

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：37104

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16106

研究課題名(和文) RAGE-aptamerのループス腎炎に対する腎保護作用とそのメカニズムの解明

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

研究代表者

田口 顕正 (TAGUCHI, KENSEI)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：10647738

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：SLEモデルマウスであるMRL-lprマウスにおいて尿中RAGE排泄が増加し、尿細管障害マーカーである尿中NAG値と正相関する。RAGEをターゲットとした治療がループス腎炎に効果があるか検討するためRAGEに対するアンタゴニストであるRAGEアプタマーを作成し、8週間の持続投与を行った。その結果、血漿BUNの改善、血漿IgG値低下・血漿C3値増加と腎機能の改善とともにSLE病勢の抑制が認められた。組織学的には半月体形成・ワイヤループ病変形成が抑制され、炎症性サイトカイン産生が有意に抑制されていた。以上よりRAGEをターゲットとした治療法がループス腎炎の新たな治療戦略になる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

成人SLE患者の約60%でループス腎炎を発症し、LN症例の約25%が発症後10年以内に末期腎不全に至る。加えてステロイド抵抗性LNや長期ステロイド内服による重篤な副作用の存在を考慮すると、新たな治療戦略の創出が急務の課題である。我々はRAGEがSLEモデルマウスで過剰発現しループス腎炎の発症進展に関与していることを突き止めた。次世代分子標的薬であるRAGEアプタマーを作成しSLEモデルマウスで効果を検討した結果、腎機能保護効果が認められ、今後のSLE治療に新たなオプションをもたらすことができると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Urine RAGE concentration was found to be increased over time in MRL-lpr mice, SLE-prone mice. The increase in urine RAGE was also parallel with urine NAG concentration, a marker of tubular damage. To determine whether RAGE-targeting therapy is beneficial for lupus nephritis, we created DNA-aptamer directed against RAGE (RAGE-apt) that can inhibit RAGE function as an antagonist and we injected RAGE-apt into MRL-lpr mice subcutaneously for 8 weeks. The mice treated with RAGE-apt showed the decrease in plasma BUN and IgG and the increase in plasma C3 levels, suggesting that RAGE-apt improved renal dysfunction and immune system abnormality. Histological analysis demonstrated that RAGE-apt reduced the formation of crescent and wire loop lesion and suppressed macrophages infiltration. Further, RAGE-apt reduced the production of inflammatory cytokines in MRL-lpr mice. Therefore, RAGE-apt can become a potent novel therapeutic strategy for inhibiting the progression of lupus nephritis.

研究分野：ループス腎炎

キーワード：ループス腎炎 RAGEアプタマー 尿細管障害

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

成人 SLE 患者の約 60%でループス腎炎(LN; Lupus nephritis)を発症し、LN 症例の約 25%が発症後 10 年以内に末期腎不全に至る[1]。加えてステロイド抵抗性 LN や長期ステロイド内服による重篤な副作用の存在を考慮すると LN はいまだに SLE 患者の生存率および QOL(quality of life)を規定する重要な因子である。RAGE (receptor for AGEs)は免疫グロブリンスーパーファミリーに属するパターン認識受容体で、終末糖化産物のみならず数多くのリガンドが結合し細胞内シグナルを惹起する。とくに SLE において、死細胞から放出される nucleosome や HMGB1 といった核内蛋白は RAGE に結合し免疫系を賦活化することが知られており、RAGE が SLE 発症に関与しているのではないかと考えられていた。実際に、ループス腎炎患者の糸球体において RAGE が過剰発現していること[2]や RAGE 遺伝子多型が SLE 患者の尿蛋白量や血清クレアチニン値の上昇と正相関していることが報告され[3]、RAGE はループス腎炎の発症進展に強く関連していることが示唆される。

## 2. 研究の目的

ループス腎炎は発症後 10 年以内に約 25%が末期腎不全に至る重篤な腎疾患で、免疫抑制剤の進歩により以前と比べ予後は改善しているものの治療抵抗例が稀ではなく、新たな治療戦略の創出が急務の課題である。我々の先行研究において、SLE-prone mice である MRL/lpr マウスにおいて、尿蛋白が出現する以前より腎臓内 RAGE 発現が増加すること、さらには尿中 RAGE 排泄も増加することが明らかとなった。そのため RAGE をターゲットとした治療薬が新たなループス腎炎発症および進行の予防に効果を示す可能性がある。そこで申請者は RAGE に対する核酸アプタマーを作成しループス腎炎の進展抑制を目的とした新規治療薬になるか検討するとともに、血清・尿中 RAGE が SLE の病勢に依存しないループス腎炎発症のバイオマーカーになるか研究を行う。

