

令和 6 年 6 月 9 日現在

機関番号：35307

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06657

研究課題名(和文) 内因性AGEによる組織リモデリング増悪化機構の解明と新規標的治療法の創成

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of tissue remodeling exacerbated by endogenous AGEs 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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：組織リモデリング病態の発症や増悪化に関する内因性起炎因子(DAMPs, AGEs)と相互作用する因子の分子同定、相互作用(複合体形成)に伴う炎症応答の調節機構について検討した。その結果、カチオン性のリボソーム構成タンパク質(RPL9)が、内因性起炎性に対して高い結合親和性を示すこと、直接的相互作用を介して複合体を形成することを見出した。更に、RPL9自体にはDAMPs活性は無かったものの、LPS+HMGB1共刺激誘発性TNF- $\alpha$ 発現亢進を有意に抑制し、anti-DAMPsとしての性質が見出され、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

組織リモデリング病態の増悪化因子である内因性起炎因子(DAMPs, AGEs)による炎症の慢性化機構について解析し、新規結合因子(カチオン性RPs)の新規同定、複合体形成に伴う炎症応答の調節機構の存在を明らかにした。本知見は、炎症病態におけるDAMPs複合体形成に伴う新規の炎症応答制御機構の存在の可能性を示すものであると共に、組織リモデリング病態の分子理解と病態改善に向けた新規分子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 molecular identification of factors that interact with endogenous inflammatory factors (DAMPs and AGEs) related to the onset and exacerbation of tissue remodeling pathologies, and the regulatory mechanisms of inflammatory responses associated with the interactions (complex formation). We found that a cationic ribosomal protein (RPL9) exhibits high binding affinity to endogenous inflammatory factors and forms complexes with them via direct interactions. Furthermore, although RPL9 itself had no DAMPs activity, it significantly suppressed LPS+HMGB1 co-stimulation-induced enhancement of TNF- $\alpha$  expression and was found to have anti-DAMPs properties, suggesting a molecular understanding of tissue remodeling pathology and its potential as a new drug 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) 近年、欧米化した食生活やライフスタイルの変化に伴って生じる慢性炎症応答が、生活習慣病の発症や重症化に大きく関与していることが明らかにされつつある。炎症の慢性化・遷延化によって生じる組織リモデリング病態は、動脈硬化などの生活習慣病や多くの難治性疾患の増悪化に深く関与し、極めて甚大な医療負担を及ぼすにもかかわらず、それらに対する有効な根治的治療法は未確立のままである。加えて、慢性炎症自体の発生機序や制御法の詳細についても未だに不明な点が多く残されている。

(2) これまでの研究によって、生活習慣病に代表される組織リモデリング病態の病巣局所に複数の起炎因子 (Damps, AGEs など) が出現し、これらが炎症を過剰亢進させることによって病巣拡大に深く関与していることが明らかにしてきた。その一方で、炎症病態下における上記の内因性起炎因子の存在様式や他の相互因子の実体、更には、相互作用に伴う炎症応答の調節機序の存在と病態生理学への関わりについては、ほとんど究明がなされていなかった。

(3) 本研究では、上記の内因性起炎因子を担持させたアフィニティ担体を調製し、これを用いて相互作用因子の探索と分子同定を行うと共に、複合体形成の存在ならびに相互作用に基づく炎症応答の調節機序について細胞レベルで解明研究を行った。

## 2. 研究の目的

(1) 炎症の慢性化・遷延化によって生じる組織リモデリング病態は、動脈硬化などの難治性疾患の増悪化に深く関与し、極めて甚大な医療負担にもかかわらず有効な治療法は未確立のままである。申請者らは、自然免疫応答の制御研究の過程で、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増悪化を引き起こす起炎性因子 (Damps や AGEs) の存在を見出し、中和抗体を用いた解析から、それらの因子の遮断が病態治療や予防に直結している事を発見した。

(2) 本研究では、上記の起炎性因子 (Damps や AGEs) の生体内での存在様式を明らかにするために、Damps や AGEs をコアとする起炎性複合体の病巣における存在の有無、ならびに構成因子の分子同定を行う。加えて、起炎性複合体を構成する因子同士の相互作用に基づく活性調節機構の解明を細胞レベルで展開することによって、組織リモデリング病態の実体解明と克服につなげて行くこととした。

## 3. 研究の方法

(1) 内因性 AGE をコアとする起炎性複合体の構成因子の探索と同定： 組織リモデリング病態の組織病巣から同定した Damps ならびに AGEs 標品を調製し、これら分子を特異リガンドとしたアフィニティ担体を調製した。担体と組織抽出液を反応させ、生理緩衝液で洗浄した後に、高塩溶液で段階的溶出し、結合因子画分の回収を行った。その後、溶出画分を質量分析にかけて分子同定を行った。この過程で、Damps はタグ付き昆虫細胞発現系を用いて高純度かつ LPS フリーの可溶性標品として調製した。

(2) 起炎性複合体構成因子間の相互作用に基づいた炎症応答の調節機序の解明： 起炎性複合体を構成する各因子群と内因性 AGE との相互作用に基づいて、複合体形成に伴う炎症応答の変化や制御機構の実態について解析を行った。炎症応答の変化を可視化・明確化するために、様々な受容体欠損細胞株やレポーター導入細胞株を用い、起炎性複合体構成因子同士の相互作用に伴う変化を検討した。

## 4. 研究成果

(1) AGEs を特異リガンドとしたアフィニティ担体を用いて AGEs 親和性を持つ生体内因子を探索したところ、リボソーム構成タンパク質 (ribosomal proteins, RPs) が高い結合親和性を示すことが判明した。

