B 遺伝子の下流にレポーターとしてアルカリホスファターゼを導入した細胞株を用いることによって、内因性 AGE による NF- $\kappa$ B 活性化反応をアルカリホスファターゼ分泌を介して、分光光度学的に評価するアッセイ系を確立できた。本アッセイは、多検体を同時に解析することが可能で、必要とする試料も極めて少量 (培養液: ~数  $10 \mu\text{L}$ ) であり、細胞破壊の必要性がないことから簡便かつ短時間に細胞内の NF- $\kappa$ B 活性化を見積もることが可能となった。この細胞アッセイ系を用いて、内因性 AGE 刺激を行ったところ、濃度依存的に NF- $\kappa$ B 活性化ならびに炎症性サイトカインの産生亢進が観察された。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 15 件)

- ① Zhang J, Takahashi HK, Liu K, Wake H, Liu R, Maruo T, Date I, Yoshino T, Ohtsuka A, Mori S, Nishibori M : Anti-high mobility group box-1 monoclonal antibody protects the blood-brain barrier from ischemia-induced disruption in rats. *Stroke* 42: 1420-1428 (2011) 査読有  
DOI: 10.1161/STROKEAHA.110.598334
- ② Kanellakis P, Agrotis A, Kyaw TS, Koulis C, Ahrens I, Mori S, Takahashi HK, Liu K, Peter K, Nishibori M, Bobik A : High-mobility group box protein 1 neutralization reduces development of diet-induced atherosclerosis in apolipoprotein e-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31: 313-319 (2011) 査読有  
DOI: 10.1161/ATVBAHA.110.218669
- ③ Mori S, Takahashi HK, Liu K, Wake H, Zhang J, Liu R, Yoshino T, Nishibori M : Ciprofloxacin inhibits advanced glycation end products-induced adhesion molecule expression on human monocytes. *Br J Pharmacol* 161: 229-240 (2010) 査読有  
DOI: 10.1111/j.1476-5381.2010.00880.x
- ④ Takahashi HK, Liu K, Wake H, Mori S, Zhang J, Liu R, Yoshino T, Nishibori M : Effect of nicotine on advanced glycation end product-induced immune response in human monocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 332: 1013-1021 (2010) 査読有  
DOI: 10.1124/jpet.109.160861.
- ⑤ Takahashi HK, Zhang J, Mori S, Liu K, Wake H, Liu R, Sadamori H, Matsuda H, Yagi T, Yoshino T, Nishibori M : Prostaglandin E<sub>2</sub> inhibits advanced glycation end product-induced adhesion molecule expression on monocytes, cytokine production, and lymphocyte proliferation during human mixed lymphocyte reaction. *J Pharmacol Exp Ther* 334: 964-972 (2010) 査読有  
DOI: 10.1124/jpet.110.169102.
- ⑥ Takahashi HK, Liu K, Wake H, Mori S, Zhang J, Liu R, Yoshino T, Nishibori M : Prostaglandin E<sub>2</sub> inhibits advanced glycation end product-induced adhesion molecule expression, cytokine production, and lymphocyte proliferation in human peripheral blood mononuclear cells. *J Pharmacol Exp Ther* 331: 656-670 (2009) 査読有  
DOI: 10.1124/jpet.109.157594.
- ⑦ Wake H, Takahashi HK, Mori S, Liu K, Yoshino T, Nishibori M : Histamine inhibits advanced glycation end products-induced adhesion molecule expression on human monocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 330: 826-833 (2009) 査読有  
DOI: 10.1124/jpet.109.155960.

- ⑧ Takahashi HK, Mori S, Wake H, Liu K, Yoshino T, Ohashi K, Tanaka N, Shikata K, Makino H, Nishibori M : Advanced glycation end products subspecies-selectively induce adhesion molecule expression and cytokine production in human peripheral blood mononuclear cells. J Pharmacol Exp Ther 330: 89-98 (2009) 査読有  
DOI: 10.1124/jpet.109.150581.

〔学会発表〕(計 25 件)

- ① 森 秀治: アレイ解析による HMGB1 相互作用因子の網羅的探索, 日本薬学会第 132 年会, 2012 年 3 月, 札幌
- ② 森 秀治: 抗 HMGB1 抗体の結合特異性と機能解析, 第 49 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, 2010 年 11 月, 米子
- ③ 森 秀治: 治療分子標的としての HMGB1 と創薬, 日本薬学会第 130 年会, 2012 年 3 月, 岡山

## 6. 研究組織

### (1) 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

### (2) 研究分担者

五味田 裕 (GOMITA YUTAKA)  
就実大学・薬学部・教授  
研究者番号: 00088709