

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17729

研究課題名（和文）終末糖化産物受容体阻害アプタマーによる血管再狭窄に対する新しい治療手段の開発

研究課題名（英文）Effects of DNA aptamer raised against advanced glycation end products on arterial restenosis

研究代表者

九島 秀樹 (Kushima, Hideki)

昭和大学・医学部・兼任講師

研究者番号：70792696

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）：終末糖化産物(AGEs)は糖化蛋白で、加齢や糖尿病によって促進的に形成され、動脈硬化性疾患の発症と進展に関与することが明らかとなりつつある。進行した動脈硬化性病変の治療として血管形成術が行われるが、糖尿病患者では、術後に再び狭窄していくリスクが高いという問題がある。本研究では、肥満糖尿病モデルマウスに、AGEsを中和するDNAアプタマーもしくはAGEs受容体のRAGEを阻害するDNAアプタマーを投与する事で、大腿動脈障害後の再狭窄が抑制されることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日本では、成人の6人に1人が糖尿病あるいはその予備軍であると推察されており、人口の高齢化によってこの割合はさらに増加していくと予想される。このため、糖尿病の合併症への対策は重要な問題である。DNAアプタマーは、抗体医薬品に比べて安価で、大量に調整もできることから、次世代のバイオ医薬品として注目を集めている。本研究から、糖尿病患者における血管形成術後の再狭窄に対するAGEs中和DNAアプタマーとRAGE阻害DNAアプタマーの有用性が示され、新たな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）：Advanced glycation end products (AGEs) are formed through a non-enzymatic glycation reaction of proteins, the process of which can be accelerated by aging or diabetes. Many studies have revealed that AGEs are associated with increased risks for many diseases including atherosclerotic cardiovascular disease. Angioplasty is a procedure to open narrow coronary arteries caused by atherosclerosis. However, diabetes is shown to be a risk for restenosis after angioplasty, which can result in a failure of angioplasty. Recently, we developed DNA aptamers that can inhibit toxic effects of AGEs through directly binding to AGEs or receptor for AGEs (RAGE). In this study, we treated KK-Ay mice, a model of obesity-induced diabetes, with these aptamers. We found that, compared to control aptamer, AGEs neutralizing DNA aptamer and RAGE inhibitory DNA aptamer prevented restenosis after femoral artery wire injury.

研究分野：糖尿病

キーワード：糖尿病 再狭窄 マウスモデル アプタマー 終末糖化産物 RAGE

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

動脈硬化症を基盤として発症する虚血性心疾患は、現代において主たる死因の一つであり、血流が遮断されて臓器壊死が進行する前に血行を再建する必要がある。血行再建では、経皮的血管形成術や冠動脈バイパス術などが用いられているが、後者は侵襲性が高く、脳梗塞など周術期合併症のリスクが高いため、一般的には経皮的血管形成術が選択されるケースが多い。しかし、経皮的血管形成術では、血管再狭窄や遅発性血栓などの問題があり、その長期予後は必ずしも満足のものではない。

研究代表者の所属する昭和大学糖尿病・代謝・内分泌内科学講座の山岸 昌一の研究グループはこれまでに 1) AGEs が受容体 RAGE を介して認識され、試験管内で内皮細胞の機能障害、平滑筋細胞の遊走・増殖、炎症反応を惹起させること、2) 血中 AGEs レベルが、糖尿病、慢性腎臓病、メタボリックシンドローム患者で高値を示し、血管障害マーカーや炎症マーカーと関連することなどを明らかにしてきた (Nature 2000;404:787-90, Diabetes Care 2012;35:2618-25, Diabetes Care 2015;38:119-25, Diabetes 2017;66:1683-95)。