## 3. 研究の方法

### 1. SLE 患者の血清・尿中 RAGE が発症予測バイオマーカーになるか

1-1; SLE 患者において LN 発症群と LN 未発症群で血清・尿中 RAGE 濃度を測定する。

1-2; MRL-lpr マウスにおいて各タイムポイントで尿中 RAGE 濃度を測定し、既存の腎臓関連パラメーターとの関連性および腎臓組織学的変化との相関関係を解析する。

1-3; LN における RAGE の腎臓内発現パターンの解析を行う。

### 2. RAGE アプタマーは LN の新規治療戦略になるか

RAGE に対するアンタゴニストである次世代分子標的薬 RAGE アプタマーを SELEX 法にて作成し[4]、MRL/lpr マウスに RAGE アプタマーを持続皮下投与する(8 週 16 週令)。腎機能変化、腎組織学的変化、炎症性サイトカイン発現量、尿蛋白・尿中アルブミン排泄量の評価を行う。

## 4. 研究成果

### SLE 患者の尿中 RAGE 濃度測定

まず我々は SLE 患者の尿中 RAGE 濃度の測定を行ったところ、使用した ELISA ではヒト RAGE を検出することができなかった。尿の保存期間が長く RAGE の構造変化が起きている可能性や、ELISA の抗体がヒト RAGE に対する親和性・特異性が低い可能性などが考えられ、今後新鮮尿を用いる方法や ELISA 以外の方法を検討している。

### MRL-lpr マウスにおける RAGE 発現パターン

MRL-lpr マウスの RAGE 発現がどの細胞で増加しているかについて免疫蛍光染色を用いて解析した。メサンギウム細胞マーカー (COL4a1) と RAGE の発現は一致せず、ポドサイトおよび血管内皮細胞と一致していた。ポドサイトの RAGE は尿細管腔側の膜表面に発現していたものの、コントロールと比較しその増加は大きくなかった。一方で、CD34 でマークした血管内皮細胞において、RAGE 発現増加率が最も大きかった。ワイヤーループ病変において RAGE が強発現していることから、RAGE の血管内皮病変への関与が強くと示唆される (図 1)。さらに腎臓内血管周囲に集簇する免疫細胞について RAGE 発現を検討したところ、好中球・顆粒球・T 細胞での RAGE 発現はなく、B 細胞において RAGE 発現が亢進していた。また尿細管細胞では、週令が早い時期から遠位尿細管の RAGE が増加し、その後病勢が進行するにつれて近位尿細管での RAGE 発現が亢進するほか、近位尿細管では RAGE 陽性 punctae が多数認められ、これらはエンドゾーム表面マーカーである Rab7 と共陽性であり、RAGE が尿細管のエンドゾーム機構を制御している可能性が示唆された。

### MRL-lpr マウスにおける尿中 RAGE 濃度と腎障害尿中マーカーの関連性についての検討

MRL-lpr マウスでは SLE の病勢が進行するにつれて、尿細管障害マーカーである尿中 NAG 濃度および腎障害マーカーである尿蛋白量が増加する (図 2a)。16 週令における尿中 RAGE 濃度は尿中 NAG 濃度と強い正相関を示したが (図 2b)、尿蛋白量とは有意な相関は認められなかった (図 2c)。尿中 NAG は尿細管マーカーであることから、尿中 RAGE 濃度はループス腎炎における尿細管障害のマーカーになる可能性がある。

### MRL-lpr における RAGE アプタマーの治療効果

SLE-prone mice である MRL-lpr マウスに RAGE アプタマーと、ランダムな配列で RAGE に結合力を有さないコントロールアプタマーを持続皮下投与し、ループス腎炎の進行を抑制するか否かについて検討した。MRL-lpr マウスとバックグラウンドが一致した MRL-MPJ マウスをコントロール群として作成した。

