

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月25日現在

機関番号：34413

研究種目：基盤 B 一般

研究期間：2021 ～ 2023

課題番号：21390013

研究課題名（和文） 終末糖化産物の受容体 (RAGE) を標的とする糖尿病合併症の予防・治療薬の探索

研究課題名（英文） Research and development of drugs of prevention and treatment for complication of diabetes targeting the receptor of advanced glycation end products (RAGE)

研究代表者 小林 祐次 (KOBAYASHI YUJI)

大阪薬科大学薬学部教授

研究者番号：20127228

研究成果の概要（和文）：糖尿病の合併症である網膜症、腎炎、神経症はすべて、血中の糖と蛋白質が反応して生じる終末糖化産物（AGE）が受容体（RAGE）と結合して血管内皮細胞に誘導される現象に起因する。NMR, X線結晶解析、構造エネルギー計算、超遠心分析、等温滴定型熱量測定などから得られる構造情報と熱力学的情報を考慮し、この相互作用を阻害する候補物質を設計・化学合成し、糖尿病血管合併症に対する予防・治療薬の開発を進めている。

研究成果の概要（英文）：The worst three complications of diabetes; retinopathy, nephritis and neurosis, are due to phenomena in vascular endothelial cells induced by the binding of AGE to its receptor. (AGE; Advanced Glycation End products, the reaction products between protein and sugar in blood) The aim of this project is to develop therapeutic agents for diabetic vascular complications by rational design and chemical synthesis of candidates to inhibit this interaction with considering the structural information obtained by NMR, X-ray crystallography, conformation energy calculation and thermodynamic information by ultracentrifugation analysis and isothermal titration calorimetry and so on.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成21年度	10,600,000	3,180,000	13,780,000
平成22年度	2,700,000	810,000	3,510,000
平成23年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
総計	14,800,000	4,440,000	19,240,000

研究分野：医療薬学

科研費の分科・細目：薬学、物理系薬学

キーワード：創薬、糖尿病、最終糖化産物、AGE、RAGE、SBDD、
バーチャルスクリーニング、NMR

1. 研究開始当初の背景

蛋白質とグルコースのような糖類が共存すると、複雑な連鎖反応が生じ、その結果、褐色物質が生じる現象はメイラード反応と呼ばれ、その反応物は終末糖化産物(AGE)と

総称されている。この反応は我々の体の中でも徐々に進行していて、取分け、糖尿病患者では血中のグルコース濃度が高いため反応が加速されていることが明らかとなっている。2000年代になり、AGEがその受容体

(RAGE)に結合し、種々の細胞現象を誘導することが見出されてきた。共同研究者である金沢大の山本らは一貫して糖尿病合併症の発症機構に関して研究を行ってきたが、①血管細胞の *in vitro* 培養系を用いて AGE が RAGE を介して血管細胞に糖尿病血管合併症に特徴的な細胞変化を引き起こすこと②血管細胞で RAGE を過剰発現するトランスジェニックマウスと RAGE 欠損マウスを作製して病態の解析を行い、RAGE 過剰発現が腎症などの糖尿病血管合併症の増悪を引き起こす一方で、RAGE 欠損マウスでは逆に糖尿病血管合併症の発症・進展が顕著に抑制されることを示した。これらの知見に基づき、我々は AGE-RAGE 相互作用の阻害剤を見出すことが出来れば、それは糖尿病血管合併症の予防・治療薬に成ると考え、この阻害剤の探索を行ってきた。

2. 研究の目的

糖尿病の患者数は近年増大の一途をたどり、その合併症の問題は深刻である。なかでも糖尿病の三大合併症とされる①後天性失明の第一の原因である網膜症、②透析原因の第一である腎炎、③下肢切断を強いる神経症は特に深刻である。これらは三つとも糖尿病のために生じる血管障害が引き起こす血管合併症である。従って糖尿病を発症しても、血管合併症の発症・増悪を阻止できれば患者の生命予後・QOL が著しく改善することが期待される。最近この AGE が RAGE を介して糖尿病に特徴的な血管細胞を変化させ、その結果血管障害が生じることが明らかとされた。この AGE-RAGE 相互作用の阻害剤を探索し、それをリードとして薬剤としての最適化を行い、対症療法に頼っている糖尿病性血管合併症の予防・治療に、有効かつ具体的な薬剤候補化合物を見出すことを目的としている。