また、研究代表者の所属する研究グループは AGEs-RAGE 系を制御する新たな治療薬の開発に取り組み、AGEs に対して強固に結合してその作用を阻害する DNA アプタマー(標的に特異的に結合する一本鎖の DNA)の開発に成功した。そして、実際に AGE アプタマーをラットに投与することでバルーン障害後の動脈狭窄が抑制されることを実証した(Int J Cardiol 2014;171:443-6)。さらに、AGEs への結合性を飛躍的に高めたアプタマーや RAGE に対する DNA アプタマーの開発にも成功している(Diabetes 2017;66:1683-1695, Ophthalmic Res 2015;54:175-80)。以上のことから、これらの DNA アプタマーにより AGEs-RAGE 系を阻害できれば、血管形成術後の再狭窄の発症・進展を制御できるのではないかと着想するに至った。

2. 研究の目的

本研究は、DNA アプタマーを用いた AGEs-RAGE 系の制御が、血管形成術後の再狭窄にたいする新たな治療標的となりうるかどうか、という学術的な問いに答えを出そうとするものである。そのために、本研究では、AGEs 中和 DNA アプタマーと RAGE 阻害 DNA アプタマーをモデル動物に投与することでワイヤー傷害後の血管狭窄、血管リモデリングを抑制できるかどうか、そして、どのような分子機構を介するかについて検証していく。さらに、血管周囲脂肪は糖尿病や肥満によってリモデリングをおこし、血管構成細胞の炎症や増殖を惹起するアディポカインを分泌することが知られており、本研究では当該アプタマーが血管周囲脂肪に及ぼす影響について包括的な検討を加える。

3. 研究の方法

大腿動脈ワイヤー傷害モデルを用いて、動脈再狭窄に対する AGEs 中和 DNA アプタマーと RAGE 阻害 DNA アプタマーの有効性を評価した。生後 12 週齢のオスの正常代謝モデルマウス(C57BL6/J)、肥満糖尿病モデルマウス(KK-Ay)を用い、薬液徐放作用のある浸透圧ポンプを背側皮下に植え込むことで AGEs 中和アプタマー、RAGE 阻害 DNA アプタマー、もしくはコントロール DNA アプタマー(ランダム配列の一本鎖 DNA)を持続投与した。KK-Ay マウスは、過食による高度肥満を呈し、糖尿病を発症することから、ヒトにおける 2 型糖尿病に類似した肥満糖尿病モデルとして広く用いられている。研究に用いた DNA アプタマーはこれまでに我々が開発し、細胞実験で有効性が確認されているものを用いた。

そして、DNA アプタマーの投与開始から 14 日後に、大腿動脈にガイドワイヤーを挿入し、動脈内腔から内膜と中膜を傷害して動脈再狭窄を惹起した。DNA アプタマー投与から 28 日の時点で血液と大腿動脈を採取し、下記項目の解析を行った。

- (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(全血中のグリコヘモグロビン[HbA1c]、血清中のグルコース、インスリン、総コレステロール、中性脂肪、アディポネクチン、可溶性 VCAM-1、Pentraxin-3)
- (3) 血清、組織中の AGEs、RAGE レベル(ELISA 法、免疫染色法)
- (4) 大腿動脈、大腿動脈周囲脂肪
 - a. 組織学的変化: Elastica Van Gieson 染色
 - b. Real-time RT-PCR 法: IL-1、IL-6、MCP-1、TNF、VCAM、ICAM、VEGF、PDGFs、TGF-1、osteopontin、MMPs、TIMPs、adiponectin などの発現
 - c. 免疫染色法: Ki-67、MOMA-2、TUNEL、酸化ストレス
- (5) インスリン抵抗性(ブドウ糖負荷試験)

