

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06461

研究課題名(和文) 催動脈硬化作用を持つ終末糖化産物の構造体の同定 - アプタマーを用いた解析

研究課題名(英文) Identification of structures of advanced glycation end-products responsible for proatherosclerotic effects - analysis using aptamers.

研究代表者

松井 孝憲 (Matsui, Takanori)

久留米大学・医学部・准教授

研究者番号：10425233

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：動脈硬化症の発症・進展に深く関わるグリセルアルデヒド由来の終末糖化産物(GLA-AGEs)に着目し、GLA-AGEsの作用を担う構造体を突き止めることを目的として、おこなった。そのために、既知の3つのGLA-AGEs構造体の作用を、培養細胞を用いて明らかにした。また、GLA-AGEs構造体に結合するアプタマー(一本鎖のDNA)を作成し、GLA-AGEs構造体の作用に対する阻害効果や、これまで生体内レベルの定量が困難だったGLA-AGEs構造体の新規定量方法を開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

動脈硬化症は心血管病の基盤となる疾患であり、本邦において主たる死因の一つである。しかし、その発症メカニズムは様々な生活習慣病と関わっており、解明と治療法の開発は困難である。そのため、多くの生活習慣病と動脈硬化症をつなぐ共通の病的因子を同定し、それに対する特異的な治療法の開発が望まれてきた。今回我々は、生体内の老化物質である3つの終末糖化産物に着目し、それぞれに結合する新規の核酸医薬品であるアプタマーを作成し、阻害効果と、アプタマーを応用した終末糖化産物の定量方法の開発をおこなった。動脈硬化症と生活習慣病をつなぐ共通因子の解明と、新規の動脈硬化症の治療方法を提供に繋がる成果を得られた。

研究成果の概要(英文)：We aimed to identify the structures responsible for the action of glyceraldehyde-derived glycation end products (GLA-AGEs), which are closely related to the onset and progression of atherosclerosis. For this purpose, the effects of three known GLA-AGEs structures were elucidated using cultured human cells. In addition, aptamers (single-stranded DNA) that bind to GLA-AGEs structures were created, and their inhibitory effects on the actions of GLA-AGEs structures and a novel method for quantifying GLA-AGEs structures, which had been difficult to quantify in vivo, were developed.

研究分野：血管生物学

キーワード：動脈硬化 終末糖化産物 核酸医薬品

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

動脈硬化症を基盤として発症する心血管病は、現代において主たる死因の一つであるが、リスクの集学的な管理は容易ではない。そのため、多くの生活習慣病と動脈硬化症をつなぐ共通の病的因子を同定し、それに対する特異的な治療法の開発が望まれていた。

我々はこれまでにグリセルアルデヒド由来の終末糖化産物 (GLA-AGEs) が、1) 受容体 RAGE を介して動脈硬化症を引き起こすこと、2) その血中レベルが各種生活習慣病で上昇し、動脈硬化巣の炎症や重症度と相関することで心血管病の予測因子となりうることを明らかにしてきた (Yamagishi S, et al. *Curr Pharm Des.* 2008;14:487-95. Ojima A, et al. *Int J Cardiol.* 2014;171:443-6. Tahara N, et al. *Diabetes Care* 2012, 35: 2618 -25. Ueda S, et al. *Cardiovasc Ther.* 2012;30:249-54.)。これらの事実は、GLA-AGEs が動脈硬化症の有用な治療標的となることを示している。しかしながら、GLA-AGEs は多種多様な修飾構造体から構成されているため、GLA-AGEs の催動脈硬化作用を担う分子の実体は明らかでなかった。以前より我々は、グリセルアルデヒドによる糖化産物である GLAP (グリセルアルデヒド由来ピリジニウム) と MG-H1 (メチルグリオキサリドイミダゾロン) が、血管内皮細胞の RAGE を介して酸化ストレス産生と炎症性反応を惹起することを見出してきた (Matsui T, et al. *Cardiovasc Diabetol.* 2015;14:1. Ishibashi Y, et al. *Diab Vasc Dis Res.* 2017;14:450-3.)。また、同じく APN (アルグピリミジン) も GLA-AGEs に存在する構造体であることが報告されている (Shipanova IN, et al. *Arch. Biochem. Biophys.* 1997;344: 29-36.)。以上より、GLAP、MG-H1、APN が GLA-AGEs の作用実体であると考えられたが、その詳細については不明なままであった。

