

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07075

研究課題名(和文) 動脈硬化症モデル動物への終末糖化産物アプタマーの治療応用

研究課題名(英文) Effects of DNA-aptamer raised against AGEs on atherosclerosis in ApoE-null mice

研究代表者

寺崎 道重 (Terasaki, Michishige)

昭和大学・医学部・講師

研究者番号：90621342

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)：終末糖化産物は老化蛋白の一つであり、老年病の発症と進展に関わることが明らかとなりつつある。本研究では、終末糖化産物 advanced glycation end products(AGEs)が、その受容体RAGEと結合する事でマクロファージの泡沫化を介して動脈硬化を進展する事を明らかにし、その作用はDNAアプタマーを投与することで阻害できることを実証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

DNAアプタマーは、抗体医薬品と比較し安価であり大量に調整もできるため、次世代のバイオ医薬品として注目を集めている。我が国の人口動態は高齢化しており、老年病への対策は重要な問題となっている。本研究によって、AGEsとその受容体RAGEに結合してその機能を阻害するDNAアプタマーの老年病の一つである抗動脈硬化作用が示され、今後の動脈硬化症に関連する心筋梗塞や脳梗塞、その他血管合併症に対する治療法の開発につながると予想される。

研究成果の概要(英文)：AGEs have been known to be one of the aging protein, whose effects are associated with the onset and promotion of geriatric disease. In this study, interaction of AGEs with RAGE could increase macrophage foam cell formation and promote atherosclerosis, these effects may be abolished by DNA-aptamer against AGEs/RAGE in the atherogenic animal models.

研究分野：動脈硬化

キーワード：AGEs RAGE aptamer macrophage atherosclerosis

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、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

生活習慣病や老年病に伴って生体内に蓄積する AGEs がその受容体 RAGE を介して、心血管病の発症、進展に関わることが、我々を含めて国内外の施設から報告されている (J Diabetes 2017;9:141-8. Circulation 2006;114:597-605. Curr Pharm Des 2017;23:937-943)。しかしながら、これまでに実に様々な種類の AGEs 阻害剤や RAGE 阻害薬の開発が進められていたが (Cardiovasc Ther 2008;26:50-8. Diabetes 2012;61:549-59. Med Chem 2017;60:7213-7232. Bioinformation 2016;12:124-130)、副作用等の問題から実用化されるに至っていない。

我々は、AGEs や RAGE に特異的に結合してその作用・機能を阻害する DNA アプタマーの開発に成功し、これらのアプタマーは *in vitro* で AGEs が RAGE に結合するのを強固に抑制し、*in vivo* においても複数のモデル動物で腎障害が抑制されることを実証してきた (Diabetes 2017;66:1683-1695. Sci Rep 2018;8:2686. Diabetes 2013;62:3241-50. Horm Metab Res 2015;47:253-8)。さらに、AGEs への結合性が飛躍的に向上した改良 AGE アプタマーを作成することにも成功し、1 型糖尿病モデルラットで網膜症への有効性を明らかにしている (Ophthalmic Res 2015;54:175-80)。そこで、研究代表者はこれらのアプタマーを用いた治療のさらなる可能性に着目し、AGE アプタマーと RAGE アプタマーが動脈硬化症とそれに関連する危険因子 (腎障害、脂肪炎症、インスリン抵抗性) の包括的な治療につながるのではないかと着想するに至った。アプタマーは次世代の新規医薬品として注目されており、抗体医薬に比べて PCR 法を基にした技術を用いるため、安価で大量に作成することができ、熱に安定であり、標識も容易で、組織移行性も高いといった多くの特徴と利点を有する。実際にアプタマーは、血管内皮増殖因子や第凝固因子等のタンパク質やペプチドを阻害する手段として臨床的に応用、実用化されはじめている。

我々は、これまでにアプタマーを用いた *in vivo*、*in vitro* の研究成果を数多く発表しており (Diabetes 2017;66:1683-1695. Ophthalmic Res 2015;54:175-80)、本研究で使用する AGE アプタマーと RAGE アプタマーはすでに調整済みの状況にある。また、研究代表者は動脈硬化モデル動物の作成に習熟しており (Int J Endocrinol 2018;2018:8458304)、本研究を遂行する上で準備は万全であった。

### 2. 研究の目的

AGE アプタマーと RAGE アプタマーをモデル動物に投与することで動脈硬化症の発症・進展を抑制できるかどうか、また、どのような分子機構を介するかについて、そのリスク因子となる腎障害、脂肪炎症、インスリン抵抗性に対する当該アプタマーの効果をまとめて検証する事であった。

### 3. 研究の方法

動脈硬化モデルマウスにアポリポプロテイン E 欠損マウス (ApoE<sup>sh1</sup>、高脂肪・高コレステロール食で飼育)、非動脈硬化コントロールに BALB/c マウス (通常食で飼育) を用いた。発症予防実験では大動脈にアテローム斑が認められない 12 週齢のマウス、進展抑制実験では大動脈弓部を中心にアテローム斑が明瞭に形成される 20 週齢のマウスを使用。AGE アプタマー、RAGE アプタマー、もしくはコントロールアプタマー (ランダム配列の一本鎖 DNA) は薬液徐放作用のある浸透圧ポンプをマウスの腹腔内に植え込むことで持続投与した。そして、以下の項目につき 0、4、8 週の時点で解析し、動脈硬化に対する作用について検討した。また、右腕頭動脈はアテローム斑の好