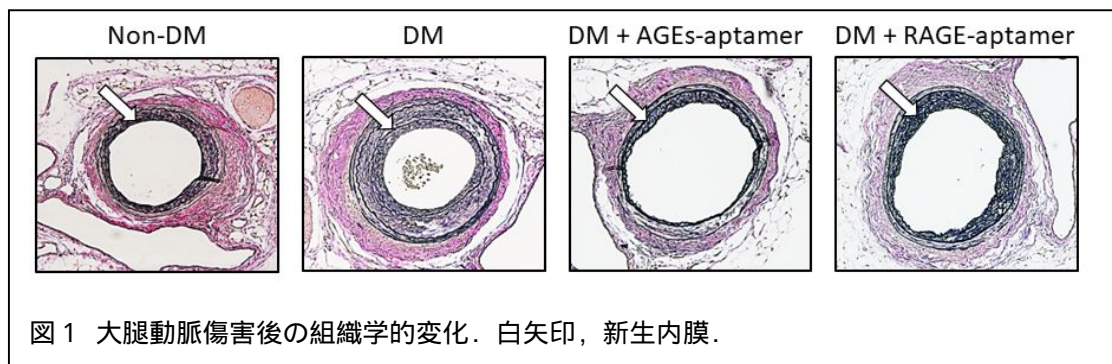
4. 研究成果

本研究に用いた KK-Ay マウスは、DNA アプタマーを投与する時点で全てのマウスが著明な高血糖を呈していた。DNA アプタマー投与から 2 週間後に大腿動脈のワイヤー傷害を行い、さらに 4 週間後に血液と大腿動脈を採取して解析を行った。

実験終了時の体重および HbA1c 値と血中グルコース値・中性脂肪値は、肥満糖尿病マウスが非糖尿病に対して高値であった。さらに、血中 AGEs 値は、肥満糖尿病マウスで約 3 倍の上昇を認

めた。肥満糖尿病マウスについては、コントロール DNA アプタマー群、AGEs 中和 DNA アプタマー群、RAGE 阻害 DNA アプタマー群で、これらの測定項目に差を認めなかった。

ワイヤー傷害を行った動脈の組織切片を作成し、EVG 染色を行って、組織学的変化を解析した。肥満糖尿病マウスでは、動脈障害後に形成される新生内膜の面積が増加した(図1)。AGEs 中和 DNA アプタマーもしくは RAGE 阻害 DNA アプタマーを投与された肥満糖尿病マウスでは、コントロール DNA アプタマーを投与された肥満糖尿病マウスと比較して、動脈障害後の新生内膜の形成が非糖尿病マウスと同程度まで抑制された(図1)。



AGEs 中和 DNA アプタマーと RAGE 阻害 DNA アプタマーは、血中 AGEs 濃度を含めた代謝パラメーターを変化させずに動脈障害後の新生内膜形成を抑制したことから、再狭窄の原因となる新生内膜過形成には AGEs-RAGE 系が関与しており、DNA アプタマーによる AGEs-RAGE 系の阻害が有効な治療手段となりうることを示唆された。

ワイヤー傷害を行った動脈の組織切片を用いた免疫染色では、肥満糖尿病マウスの動脈周囲脂肪組織に AGEs が蓄積しており、酸化ストレスマーカー 8-OHdG の増加と増殖因子 PDGF-DD 陽性細胞の増加が認められた。今後は、DNA アプタマーによる AGEs-RAGE 系の阻害がどのような分子機序を介して新生内膜の過形成を抑制したのかについて検討を進めていく予定である。

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 Yashima H, Terasaki M, Sotokawauchi A, Matsui T, Mori Y, Saito T, Osaka N, Kushima H, Hiromura M, Ohara M, Fukui T, Yamagishi SI.	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0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, 九島 秀樹, 広村 宗範, 大坂 直也, 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ApoE欠損マウスの動脈硬化進展を抑制する.
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 八島 広典, 寺崎 道重, 外川内 亜美, 松井 孝憲, 齋藤 智美, 森 雄作, 大坂 直也, 九島 秀樹, 広村 宗範, 小原 信, 福井 智康, 山岸 昌一.
2. 発表標題 終末糖化産物-受容体系の活性化は酸化ストレスを誘導しCdk5-CD36を介してマクロファージ泡沫化を促進する.
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 八島 広典, 寺崎 道重, 外川内 亜美, 斎藤 智美, 松井 孝憲, 森 雄作, 大坂 直也, 九島 秀樹, 広村 宗範, 小原 信, 福井 智康, 高橋 育克, 山岸 昌一.
2. 発表標題 AGE-RAGE Axisは酸化ストレスを誘導しCdk5-CD36を介しマクロファージ泡沫化を促進する.
3. 学会等名 第94回日本内分泌学会学術総会.
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
---------	---------