様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科研費 KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ３０ 年　 ６ 月　 ７ 日現在

機関番号：３５３０７
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2015～2017
課題番号：１５Ｋ０８６０５

研究課題名（和文）内因性ＡＧＥをコアとする組織リモデリング病態の発症機序解明と新規標的治療法開発

研究課題名（英文）Roles of AGEs as exacerbation factor in pathogenesis of tissue remodeling and the development of novel targeted therapy

研究代表者
森　秀治（MORI, Shuji）

就実大学・薬学部・教授

研究者番号：５０２２０００９

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）：組織リモデリング病態の形成に関わる因子を見出すために，タンパク質アレイ解析を実施し，HMGB1結合因子としてTWEAKを見出した。TWEAKは，血管内皮細胞のIL-8産生を増大させた。また，AGEは特異的にTWEAKと結合し，これによってTWEAK誘導性IL-8産生応答を含むTWEAKの生理活性を抑制した。本知見から，組織リモデリング病態の制御のための新たな治療標的分子として，TWEAK－AGEsから成る複合体が重要な役割を示す事が示唆された。

研究成果の概要（英文）：We screened the binding factor which can interact with HMGB1 by ProtoArray analysis, and studied the pathophysiological roles of its interaction. As the result, we found that TWEAK can interact with HMGB1 with high affinity. TWEAK induced the enhancement of IL-8 mRNA expression in endothelial cells. AGEs specifically bind to TWEAK, and inhibited some inflammatory activities including TWEAK-induced IL-8 mRNA expression. These findings indicated the importance of TWEAK-AGEs interaction as novel therapeutic target molecule in the inflammatory diseases.

研究分野：薬理学，応用薬理学

キーワード：炎症　組織リモデリング　サイトカイン　分子標的

１．研究開始当初の背景
(1)　組織リモデリングは，心筋梗塞・糖尿病・気管支喘息などの慢性炎症に起因した難治性疾患の増悪化に深く関与し，高い死亡率と重度後遺症による看護・介護等の医療負担も大きく，その損失は極めて甚大である。しかしながら，これらの疾患に対する根治的治療法は未確立のままであり，その克服は，現代医療が取り組むべき最重要課題の一つと言える。組織リモデリングは，病的な組織構造と機能障害を伴った重篤な難治性疾患を意味し，その発症メカニズムや増悪化に関わる因子を見出し，その病態生理や制御方法を究明する事は，疾患の未然防止や新たな分子標的治療の開発につながる極めて重要な研究対象と考えられた。

(2)　我々は，自然免疫系の主役として生体防御に重要な役割を果たす事で知られる単球/マクロファージが，細胞接着因子の発現を介して，リンパ球や内皮細胞などの様々な細胞と相互作用し，炎症惹起や組織修復等に重要な働きをしている事を明らかにして来た。その研究プロセスの中で，偶然にも組織リモデリング病態時に病巣局所に出現する生体内因子（HMGB1, high mobility group box-1）の存在を新たに見出し，これが組織リモデリング病態の増悪化に深く関わっている事を見出した。その後の研究で，HMGB1 は白血球遊走や接着因子発現亢進などの生理活性を有し，炎症惹起に伴う濃度上昇も認められた。HMGB1 に対する中和抗体を作製し，脳梗塞モデル動物に投与したところ，抗体は梗塞時の過剰な生体応答を減弱し，梗塞巣面積を劇的に縮小させた。更に，抗体による治療効果は，その他にクモ膜下出血モデルや糖尿病合併症モデル等においても観察された。HMGB1 の生理活性，即ち起炎活性は，主に細胞表面上に存在する特異受容体（RAGE）を刺激する事によって発揮される事も明らかとなった。従来より RAGE はパターン認識受容体に分類され，HMGB1 の他にも，糖尿病などの生活習慣病の際に糖化反応の増大に伴って高産生される終末糖化産物（AGEs，advanced glycation end products）に対しても高い結合親和性を示す事が明らかとなっている。

