

## 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 20 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590904

研究課題名（和文） RAGE をターゲットとした糖尿病性腎症・RPGN の新規治療法の開発

研究課題名（英文） Novel therapeutic approach against receptor for advanced glycation end products in patients with diabetic nephropathy or RPGN.

研究代表者

深水 圭（FUKAMI KEI）

久留米大学・医学部・准教授

研究者番号：80309781

研究成果の概要（和文）：

今回我々はAGEsと特異的に結合し、その生理学的活性を抑制するAGEs-aptamerを開発し糖尿病性腎症、RPGNにおける腎保護効果について検討した。AGEs-aptamerはAGEsとRAGEの結合を阻害し、DM由来AGEs蓄積は、AGEs-aptamer投与により抑制された。AGEs-aptamer投与は、UAE、メサンギウム基質の増加、糸球体肥大、尿中8-OHdG、MCP-1、CTGF、Type-IV collagen、RAGE発現増加を改善した。現在affinityが強いAGEs-aptamer、RAGE-aptamerを開発しており、糖尿病性腎症患者に対する臨床応用を想定した研究を行っていく予定である。

研究成果の概要（英文）：

Advanced glycation end products (AGEs) and their receptor (RAGE) play a role in diabetic nephropathy. We examined effects of AGE- and RAGE-aptamer on renal injury in KKAY/Ta mice. Glomerular AGEs levels were significantly increased in KKAY/Ta mice, which were blocked by AGEs-aptamer. Urinary albumin and 8-hydroxy-2'-deoxy-guanosine levels were increased, and glomerular hypertrophy and extracellular matrix accumulation were prevented by AGEs-aptamer. Our present data suggest that continuous administration of AGEs-aptamer may be a feasible and promising therapeutic strategy for the treatment of diabetic nephropathy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・腎臓内科学

キーワード：diabetic nephropathy, RPGN, glycation, RAGE

### 1. 研究開始当初の背景

Advanced glycation endproducts (AGEs) は、直接的な蓄積による腎障害のみならず、受容体 (RAGE) を介したメサンギウム細胞・糸球体上皮細胞障害を惹起し、糖尿病性腎症の進展に深く関与する。

### 2. 研究の目的

今回我々は AGEs と特異的に結合し、その生理学的活性を抑制する AGEs-aptamer、RAGE-aptamer を開発し糖尿病性腎症、RPGN における腎保護効果とその機序について検討した。

### 3. 研究の方法

糖尿病性腎症に酷似した病変を呈する 2 型糖尿病モデルマウス (KKAy/Ta;DM) に Ctrl-aptamer と AGEs-aptamer 各々 3 $\mu$ M を腹腔内に 8 週間持続投与し、AGEs-aptamer の体内動態を検討した。さらに腎臓における AGEs の蓄積、尿中アルブミン排泄 (UAE)、組織学的変化、podocyte loss (synaptopodin の免疫染色)、酸化ストレス (尿中 8-OHdG) レベルを解析した。腎皮質における MCP-1、CTGF、Type-IV collagen、RAGE の遺伝子発現を real-time PCR にて検討した。ヒトメサンギウム細胞 (NHMC)、マウス podocyte、THP-1 細胞を培養し、AGEs 刺激によって惹起される MCP-1、CTGF、RAGE の発現、ROS の産生に対する AGEs-aptamer の効果を検討し、さらに AGEs 蓄積抑制メカニズムの解明を試みた。

### 4. 研究成果

腎臓における AGE-aptamer は血中レベルと比較し 8 倍多く分布し、その半減期は 7 日間であった (Kd1.36 $\times 10^{-6}$ M)。AGEs-aptamer は AGEs と RAGE の結合を強力に阻害し得た ( $10^{-8}$ ~ $10^{-9}$ M)。DM マウスにおいて AGEs は主にメサンギウム領域に発現しており、AGEs-aptamer 投与はそれらを完全に抑制した。AGEs-aptamer 投与は、DM 由来 UAE、腎重量増加を有意に改善した。DM 由来メサンギウム基質の増加、糸球体肥大、podocyte loss は AGEs-aptamer 投与により有意に改善し、それらは尿中 8-OHdG、MCP-1、CTGF、Type-IV collagen、RAGE の遺伝子発現の改善を伴っていた。更に NHMC、podocyte に AGEs 100 $\mu$ g/ml を添加すると MCP-1、CTGF、RAGE の遺伝子発現と ROS 産生が誘導され、それらは AGEs-aptamer の共存下で抑制された。AGEs-aptamer の AGEs への結合は、AGEs-RAGE 系を阻害するだけでなく、マクロファージによる AGEs の分解を促進することから、AGEs 蓄積の抑制を介し、AGEs-RAGE 系ブロックによりメサンギウム細胞、podocyte に対して保護的に作用することが示唆された。

### 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 17 件)

1. Telmisartan inhibits AGE-induced

podocyte damage and detachment. Fukami K, Yamagishi S, Kaifu K, Matsui T, Kaida Y, Ueda S, Takeuchi M, Asanuma K, Okuda S. Microvasc Res. 2013 in press. (査読あり)