3. 研究の方法

研究は大きく分けて、図 1 に示す最近我々が決定し精密化も終えた RAGE の構造に基づいて図 2 に示すように ①リード化合物の探索；バーチャルスクリーニング、ハイスループットスクリーニング、リガンド AGE の分離精製、②リード化合物の最適化；化学合成、*in vivo*, *in vitro* における生物活性、薬理活性、毒性、体内動態等の評価、③リード化合物の合理的設計；NMR 等による AGE-RAGE 相互作用解析、X 線による複合体の構造解析、CARDD, 熱力学的解析、④非臨床試験；病態モデルなどの動物実験より

成り立っている。

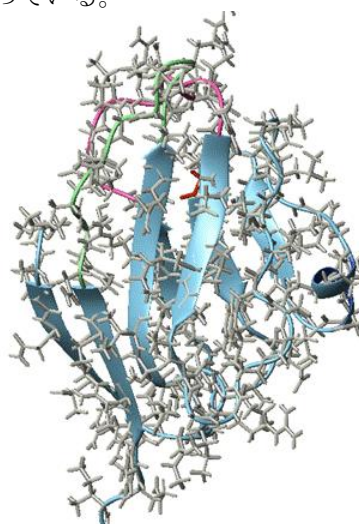


図 1. vRAGE の溶液構造(PDB ID: 2E5E)

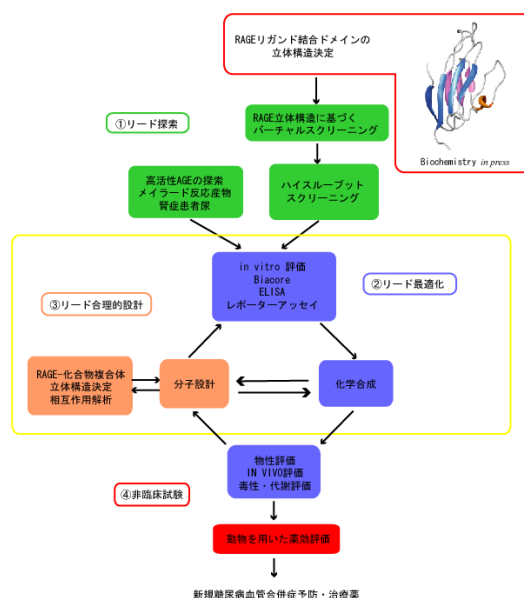


図 2. 本研究の全体像

すなわち、リガンド-受容体の相互作用に関する研究はリガンドに関する知見を基に開始するのが一般的であるが、リガンドが同定されていないこの AGE-RAGE 系では事情が大きく異なっている。我々は受容体の構造よりアプローチする戦略をとり、まず RAGE の AGE 結合部位を含むと考えられるドメイン (vRAGE と名付けた) の構造を NMR により決定した。①この構造情報を用いてコンピュータ上でのバーチャルスクリーニングにより、特異的に RAGE に結合することが期待される候補物質約 100 種を抽出した。その化合物に対し ELISA 実験を行い、糖化アルブミンと競合的に結合するものを 4 種見出した。それらは AGE が RAGE に結合することにより惹き起こされる細胞内シグナルの一つである転写因子 NF- κ B の活性化を阻害す

る活性を細胞レベルで示した。②これら化合物の誘導体の化学合成を行い、合成した誘導体についてそれぞれ **Biacore** 測定や、**NF- κ B** の活性化阻害を指標としたレポーターアッセイを行うとともに、合成過程にフィードバックすることにより活性の高いものを見出す努力を重ねる。③活性の高いものについて受容体との結合を種々の物理化学的手法を用いて熱力学的に解析を行っている。得られた情報を用いて結合部位の同定、結合様式の解析を行うと同時に、②にフィードバックして *in vivo*, *in vitro* における生物活性を解析し、リード化合物の最適化を行う。④薬剤として有力な候補化合物について製薬会社との共同研究により非臨床試験を行う。さらに②、③、④のフィードバックを繰り返す。