(3)　これらの知見は，受容体 RAGE を介した起炎性シグナルを何らかの手法で遮断する事が組織リモデリング病態の予防や治療を行う上で重要である事を示唆し，また HMGB1－AGEs－受容体 RAGE をコアとする因子に相互作用を示す他の生体内因子の同定を行う事が，組織リモデリング病態に対する新たな治療標的を見出す上で極めて重要である事を意味するものと考えられた。

２．研究の目的
(1)　組織リモデリングは，脳梗塞や糖尿病などの慢性炎症に起因した難治性疾患の増悪化に深く関与し，本邦における死因の上位を占め，高い再発リスクと重度後遺症に伴う医療負担が甚大であるにも拘わらず，有効な治療法は未確立のままである。これまでに我々は，組織リモデリング病巣局所に出現し，過剰な免疫亢進作用によって病態増悪化を惹起する因子として HMGB1 を見出した。加えて，本因子に対する抗体投与が，疾患モデル（糖尿病や脳梗塞モデル等）に対して著効性を示す事から，HMGB1 の遮断が組織リモデリング病態の治療・予防に直結している事を発見した。また，これまでの知見から HMGB1 はパターン認識受容体である RAGE を刺激して，起炎性活性を発揮する事が判明しているが，RAGE を刺激する因子としては，他に終末糖化産物（AGEs）が知られている。しかしながら，現時点で，病巣局所において AGEs や HMGB1 が単独で RAGE を刺激して活性を発揮しているのか，あるいは他の生体内因子と相互作用して複合体を形成した状態で作用しているのかについては不明なままであった。病巣部位での存在様式が明確になれば，新たな炎症制御機構の有無や治療標的分子の可能性などを明らかにする事につながり，極めて興味ある研究課題であると思われた。

(2)　この様な背景の下，本研究では 1) AGEs や HMGB1 がコアとなっている起炎性複合体構成因子の探索を行い，2) 構成因子間の相互作用に基づいて AGEs 等の機能が如何に変化するかを究明し，新たな組織リモデリング治療の開発につなげて行く予定である。

３．研究の方法
(1)　アレイ解析を用いた起炎性複合体構成因子の網羅的探索：組織リモデリング病態の進行組織病片から HMGB1 を単離し，アミノ酸配列情報を基にして，組換え型 HMGB1 を調製し，この標識体をプローブとしたタンパク質マイクロアレイ解析による起炎性複合体構成因子の網羅的探索と同定をはかる。HMGB1 のフル DNA をタグ付き大腸菌発現ベクターに入れ，常法に基づいて組換え体タンパク質として発現させる。発現誘導した組換え体タンパク質をアフィニティ精製し，高純度の可溶性標品を得る。次に，精製標品に標識化（ビオチン化，蛍光化）を施し，これを固相法の原理に基づいてタンパク質マイクロアレイ（ProtoArray）と反応させる。アレイ解析では事前に 10,000 種を超える GST 融合ヒト機能性タンパク質をアレイ上にスポットしてあり，これによって極めて網羅的かつ迅速に複合体形成の有無を検出する事が可能となる。アレイへの標識化 HMGB1 の反応に続いて AlexaFluor 化ストレプトアビジンを反応させ，洗浄・乾燥後に蛍光強度をスキャンする事により複合体形成因子の同定をはかる。

(2)　起炎性複合体構成因子間の相互作用に基づいた炎症応答制御機構の解明：前項で見

出された起炎性複合体構成因子と AGEs との相互作用に基づいて，炎症応答変化の実態について解析を進める。具体的には，受容体 RAGE を発現している培養細胞（EA.hy.926 内皮細胞株）を用いて，AGEs との複合体形成，すなわち両者間の相互作用に伴う細胞応答（例えば，NF-κB 活性化やサイトカイン発現など）の変化について検討し，その病態生理学的意義を明らかにしていく。

