

## 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25年5月8日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22390111

研究課題名（和文） 終末糖化産物アプタマーを用いた糖尿病血管症の治療戦略

研究課題名（英文） Therapeutic strategy for diabetic angiopathy using AGE aptamer

研究代表者

山岸 昌一（YAMAGISHI SHOICHI）

久留米大学・医学部・教授

研究者番号：40281026

研究成果の概要（和文）：終末糖化産物（AGE）の作用をブロックする DNA アプタマーを作成し、当該アプタマーを糖尿病モデル動物に持続投与することで、タンパク尿の排泄が抑えられるとともに、腎臓や網膜の炎症が改善され、糖尿病細小血管障害が抑制されること、ならびにバルーン障害後の血管の再構築が抑制され、大血管障害に対しても保護的に作用することが見いだされた。AGE-アプタマーは、糖尿病血管症に対する新しい治療戦略となりうるかもしれない。

研究成果の概要（英文）：Continuous infusion of DNA aptamer raised against advanced glycation end products (AGE) not only blocked the development and progression of diabetic microangiopathy by reducing proteinuria and inflammatory reactions in the kidney and retina, but also inhibited balloon-injured neointima formation in diabetic rats. AGE-aptamer may be a novel therapeutic strategy for diabetic angiopathy.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
2011年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2012年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
年度			
年度			
総計	13,400,000	4,020,000	17,420,000

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：糖尿病、AGE、AGE-アプタマー

## 1. 研究開始当初の背景

糖尿病は、インスリンの分泌障害や標的臓器における作用不全によって慢性の高血糖がひきおこされる代謝疾患群である。しかしながら、患者のQOLと生命予後の観点からみれば、糖尿病は心血管病であるともいえる。これらの事実は糖尿病においては、‘慢性の血管合併症’を予防することが、治療戦略上最も重要な課題であることを示している。EDIC-DCCT 試験によれば、1型糖尿病の初期6.5年間の血糖コントロールが厳格である

と、その効果が長期にわたって持続し、試験終了後少なくとも8年間は細小血管症の進展が抑制でき、11年後の心血管イベントの発症も有意に抑えられることが見いだされた。さらに2型糖尿病患者を対象としたUKPDS後の10年間にわたるfollow-up研究（UKPDS80研究）でも、初期からの厳格な血糖管理が血管合併症の進展に対して遺産的効果（legacy effect）を及ぼしていることが報告された。これらの事実は、糖尿病患者においては、ある程度の期間高血糖に暴露され

てしまうと生体がそれを「高血糖のつけ・借金」として記憶し、その後血糖コントロールを行っても必ずしも血管合併症の進展を完全には抑えられないことを意味している。つまり、ヒトの糖尿病血管症においても実験動物同様「高血糖の記憶 (metabolic memory)」というメカニズムが関わることが推定される。終末糖化産物 (AGE) は、血糖コントロールの程度とその持続期間により不可逆的に生体内で形成、蓄積され、一度生体内で形成されるとなかなか代謝されず長期にわたって作用を及ぼすことから、AGE 病因仮説は「高血糖の記憶」という現象と最もよく符合する。我々はこれまでに、AGE が血管壁細胞や糸球体構成細胞上に存在する受容体 RAGE によって認識され、細胞内酸化ストレスを惹起させ様々な血管合併症関連遺伝子を発現させて、糖尿病網膜症、腎症、動脈硬化症の発症・進展に関わること (JBC 2006, 281, 20213-20; Curr Pharm Des 2005, 11, 2079-99; Kidney Int 2004, 66, 2137-47; Diabetologia 2003, 46, 284-7; FASEB J 2002, 16, 1928-30; JCI 2001, 108, 261-8; Nature 2000, 404, 787-90)、糖尿病患者においては、健常人と比較して血中 AGE 濃度が有意に高く、各種炎症マーカーや血管合併症の重症度や予後と相関すること (Diabetes Metab Res Rev 2008, 24, 109-14; Curr Drug Targets 2007, 8, 952-9; Mol Med 2007, 13, 185-9) などを明らかにしてきた。以上の事実から、「AGE の作用を阻害できれば、糖尿病血管合併症の発症・進展を阻止できるのではないか」と着想するに至った。

