

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 28 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293127

研究課題名(和文) 終末糖化産物受容体阻害アプタマーの開発と心血管病、癌への応用

研究課題名(英文) Development of DNA-aptamer raised against RAGE and its clinical application for cardiovascular disease and cancer

研究代表者

山岸 昌一 (Yamagishi, Shoichi)

久留米大学・医学部・教授

研究者番号：40281026

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,400,000円

研究成果の概要(和文)：終末糖化産物を認識し病的シグナルを伝達する受容体(RAGE)の機能を阻害するDNAアプタマー(RAGEアプタマー)の糖尿病モデル動物や担癌動物に投与した。RAGEアプタマーは、ストレプトゾトシンで誘発した糖尿病ラットの腎症及び、ヒトメラノーマ細胞を移植したヌードマウスにおいて、いずれも抑制する効果を示した。さらに、RAGEアプタマーの投与を開始した時期は、腎症と腫瘍の病態が増悪してからであったにも関わらず、RAGEアプタマーが抑制効果を示したことは、将来の臨床応用に向けて重要な知見が得られたといえる。

研究成果の概要(英文)：Advanced glycation end products (AGEs) and their receptor (RAGE) play a role in diabetes-associated complications, such as diabetic nephropathy and cancer. We screened DNA aptamer directed against RAGE (RAGE-aptamer) in vitro, and examined its effects on renal injury in streptozotocin-induced diabetic rats and melanoma growth in nude mice. Urinary albumin and 8-hydroxy-2'-deoxy-guanosine, AGEs and RAGE levels were increased, and enhanced glomerular extracellular matrix accumulation were observed in diabetic rats, all of which were prevented by RAGE-aptamer. Moreover, RAGE-aptamer inhibited tumor growth in nude mice, and decreased expression levels of proliferating nuclear antigen, CD31 and Mac-3, markers of endothelial cells and macrophages, respectively. RAGE-aptamer may be a novel therapeutic agent for diabetes-associated complications.

研究分野：糖尿病学

キーワード：糖尿病合併症治療 DNAアプタマー 核酸医薬品 終末糖化産物 終末糖化産物受容体

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ひきおこされる代謝疾患群である。しかしながら、患者の QOL と生命予後の観点からみれば、糖尿病は心血管病であるともいえる。実際、糖尿病腎症は新規透析導入の原因疾患の第 1 位であるし、網膜症によって年間約 3,500 人の方々が失明に至っている。また、糖尿病患者の約 30% が心筋梗塞や脳血管障害などの心血管事故により亡くなっているのが現状である。さらに最近になり、糖尿病では癌を発症する危険性が高まっており、血糖コントロール不良の症例ほど癌死のリスクが上昇することも明らかにされてきた。つまり、糖尿病では日本人の 3 大死因を構成する疾患の発症リスクが著しく高まっていることになる。以上の事実は、糖尿病診療において、心血管病と癌に対する新しい治療手段の確立が喫緊の課題であることを示している。

一方、糖尿病血管合併症の発症・進展機序を考える上で興味深い臨床報告が最近なされてきている。EDIC-DCCT 試験によれば、1 型糖尿病の初期 6.5 年間の血糖コントロールが厳格であると、その効果が長期にわたって持続し、試験終了後少なくとも 8 年間は細小血管症の進展が抑制でき、11 年後の心血管イベントの発症も有意に抑えられるという。さらに 2 型糖尿病患者を対象とした UKPDS 後の 10 年間にわたる follow-up 研究 (UKPDS80 研究) でも、初期からの厳格な血糖管理が血管合併症の進展に対して遺産効果を及ぼしうることが報告された。これらの観察結果は、糖尿病患者においては、ある程度の期間高血糖に暴露されてしまうと生体がそれを「高血糖のつけ・借金」として記憶してしまい、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を示唆している。つまり、ヒトの糖尿病血管症においても実験動物同様「高血糖の記憶 (metabolic memory)」というメカニズムが関わることが推定される。AGE は、血糖コントロールの程度とその持続期間により不可逆的に生体内で形成、蓄積され、一度形成されるとなかなか代謝されないため、「高血糖の記憶」という現象を最も良く説明できる物質だと言える。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。このことから、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。