４．研究成果

(1) アレイ解析を実施し，得られた蛍光強度のうちで Z-ファクターが高値の順にソートし，標準タンパク質よりも高い蛍光シグナルを与えるものを複合体形成因子として選別した。その結果，HMGB1 に対して高親和性を示す複合体構成因子候補として，腫瘍壊死因子（TNF）に類似配列を持つ TWEAK を見出す事に成功した。

(2) TWEAK と AGEs との相互作用について，培養細胞株を用いた炎症応答を評価系に用いて解析を行った。実際には，内皮細胞株を用いて，TNFα または TWEAK 誘導性の IL-8 遺伝子発現応答に及ぼす AGEs 共存の効果を，リアルタイム PCR によって測定した。また，プルダウンアッセイは，組換え体 His タグ付加 TWEAK を調製し，これと AGEs を用いて行った。加えて，NF-κB 活性化は，古典経路ならびに非古典経路に特異的な抗体を用いてウェスタンブロッティングによって検討した。その結果，AGEs は TWEAK 誘導性の IL-8 mRNA 発現を濃度依存的に抑える事が明らかとなった。その際，AGEs 自体は IL-8 発現応答に影響を与えない事も判明した。プルダウンアッセイによって，AGEs が TWEAK に直接的に結合する事も見出された。TNFα は IL-8 産生を誘導し，その際の古典的 NF-κB 活性化は TWEAK を前処置しておく事によって抑制されたが，その一方で TWEAK 自体による非古典的 NF-κB の活性化は TWEAK を前処置する事によって亢進した。更に TWEAK の前処理による亢進反応は，AGEs を共存させる事によって遮断する事も明らかとなった。これらの知見は，AGEs と TWEAK との間に直接的な相互作用が存在し，これによって内皮細胞の炎症応答に複雑に影響を与え，組織リモデリング病態の形成に寄与している可能性を示唆するものであり，AGEs－HMGB1－TWEAK－RAGE からなる機能的複合体形成が新たな創薬標的になり得るものと考えられた。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計６件）

① Watanabe M, Toyomura T, Wake H, Liu K, Teshigawara K, Takahashi H, Nishibori M, Mori S：Advanced glycation end products attenuate the function of tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis to regulate the inflammatory response. Mol Cell Biochem, 査読有, 434 巻, 2017, 153-162 DOI:10.1007/s11010-017-3045-6

② Morioka Y, Teshigawara K, Tomono Y, Wang D, Izushi Y, Wake H, Liu K, Takahashi HK, Mori S, Nishibori M：The specific localization of advanced glycation end-products (AGEs) in rat pancreatic islets. J Pharmacol Sci, 査読有, 134 巻, 2017, 218-224 DOI:10.1016/j.jphs.2017.07.005

③ Fu L, Liu K, Wake H, Teshigawara K, Yoshino T, Takahashi H, Mori S, Nishibori M：Therapeutic effects of anti- HMGB1 monoclonal antibody on pilocarpine- induced status epilepticus in mice. Sci Rep, 査読有, 7 巻, 2017, 1179 DOI:10.1038/s41598-017-01325-y.

④ Wang D, Liu K, Wake H, Teshigawara K, Mori S, Nishibori M：Anti-high mobility group box-1 (HMGB1) antibody inhibits hemorrhage-induced brain injury and improved neurological deficits in rats. Sci Rep, 査読有, 7 巻, 2017, 46243 DOI:10.1038/srep46243

⑤ Haruma J, Teshigawara K, Hishikawa T, Wang D, Liu K, Wake H, Mori S, Takahashi HK, Sugiu K, Date I, Nishibori M：Anti-high mobility group box-1 (HMGB1) antibody attenuates delayed cerebral vasospasm and brain injury after subarachnoid hemorrhage in rats. Sci Rep, 査読有, 6 巻, 2016, 37755 DOI:10.1038/srep37755

⑥ Izushi Y, Teshigawara K, Liu K, Wang D, Wake H, Takata K, Yoshino T, Takahashi HK, Mori S, Nishibori M：Soluble form of the receptor for advanced glycation end-products attenuates inflammatory pathogenesis in a rat model of lipopolysaccharide- induced lung injury. J Pharmacol Sci, 査読有, 130 巻, 2016, 226-234 DOI:10.1016/j.jphs.2016.02.005

