

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：37104

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16387

研究課題名（和文）RAGEアプタマーによる心血管代謝病の制御 - 動物モデルにおける検討

研究課題名（英文）Regulation of Cardiovascular and Metabolic Diseases by RAGE-Aptamer - Study in Animal Models

研究代表者

外川内 亜美（Sotokawauchi, Ami）

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：60809177

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：終末糖化産物（AGE）と受容体RAGEの相互作用が糖尿病性合併症の発症と亢進に関与している。

我々はインスリン抵抗性を有する肥満2型糖尿病KKAy/Taマウスにおいて、RAGEアプタマーが尿細管障害を抑制するかどうかを検討した。8週齢のKKAy/TaマウスにRAGEアプタマーを腹腔内に4週間または8週間持続投与した。RAGEアプタマーは糖尿病マウスの尿中NAG活性とHOMA-IRの上昇を有意に抑制した。さらに、腎臓のAGE、RAGE、NADPHオキシダーゼ活性が有意に減少し、糸球体および間質部の形態変化の改善に伴い、脂肪細胞のアディポネクチン発現が増加したことが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病患者数は増加の一途を辿っており、予備軍を含め2200万人が糖尿病合併症のリスクにさらされている。糖尿病腎症は新規透析導入の原因疾患第一位であり、年間1万6千人が新たに透析導入に至るほどの社会問題となっている。

本研究においてRAGEアプタマーの投与が糖尿病マウスの腎尿細管障害およびインスリン抵抗性を改善したことから、腎臓および脂肪組織のAGE-RAGE系の阻害が腎症およびインスリン抵抗性の新規治療標的となりうることを期待される。

研究成果の概要（英文）：Interaction of advanced glycation end products (AGEs) with the receptor RAGE plays a role in the development and enhancement of diabetic complications.

We examined whether RAGE-aptamer inhibited tubular damage in KKAy/Ta mice, obese type 2 diabetic mice with insulin resistance. Eight-week-old KKAy/Ta mice received continuous intraperitoneal infusion of RAGE-aptamer for 4- or 8-weeks. RAGE-aptamer significantly inhibited the increase in urinary NAG activity and HOMA-IR in diabetic mice. Furthermore, renal AGE, RAGE, and NADPH oxidase activity were significantly decreased in RAGE-aptamer-treated mice, while adipose tissue adiponectin expression was increased with amelioration of histological alterations in glomerular and interstitial area.

研究分野：生化学

キーワード：終末糖化産物受容体 2型糖尿病 アプタマー

## 1. 研究開始当初の背景

糖尿病は、インスリンの分泌障害や標的臓器における作用不全によって慢性の高血糖が引き起こされる代謝疾患群である。複数の大規模臨床試験の結果より、糖尿病患者において、ある程度の期間高血糖に暴露されてしまうと、その後血糖コントロールを行っても必ずしも血管合併症の進展を完全には抑えられないことが判明している。つまり、血管合併症の発症において、生体が「高血糖のつけ」を記憶してしまう、「高血糖の記憶」というメカニズムが関わることが推定されている。これらの事実は、高血糖により一度生体内で形成されると、なかなか代謝されず血管組織に長く留まり、臓器障害を引き起こし続ける物質が、糖尿病性血管合併症を引き起こしている可能性を示唆している。

