

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 26 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462662

研究課題名(和文) RAGEを標的とした加齢黄斑変性の新規治療法の開発

研究課題名(英文) Novel therapeutic strategy targeting advanced glycation end product

研究代表者

白神 史雄 (Shiraga, Fumio)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：50187530

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：加齢黄斑変性は本邦の失明の主要な原因の一つであり、眼内に異常な血管新生を来す疾患である。本研究では加齢によって生体内に増加し血管新生を引き起こすと考えられる終末糖化産物を標的とし、その新規抗体の探索を行った。本研究で得られた新規抗体はいずれも有意な血管新生阻害作用を示さなかったが、今後さらなる探索を進めていく上で基盤となる成果が得られた。

研究成果の概要(英文)：Age-related macular degeneration is one of the major causes of blindness in Japan, and is a disease that causes abnormal angiogenesis in the eye. In this study, we targeted advanced glycation end product that increase by aging and are considered to cause angiogenesis. In this study, we searched new antibodies to the product. All of the novel antibodies obtained in this study did not show any significant angiogenesis inhibitory effect, but the results obtained are considered to be the basis for further research in the near future.

研究分野：眼科

キーワード：加齢黄斑変性 治療

### 1. 研究開始当初の背景

加齢黄斑変性は本邦の失明原因の第4位、欧米の成人の失明原因の第1位の疾患であり、今後患者数が急増すると考えられている。加齢黄斑変性では、網膜(黄斑部)に病的な血管新生が起こり、血管新生からの滲出や出血によって視細胞が障害を受け視力が著しく低下する。近年、病的な血管新生に対して抗VEGF抗体による治療が行われており、視力の“維持”に有効とされている。しかし、ひとたび血管新生が起こると視細胞の障害は不可避であり、視力の“改善”は見込めない。そのため、患者の期待に真に応える治療法であるとは言えない。申請者は、抗VEGF抗体治療の経験(1500例/年)を背景に、加齢黄斑変性に対しては血管新生を来す前に予防的治療を行い、視細胞の障害を未然に防ぐことが極めて重要であると考えた。

加齢黄斑変性では血管新生が生じる前に、黄斑部にドルーゼンと呼ばれる黄色の沈着物が形成される。近年、ドルーゼンが終末糖化産物(AGE)やアミロイド $\beta$ (A $\beta$ )などの炎症原因タンパクから構成されることが判明した。これらのタンパクは加齢や糖尿病に伴って組織に徐々に蓄積し、酸化ストレスや慢性炎症を起こし血管新生を誘導する。そのため、これらの炎症原因タンパクの形成やその下流経路を阻害することが、加齢黄斑変性に対する予防的治療になると考えられる。

申請者らはこれまでに、AGEの受容体であるRAGEに着目しその阻害剤の開発に取り組んできた。その理由は、近年RAGEがAGEのみならず、A $\beta$ やHigh Mobility Group Box Chromosomal Protein 1(HMGB1)、S100、 $\beta$ 2インテグリンMac1などの炎症関連因子の共通の受容体であると判明したためである。すなわち、炎症関連因子を個々に阻害するよりも共通の受容体を阻害することで、より確実に強力な抗炎症効果を得られると考えた。

### 2. 研究の目的

加齢黄斑変性は失明に至る難治性の眼疾患であり、加齢とともに蓄積する炎症原因タンパク(終末糖化産物,アミロイド $\beta$ )による酸化ストレスや慢性炎症を背景として発症する。申請者らはこれまでに、これらの炎症原因タンパクとその関連因子の阻害が脳や心血管疾患の進行を阻害することを明らかにしてきた。また、予備実験において、炎症原因タンパクの共通の受容体であるRAGEを阻害する新規化合物を探索し、候補となる物質を見出した。そこで本研究では、炎症原因タンパクによる酸化ストレスや慢性炎症に対する新規化合物の抑制効果を明らかにし、加齢黄斑変性の新たな治療法開発の基盤となる研究を行う。

### 3. 研究の方法

(1) 網膜色素上皮細胞に対するAGEの細胞障害作用の検討

iPS由来網膜色素上皮細胞に対して、グリセルアルデヒド由来AGE(AGE-2)と、グリコールアルデヒド由来AGE(AGE-3)を作用させ、細胞アポトーシスの誘導や、RAGEを介した炎症性シグナルの変化をwestern blottingで検討した。

(2) RAGE阻害剤の候補となる新規化合物の探索

試験管内結合アッセイ(ELISA)を用いて、RAGE阻害剤の候補化合物を探索した。対象となる化合物は天然物の抽出物、反応中間体、生理活性ペプチド断片である。これらを含む化合物ライブラリーから、ELISAの手法を用いて、網羅的に探索スクリーニングを行った。

