

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06952

研究課題名(和文) 糖尿病心筋症の新たな治療法の開発-終末糖化産物阻害アプタマーを用いた解析

研究課題名(英文) DNA aptamer raised against advanced glycation end products as a novel therapeutic option for the prevention of diabetes-associated cardiac hypertrophy

研究代表者

福井 智康 (Fukui, Tomoyasu)

昭和大学・医学部・准教授

研究者番号：50384475

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)は高血糖やインスリン抵抗性とは独立して糖尿病合併症の発症・進展に関与することが示唆されてきている。本研究では、肥満糖尿病モデルマウスを用い、AGEsに特異的に結合してその作用を阻害するDNAアプタマーを投与することで、心リモデリングが抑制されることを発見した。さらに、培養した心筋細胞を用いた実験により、心筋細胞の肥大において、高グルコースよりもAGEsが関わっていることが明らかとなった。これらの結果により、AGEsが糖尿病心筋症の病態に関与しており、DNAアプタマーによるAGEsの中和が新たな治療手段となりうることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心不全は糖尿病患者の主要な死因の一つであり、その背景には心肥大と心拡張機能障害を特徴とする糖尿病性心筋症が存在する。さらに、肥満を伴った糖尿病患者では高血圧症を合併することが多く、それによって心肥大が助長され、さらに心不全のリスクが高まる。したがって、高血圧合併肥満糖尿病患者における心不全発症の分子機序を明らかにし、それに対する新しい治療戦略を提示することは喫緊に取り組まなければならない課題の一つである。本研究により、AGEsが糖尿病と心筋リモデリングをつなぐ共通の病態因子であることが同定され、糖尿病性心筋症に対する新しい治療手段が提示されることとなり、その学問的かつ臨床的意義と価値は大きい。

研究成果の概要(英文)：Accumulating evidence has shown that advanced glycation end products (AGEs) play essential roles in the development and progression of diabetic complications. We have previously developed DNA aptamer that can inhibit the toxic effects of AGEs. In this study, we found that the administration of such DNA aptamer inhibited cardiac hypertrophy and fibrosis in a mouse model of diabetes with obesity. Furthermore, in the in vitro study using cultured cardiomyocytes, exposure to AGEs rather than high glucose were shown to induce cellular hypertrophy. These findings suggest that AGEs may be associated with diabetes-associated cardiac hypertrophy, and that DNA aptamer raised against AGEs can be a novel therapeutic option against it.

研究分野：糖尿病

キーワード：終末糖化産物 糖尿病 糖尿病性心筋症 DNAアプタマー

1. 研究開始当初の背景

心不全は糖尿病患者の主要な死因の一つであり、その背景には心肥大と心拡張機能障害を特徴とする糖尿病性心筋症が存在する。さらに、肥満を伴った糖尿病患者では高血圧症を合併することが多く、それによって心肥大が助長され、さらに心不全のリスクが高まる。したがって、高血圧合併肥満糖尿病患者における心不全発症の分子機序を明らかにし、それに対する新しい治療戦略を提示することは喫緊に取り組まなければならない課題の一つである。

我々はこれまでに、1) AGEs が受容体 RAGE を介して認識され、試験管内で血管構成細胞に作用し、酸化ストレス、炎症反応、血栓形成を惹起させること、2) 糖尿病、特に、高血圧と肥満を合併した糖尿病で、AGEs の生成、蓄積が亢進し、血中 AGEs レベルが血管障害マーカーや炎症マーカーと相関することを明らかにしてきた (Nature 2000;404:787-90. Diabetes Care 2012;35:2618-25. Diabetes Care 2015;38:119-25. Diabetes 2017;66:1683-95)。また、AGEs は心筋コラーゲンの糖化変性、心筋細胞のアポトーシスや Ca イオンの流入異常を引き起こし、心不全の発症、進展に関わることも知られている (FEBS Open Bio 2017;7:1672-1685. Pflugers Arch 2012;464:613-21. Am J Physiol Heart Circ Physiol. Cardiology 2014;129:75-83. J Cell Mol Med 2009;13:1751-64. Am J Physiol Endocrinol Metab 2008;295:E323-30)。以上の事実は、AGEs-RAGE 系が糖尿病性心筋症を抑制するための治療標的となることを示している。