#### 1) 腎臓関連パラメーターの変化

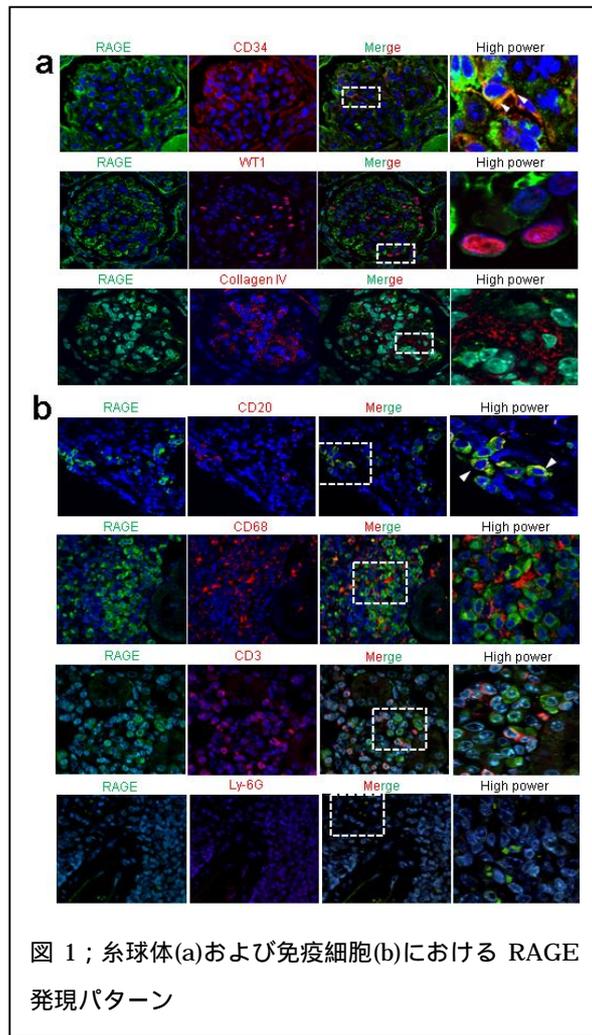


図 1; 糸球体(a)および免疫細胞(b)における RAGE 発現パターン

	MRL/MPJ (n=5)	MRL/lpr + Ctrl-apt (n=9)	MRL/lpr + RAGEapt (n=5-6)
Systolic BP (mmHg)	94.3 ± 2.4	105.9 ± 3.9 †	90.0 ± 7.0 †
HR (bpm)	626.8 ± 30.6	598.7 ± 22.8	571.2 ± 17.3
KW/BW (mg/g)	8.0 ± 0.2	15.0 ± 0.7 *	14.1 ± 0.5 *
Plasma BUN (mg/dL)	28.6 ± 1.5	50.8 ± 4.8 *	28.9 ± 1.3 #
Plasma Na (mEq/L)	152.0 ± 0.4	178.6 ± 1.6 *	162.6 ± 2.4 * #
Plasma K (mEq/L)	6.4 ± 0.3	8.4 ± 0.3 *	7.3 ± 0.2 * #
Plasma IgG (mg/dL)	20.3 ± 3.0	210.1 ± 17.6*	145.6 ± 15.3 * #
Plasma C3 (mg/dL)	23.0 ± 0.9	20.8 ± 1.8	28.0 ± 1.4 * #
UAE (µg/mgCre)	1.3 ± 0.5	69.5 ± 23.9	70.2 ± 17.0

Data are means ± SEM.

\*P < 0.05 vs. MRL/MPJ. #P < 0.05 vs. MRL/lpr + Ctrl-apt,

†P = 0.051 vs. MRL/MPJ, ‡P = 0.055 vs. MRL/lpr + Ctrl-apt.