(3) 網膜色素上皮細胞を用いた、新規化合物の安全性、酸化ストレス効果、抗炎症効果の評価

①安全性の検討

RAGE阻害剤はRAGEに対して特異的に作用し、正常な細胞機能に悪影響を及ぼさないことが求められる。そこで、網膜を構成する各種細胞を用いて、安全性の評価を行った。使用した細胞は、網膜色素上皮細胞(ARPE-19)とiPS由来網膜色素上皮細胞である。具体的には、候補化合物を細胞に作用させ、細胞の形態、増殖能(MTTアッセイ、増殖曲線)に及ぼす影響について検討した。

②酸化ストレス誘導と新規化合物による酸化ストレス効果の検討

網膜色素上皮細胞(ARPE-19)にtert-Butylhydroperoxide(t-BHP)0.3mMを72時間作用させ酸化ストレスを誘導した。その際に、新規化合物を同時に作用させ72時間後にMTTアッセイを行った。

(4) 新規化合物が加齢黄斑変性動物モデル眼に及ぼす効果の評価

はじめに培養細胞で効果がみられたRAGE阻害剤候補化合物の安全性を正常マウスを用いて評価した。その上で加齢黄斑変性動物モデル眼における疾病進行予防効果を検討した。

①正常マウスにおける候補化合物の安全性評価

正常マウスに候補化合物を眼球内投与もしくは腹腔内投与を行い、マウスに及ぼす影響(体重、血圧、心拍数、食欲等)を評価した。

②加齢黄斑変性動物モデルとしては、以下のレーザー誘導脈絡膜新生血管モデルを使用した。すなわち、オス、8週齢のC57BL/6Jマウスに1眼につき約6発レーザーを照射し、脈絡膜新生血管を誘導した。その上で、新規化合物を腹腔内(4mg/kgを200 $\mu$ L)もしくは眼内(50 $\mu$ g/ml 2 $\mu$ L)に投与し、レーザー照射後10日目に、脈絡膜フラットマウントを作成し、isolectin GS-IB4, Alexa Fluor $\times$ 488

conjugate を用いて、脈絡膜新生血管を染色し、脈絡膜新生血管の面積を ImageJ ソフトウェアを用いて定量評価した。

#### 4. 研究成果

(1) 本研究室で iPS 細胞から網膜色素上皮細胞を分化誘導した。また、数ある AGE の中で、細胞に対する毒性が強いグリセルアルデヒド由来 AGE (AGE-2) と、グリコールアルデヒド由来 AGE (AGE-3) とを作成し、iPS 由来網膜色素上皮細胞に作用させ、細胞アポトーシス誘導の有無を Caspase-3 の発現量で検討した。しかし、これらの AGE を高濃度、長時間付加しても (2000u1/ml, 96 時間) Caspase-3 の発現は不変であった。AGE が RAGE を介して細胞を障害するシグナル経路としては次の 4 つが知られている。すなわち① JAK signal transducer and activator of transcription (STAT)、② MAPKs including ERK1/2, p38, and JNK、③ Ras-Rac-Cdc42、④ (PI3-K)-Akt/PKB である。AGE-2 および 3 が iPS 由来網膜色素上皮細胞に及ぼす影響を検討するため、先述のシグナル経路の内、主な経路として JNK および NFkB 経路の活性化を検討した。iPS 由来網膜色素上皮細胞に AGE-2 および 3 をそれぞれ 100, 400, 1000, 2000  $\mu$ g/ml を 96 時間作用させ、western blotting を行った。しかし、AGE-2 および 3 のいずれにおいても、JNK および NFkB 経路は活性化しなかった。これらの結果は、AGE-2 および 3 が iPS 由来網膜色素上皮細胞に対してそれぞれ単独では細胞障害性作用を起こさないことを示唆する結果であった。

(2) 上記の結果は、当初の予想外の結果であり、今後細胞障害を網膜色素上皮細胞に誘導するためには AGE2, 3 のみでは不十分であることを示すものであった。そこで、今後は AGE 以外の他の RAGE リガンドを用いる必要があると考え、HMGB-1 を一つの候補と考えた。その場合に網膜色素上皮細胞に RGE が存在することを確認する必要があったため、iPS 由来網膜色素上皮細胞における RAGE の存在を western blotting で確認した。

(3) 上記の (1) (2) と並行して、RAGE 阻害剤の候補となる新規化合物の探索を行った結果、抗 HMGB-1 抗体、抗 CRA 抗体、抗 4HNE 抗体の 3 種の抗体候補を抽出することに成功した。そこで、これらの抗体を iPS 由来網膜色素上皮細胞や ARPE-19 の培養液中に添加し、通常の細胞培養条件下では細胞の形態、増殖能に悪影響を及ぼさないことを確認した。次に、ARPE-19 を用いて、t-BHP による細胞障害におけるこれらの新規抗体の保護作用を MTT アッセイで評価した。その結果、t-BHP で誘導された細胞障害は、いずれの抗体のいずれの濃度においても統計学的に有意に改善しなかった (図 1)。