他の研究室並びに製薬会社との共同研究

大阪薬科大学の我々の研究室自身だけでなく大阪大学薬学部の高分子化学分野・合成化学分野の協力を得て上記の化学合成実験を行ってきたが、そのキャパシティーに限界を生じた。**IC₅₀** がサブ μ M の候補物質を見出す段階に達したのち、飛躍的な改善を目指し、合成面での製薬会社とまた生物化学、薬理学面での金沢大学医学部の山本教授の研究室、構造生物学面での大阪大学薬学部と我々の四者間の共同研究契約を締結し、陣容を確保した。すなわち我々の研究室が主に物理化学面から候補物質の設計を、製薬会社が有機合成を行い、我々が *in vitro* assay を、大阪大学が構造解析を、金沢大が *in vivo* assay を、さらに製薬会社が動物実験を行い、常に四者が情報交換しフィードバックを繰り返すことを行っている。

4. 研究成果

(1)既に我々は **SDfile** から化合物情報を抽出して市販されている約 300 万種の低分子化合物をデータベースに登録し、その構築したスクリーニングライブラリーから出発して図のバーチャルスクリーニング、ハイスループットスクリーニングから図 3 に示す 4 種の化合物を候補物質として見出していた。これら化合物は非常に高価であるので、次の段階での分子構造の最適化も踏えて、誘導体の合成が容易な合成経路を開発した。

(2)溶液構造が決定された **vRAGE** はイムノグロブリンフォールドを有しており、1 つの α ヘリックスと 4 つ及び 3 つの β ストランドからなる 2 枚の β シートを持っている。この分子のリガンド認識において重要と考えられ

る分子表面の様子を調べるため、**vRAGE** の表面電荷の解析を行った。結果は図のように、**vRAGE** の分子表面が、全体的に正に荷電していることが明らかになった。**AGE** は生成過程においてアミノ基が修飾され負に荷電する傾向があるため、この **vRAGE** 表面の正電荷は、**AGE** との結合に寄与していると予想した。

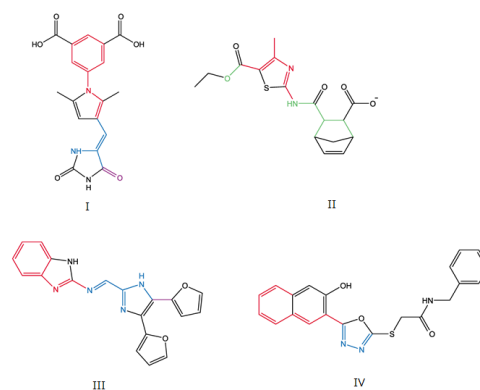


図 3. スクリーニングにより見出した化合物

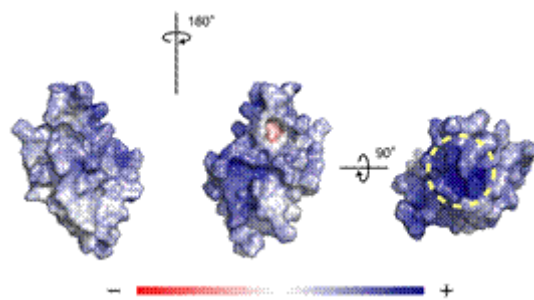


図 4. **vRAGE** の表面電化分布

(3)**vRAGE** 表面電荷の解析結果を基に、変異を導入し、その **AGE** 結合活性の変化を測定することにより **AGE** 結合に寄与する残基の特定を行った。変異部位として強く正に荷電していた領域の周辺に存在する 9 つの塩基性残基を選択し、それぞれアラニンに置換した **single mutant** を得るため **QuickChange** 法により変異の入った遺伝子を作成し調製した。**ELISA** 法を用いて変異導入による **AGE** 結合活性の変化を評価した結果、特に **K23A**、**K24A**、**R84A** の結合活性が大きく低下していることが明らかになった。さらにこれら 3 残基を同時に置換したところほとんど **AGE** 結合活性がなくなった。この 3 残基は立体構造上では非常に近接して正電荷クラスターを形成していた。