表 1; 各種パラメーターの比較

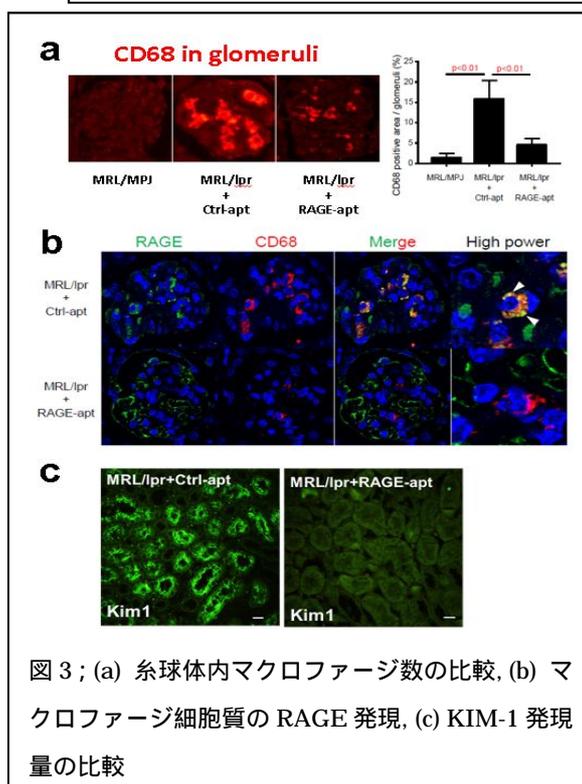
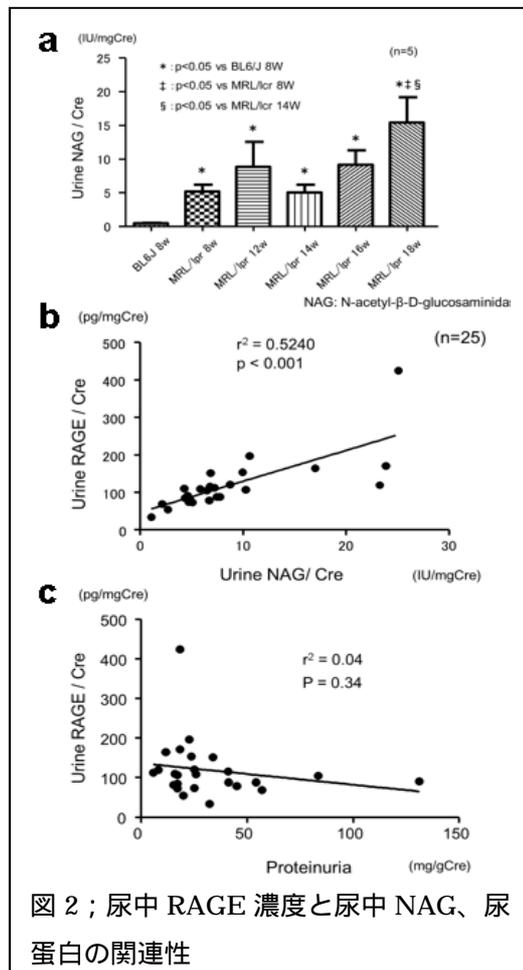
血漿 BUN 値・ナトリウム値・カリウム値は RAGE アプタマー投与により改善を示し、免疫反応の指標である血漿 IgG 値も RAGE アプタマー投与にて低下している。血漿中 C3 値低下が改善していることから、RAGE アプタマー投与にて腎機能の改善のみならず、全身性の免疫応答異常も改善していることが示唆された(表 1)。さらに収縮期血圧の低下も認められており、腎機能改善の他に、後述する RAGE アプタマーによる血管内皮障害抑制がこのような表現型獲得に寄与したと考えられる。

## 2) RAGE アプタマーはマクロファージ浸潤を抑制し、尿細管障害を緩和する

RAGE アプタマー投与群においてマクロファージ活性化が抑制されていた。具体的には、腎臓内マクロファージ数が有意に減少しており、とくに糸球体のマクロファージ数が著明に減少していた。さらに RAGE アプタマー治療群ではマクロファージ細胞質における RAGE 陽性 punctae の数が減少していることから、マクロファージにおけるリガンド処理およびその後のマクロファージ活性化に RAGE が関与している可能性が示唆された(図 3a-b)。尿細管障害マーカーである Kidney injury molecule-1 (KIM-1)の発現を解析したところ、RAGE アプタマー投与群において KIM-1 の発現は著明に減少していた(図 3c)。

## 3) RAGE アプタマーはループ腎炎における糸球体病理所見を改善する

ループ腎炎の代表的な病理所見であるメサンギウム領域の拡大について検討したところ、RAGE アプタマーは MRL-lpr マウスで高率に認められるメサンギウム領域拡大を抑制することが明らかとなった(図 4a-b)。さらに半月体の形成についても同様に、RAGE アプタマー投与群において有意に抑制されていた(図 4a and c)。また、血管内皮病変の代表的病理所見であるワイヤループ病変について、RAGE アプタマー投与にてその病理所見発症は有意に抑制されていた。このことから糸球体病変の改善に RAGE アプタマーは寄与していることが明らかになった(図 4d-e)。



#### 4) RAGE アプタマー投与群で腎臓内の炎症性サイトカイン産生が抑制される

炎症性サイトカインが増加すると、SLE の進行に拍車がかかると同時に、ループス腎炎の進展に強く関連する[5]。そこで RAGE アプタマー治療群、コントロールアプタマー投与群 MRL-lpr マウス、および MRL/MPJ マウスにおける各臓器の炎症性サイトカインの産生について qPCR を用いて検討を行った。腎臓においてコントロール群である MRL/MPJ マウスと比較し MRL-lpr マウスでは IL-6、TNF- $\alpha$ 、MCP-1 などの炎症性サイトカインは著明に増加し、それは RAGE アプタマー投与にて有意に抑制されていた(図 5a)。肝臓においても IL-6 および MCP-1 の増加が RAGE アプタマーにて改善していた。一方で、脾臓においては IL-6 および MCP-1 の増加が認められるものの、RAGE アプタマーのサイトカイン産生抑制効果は認められなかった。肺において MCP-1 の上昇と RAGE アプタマーによる抑制が認められるものの、IL-6・TNF- $\alpha$  の有意な変化は認められなかった。我々の先行研究において、放射性アイソトープを用いた体内分布解析では RAGE アプタマーは腎臓・肝臓・骨格筋への分布が最も多いことを突き止めており、腎臓・肝臓での炎症性サイトカイン抑制作用が強い理由の一つとして、RAGE アプタマーの臓器別分布を反映していると考えている。