2. DNA aptamer raised against AGEs blocks the progression of experimental diabetic nephropathy. 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, S. \* Kaida Y and Fukami K contributed equally to this study. Diabetes 2013 in press. (査読あり)

3. Evidence for a positive association between serum carnitine and free testosterone levels in uremic men with hemodialysis. Sakai K, Fukami K, Yamagishi S, Kaida Y, Adachi T, Ando R, Manabe R, Otsuka A, Sugi K, Ueda S and Okuda S. Rejuvenation Res. 2013 in press. (査読あり)

4. AGEs-RAGE system in cardiovascular disease. Fukami K, Yamagishi S, Okuda S. Cur Pharm Des 2013 in press. (査読あり)

5. Effects of Switching from Calcium Carbonate to Lanthanum Carbonate on Bone Mineral Metabolism in Hemodialysis Patients. Manabe R, Fukami K, Ando R, Sakai K, Kusumoto T, Hazama H, Adachi T, Kaida K, Nakayama N, Ueda S, Kohno K, Wada Y, Yamagishi S, Okuda S. Ther Apher Dial. 17 Suppl 1:35-40, 2013. (査読あり)

6. First reported case of collagenofibrotic glomerulopathy with a full-house pattern of immune deposits. Fukami K, Yamagishi S, Minezaki T, Nishi S, Hisano S, Okuda S. Clin Nephrol. 2013 in press. (査読あり)

7. Glucagon-like Peptide-1 Receptor Agonist Inhibits Asymmetric Dimethylarginine Generation in the Kidney of Streptozotocin-Induced Diabetic Rats by Blocking Advanced Glycation End Product-Induced Protein Arginine Methyltransferase-1 Expression. Ojima A, Ishibashi Y, Matsui T, Maeda S, Nishino Y, Takeuchi M, Fukami K, Yamagishi SI. Am J Pathol. Am J Pathol. 182(1):132-41, 2013. (査読あり)

8. Serum asymmetric dimethylarginine levels are independently associated with procollagen III N-terminal peptide in non-alcoholic fatty liver disease patients. Hyogo H, Yamagishi S, Maeda S, **Fukami K**, Ueda S, Okuda S, Nakahara T, Kimura Y, Ishitobi T, Kazuki C. Clin Exp Med. 2013 in press. (査読あり)

9. PEDF inhibits AGE-induced podocyte apoptosis via PPAR-gamma activation. Ishibashi Y, Matsui T, Ohta K, Tanoue R, Takeuchi M, Asanuma K, **Fukami K**, Okuda S, Nakamura K, Yamagishi S. Microvasc Res (85) 54-8, 2013. (査読あり)

10. Experimental diabetic nephropathy is accelerated in matrix metalloproteinase-2 knockout mice. Takamiya Y, **Fukami K**, Yamagishi S, Kaida Y, Nakayama Y, Obara N, Iwatani R, Ando R, Koike K, Matsui M, Nishino Y, Ueda S, Cooper ME, and Okuda S. Nephrol Dial Transplant. 28(1):55-62, 2013. (査読あり)

11. Decreased serum carnitine is independently correlated with increased tissue accumulation levels of advanced glycation end products in hemodialysis patients. Adachi T, **Fukami K**, Yamagishi S, Kaida Y, Ando R, Sakai K, Adachi H, Otsuka A, Ueda S, Sugi K and Okuda S. Nephrology 17(8):689-94, 2012. (査読あり)

12. Proteinuria elevates asymmetric dimethylarginine levels via protein arginine methyltransferase-1 overexpression in a rat model of nephrotic syndrome. Kaida Y, Ueda S, Yamagishi S, Nakayama Y, Ando R, Iwatani R, **Fukami K**, Okuda S. Life sciences 24(91): 301-305, 2012. (査読あり)

13. Role of advanced glycation end products (AGEs) oxidative stress in vascular complications in diabetes. Yamagishi SI, Maeda S, Matsui T, Ueda S, **Fukami K**, Okuda S. Biochim Biophys Acta. 1820(5):663-671, 2012. (査読あり)

14. A new vasculitis activity score for predicting death in myeloperoxidase-antineutrophil cytoplasmic antibody associated vasculitis patients. Koike K, **Fukami K**, Yonemoto K, Iwatani R, Obara N, Ueda K,

Toyonaga M, Ueda S, Ohara A, Takeda K, Yamagishi S, Okuda S. Am J Nephrol. 35(1):1-6 2011. (査読あり)

15. Beneficial cardiometabolic actions of telmisartan plus amlodipine therapy in elderly patients with poorly controlled hypertension. Bekki H, Yamamoto K, Sone M, Homma T, Nakata M, Nohara M, **Fukami K**, Okuda S, Yamagishi S. Clin Cardiol. 34(4):261-5, 2011. (査読あり)

16. Tissue level of advanced glycation end products (AGEs) is an independent determinant of high sensitive C-reactive protein levels in hemodialysis patients. Makio Nagano, **Kei Fukami**, Sho-ichi Yamagishi, Kazuko Sakai, Yusuke Kaida, Takafumi Matsumoto, Takuma Hazama, Masahiro Tanaka, Seiji Ueda, and Seiya Okuda. Nephrology. 16(3) 299-303, 2011. (査読あり)