2. 研究の目的

本研究は、GLAP、MG-H1、APN が動脈硬化症の発症・進展に関わるか否か、DNA アプタマーを用いて *in vitro* と *in vivo* で検証することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) MG-H1、APN のアプタマーの作製

研究代表者がおこなった GLAP アプタマーの作製と同様の方法で作製した (Matsui T, et al. *Cardiovasc Diabetol.* 2015;14:1.)。ランダム配列の DNA ライブラリから、MG-H1 または APN に結合するオリゴ DNA を SELEX 法 (試験管内進化法) により選別した (約 100 個)。続いて、RAGE と MG-H1 または APN との結合を阻害するオリゴ DNA を、RAGE を固相化した ELISA 法により絞り込んだ (20 個)。Surface plasmon 共鳴法により、各オリゴの MG-H1、APN に対する結合強度を検討した。結合強度に関して想定より若干弱かったものについて、SELEX 法の追加及び、DMSO、 $MgCl_2$ 濃度の検討を追加しておこない、得られたクローンについて結合強度の測定をおこなった。また、各オリゴに関して、AGE 受容体 (RAGE) と MG-H1、APN の結合阻害効果を ELISA 法により検討した結果、それぞれ阻害効果が高いクローンを 5 個ずつ選抜した。

(2) GLAP、MG-H1、APN による平滑筋細胞、マクロファージの作用に対する各アプタマーの抑制効果の検討

In vitro で GLAP、MG-H1、APN の作用を各アプタマーにより抑制しうるか検討した。ヒト単球細胞 THP-1 を Phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) により分化誘導したマクロファージ、または血管平滑筋細胞を用いた。GLAP、MG-H1、APN を培地中にそれぞれ 0.1-10 $\mu g/ml$ で添加し、各アプタマー存在下で、1-4 時間インキュベートし、細胞内酸化ストレスレベルを測定した。酸化ストレスレベルは ROS プローブ Carboxy-H2DFDA を用いて検出した。各アプタマーの対照として、ランダム配列の一本鎖 DNA をコントロールアプタマーとして用いた。

(3) GLAP、MG-H1、APN の定量

GLAP、MG-H1、APN の ELISA による定量方法を検討した。検出対象である各 AGEs は低分子量 (GLAP=255、MG-H1=228、APN=254) であるため、競合 ELISA 法の構築を試みた。96 穴プレートに各 AGEs を固相化、ブロッキング処理した後に標識済みの対応する各アプタマーと各種濃度の各 AGEs を添加した。固相化に用いる各 AGEs の濃度、緩衝液組成と、添加する各アプタマーの濃度等の条件について複数検討をおこなった。また、得られたアプタマーについて、biotin 標識