vRAGE の表面は他に疎水性残基が局在するかなり大きな窪みが特徴的である。詳細な

SPR 解析の結果 BSA-RAGE の結合は二段階反応であることが分り、RAGE は図 4 の正電荷を帯びた残基のうちでも特に結合能の低下の著しい黄色の残基と静電相互作用で結合し、構造変化を起こしたのち褐色の疎水性の穴に捕捉されることが分かった。同じく正電荷を帯びるであろう青色の残基とは静電相互作用した AGE は vRAGE の表面上、疎水性の穴とは距離が遠くて安定な疎水結合を作らず捕捉されないことが分かった。一方 vRAGE の糖鎖を切除すると AGE に対する結合能が著しく低下することが知られている。図 6 中にマゼンタ色で示す Asn 残基が存在する近辺がアミノ酸配列から糖鎖が結合する位置と考えられる。Asn81 の Asp 置換が結合能を低下させること事が分かった。負電荷の影響を考慮するとき、この位置における負電荷を帯びた糖鎖の結合が黄色の正電荷と AGE との静電相互作用を弱めることになり、この糖鎖の有無で AGE-RAGE の相互作用を制御していると考えられる。

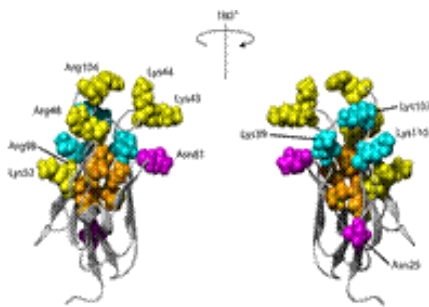


図 5. 電荷を持つ残基の分布

(4) 活性評価法

AGE-RAGE 相互作用の阻害活性を評価するための分離精製した AGE が得られないので、ウシアルブミン(BSA)をグルタルアルデヒドで処理し得られた反応混合物を BSA-AGE として用いた。また Lys を同様に処理したものについては *in vivo* アッセイで活性を持つことを認められなかったが、*in vitro* での活性を認めたので、BSA-AGE に比べて分子量が小さく解析が容易であることを考え、これを Lys-AGE として参考に用いた。活性はこれらと RAGE の結合阻害を表面プラズモン共鳴法および ELISA 法を用いて行った。また AGE が RAGE に結合することにより惹き起こされる細胞内シグナルの一つである転写因子 NF- κ B の活性化の阻害を指標としたレポーターアッセイを行った。

(5) 更なるリード化合物の探索

図 3 に示した 4 種の候補化合物は *in silico*

スクリーニングによって独立に見出されたにも拘らず赤色と青色で示したように分子の骨格を形成する結合に共通点が見られた。この共通骨格を有する化合物を先のライブラリーから検索して新たな候補化合物とし、それらの活性を測定した。また結合サイトとして予想した部位が、上記 4 種の候補化合物の結合部位である事を明らかにしたが、他の部位を結合サイト候補として先と同様の *in silico* スクリーニングを繰り返し有力な候補物質について活性評価を行った。

(6) 有機化学合成によるリード化合物の最適化

上記 4 種の候補化合物について、創薬科学で行われる常法に従って数多くの化学修飾を行った。例えば図の化合物上で R1、R2、R3 と示した個所への系統立った官能基の置換を行うことで良好な CLogP 値や IC50 値を探索した。

共同研究契約を締結後、上記のフィードバックを繰り返し骨格構造をも改変した候補物質を設計、合成し、既に 500 種以上の化合物を得ている。今後モデル動物を用いて副作用の有無、溶解度等の物性など薬剤としての最適化を図る。

(7) AGE-RAGE の分子間相互作用解析

我々が担当している物理化学的解析では trNOE、STD 法、water LOGSY 法など分子間相互作用に直接寄与する ^1H を低分子側であるリガンド(薬剤)で選択的に検出する NMR 手法を種々検討した。また RAGE の結晶化を試み、結晶に候補化合物をソーキングして、複合体の解析を試みている。特に予算の都合で購入できなかった極低濃度での測定が可能な蛍光による超遠心分析は実現しなかったが、代わりに購入できた等温滴定型熱量計による相互作用解析を開始した。しかし全ての候補化合物の溶解性が低く NMR の場合と同様実験条件の探索を行なっている段階である。