発部位で、心基部や大動脈と異なりプラーク破裂が生じることから (Curr Opin Lipidol 2013;24:419-25)、同部位も動脈硬化の評価部位に含める事を検討した。

1. 生理学的指標(食餌量、飲水量、血圧、脈拍、体重)
2. 生化学的指標(血清中のグルコース、インスリン、総コレステロール、HDL コレステロール、中性脂肪など)
3. 血清および組織中の AGEs、RAGE レベル(ELISA 法、免疫染色法)
4. 心臓、大動脈、右腕頭動脈の組織学的変化(Oil-Red O 染色、H&E 染色、Masson's trichrome 染色)
5. 心臓、大動脈、右腕頭動脈の分子生物学的変化
6. 腹腔マクロファージの *in vivo* 実験で ox-LDL 取り込みは蛍光ラベル ox-LDL で定量化、関連する遺伝子発現を Real-time PCR で測定した。ヒト単球細胞 THP-1 から分化誘導したマクロファージを用い、*in vitro* の実験系で AGE アプタマーと RAGE アプタマーが動脈硬化を抑制する機序を明らかにする実験を行った。AGEs を培地中に添加し、AGE アプタマー、RAGE アプタマー、コントロールアプタマー存在、非存在下で、細胞内酸化ストレスレベルを蛍光試薬 (DCFDA-DA) を用いて測定。また、各種遺伝子発現を Real-time RT-PCR 法で、マクロファージの ox-LDL 取り込みは蛍光ラベル ox-LDL で定量化した。

#### 4 . 研究成果

終末糖化産物は老化蛋白の一つであり、老年病の発症と進展に関わることが明らかとなりつつある。本研究では、終末糖化産物 advanced glycation end products(AGEs)が、その受容体 RAGE と結合する事でマクロファージの泡沫化を介して動脈硬化を進展する事を明らかにし、その作用は DNA アプタマーを投与することで阻害できることを実証した。

DNA アプタマーは、抗体医薬品と比較し安価であり大量に調整もできるため、次世代のバイオ医薬品として注目を集めている。我が国の人口動態は高齢化しており、老年病への対策は重要な問題となっている。本研究によって、AGEs とその受容体 RAGE に結合してその機能を阻害する DNA アプタマーの老年病の一つである抗動脈硬化作用が示され、今後の動脈硬化症に関連する心筋梗塞や脳梗塞、その他血管合併症に対する治療法の開発につながると予想された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yashima H, Terasaki M, Sotokawauchi A, Matsui T, Mori Y, Saito T, Osaka N, Kushima H, Hiromura M, Ohara M, Fukui T, Yamagishi S-i.	4. 巻 21
2. 論文標題 AGE-RAGE axis stimulates oxidized LDL uptake into macrophages through cyclin-dependent kinase 5-CD36 pathway via oxidative stress generation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 9263
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms21239263	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 該当する

1. 著者名 Terasaki M, Yashima H, Mori Y, Saito T, Matsui T, Hiromura M, Kushima H, Osaka N, Ohara M, Fukui T, Hirano T, Yamagishi SI.	4. 巻 21
2. 論文標題 A Dipeptidyl Peptidase-4 Inhibitor Inhibits Foam Cell Formation of Macrophages in Type 1 Diabetes via Suppression of CD36 and ACAT-1 Expression	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 4811
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms21134811	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 該当する

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 寺崎 道重、森 雄作、八島 広典、外川内 亜美、松井 孝憲、斎藤 智美、広村 宗範、大坂 直也、藤川 大輝、川上 来知、白神 佳枝、小原 信、福井 智康、山岸 昌一
2. 発表標題 終末糖化産物受容体（RAGE）に対するDNAアプタマーは動脈硬化進展を抑制する～動脈硬化モデルマウスによる検討～
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 Terasaki M, Mori Y, Yashima H, Saito T, Sotokawauchi A, Matsui T, Hiromura M, Osaka N, Kawakami R, Shiraga Y, Ohara M, Fukui T, Yamagishi SI.
2. 発表標題 DNA-aptamer raised against receptor for advanced glycation end products inhibits atherosclerosis
3. 学会等名 第29回国際高血圧学会（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 寺崎 道重、森 雄作、八島 広典、松井 孝憲、斎藤 智美、大坂 直也、広村 宗範、高畑 洋、藤川 大輝、川上 来知、白神 佳枝、外川内 亜美、小原 信、福井 智康、山岸 昌一
2. 発表標題 終末糖化産物受容体 (RAGE) 阻害アプタマーは動脈硬化進展を抑制する
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 寺崎道重、森雄作、斎藤智美、小原信、福井智康、八島広典、山岸 昌一
2. 発表標題 動脈硬化症に対する新規治療戦略：終末糖化産物を標的とした機能性核酸医薬の有効性の検討
3. 学会等名 第23回日本抗加齢医学会総会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 寺崎道重、柴田佳太、森雄作、斎藤智美、松井孝憲、八島広典、大坂直也、藤川大輝、高畑洋、広村宗範、竹鼻伸晃、高橋範之、江波戸彩乃、小原信、福井智康、蓮見恵司、東元祐一郎、野部浩司、山岸 昌一
2. 発表標題 SMTP-44D は ApoE 欠損マウスの動脈硬化進展を抑制する
3. 学会等名 第23回日本抗加齢医学会総会
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	広村 宗範  (Hiromura Munenori)  (00773186)	昭和大学・医学部・講師   (32622)	

6. 研究組織（つづき）

	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	山岸 昌一  (Yamagishi Sho-ichi)  (40281026)	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