

令和元年6月24日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08564

研究課題名(和文) 高血圧腎障害に対する新規治療薬RAGE-DNAアプタマーの開発とメカニズムの解明

研究課題名(英文) The efficacy of RAGE-DNA aptamer for prevention of hypertensive nephropathy

研究代表者

柴田 了 (Shibata, Ryo)

久留米大学・医学部・講師

研究者番号：10723588

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：高血圧症は慢性腎臓病を引き起こす主な疾患の一つであり、一度高血圧性腎臓病を罹患すると損進行を止めることは容易なことではない。そのため高血圧性腎障害に対する新規治療法を確立することが急務の課題である。我々は高血圧性腎臓病の進行に関与するミネラルコルチコイド受容体の活性化に、Advanced glycation endproducts(AGE)が強く関連していることを突き止めた。そこで次世代分子標的薬であるDNAアプタマー技術を利用してAGE受容体を阻害するDNAアプタマーを開発し、それらが高血圧性腎臓病の進展を抑制することを突き止めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々はAGE-RAGE系の活性化が血圧とは独立してミネラルコルチコイド受容体活性化を介して慢性腎臓病の発症進展に関与していることを発見した。この知見は、AGE-RAGE系が高齢者で活性化していることから鑑みて、高齢者高血圧症例において血圧を厳密に管理しても高血圧性腎障害を改善できないというクリニカルクエッションを解明するヒントであると考えている。さらに我々はRAGEに対するアンタゴニストとして機能するDNAアプタマーを共同研究で開発し、それが高血圧マウスにおいて腎障害を抑制することを突き止めた。以上よりRAGEに対するDNAアプタマーが高血圧性腎障害に対する新たな治療戦略になる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Hypertension-induced kidney disease (HKD) is one of the major diseases that are linked to progression of chronic kidney disease (CKD); however, there has been few sovereign remedies to prevent onset and progression of HKD. Therefore, it is necessary to create new therapeutic strategy for slowing down progression of HKD. Our data demonstrated that mineralocorticoid receptor, a main contributor for CKD progression, is activated by advanced glycation endproducts through receptor for AGE (RAGE). We created DNA aptamer directed against RAGE which functions as antagonist of RAGE and found that RAGE-DNA aptamer is capable of inhibiting progression of HKD through inactivation of MR and subsequently inhibition of profibrotic process. These findings suggest that AGE-RAGE axis is involved in HKD progression and RAGE-DNA aptamer is potentially new therapeutic strategy for inhibition of HKD onset and progression.

研究分野：高血圧性腎障害

キーワード：高血圧性腎障害 RAGE 終末糖化産物 ミネラルコルチコイド受容体

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

グルコースなどの還元糖は遊離アミノ酸と非酵素的に反応することで Schiff 塩基、アマドリ化合物を形成した後、脱水・縮合を経て、不可逆的に AGEs を形成する。このような糖化依存的な生成経路が一般的であるが、AGEs の一つである N^ε-carboxymethyl lysine (CML) は、グルコースの自動酸化・アマドリ化合物の酸化的開裂などの酸化ストレス依存的に産生される (Diabetes, 2004)。このことから、高血糖だけでなく酸化ストレスが増加した状況においても AGEs 産生が亢進することが示唆される。一方、RAGE は免疫グロブリンスーパーファミリーに属する膜 1 回貫通受容体で、多くのリガンドは V-domain に結合する。AGEs が RAGE に結合すると、活性酸素種 (reactive oxygen species; ROS) の産生を促し細胞障害性に働くことが報告されている。透析導入における高血圧腎硬化症の占める割合は、数多くの降圧薬が開発されているにもかかわらず増加の一途を辿っており、高血圧による直接的な臓器障害以外の増悪因子を同定し、治療に介入することが急務の課題と考える。Tanji らは酸化ストレス依存性に産生される CML が高血圧性腎硬化症患者の腎組織において異常蓄積していることを報告した (JASN 2000)。加えて、RAGE が高血圧性腎硬化症の腎組織において発現亢進していることが明らかとなったものの (JASN 2003)、それが病態生理学的な原因なのか、それとも高血圧による結果なのかはいまだに解明されていない。