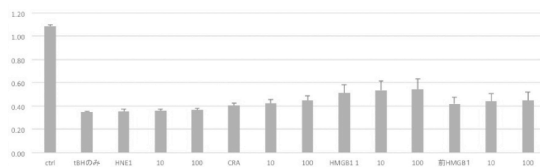


図 1 t-BHP による細胞障害に対する新規抗体の保護効果

(4) 今回使用した新規抗体のうち、HMGB-1 抗体はこれまでに、脳虚血モデルマウスにおいて、の血管からの浸出液の漏出を阻害し、脳浮腫を抑制することが明らかにされている。また、t-BHP による細胞障害に対する保護効果の結果 (図 1) においても、統計学的な有意差は得られなかったが、他の抗体に比べて保護作用を示していた。そこで、マウスの加齢黄斑変性動物モデルに対して HMGB-1 抗体を作用させ、抗血管新生作用を検討した。HMGB-1 抗体ははじめに腹腔内投与を行い、次に硝子体内への投与を行った。その結果、どちらの投与方法においても、HMGB-1 抗体がレーザー誘導脈絡膜血管新生を有意に阻害しなかった (図 2、3、4)。

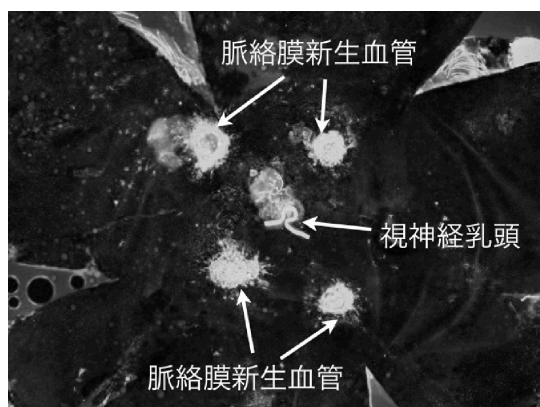


図 2 レーザー照射によって誘導された脈絡膜新生血管

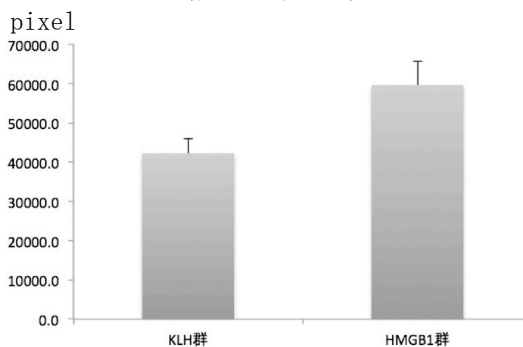


図 3 HMGB-1 抗体による脈絡膜新生血管阻害作用 (腹腔内投与)

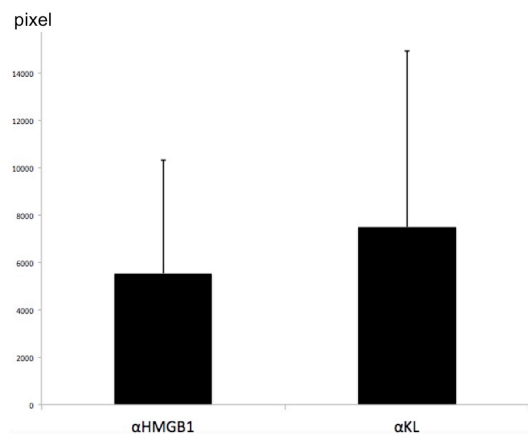


図4 HMGB-1抗体による脈絡膜新生血管阻害作用（硝子体内投与）

以上の結果から、新たに抽出した抗体については本研究で明らかな血管新生阻害作用を示すことはできなかった。今後さらなる新規阻害物質の探索を進め、加齢黄斑変性の新たな治療法開発の基盤となる研究を行うことが課題である。

#### 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）

〔学会発表〕（計1件）

①的場亮、森實祐基、木村修平、米澤朋子、須野学、岡野内俊雄、高島隆、三原研一、佐々木ミチ、飯嶋克昌、白神史雄、**2016-04-07. 01-076**・剥離した内境界膜に含まれる終末糖化産物の定量評価、日本眼科学会、2016年4月7日、仙台国際センター（宮城県仙台市）

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

白神 史雄 (Shiraga Fumio)  
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授  
研究者番号：50187530

##### (2) 研究分担者

西堀 正洋 (Nishibori Masahiro)  
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授  
研究者番号：50135943

森實 祐基 (Morizane Yuki)  
岡山大学・大学病院・講師

研究者番号：50432646

##### (3) 研究協力者

平野 雅幸 (Hirano Masayuki)  
高橋 耕介 (Takahashi Kosuke)  
的場 亮 (Matoba Ryo)