(8) RAGE-S100B の分子間相互作用解析

RAGE はマルチリガンド受容体であり AGE 以外にも、癌転移に関連する HMGB1、炎症誘発性サイトカインである S100B、アルツハイマー病脳に蓄積するアルツハイマー・アミロイド蛋白質などと相互作用することが報告されており、RAGE のリガンド認識機構の解明が待たれている。上述のように BSA-AGE や Lys-AGE をリガンドとして RAGE との阻害相互作用阻害物質を探索し

てきたが、より履歴の明確な RAGE に対するリガンドとしてこれら内在性のリガンドを対照として用いてきた。500 種に上る候補物質の中で S100B と RAGE の相互作用を阻害する物質を見出した。

以前より ITC や NMR 測定の結果の解釈に苦しみ、分子の会合をより直接的に観測する手法として超遠心分析法の適応を検討した。該当する化合物が蛋白質 (RAGE や S100B) の吸収を示さない 300nm より長波長に吸収を持つことを利用して以下の超遠心実験を行った。図 6 の上段の青から赤へのカーブは S100B のセル内の吸収の時間経過を示す。この沈降による濃度分布の時間変化を Lamm の方程式を用いて数値解析した結果、下段の沈降係数で表した粒度分布を得た。この沈降係数から S100B はすでに文献に報告されている通り前者はダイマーであり、後者はテトラマーの平衡系と分かると同時に、本化合物がこの両者と結合していることを明らかにした。

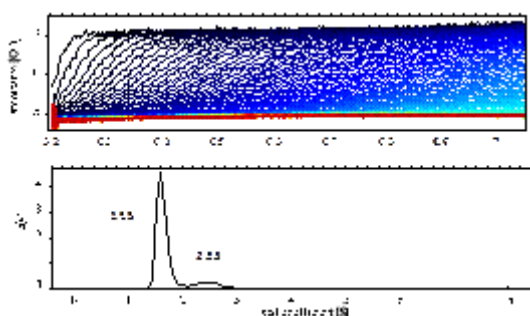


図 6. 化合物-S100B 複合体溶液の沈降速度実験

この事実はこの化合物が S100B の阻害薬として、てんかんやアルツハイマーの神経疾患の予防や治療薬開発に貢献する可能性を示した。これは本研究の大きな副産物として新しい創薬候補を得たことになる。またこの手法は今後の創薬におけるリガンド探索に応用でき、当初申請していた分析用超遠心機に蛍光測定装置を附置することにより一層その威力を発揮するであろうことを実証した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 10 件)

1) "Polymorphism of Collagen Triple Helix Revealed by (^{19}F) NMR of Model Peptide [Pro-4(R)-Hydroxyprolyl-Gly](3)-[Pro-4(R)-

Fluoroprolyl-Gly]-[Pro-4(R)-Hydroxyprolyl-Gly](3)." Kawahara K, Nemoto N, Motooka D, Nishi Y, Doi M, Uchiyama S, Nakazawa T, Nishiuchi Y, Yoshida T, Ohkubo T, Kobayashi Y. J Phys Chem B. in press, 査読有り

2) "Conformational preferences of 4-chloroproline residues." Park HS, Byun BJ, Motooka D, Kawahara K, Doi M, Nakazawa T, Kobayashi Y, Kang YK. Biopolymers. 97, 629-641(2012). 査読有り DOI: 10.1002/bip.22054.

3) "The triple helical structure and stability of collagen model peptide with 4(S)-hydroxyprolyl-pro-gly units." Motooka D, Kawahara K, Nakamura S, Doi M, Nishi Y, Nishiuchi Y, Kee Kang Y, Nakazawa T, Uchiyama S, Yoshida T, Ohkubo T, Kobayashi Y. Biopolymers. 98, 111-121(2011). 査読有り DOI: 10.1002/bip.21730.