我々は AGEs-RAGE 系をターゲットとした創薬にも近年着手しており、次世代分子標的薬として注目を集めている核酸アプタマーの作成とその効果について研究を進めていた。AGEs の中で細胞毒性が強いと言われるグリセルアルデヒド由来 AGE に対するアンタゴニストとしての核酸アプタマーを我々は作成し、自然発症 2 型糖尿病マウス KKAY/Ta マウスに持続投与したところ、糖尿病性腎症の発症進展を著明に抑制したことを報告した (Diabetes 2013)。しかしながら、グリセルアルデヒド由来 AGE は RAGE リガンドの 1 つであり、リガンド各々を核酸アプタマーによって抑制することは不可能であるため、RAGE 自身に対する antagonist としての核酸アプタマーに着目した。受容体に対する核酸アプタマーとしては世界に先駆けて、RAGE の v-domain に対するアプタマー (以下 RAGE-DNA アプタマー) の作成に成功したため、RAGE-DNA アプタマーの研究を行う計画としていた。

2. 研究の目的

透析導入原疾患で唯一増加傾向にある高血圧性腎硬化症において、降圧剤のみではその進行を抑制できていないため、高血圧性腎障害における新たな治療ターゲットの創出と創薬を目的とした研究を行う。先行研究にて RAGE KO マウスにデオキシコルチコステロン (DOCA) で高血圧性腎障害を惹起しても尿中アルブミン排泄が抑制されていることから、RAGE への薬学的抑制が腎保護効果を発揮するであろうと仮説を立て、薬物動態および安全性について検討する。加えて、同モデルで誘導されるはずのミネラルコルチコイド受容体 (MR) 活性が RAGE KO マウスでは抑制されることから RAGE に対する核酸アプタマーを作成、腎保護効果の有無とそのメカニズムを明らかにする、RAGE はリガンドと独立して MR 活性を制御している可能性が示唆され、創薬の利益を裏打ちするメカニズムについて解明する。

3. 研究の方法

我々は先行研究で MR 活性化高血圧腎障害モデルにおける RAGE-DNA アプタマーのポドサイト保護に基づく尿蛋白抑制効果を見出した。しかしながら、RAGE-DNA アプタマーの腎保護効果における詳細なメカニズムや、それを裏打ちするであろう RAGE の MR 制御メカニズムについて解明できておらず、ポドサイト培養細胞を用いた *in vitro* 実験を中心に、その究明を行う予定とした。加えて、RAGE-DNA アプタマーの臓器別分布様式や半減期、代謝メカニズムなど薬理的動態の解明および容量別の腎保護効果および有害事象について検討した。

4. 研究成果

RAGE-DNA アプタマーの腎保護効果メカニズムについて

ポドサイト培養細胞に終末糖化産物である Carboxymethyl lysine (CML) を添加したところ、ポドサイト培養細胞におけるミネラルコルチコイド受容体の発現レベルが時間および濃度依存的に増加していた。さらに、その CML に誘導される MR 発現亢進は RAGE アプタマーによって抑制され、MR 拮抗薬であるスピロラクトンでは改善されなかったことから、アルドステロン非依存的に CML が MR 発現亢進に関与していることを突き止めた。

次にアルドステロン-MR 経路が AGE-RAGE 系の活性化に関与するかどうか検討するために、ポドサイト培養細胞にアルドステロンを添加し、RAGE アプタマー、スピロラクトン、L-NAME、Bapta などを共培養し、活性酸素種やそれに誘導産生される AGE の一種である CML の濃度を測定した。アルドステロン添加後のポドサイト細胞質内の ONOO⁻ の発現マーカーであるニトロタイロシン濃度を測定してみると、アルドステロンが ONOO⁻ を誘導しており、それはスピロラクトンで抑制された。また、ONOO⁻ の抑制化合物である Mn-TBAP とアルドステロンを共培養しポドサイト細胞内の CML 濃度を測定してみた。するとアルドステロン投与により細胞内 CML 濃度は有意に増加するが、MnTBAP との共培養にて CML 産生は有意に抑制された。これらの結果から、アルドステロンが MR に結合すると活性酸素種である ONOO⁻ が増加し、グルコース濃度に依存せず AGE の一周である CML を細胞内で増加させることを突き止めた。