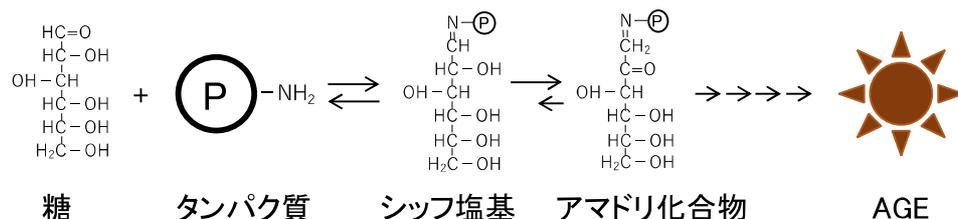


図 1. 糖化反応の概略

糖や糖由来のカルボニル化合物とタンパク質中のアミノ基が非酵素的に反応して合成される、終末糖化産物 (Advanced Glycation End Products, AGE) は血糖コントロールの程度とその持続期間に伴い生体内で形成、蓄積され、一度形成されるときわめてゆっくりにしかなら代謝されないため、「高血糖の記憶」という現象を最もよく説明できる物質だといえる (図 1)。AGE は細胞表面受容体 (Receptor for AGE, RAGE) を介して、酸化ストレスや炎症反応を惹起する。さらに AGE 自身により RAGE の発現が亢進することも報告されている (図 2)。つまり、AGE-RAGE 系の持続的な活性化が、長期にわたる「高血糖の記憶」を形作っていることが考えられる。我々は AGE-RAGE 系が糖尿病腎症や網膜症、心血管病、癌、アルツハイマー病、骨粗鬆症などいくつかの疾患の発症および進展に関わることを示してきた (*J. Diabetes* 2017;9:141-98, *Mini Rev. Med. Chem.* 2019;19:1040-8)。また、血中および組織の AGE レベルは各種炎症性マーカーや血管合併症の重症度や予後、癌の発症リスクと関連している (*Int. J. Cardiol.* 2015;185:263-8, *Diabetes Care* 2015;38:119-25, *Diabetes Care* 2012;35:2618-25)。以上の事実は AGE-RAGE 系の阻害が糖尿病合併症の治療標的となりうることを示唆している。

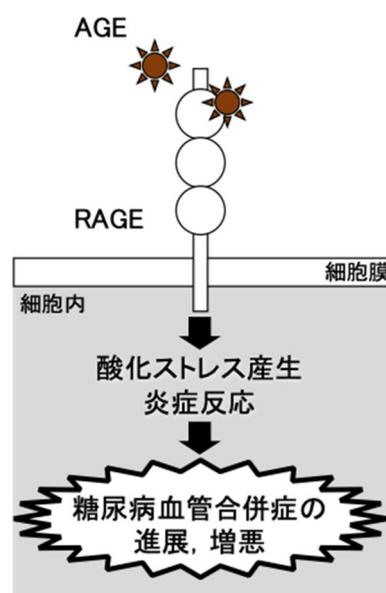


図 2. AGE-RAGE 系の概略

我々はこれまでに、AGE に強固に結合し、AGE-RAGE 系を阻害する DNA アプタマーにより、1 型糖尿病モデル動物において、腎症や網膜症などの合併症の進展が抑制されることを明らかにしてきた (*Diabetes* 2017;66:1683-95)。しかし、RAGE は AGE 以外の炎症性リガンドとも結合するため、合併症を制御するには、RAGE の阻害が必要となる。本研究では、RAGE に結合し、その情報伝達を阻害する RAGE アプタマーを作製し、このアプタマーを肥満 2 型糖尿病モデル動物に投与することで広範に臓器障害が抑えられるかどうか検討していく。

## 2. 研究の目的

本研究は、RAGE の細胞外ドメインに結合する RAGE 阻害 DNA アプタマーを 2 型糖尿病モデルマウスに投与し、インスリン抵抗性や腎症が抑えられるかどうか検討する。そして、このアプタマーの糖尿病治療薬としての有効性を検証し、臨床応用への可能性を模索しようとするものである。

### 3. 研究の方法

#### (1) 糖尿病モデル動物へのアプタマーの投与

RAGE アプタマー (RAGE-Apt) およびコントロールアプタマー (Ctrl-Apt) は *Diabetes* 2017;66:1683-95 に従い作成した。各アプタマーの配列は以下の通りである。大文字はホスホロチオエート化されている。

RAGE-Apt: 5' - ccTgATATggTgTcAccgcccgcTTAgTATTggTgTcTAc -3'

Ctrl-Apt: 5' - ttcggCctgggGgcccgcCagttcGggtccAgtcgcGggag -3'

8 週齢の 2 型糖尿病マウス (KKAy/Ta) の腹腔内に浸透圧ポンプを用いて 2 pmol/day/body weight (g) の RAGE-Apt あるいは Ctrl-Apt を 4 週間または 8 週間持続投与した。浸透圧ポンプは 4 週間分の薬剤投与が可能であるため、8 週間投与群は 4 週間の投与後に再度開腹し、新しい浸透圧ポンプと入れ替えた。1 週間ごとに体重の変化、2 週間ごとに空腹時・随時血糖、4 週間ごとに血圧を測定し、採尿を行った。4 週間 (12 週齢) および 8 週間 (16 週齢) のアプタマー投与を経て、イソフルラン無痛麻酔下で全血、腎臓、脂肪、肝臓、大動脈などの組織を回収した。また、コントロールとしてアプタマー未投与の 8 週齢のマウスも全血、組織を回収した。