部位の変更と、スペーサー配列の挿入等を施工し、検出感度を改善がみられるか検討した。

4. 研究成果

GLAPに加えて、MG-H1及びAPNの分化THP-1細胞、血管平滑筋細胞におけるROS産生を確認できた。さらに、アプタマー作成法であるSELEX法の条件を検討したことで、十分に親和性の高いMG-H1、APNに結合するアプタマーを得ることで、各アプタマーによる対応するAGEsのROS産生阻害効果について検討できた。また、MG-H1、APNを検出するサンドイッチELISAについても、当初はELISAの検出感度が低かったが、再度SELEX条件を検討しアプタマーの再作成と、biotin標識部位及びスペーサー配列を検討することで、感度の高いELISA系を作成できた。当該ELISAによりマウス血清中の各AGEsの検出が可能になった。引き続き、血漿、組織抽出液、尿、唾液等の生体試料を用いたELISAによる各AGEsの定量及び、動脈硬化モデル動物、糖尿病モデル動物等の検体についても各AGEs含有量を測定し、各疾患との関連について明らかにしたい。また、各アプタマーを用いた免疫染色により、動物組織中の各AGEsレベルについても検討をおこなう。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sotokawauchi Ami, Nakamura Nobutaka, Matsui Takanori, Higashimoto Yuichiro, Yamagishi Sho-ichi	4. 巻 21
2. 論文標題 Glyceraldehyde-Derived Pyridinium Evokes Renal Tubular Cell Damage via RAGE Interaction	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 2604 ~ 2604
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21072604	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 -
1. 著者名 Nakamura Nobutaka, Matsui Takanori, Nishino Yuri, Sotokawauchi Ami, Higashimoto Yuichiro, Yamagishi Sho-ichi	4. 巻 2019
2. 論文標題 Long-Term Local Injection of RAGE-Aptamer Suppresses the Growth of Malignant Melanoma in Nude Mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Oncology	6. 最初と最後の頁 1 ~ 10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2019/7387601	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 -
1. 著者名 Matsui T, Ishibashi Y, Sotokawauchi A, Isami F, Abe Y, Yamagishi SI.	4. 巻 15
2. 論文標題 Butanolic Extract of Noni Inhibits Proliferation, Inflammation, and Proprotein Convertase Subtilisin Kexin Type 9 (PCSK9) Expression in Cultured Smooth Muscle Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Natural Product Communication	6. 最初と最後の頁 1 ~ 7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -
1. 著者名 Higashimoto Y, Tanaka K, Matsui T, Sakaguchi T, Yamagishi S-I, Motomiya Y.	4. 巻 8
2. 論文標題 Fibroblast Growth Factor 23 Contributes to Regulation of Hepcidin/Ferroportin Axis.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Austin J Pharmacol Ther.	6. 最初と最後の頁 1118
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

1. 著者名 Yabuuchi Junko, Ueda Seiji, Yamagishi Sho-ichi, Nohara Nao, Nagasawa Hajime, Wakabayashi Keiichi, Matsui Takanori, Yuichiro Higashimoto, Kadoguchi Tomoyasu, Otsuka Tomoyuki, Gohda Tomohito, Suzuki Yusuke	4. 巻 10
2. 論文標題 Association of advanced glycation end products with sarcopenia and frailty in chronic kidney disease	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 17647
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-74673-x	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 -

1. 著者名 Sotokawauchi Ami, Matsui Takanori, Higashimoto Yuichiro, Nishino Yuri, Koga Yoshinori, Yagi Minoru, Yamagishi Sho-ichi	4. 巻 18
2. 論文標題 DNA aptamer raised against receptor for advanced glycation end products suppresses renal tubular damage and improves insulin resistance in diabetic mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Diabetes and Vascular Disease Research	6. 最初と最後の頁 1.47916E+14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/1479164121990533	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 -

1. 著者名 Fujikawa Tomoki, Ohara Makoto, Kohata Yo, Nagaike Hiroe, Fukase Ayako, Osaka Naoya, Yashima Hironori, Sato Nobuko, Kushima Hideki, Shinmura Kyoko, Takahashi Yasuyoshi, Hiromura Munenori, Terasaki Michishige, Mori Yusaku, Fukui Tomoyasu, Matsui Takanori, Hirano Tsutomu, Yamagishi Sho-ichi	4. 巻 12
2. 論文標題 Glucose Variability is Independently Correlated with Serum Level of Pigment Epithelium-Derived Factor in Type 2 Diabetes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Diabetes Therapy	6. 最初と最後の頁 827 ~ 842
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s13300-021-01008-y	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 -

1. 著者名 Tsuruhisa Shiori, Matsui Takanori, Koga Yoshinori, Sotokawauchi Ami, Yagi Minoru, Yamagishi Sho-Ichi	4. 巻 22
2. 論文標題 Pigment epithelium?derived factor inhibits advanced glycation end product?induced proliferation, VEGF and MMP?9 expression in breast cancer cells via interaction with laminin receptor	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 629
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ol.2021.12890	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 -

1. 著者名 Koga Yoshinori, Sotokawauchi Ami, Higashimoto Yuichiro, Nishino Yuri, Hashizume Naoki, Kakuma Tatsuyuki, Akiba Jun, Tanaka Yoshiaki, Matsui Takanori, Yagi Minoru, Yamagishi Sho-ichi	4. 巻 2021
2. 論文標題 DNA-Aptamer Raised against Receptor for Advanced Glycation End Products Improves Survival Rate in Septic Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Oxidative Medicine and Cellular Longevity	6. 最初と最後の頁 1~20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2021/9932311	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 -