〔学会発表〕（計 10 件）

① 森 秀治, 渡邊政博, 和氣秀徳, 劉克約, 勅使川原匡, 高橋英夫, 西堀正洋, 豊村隆男：AGEs-RAGE 間相互作用に影響を与える生理活性因子の同定と性状. ConBio2017（第 90 回日本分子生物学会, 第 90 回日本生化学会合同大会, 2017 年

12 月 7 日，神戸国際会議場（神戸）

② 渡邊政博，豊村隆男，和氣秀徳，劉克約，勅使川原匡，高橋英夫，西堀正洋，森　秀治：AGEs が TWEAK の機能に与える影響の解析．第 56 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会，2017 年 10 月 22 日，徳島大学（徳島）

③ 森　秀治，渡邊政博，和氣秀徳，勅使川原匡，劉克約，高橋英夫，西堀正洋，豊村隆男：AGEs 親和性に基づく AGEs 結合因子の同定と細胞応答変化．第 38 回日本炎症・再生医学会，2017 年 7 月 19 日，大阪国際会議場（大阪）

④ 森　秀治，渡邊政博，和氣秀徳，劉克約，勅使川原匡，高橋英夫，西堀正洋，豊村隆男：AGEs 結合因子刺激に対するマクロファージ系細胞の応答性．日本薬学会第 137 年会，2017 年 3 月 27 日，仙台国際会議場（仙台）

⑤ 森　秀治，渡邊政博，和氣秀徳，劉克約，勅使川原匡，高橋英夫，西堀正洋，豊村隆男：70kD AGEs 結合因子による AGEs シグナリングへの影響．第 39 回日本分子生物学会年会，2016 年 11 月 30 日，パシフィコ横浜（横浜）

⑥ 渡邊政博，豊村隆男，和氣秀徳，劉克約，勅使川原匡，高橋英夫，西堀正洋，森　秀治：AGEs による TNF 関連分子の機能変化．日本薬理学会近畿部会，2016 年 11 月 19 日，京都大学（京都）

⑦ 森　秀治，渡邊政博，和氣秀徳，劉克約，勅使川原匡，高橋英夫，西堀正洋，豊村隆男：HMGB1 親和性因子による AGEs-RAGE 結合性の増大．日本薬学会第 136 年会，2016 年 3 月 27 日，パシフィコ横浜（横浜）

⑧ 森　秀治，渡邊政博，和氣秀徳，劉克約，勅使川原匡，高橋英夫，西堀正洋，豊村隆男：AGEs-RAGE 結合増大活性を示す HMGB1 結合因子の探索．BMB2015 第 38 回日本分子生物学会・第 88 回日本生化学会合同大会，2015 年 12 月 1 日，神戸国際会議場（神戸）

⑨ 渡邊政博，豊村隆男，和氣秀徳，劉克約，勅使川原匡，高橋英夫，西堀正洋，森　秀治：HMGB1 と相互作用するサイトカインに対する AGEs の影響．BMB2015 第 38 回日本分子生物学会・第 88 回日本生化学会合同大会，2015 年 12 月 1 日，神戸国際会議場（神戸）

⑩ 森　秀治，和氣秀徳，劉克約，勅使川原匡，高橋英夫，西堀正洋，豊村隆男：HMGB1 結合因子の同定と病態生理学的意義．日本薬学会第 135 年会，2015 年 3 月 26 日，神戸国際会議場（神戸）

６．研究組織

(1) 研究代表者
森　秀治（MORI Shuji）
就実大学・薬学部・教授
研究者番号：５０２２０００９

(2) 研究分担者
豊村　隆男（TOYOMURA Takao）
就実大学・薬学部・講師
研究者番号：４０４２５１３７

渡邊　政博（WATANABE Masahiro）
就実大学・薬学部・助教
研究者番号：１０７５８２４６