## 2. 研究の目的

我々は最近、AGE と特異的に結合し、試験管内において AGE の作用を阻害できる DNA アプタマー (以下、AGE-アプタマー) の開発に成功した。DNA アプタマーは標的蛋白との親和性が高く、毒性が強く免疫原性が低い蛋白に対しても応用でき、抗体に比べて安価に大量に調整できることから、次世代のバイオ医薬品として注目されている。そこで本研究の目的は、AGE-アプタマーを糖尿病モデル動物に投与して、当該アプタマーの血管合併症への有効性を検討し、将来の臨床応用への可能性を模索しようとするものである。

## 3. 研究の方法

(1) まず、修飾 AGE ならびにコントロールアプタマーの作製を行い、ストレプトゾトシン糖尿病ラットの腹腔内に AGE-アプタマーを持続的に投与し、血中あるいは組織中の AGE レベルをコントロール動物レベルにまで低下できる至適投与量を決定する。ついで、ストレプトゾトシン糖尿病ラットに修飾 AGE ならびにコントロールアプタマーを投与し、

糖尿病網膜症・腎症の初期ならびに後期病変、バルーン傷害後血管リモデリングに及ぼす AGE-アプタマーの効果について、生理学的、分子生物学的、病理学的解析を用いて検討する。

(2) 具体的には、Fluorescein で標識したコンカナバリン A レクチンにより網膜血管へ接着した白血球を可視化し、その程度を定量化する (2ヶ月目)。Fluorescein による蛍光造影眼底検査で、血管透過性の亢進の程度を定量化する (2ヶ月目)。血管透過性の亢進と網膜血管への白血球の接着には、VEGF や ICAM-1 の発現亢進が重要であることが知られている。そこで、real-time PCR ならびに western blot を用いて、両因子発現に及ぼす AGE-アプタマーの影響について検討する (2ヶ月目)。

(3) さらに、腎機能、腎重量、血圧などに及ぼす影響を検討する (1、2ヶ月目)。尿中微量アルブミン量、蛋白尿ならびに尿細管障害マーカー排泄に及ぼす影響を測定する (1、2ヶ月目)。微量アルブミン尿の出現や尿細管の障害には、酸化ストレスの産生や炎症反応に関わることが知られている。そこで、酸化ストレスマーカーである 8-OHdG の尿中排泄量や腎組織における VEGF、MCP-1 の発現を ELISA 法や real-time PCR ならびに western blot を用いて検討する (1、2ヶ月目)。組織学的に糸球体硬化症や尿細管間質病変に及ぼす AGE-アプタマーの効果について検討する。

(4) また、糖尿病網膜症、腎症いずれにおいても AGE-アプタマーの投与により、組織レベルの AGE や RAGE の発現レベルが低下し、情報伝達を担う分子である NADPH オキシダーゼの発現や活性が抑制されているかどうかを免疫染色法、real-time PCR、western blot、酵素法などで検討する (2ヶ月目)。

(5) バルーン傷害モデル作製後、至適投与量の修飾 AGE-アプタマーあるいはコントロール DNA アプタマーを投与し、2、4週間目に屠殺し、障害部位血管を摘出する。ヘマトキシリン-エオジン染色後、血管内腔面積、内膜/中膜比を測定し、AGE-アプタマーにより血管リモデリングが抑制されるかどうかを検討する。次いで組織学的にマクロファージの浸潤や平滑筋細胞の増殖・遊走が抑えられているかどうか、マクロファージや平滑筋細胞に特異的なマーカーを用いて定量化する。さらに血管リモデリングに関わることで知られている MCP-1 や PDGF-B の発現を real-time PCR ならびに western blot を用いて検討する。あわせて組織レベルの AGE や