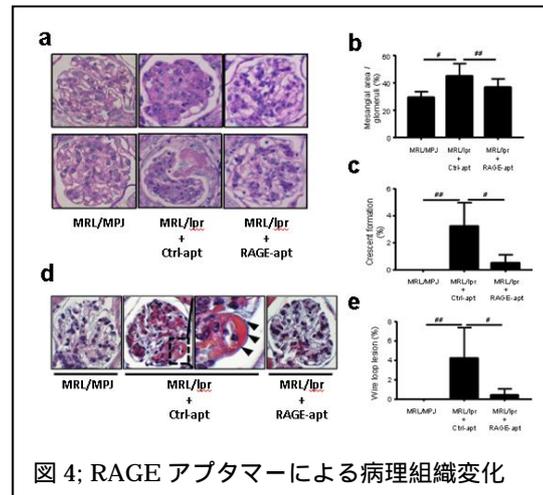


図 4; RAGE アプタマーによる病理組織変化

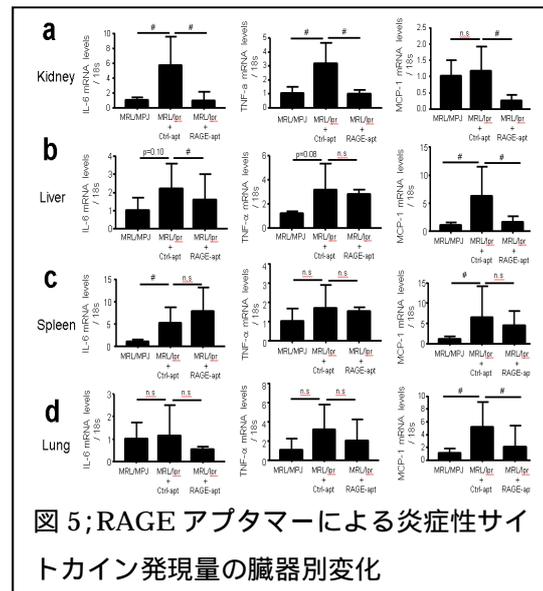


図 5; RAGE アプタマーによる炎症性サイトカイン発現量の臓器別変化

#### 引用文献

1. Pons-Estel, G.J., et al., *Understanding the epidemiology and progression of systemic lupus erythematosus*. Semin Arthritis Rheum, 2010. **39**(4): p. 257-68.
2. Tanji, N., et al., *Expression of advanced glycation end products and their cellular receptor RAGE in diabetic nephropathy and nondiabetic renal disease*. J Am Soc Nephrol, 2000. **11**(9): p. 1656-66.
3. Martens, H.A., et al., *Receptor for advanced glycation end products (RAGE) polymorphisms are associated with systemic lupus erythematosus and disease severity in lupus nephritis*. Lupus, 2012. **21**(9): p. 959-68.
4. Taguchi, K., et al., *RAGE-aptamer attenuates deoxycorticosterone acetate/salt-induced renal injury in mice*. Sci Rep, 2018. **8**(1): p. 2686.
5. Iwata, Y., et al., *The role of cytokine in the lupus nephritis*. J Biomed Biotechnol, 2011. **2011**: p. 594809.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kensei Taguchi, Bertha C Elias, Craig R Brooks, Seiji Ueda, Kei Fukami	4. 巻 25;84(1)
2. 論文標題 Uremic Toxin-Targeting as a Therapeutic Strategy for Preventing Cardiorenal Syndrome	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Circ J	6. 最初と最後の頁 2-8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1253/circj.CJ-19-0872	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kensei Taguchi
2. 発表標題 DNA-aptamer raised against RAGE improves the development of lupus nephritis in MRL/lpr mice
3. 学会等名 American society of Nephrology（国際学会）
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 ループス腎炎を処置または予防するための医薬組成物およびループス腎炎のバイオマーカー	発明者 田口顕正、深水圭	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2018-150272	取得年 2018年	国内・外国の別 国内

〔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
---------------------------	-----------------------	----