各群以下の通りである。

8 週齢マウス\_未投与 (N=5)

12 週齢マウス\_Ctrl-Apt\_4 週間投与 (N=6)

12 週齢マウス\_RAGE-Apt\_4 週間投与 (N=5)

16 週齢マウス\_Ctrl-Apt\_8 週間投与 (N=6)

16 週齢マウス\_RAGE-Apt\_8 週間投与 (N=6)

#### (2) 生化学的分析

尿中のタンパク質, アルブミン, クレアチニン, NAG (N-アセチル-D-グルコサミニダーゼ) 活性, NADPH オキシダーゼ活性, 血漿のインスリン, 血清の総コレステロール, HDL コレステロール, トリグリセリド, クレアチニン, AST, ALT, 尿素窒素, シスタチン C, アディポネクチン濃度を化学的分析装置や酵素結合免疫吸着法などを用いて測定した。

#### (3) 免疫組織化学的分析

回収した組織を 4% パラホルムアルデヒドで固定, パラフィン包埋し, 4 μm の切片にした。腎臓の切片を AGE の一種であるカルボキシメチルリジン (CML) 抗体および RAGE 抗体を用いて免疫染色した。また, 脂肪組織の切片をアディポネクチン抗体を用いて蛍光染色した。

腎臓の形態観察のために, ヘマトキシリン-エオシン染色および Periodic Acid-Schiff 染色を行なった。

### 4. 研究成果

表 1 動物の生化学的検査

	8-week-old	12-week-old		16-week-old	
		Ctrl-Apt	RAGE-Apt	Ctrl-Apt	RAGE-Apt
Number	5	6	5	6	6
Body weight (g)	33.4 ± 2.0	41.9 ± 1.3 <sup>††</sup>	40.9 ± 1.4 <sup>††</sup>	45.7 ± 2.8 <sup>††</sup>	42.8 ± 3.3 <sup>††</sup>
Heart rate (beats/minute)	704 ± 49	731 ± 23	738 ± 26	749 ± 25	730 ± 33
Mean blood pressure (mmHg)	73 ± 8	98 ± 11 <sup>††</sup>	97 ± 6 <sup>††</sup>	89 ± 8 <sup>††</sup>	93 ± 3 <sup>††</sup>
Fasting blood glucose (mg/dL)	119 ± 16	200 ± 19 <sup>††</sup>	215 ± 23 <sup>††</sup>	201 ± 39 <sup>†</sup>	176 ± 71
Total cholesterol (mg/dL)	115 ± 25	105 ± 6	91 ± 6	124 ± 28	104 ± 11
HDL cholesterol (mg/dL)	136 ± 32	98 ± 16	115 ± 29	134 ± 35	103 ± 15
Triglycerides (mg/dL)	129 ± 11	183 ± 26 <sup>†</sup>	242 ± 15 <sup>†*</sup>	234 ± 31 <sup>††</sup>	160 ± 23 <sup>*</sup>
Creatinine (Cr) (mg/dL)	0.15 ± 0.06	0.23 ± 0.05	0.25 ± 0.06	0.34 ± 0.09	0.20 ± 0.08
AST (U/L)	39 ± 4	113 ± 20 <sup>††</sup>	140 ± 22 <sup>††</sup>	91 ± 14	102 ± 40 <sup>†</sup>
ALT (U/L)	25 ± 1	59 ± 10	67 ± 37	56 ± 20	53 ± 15
Blood urea nitrogen (mg/dL)	22.8 ± 2.3	46.9 ± 1.5 <sup>††</sup>	43.1 ± 3.6 <sup>††</sup>	48.4 ± 7.3 <sup>††</sup>	37.1 ± 9.6 <sup>†</sup>
Urinary NAG activity (U/mg Cr)	0.47 ± 0.06	0.65 ± 0.07 <sup>†</sup>	0.48 ± 0.09 <sup>*</sup>	0.98 ± 0.21 <sup>††</sup>	0.58 ± 0.11 <sup>**</sup>
Urinary albumin (mg/g Cr)	632.1 ± 214.7	1409.7 ± 1104.1	1561.4 ± 862.3	1162.9 ± 569.2	504.9 ± 101.2
Serum cystatin C (ng/mL)	571.5 ± 171.6	1089.5 ± 182.0 <sup>††</sup>	1163.8 ± 222.5 <sup>††</sup>	1285.9 ± 325.2 <sup>†</sup>	1089.2 ± 201.7 <sup>†</sup>
Serum adiponectin (μg/mL)	2.96 ± 0.25	3.50 ± 0.18	2.78 ± 0.39 <sup>*</sup>	2.33 ± 0.26 <sup>†</sup>	2.34 ± 0.29 <sup>†</sup>
Kidney weight/body weight (%)	0.74 ± 0.03	0.78 ± 0.11	0.79 ± 0.13	0.77 ± 0.12	0.67 ± 0.12