また、我々は AGEs-RAGE 系を制御する新たな治療薬の開発の取り組み、AGEs もしくは RAGE に対して強固に結合してその作用・機能を阻害する DNA アプタマー(標的に特異的に結合する一本鎖の DNA)の開発に成功した。そして、これらのアプタマーの投与によってラットモデルの腎障害を抑制できることを実証した (Diabetes 2017;66:1683-1695. Diabetes 2013;62:3241-50)。以上のことから、これらのアプタマーにより AGEs-RAGE 系を阻害できれば、糖尿病性心筋症の発症・進展を制御できるのではないかと着想するに至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、AGEs アプタマーをモデル動物に投与することで心肥大、心不全を抑制できるかどうかを検証するとともに、また、細胞実験系も用いて AGEs がどのような分子機構を介して心肥大を惹起するのかを明らかにしていくことである。

3. 研究の方法

本研究では肥満糖尿病モデルマウスとして KK-Ay マウスを、野生型コントロールとして C57BL6/J マウスを用いた。生後 6 週齢のオスのマウスを日本クレア社より購入して実験に用いた。生後 7 週齢の時点で、KK-Ay マウスは AGEs アプタマー群もしくはコントロールアプタマー群に、C57BL6/J マウスはコントロールアプタマー群に振り分けた。アプタマーは薬液徐放作用のある浸透圧ポンプ(Alzet1004)を背部皮下に植え込み、10 pmol/g 体重/日となるように持続皮下投与した。アプタマーの投与開始から経時的に食餌摂取量と体重を測定した。アプタマーの投与開始から 6 週後に血圧を測定し、血液と心臓を採取した。採取した血液は血糖、HbA1c、インスリン、総コレステロール、中性脂肪、AGEs の測定に用いた。採取した心臓は重量を測定し、心尖部を real-time RT-PCR 法による遺伝子発現レベルの評価に、左室乳頭筋を含む残りの心組織をマッソントリクローム染色による心室壁肥厚と間質線維化の評価に用いた。

次に、心筋細胞に対する AGEs の直接的作用を調べるため、マウスから単離した心筋細胞を正常グルコース(5.5 mM)もしくは高グルコース(25 mM)で 12 時間培養した後に、AGEs(100

ug/ml)で48時間インキュベートし、real-time RT-PCR法で遺伝子発現レベルを評価した。

4. 研究成果

アプタマー投与開始から6週間後の評価では、コントロールアプタマーを投与されたC57BL/6Jマウス(Non-DM+CTR-Apt)と比較して、コントロールアプタマーを投与されたKK-Ayマウス(DM+CTR-Apt)は体重、血糖値、インスリン値、テストステロン値、総コレステロール値、中性脂肪値、およびAGEs値が有意に高値であった。しかしながら、AGEアプタマーを投与されたKK-Ayマウス(DM+AGE-Apt)とDM+CTR-Aptの間には、体重、血糖値、インスリン値、テストステロン値、総コレステロール値、中性脂肪値、およびAGEs値について有意な差を認めなかった。このことからAGEアプタマーは代謝因子に直接的な影響を及ぼさなかったことが示された。

アプタマー投与開始から6週間後に採取した心臓の解析では、DM+CTR-AptはNon-DM+CTR-Aptと比較して、心重量の増加が見られ(Non-DM+CTR-Apt:125±9 vs. DM+CTR-Apt:199±12 mg)、左室壁の肥厚と間質線維化面積の増加が生じていた(図1)。さらに、DM+CTR-Aptの心臓では心筋細胞の肥大マーカーであるβ-MHCの遺伝子発現レベルの上昇が見られるとともに(図2)、間質の線維化に關与するTGF-β2、AGE受容体であるRAGEの遺伝子発現レベルの上昇も見られ(図2)、マクロファージ浸潤に關与するMCP-1の遺伝子発現レベルが上昇する傾向にあった(図2)。DM+AGE-Aptにおいては、DM+CTR-Aptと比較して、心臓重量の有意な変化は見られなかったものの(DM+CTR-Apt:199±12mg vs. DM+AGE-Apt:193±18mg)、左室壁の肥厚が抑制され(図1)、間質線維化面積が低下した(図1)。