1. 著者名 Tahara Nobuhiro, Tahara Atsuko, Maeda-Ogata Shoko, Yoshimura Hanae, Bekki Munehisa, Sugiyama Yoichi, Honda Akihiro, Igata Sachiyo, Nishino Yuri, Matsui Takanori, Fukami Ako, Enomoto Mika, Adachi Hisashi, Fukumoto Yoshihiro, Yamagishi Sho-ichi	4. 巻 24
2. 論文標題 Increased Urinary Levels of Pentosidine Measured by a Newly Developed Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Are Independently Correlated with Fracture After Fall	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Rejuvenation Research	6. 最初と最後の頁 449~455
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/rej.2021.0066	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 -

〔学会発表〕 計11件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 松井 孝憲、外川内 亜美、東元 祐一郎、山岸 昌一
2. 発表標題 グリセルアルデヒド由来AGEsであるGLAPとMG-H1の内皮細胞に対する炎症作用はDNAアプタマーにより抑制しうる
3. 学会等名 第20回日本抗加齢医学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 外川内 亜美、中村 信孝、松井 孝憲、東元 祐一郎、山岸 昌一
2. 発表標題 グリセルアルデヒド由来ピリジニウムは終末糖化産物受容体を介して腎尿管細胞を障害する
3. 学会等名 第93回 日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 外川内 亜美、松井 孝憲、東元 祐一郎、山岸 昌一
2. 発表標題 第63回 日本糖尿病学会年次学術集会
3. 学会等名 フルクトースは終末糖化産物形成を介して内皮細胞を障害する
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松井孝憲、外川内亜美、東元祐一郎、山岸昌一
2. 発表標題 内皮細胞におけるグリセルアルデヒド由来AGEsのRAGEを介した炎症作用は DNAアプタマーにより抑制しうる
3. 学会等名 第64回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 外川内亜美、松井孝憲、西野友梨、東元祐一郎、山岸昌一
2. 発表標題 終末糖化産物受容体RAGEを阻害するDNAアプタマーは、2型糖尿病マウスのインスリン抵抗性および腎尿細管障害を改善する
3. 学会等名 第64回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 外川内 亜美、松井 孝憲、西野 友梨、東元祐一郎、山岸 昌一
2. 発表標題 終末糖化産物受容体の阻害は2型糖尿病マウスのインスリン抵抗性および腎尿細管障害を改善する
3. 学会等名 第21回日本抗加齢医学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松井 孝憲、霧久土保利、古賀 義法、外川内 亜美、八木 実、山岸 昌一
2. 発表標題 色素上皮由来因子 (PEDF) は、ラミニン受容体を介して、乳癌細胞における終末糖化産物 (AGEs) 誘導性の増殖とVEGFおよびMMP-9の発現を抑制する
3. 学会等名 第94回 日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 外川内 亜美、東元 祐一郎、古賀 義法、松井 孝憲、山岸 昌一
2. 発表標題 DNAアプタマーによるAGE - RAGE系の阻害は老年疾患を包括的に抑制する
3. 学会等名 第32回脳心血管抗加齢研究会第17回学術大会・日本抗加齢協会第5回学術フォーラム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松井 孝憲、東元 祐一郎、甲斐田裕介、深水 圭、山岸 昌一
2. 発表標題 終末糖化産物 (AGEs) の阻害による老年病の包括的抑制
3. 学会等名 第22回日本抗加齢医学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松井 孝憲、霧久土保利、古賀 義法、外川内 亜美、八木 実、山岸 昌一
2. 発表標題 色素上皮由来因子は、終末糖化産物 (AGEs) により惹起された乳癌細胞の増殖とVEGFおよびMMP-9の発現を抑制する
3. 学会等名 第65回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 外川内亜美, 東元祐一郎, 松井孝憲, 山岸昌一
2. 発表標題 DNAアプタマーを用いた終末糖化産物 (AGE) および受容体 (RAGE) の阻害は糖尿病合併症を包括的に抑制する
3. 学会等名 第65回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
研究分担者	東元 祐一郎 (Higashimoto Yuichiro) (40352124)	久留米大学・医学部・教授 (37104)	
研究分担者	外川内 亜美 (Sotokawauchi Ami) (60809177)	久留米大学・医学部・助教 (37104)	

	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
研究協力者	山岸 昌一 (Yamagishi Sho-ichi)	昭和大学・医学部・教授 (32622)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------