Data are mean ± SD. <sup>†</sup>P < 0.05, <sup>††</sup>P < 0.01 compared with 8-week-old; <sup>\*</sup>P < 0.05, <sup>\*\*</sup>P < 0.01 compared with Ctrl-Apt.

2 型糖尿病モデル動物の生化学的検査の結果を表 1 に示す。8 週齢のコントロールマウスと比較して、12 週齢の Ctrl-Apt 投与マウスは体重、平均血圧、空腹時血糖、トリグリセリド、AST、尿素窒素が、16 週齢の Ctrl-Apt 投与マウスでは体重、平均血圧、空腹時血糖、トリグリセリド、尿素窒素が、AST は 16 週齢の RAGE-Apt 投与マウスで有意に増加した。12 週齢と 16 週齢の両方においてトリグリセリドを除き、Ctrl-Apt 投与と RAGE-Apt 投与に有意な差は見られなかった。12 週齢の RAGE-Apt 投与マウスのトリグリセリドは Ctrl-Apt 投与より有意に増加させたが、16 週齢においては減少させた。8 週齢のコントロールマウスと比較して、16 週齢の両投与群マウス

で血清アディポネクチンレベルが有意に低下したが、12 週齢では有意な差は認められなかった。12 週齢および 16 週齢の尿中 NAG 活性は 8 週齢のコントロールマウスと比較して、Ctrl-Apt 投与したマウスで有意に上昇し、RAGE-Apt 投与により減少した。12 週齢および 16 週齢マウスのシスタチン C は 8 週齢と比較して有意に高かったが、Ctrl-Apt 投与と RAGE-Apt 投与で有意な差はなかった。

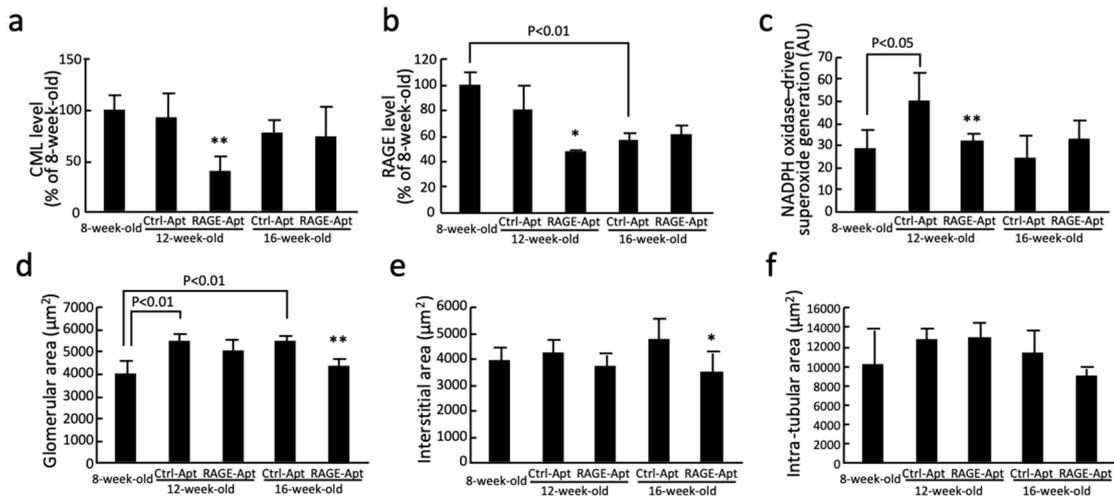


図 3. 腎臓における CML レベル(a), RAGE レベル(b), NADPH オキシダーゼ活性レベル(c), 糸球体面積(d), 皮質間質面積(e), 尿細管内腔面積(f)。