17. Pigment epithelium-derived factor (PEDF) inhibits proximal tubular cell injury in early diabetic nephropathy by suppressing advanced glycation end products (AGEs)-receptor (RAGE) axis. Maeda S, Matsui T, Takeuchi M, Yoshida Y, Yamakawa R, **Fukami K**, Yamagishi SI. Pharmacol Res. 63(3):241-8, 2011. (査読あり)

[学会発表] (計 5 件)

1. DNA aptamer raised against AGEs improves diabetic nephropathy in KK/Ay-Ta mice  
**Kei Fukami**, Sho-ichi Yamagishi, Yusuke Kaida, Yuichiro Higashimoto, Masayoshi Takeuchi, Hiroyoshi Inoue, Seiya Okuda. 日本循環器学会学術集会 2013、3、15-17、パシフィコ横浜

2. DNA aptamer raised against AGEs improves diabetic nephropathy in KK/Ay-Ta mice  
Nana Obara, **Kei Fukami**, Sho-ichi Yamagishi, Yusuke Kaida, Yuichiro Higashimoto, Masayoshi Takeuchi, Seiji Ueda, Hiroyoshi Inoue, Seiya Okuda. 2012 International Symposium on the Maillard Reaction | IMARS. 2012, 9, 16-20, Nancy, France

3. DNA aptamers raised against AGEs improve diabetic nephropathy in KK/Ay-Ta mice.  
Yusuke Kaida , **Kei Fukami**, Sho-ichi

Yamagishi, Yuichiro Higashimoto, Nana Obara, Ryotaro Ando, Yosuke Nakayama, Masayoshi Takeuchi, Takanori Matsui, Seiji Ueda, Hiroyoshi Inoue, Seiya Okuda. American Society of Nephrology. 2011, 11, 10-12. Philadelphia, Pennsylvania

4. AGEs-DNA アプタマーは糖尿病腎症の糸球体硬化を改善する。甲斐田裕介、深水圭、上田誠二、山岸昌一、奥田誠也。日本腎臓学会学術集会 2011、6、15-17、パシフィコ横浜

5. DNA aptamers raised against AGEs improve diabetic nephropathy in KK/Ay-Ta mice  
DNA aptamers raised against AGEs improve diabetic nephropathy in KK/Ay-Ta mice  
Kei Fukami, Sho-ichi Yamagishi, Yuichiro Higashimoto, Yusuke Kaida, Ryuji Iwatani, Ryotaro Ando, Yosuke Nakayama, Masayoshi Takeuchi, Takanori Matsui, Seiji Ueda, Hiroyoshi Inoue, Seiya Okuda. International Society of Nephrology. 2011, 4, 8-12, Vancouver, Canada.

〔図書〕(計8件)

1. 糖尿病性腎症のすべて；腎症の治療・管理・対策とそのエビデンス  
深水圭、奥田誠也  
Visual 糖尿病臨床のすべて 中山書店 168-175 2012

2. Chapter 1 AGEs 化反応の基礎  
AGEs 受容体  
深水圭、奥田誠也  
AGEs と老化 メディカルレビュー社 2012年

3. 特集：糖尿病性腎症への挑戦  
AGE の腎症進展における役割と治療法開発への期待  
深水圭、奥田誠也  
腎と透析 第73巻 2号 134-138 2012年

4. An Overview of Diabetic Nephropathy  
Kei Fukami, Sho-ichi Yamagishi  
Nutritional and Therapeutic Interventions for Diabetes and Metabolic Syndrome  
Chapter 12 P145-153 2012

5. 糖尿病にみられる急性腎不全  
深水圭、奥田誠也  
日本臨床 腎臓症候群(下巻) P137-140 2011年

6. 糖尿病患者の酸化ストレスマーカー・

AGE/PEDF

深水圭、山岸昌一、奥田誠也  
糖尿病と酸化ストレス(メディカルレビュー)  
P 149-153 2011年

7. テルミサルタンのすぐれた降圧効果と高い忍容性  
山岸昌一、戸次久敏、山本喜一郎、曾根正好、中田真詩、野原正敏、深水圭、奥田誠也  
血圧 第18巻、第7号、54-58、2011年

8. 終末糖化産物からみた慢性腎臓病(CKD)の病態解明と治療戦略  
深水圭  
久留米医学会雑誌 第74巻 第3~5号  
P95-100, 2011

〔産業財産権〕  
○出願状況(計1件)

名称：AGE特異的アプタマーの腎疾患治療用途  
発明者：深水圭  
権利者：深水圭、山岸昌一、井上浩義、奥田誠也  
種類：特許  
番号：PCT/JP2011/077062  
出願年月日：2011年11月24日  
国内外の別：国外

○取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等  
なし

6. 研究組織  
(1)研究代表者  
深水圭 (Fukami Kei)  
久留米大学・医学部・准教授  
研究者番号：80309781

(2)研究分担者 ( )

研究者番号：

(3) 連携研究者 ( )

研究者番号 :