RAGEの発現レベルが低下し、情報伝達を担う分子であるNADPHオキシダーゼの活性が抑制されているかどうかを検討する(2、4週目)。

#### 4. 研究成果

(1) 8週齢の肥満2型糖尿病モデル動物であるKKay/Taマウス腹腔内に0.136 microg/20 g body weightのフォスフォロチオエート型AGE-アプタマーあるいはコントロールDNAアプタマーを投与し、経時的に糖尿病腎症に及ぼす当該AGEアプタマーの効果について、非糖尿病コントロールマウス、コントロールDNAアプタマー投与糖尿病マウスと比較検討した。その結果、AGE-アプタマーの投与により、BUN、クレアチニンで評価される腎機能の低下が有意に抑制されること、アルブミン尿の排泄量の増加が有意に抑えられ、尿中8-OHdGなどの酸化ストレスマーカーの排泄量も低下すること、腎組織学的にメサンギウム領域の拡大や糸球体の硬化病変、ポドサイトの消失が抑制されること、腎糸球体領域におけるTNF-alpha、MCP-1、RAGE、CTGF、IV型コラーゲン等の炎症や硬化病変を引き起こす因子の発現が抑えられることが見いだされた。AGEアプタマーの投与により、KKay/Taマウスの血糖値、血圧値、脂質値等の代謝系のパラメーターは何ら影響を受けなかったが、腎糸球体領域のAGEレベルがコントロールマウスのレベルにまで抑制された。

(2) さらに、腎メサンギウム細胞にAGEを添加した時に誘導される酸化ストレス産生、MCP-1、RAGE、CTGFなどの遺伝子誘導も完全に抑制された。

(3) また、AGE-アプタマーが結合したAGEは、マクロファージによって効率的に認識され分解除去を受けることがあきらかになった。以上のことから、AGE-アプタマーは、AGEと結合しその代謝、排泄系を促進することで作用をブロックし、糖尿病腎症の発症、進展に保護的に作用するものと考えられた。

(4) 1型糖尿病モデルラットの腹腔内に0.136 microg/20 g body weightのフォスフォロチオエート型AGE-アプタマーあるいはコントロールDNAアプタマーを持続的に投与し、経時的に糖尿病網膜症と血管リモデリングに及ぼす当該AGEアプタマーの効果について、非糖尿病コントロールマウス、コントロールDNAアプタマー投与糖尿病マウスと比較検討を行った。その結果、AGE-アプタマーの投与により、バルーン障害後の血管リモデリングが抑制されること、新生内膜への平滑筋

の増殖と遊走が抑制されることが見いだされた。

(5) さらに、網膜におけるVEGF、MCP-1等の血管透過性や炎症を惹起する因子の遺伝子の発現が抑えられ、酸化ストレス産生が抑制されることが明らかにされた。

(6) 1型糖尿病モデルラットの血糖値、血圧値、脂質値等の代謝系のパラメーターはAGEアプタマーの投与により何ら影響を受けなかったが、バルーン障害部位や網膜領域におけるAGEレベルがコントロールラットのレベルにまで抑制された。さらに、AGEによる血管内皮障害もAGEアプタマーにより抑えられることが見いだされた。以上より、AGE-アプタマーは、AGEの作用をブロックし、糖尿病網膜症や大血管障害の進展にも保護的に作用するものと考えられた。

(7) 一連の研究により、AGE-アプタマーは、糖尿病血管症に対する新しい治療戦略となりうることが示唆され、当該アプタマーの臨床応用への可能性をも考えられる。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計1件)

- ① Kaida Y, Fukami K, Matsui T, Higashimoto Y, Nishino Y, Obara N, Nakayama Y, Ando R, Toyonaga M, Ueda S, Takeuchi M, Inoue H, Okuda S, Yamagishi SI、査読あり、DNA aptamer raised against AGEs blocks the progression of experimental diabetic nephropathy. 2013, doi: 10.2337/db12-1608

〔学会発表〕(計1件)

- ① 甲斐田祐介、深水圭、上田誠二、山岸昌二、奥田誠也、AGEs-DNAアプタマーは糖尿病性腎症の糸球体硬化を改善する、第54回日本腎臓病学会 2011年6月15日(横浜)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www2.ktarn.or.jp/~syamagishi/>

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

山岸 昌一 (YAMAGISHI SHOICHI)

久留米大学・医学部・教授

研究者番号：40281026

(2) 研究分担者

なし ( )

研究者番号 :

(3) 連携研究者

中村 和生 (NAKAMURA KAZUO)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号 : 9 0 3 8 9 2 4 7

松井 孝憲 (MATSUI TAKANORI)

久留米大学・医学部・講師

研究者番号 : 1 0 4 2 5 2 3 3