これらの知見をマウスにおいても確認するため、DOCA/salt 高血圧マウスの腎臓をニトロタイロシンで蛍光染色すると、高血圧マウスのポドサイトでニトロタイロシンは有意に増加し、RAGE アプタマー投与にて抑制された。このことから、ポドサイト内で MR 活性化後に AGE-RAGE

系が活性化すると、AGE が RAGE を介して MR をさらに活性化させ Vicious cycle を形成するという我々の仮説を立証することができた。

RAGE アプタマーの高血圧性腎障害に対する腎保護効果について検討するために、MR 活性化高血圧モデルである DOCA/salt マウスに対して、RAGE アプタマーを持続皮下投与し、その効果について検討した。その結果、RAGE アプタマーは血圧を変動させないものの、尿中アルブミン排泄を有意に抑制することができた。腎臓組織を評価すると、ポドサイト障害が RAGE アプタマーは改善し、糸球体メサンジウム領域の拡大が有意に抑制されていた。血清 CML 濃度を測定すると、DOCA/salt マウスでは Vehicle マウスと比較し有意に上昇し、それは RAGE アプタマーおよびスピロノラクトンで改善することを突き止めた。くわえて、ポドサイトにおける MR 発現量は RAGE アプタマー投与で有意に低下することから、RAGE アプタマーを用いて AGE-RAGE 系を抑制することは MR 発現量を制御し、ポドサイト障害を改善することで尿中アルブミン排泄を低下させる。長期的な大量の尿中アルブミンは尿細管障害を惹起することから、RAGE アプタマーの尿中アルブミン排泄抑制は、長期的には尿細管障害の抑制ひいては CKD の進展を抑制する可能性を示唆している。

RAGE アプタマーの腎保護効果をさらに説得力あるものにするため、RAGE ノックアウトマウスに DOCA/salt を負荷し、その表現型について検討した。その結果、RAGE ノックアウトマウスでは尿中アルブミン排泄が抑制され、ポドサイト障害は改善、さらにポドサイトにおける MR 発現は有意に改善していた。腎組織中の tissue growth factor(TGF)- β 、Serum-glucose kinase1(SGK1)、connective tissue growth factor(CTGF)の mRNA レベルは RAGE ノックアウトマウスにおいて有意に低下することから、RAGE をターゲットとした治療戦略は、CKD 進展を抑制することが示唆される結果であった。

以上の結果から、AGE-RAGE 系の活性が高血圧性腎障害の進展に関与する MR 発現を制御していることを見出すとともに、RAGE に対する DNA アプタマーは高血圧性腎障害の進展を抑制することを結論づけた。RAGE DNA アプタマーは高血圧性腎障害の新たな治療戦略になる可能性がある。

原発性アルドステロン症患者の末梢単核球を抽出し、アルドステロン過剰状態における AGE-RAGE の発現量について検討した。まだ症例を集めているところであるが、Preliminary data として、MR mRNA 量と、RAGE のリガンドである HMGB1 の発現量が強い正相関を示すことから、MR と AGE-RAGE 系活性の関連性についてヒトにおいても証明する予定としている。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

RAGE-aptamer attenuates deoxycorticosterone acetate/salt-induced renal injury in mice. Taguchi K, Yamagishi SI, Yokoro M, Ito S, Kodama G, Kaida Y, Nakayama Y, Ando R, Yamada-Obara N, Asanuma K, Matsui T, Higashimoto Y, Brooks CR, Ueda S, Okuda S, Fukami K.
Sci Rep. 2018 Feb 8;8(1):2686.

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況 (計 1 件)

名称：RAGE アプタマーおよびその用途
発明者：山岸 昌一、深水 圭、東元 祐一郎、松井 孝憲、田口 顕正
権利者：
種類：
番号：特開 2016-79184 (P2016-79184A)
取得年：2016
国内外の別：国内

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：深水 圭

ローマ字氏名：(FUKAMI , kei)

所属研究機関名：久留米大学

部局名：医学部内科学講座腎臓内科部門

職名：教授

研究者番号 (8 桁) : 80309781

(2)研究協力者

研究協力者氏名：田口 顕正

ローマ字氏名：(TAGUCHI , kensei)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。