さらに、DM+AGE-Aptの心臓では、β-MHCとTGF-β2の遺伝子発現レベルが有意に低下していた(図2)。一方で、MCP-1や炎症性サイトカインであるTNFにおいては有意な変化が見られなかった(図2)。これらの結果から、AGEアプタマーは、肥満糖尿病モデルマウスの心臓における左室壁肥厚と間質線維化を抑制する作用があり、その機序としてβ-MHCとTGF-β2の遺伝子発現抑制が関わっていることが明らかとなった。

次に心筋細胞に対するAGEsの直接的作用を検討した。培養したマウス心筋細胞を高グルコースで刺激するとβ-MHCが約1.3倍に増加したが、AGEsで刺激するとβ-MHCが約2.5倍に増加した。この結果から心筋細胞の肥大においては、高グルコースよりもAGEsが関わっている可能性が示された。

今後は、培養したマウス心筋細胞を用いて、AGEsがβ-MHCを増加させる分子機序を明らかにしていく予定である。

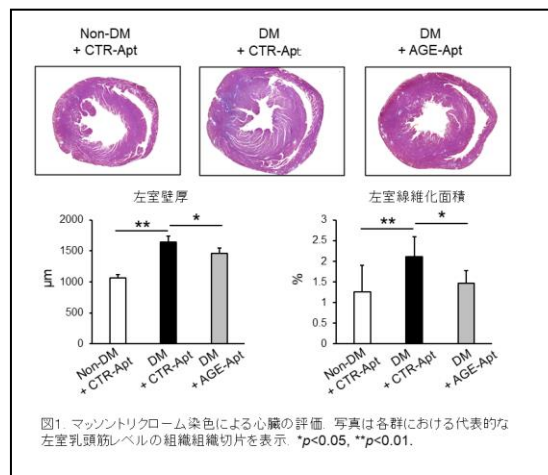


図1 マッサントリクローム染色による心臓の評価。写真は各群における代表的な左室乳頭筋レベルの組織組織切片を表示。* $p<0.05$, ** $p<0.01$ 。

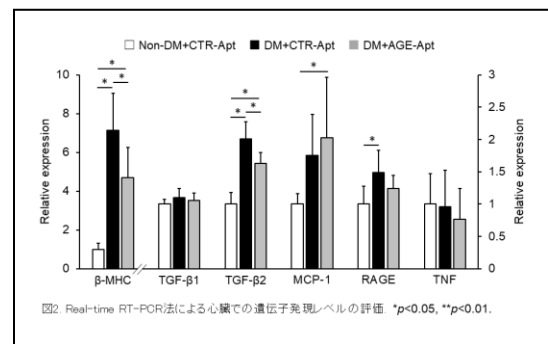


図2 Real-time RT-PCR法による心臓での遺伝子発現レベルの評価。* $p<0.05$, ** $p<0.01$ 。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 寺崎 道重, 森 雄作, 八島 広典, 斎藤 智美, 小原 信, 福井 智康, 松井 孝憲, 山岸 昌一
2. 発表標題 終末糖化産物アブタマーの治療応用
3. 学会等名 第10回日本糖尿病協会年次学術集会/同時開催 IDF-WPR Congress 2023/15th Scientific Meeting of AASD (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 寺崎 道重, 森 雄作, 斎藤 智美, 小原 信, 福井 智康, 八島 広典, 山岸 昌一
2. 発表標題 動脈硬化症に対する新規治療戦略：終末糖化産物を標的とした機能性核酸医薬の有効性の検討
3. 学会等名 第23回日本抗加齢医学会総会
4. 発表年 2023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	山岸 昌一 (Yamagishi Sho-Ichi) (40281026)	昭和大学・医学部・教授 (32622)	
研究分担者	森 雄作 (Mori Yusaku) (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
---------	---------