免疫染色の結果、12 週齢における Ctrl-Apt 投与マウスと比較して RAGE-Apt 投与で腎臓における CML および RAGE の蓄積が有意に減少した(図 3a, b)。さらに腎臓の NADPH オキシダーゼ活性も RAGE-Apt の投与で有意に減少した(図 3c)。16 週齢の各 Apt 群間で有意な差は認められなかった。図 3d に示すように、12 週齢および 16 週齢の Ctrl-Apt 投与群の糸球体面積が有意に増加していたが、16 週齢の RAGE-Apt 投与群で Ctrl-Apt 投与より減少した。さらに、16 週齢の皮質間質面積が RAGE-Apt 投与で Ctrl-Apt 投与より有意に減少していた(図 3e)。尿細管内腔面積は各群間で差がなかった。

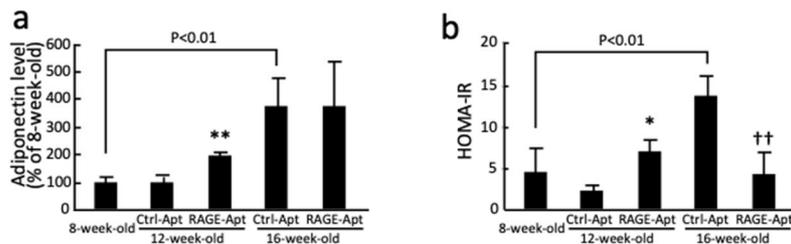


図 4. 脂肪組織におけるアディポネクチンレベル(a), HOMA-IR(b)。

脂肪組織におけるアディポネクチンレベルを免疫蛍光染色で検出したところ、12 週齢の Ctrl-Apt 群より RAGE-Apt 群の方が有意に増加していた。16 週齢においては両 Apt 群とも 8 週齢のコントロールマウスよりも高かったが、RAGE-Apt による差は認められなかった(図 4a)。16 週齢の Ctrl-Apt 投与マウスでは 8 週齢のコントロールマウスよりインスリン抵抗性の指標である HOMA-IR が有意に増加していたが、RAGE-Apt 投与で有意に低下した。12 週齢の RAGE-Apt 投与マウスの HOMA-IR は Ctrl-Apt 投与より高くなったが、8 週齢のコントロールマウスと差がなかった(図 4b)。

本研究において、インスリン抵抗性を有し、肥満を伴う 2 型糖尿病 KKAY/Ta マウスへの RAGE-Apt 投与により、皮質間質障害・機能障害のマーカーである尿中 NAG 活性の上昇が有意に抑制され、12 週齢の腎臓における CML, RAGE, NADPH オキシダーゼ活性が減少することを初めて見出した。尿中 NAG 活性は糖尿病腎症の初期段階の患者においても腎予後を予測する可能性があることから、本研究では RAGE-Apt による尿細管間質部における AGE-RAGE 系の阻害が糖尿病性腎症の新規治療戦略となる可能性を示唆している。また、16 週齢マウスの糸球体および皮質間質面積拡大の抑制効果も CML, RAGE, NADPH オキシダーゼ活性の減少と関連し AGE-RAGE 系の阻害によるものと考えられる。さらに、RAGE-Apt 投与が脂肪組織のアディポネクチン発現を増加させ、インスリン抵抗性を改善することを明らかにしたことから、脂肪細胞における AGE-RAGE 系の阻害も肥満 2 型糖尿病のインスリン抵抗性の治療標的となる可能性が示唆された。

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 0件 / うちオープンアクセス 1件）

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 -
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 オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

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

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

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
---------	---------