(2) その後の解析で RPL9 が敗血症モデルの血清中に出現してくること、DCF 法による相互作用解析によって AGEs のみならず代表的 DAMPs である HMGB1 とも直接的に結合すること、則ち複合体を形成することが明らかとなった。

(3) 更に、マクロファージ系細胞を用いた機能解析の結果、RPL9 は DAMPs としての作用は示さなかったものの、その一方で LPS+HMGB1 共刺激誘導性 TNF- $\alpha$  発現亢進を有意に抑制することが見出された。

(4) 加えて、RPS5 も RPL9 と同様に TNF- $\alpha$  発現応答を抑制することも判明し、RPL9 と RPS5 は、共にカチオン性タンパク質としての共通点を持ち、カチオン性人工ポリペプチドであるポリ-L-リジンや RPL9 のカチオン領域由来の合成ペプチドも TNF- $\alpha$  発現応答を抑制した。一方、アニオン性 RPs は LPS+HMGB1 共刺激誘導性 TNF- $\alpha$  発現応答の抑制効果を示さなかった。また、カチオン性 RPs による TNF- $\alpha$  発現応答抑制作用は、AGEs の共存によって消失することも見出された。

(5) これらの知見から、カチオン性リボソーム構成タンパク質は、LPS+HMGB1 共刺激誘導性炎症応答に対して抑制的役割を担っていること、AGEs 蓄積が有意な病態（糖尿病など）では、この抑制作用が消失して炎症応答の増悪化に繋がっていることが示唆された。

## 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, Nishinaka T, Hatipoglu OF, Takahashi H, Nishibori M, Mori S	4. 巻 49
2. 論文標題 Identification of ribosomal protein L9 as a novel regulator of proinflammatory damage-associated molecular pattern molecules	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Mol Biol Rep	6. 最初と最後の頁 2831-2838
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11033-021-07096-0	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, Nishinaka T, Hatipoglu OF, Takahashi H, Nishibori M, Mori S	4. 巻 71
2. 論文標題 Cationic ribosomal proteins can inhibit pro-inflammatory action stimulated by LPS+HMGB1 and are hindered by advanced glycation end products	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Biotechnol Appl Biochem	6. 最初と最後の頁 264-271
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/bab.2538	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 Toyomura T, Watanabe M, Wake H, Nishinaka T, Hatipoglu OF, Takahashi H, Nishibori M, Mori S	4. 巻 50
2. 論文標題 Glycolaldehyde-derived advanced glycation end products promote macrophage proliferation via the JAK-STAT signaling pathway	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Mol Biol Rep	6. 最初と最後の頁 5849-5858
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11033-023-08509-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, Hatipoglu OF, Wake H, Watanabe M, Toyomura T, Mori S, Nishibori M, Takahashi H.	4. 巻 310
2. 論文標題 Glycolaldehyde-derived advanced glycation end products suppress STING/TBK1/IRF3 signaling via CD36	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Life Sci	6. 最初と最後の頁 121116
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.lfs.2022.121116	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, Hatipoglu OF, Wake H, Watanabe M, Toyomura T, Mori S, Nishibori M, Takahashi H	4. 巻 750
2. 論文標題 Different modulation of STING/TBK1/IRF3 signaling by advanced glycation end products	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Arch Biochem Biophys	6. 最初と最後の頁 109808
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.abb.2023.109808	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 Kitaura A, Nishinaka T, Hamasaki S, Hatipoglu OF, Wake H, Nishibori M, Mori S, Nakao S, Takahashi H	4. 巻 16
2. 論文標題 Advanced glycation end-products reduce lipopolysaccharide uptake by macrophages	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plos One	6. 最初と最後の頁 e0245957
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0245957	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 Yamazaki Y, Wake H, Nishinaka T, Hatipoglu OF, Liu K, Watanabe M, Toyomura T, Mori S, Yoshino T, Nishibori M, Takahashi H.	4. 巻 408
2. 論文標題 Involvement of multiple scavenger receptors in advanced glycation end product-induced vessel tube formation in endothelial cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Exp Cell Res	6. 最初と最後の頁 112857
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.yexcr.2021.112857	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9件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 森 秀治 他
2. 発表標題 HMGB1 - LPS誘導性炎症応答を制御する生体内因子の探索研究
3. 学会等名 第43回日本炎症再生医学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森 秀治 他
2. 発表標題 HMGB1+LPS共刺激誘導性炎症応答を制御する生体内因子の性状解析
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森 秀治 他
2. 発表標題 LPS - HMGB1誘導性炎症応答の終末糖化産物による相乗的亢進作用
3. 学会等名 第42回日本炎症再生医学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森 秀治 他
2. 発表標題 終末糖化産物によるLPS - HMGB1共刺激炎症応答の相乗的活性化作用
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 豊村隆男 他
2. 発表標題 終末糖化産物AGEs共存化でのサイトカインによるTNF- $\alpha$ 分泌の誘導効果
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 森 秀治 他
2. 発表標題 新規GL01阻害剤による細胞増殖抑制作用の分子機能解析
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 森 秀治 他
2. 発表標題 HMGB1-LPS共刺激誘導性炎症に対する生体内抑制因子の同定
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 豊村隆男 他
2. 発表標題 JAK/STATを介したAGEsによる細胞増殖効果
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森 秀治 他
2. 発表標題 DAMPs相互作用に基づいた炎症応答の制御メカニズム
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022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・准教授   (35307)	
研究 分担者	渡邊 政博  (WATANABE Masahiro)  (10758246)	就実大学・薬学部・准教授   (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
---------	---------