4) Noda M, Uchiyama S, McKay AR, Morimoto A, Misawa S, Yoshida A, Shimahara H, Takinowaki H, Nakamura S, Kobayashi Y, Matsunaga S, Ohkubo, T, Robinson CV, Fukui K. "Assembly states of the nucleosome assembly protein 1 (NAP-1) revealed by sedimentation velocity and non-denaturing MS." Biochem. J. 436 101-112 (2011) 査読有り <http://www.biochemj.org/bj/436/0101/bj4360101.htm>

5) "Increasing the hydrolysis constant of the reactive site upon introduction of an engineered Cys14-Cys39 bond into the ovomucoid third domain from silver pheasant", Hemmi H, Kumazaki T, Kojima S, Yoshida T, Ohkubo, T, Yokosawa H,

Miura K, and Kobayashi Y
J. Peptide Science, 8, 595-600, (2011), 査読有り DOI: 10.1002/psc.1381

6) “Structure and Reaction Mechanism of Human Nicotinamide Phosphoribosyltransferase.” Takahashi R, Nakamura S, Nakazawa T, Minoura K, Yoshida T, Nishi Y, Kobayashi Y, Ohkubo T. J. Biochem., 147, 95-107, (2010), 査読有り <http://jb.oxfordjournals.org/content/147/1/95.long>

7) “Structural and dynamic features of the MutT protein in the recognition of nucleotides with the mutagenic 8-oxoguanine base.”, T. Nakamura, S. Meshitsuka, S. Kitagawa, N. Abe, J. Yamada, T. Ishino, H. Nakano, T. Tsuzuki, T. Doi, S. Fujii, Y. Kobayashi, M. Sekiguchi, Y. Yamagata J. Biol. Chem., 285, 444-452, (2010), 査読有り <http://www.jbc.org/content/285/1/444.long>

8) “Effect of antibody affinity and antigen valence on molecular forms of immune complexes.”, Oda M, Uchiyama S, Noda M, Nishi Y, Koga M, Mayanagi K, Robinson C. V., Fukui K, Kobayashi Y, Morikawa K, Azuma T. Mol. Immunol., 47, 357-364, (2009), 査読有り <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0161589009007111>

9) “Crystal Structure of Human Ribosomal Protein L10 Core Domain Reveals Eukaryote-Specific Motifs in Addition to the Conserved Fold” Nishimura M, Kaminishi T, Takemoto C, Kawazoe M, Yoshida T, Tanaka A, Sugano S, Shirouzu M, Ohkubo T, Yokoyama S, Kobayashi Y. J Mol Biol., 377, 421-430, (2008), 査読有り

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002228360800020X>

10) “The Solution Structure of Variable-type Domain of Receptor for Advanced Glycation Endproducts: Identification of the AGE-binding Site” S. Matsumoto, T. Yoshida, H. Murata, S. Nakamura, Y. Yamamoto, T. Watanabe, H. Yonekura, H. Yamamoto, T. Ohkubo and Y. Kobayashi. Biochemistry, 47, 12299-12311, (2008), 査読有り DOI: 10.1021/bi800910v

(2)学会発表

1)小林祐次

“合理的創薬を目指した構造解析と熱力学的解析”第47回熱測定討論会 特別講演 2011年10月21日-23日 群馬県桐生市

2)小林祐次

“Molecular interaction of PPAR α with its ligand” 12th Naples Workshop on Bioactive Peptides 2010年6月4日-7日

イタリア

3)小林祐次

“Structural and thermodynamic analyses on complex of PPAR γ and its ligand” The 13th Akabori Conference: German-Japanese Symposium on Peptide Science 2010年9月 ドイツ

6. 研究組織

(1)研究代表者

小林 祐次 (KOBAYASHI YUJI)
大阪薬科大学・薬学部・教授
研究者番号：20127228

(2)研究分担者

山田 剛司 (YAMADA TAKASHI)
大阪薬科大学・薬学部・准教授
研究者番号：20278592
西村 光広 (NISHIMURA MITSUHIRO)
研究者番号：40510285