さらに、我々はこれまでに (1) AGE が血管壁細胞、糸球体構成細胞、癌細胞上に存在する受容体 RAGE によって認識され、酸化ストレスや炎症反応、病的血管新生などを惹起させ、糖尿病網膜症、腎症、動脈硬化症、癌の増殖・転移に関わること、(Am J Pathology 2012 (in press); Pharm Res 2012, 65,

297-302; J Cell Physiol 2011, 226, 1554-63; Am J Pathology 2011, 178, 591-8; Int J Cardiol 2010, 145, 566-7; Laboratory Invest 2010, 90, 1117-27; Diabetes Metab Res Rev 2009, 25, 266-71; JBC 2006, 281, 20213-20; Diabetologia 2006, 49, 3094-9; J Bone Miner Res 2005, 20, 1647-58; J Invest Dermatology 2004, 122, 461-7; Am J Pathology 2004, 165, 1865-74; Kidney Int 2004, 66, 2137-47; Diabetologia 2003, 46, 284-7; FASEB J 2002, 16, 1928-30; JBC 2002, 277, 20309-15; Neurosci Lett 2002, 326, 1117-20; Mol Med 2002, 8, 546-50; JCI 2001, 108, 261-8; Diabetes 2001, 50, 1491-4; JBC 2001, 276, 25096-100; Nature 2000, 404, 787-90; JBC 2000, 275, 25781-90; BBRC 1999, 258, 353-7; Diabetologia 1999, 42, 579-88; Diabetologia 1998, 41, 1435-41; JBC 1997, 272, 8732-30; BBRC 1996, 222, 700-5) (2) 血中や組織 AGE レベルが各種炎症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すること (Diabetes Care 2012 (in press); Cardiovasc Ther 2012, 30, 249-54; Nephrology 2011, 16, 299-303; Atherosclerosis 2011, 219, 311-5; JACC-Imaging 2011, 4, 1110-8; Frontier Biosci 2010, 2, 1184-95; Pharmacol Res 2009, 60, 515-8; Diabetes Metab Res Rev 2008, 24, 109-14; JACC 2007, 49, 1533-9; Mol Med 2007, 13, 185-9)、(3) レニン・アンジオテンシン系の活性化や飽和脂肪酸の上昇によっても RAGE の発現が誘導され、血管障害が増悪、進展しうること (BBA 2012, 1820, 663-71; J Mol Cell Cardiol 2007, 43, 455-64; FEBS Lett 2005, 579, 4265-70; Mol Med 2002, 8, 179-84)などを明らかにしてきた。そこで、「RAGE を標的としてその作用を阻害できれば、糖尿病における心血管病と癌の進展を同時に阻止できるのではないかと」着想するに至った。我々は既に予備実験で、試験管内で RAGE と特異的に結合する DNA アプタマーをいくつか見いだしている。DNA アプタマーは標的蛋白との親和性が高く、免疫原性が低く毒性の強い蛋白に対しても応用でき、抗体に比べて安価に大量に調整できることから、次世代のバイオ医薬品として注目されている。そこで本研究では、RAGE と特異的に結合し、その機能を阻害する RAGE-アプタマーを開発して、糖尿病モデル動物や担癌動物に投与することで、当該アプタマーの心血管病と癌への有効性を検証し、将来の臨床応用への可能性を模索しようとするものである。

2. 研究の目的

(1) RAGE は、イムノグロブリンスーパーファミリーに属し、細胞外ドメインは 1 つの可変領域と 2 つの定常領域から構成されている。AGE は、RAGE の可変領域に結合することで細胞内に情報を伝達すると考えられ

ている。そこで、まず、RAGE の可変領域を認識する修飾 RAGE-アプタマー(2'-フッ化ピリミジン化、PEG 鎖化で安定化したもの)を数百種類作成する。その中から、RAGE との結合活性が高く、内皮細胞において AGE による酸化ストレスの産生と NF- κ B の活性化を抑える RAGE 阻害アプタマーをスクリーニングしていく。次いで(2)糖尿病モデル動物の血管合併症や癌の増殖、転移に対する RAGE-アプタマーの効果を検討する。ストレプトゾトシン糖尿病ラットと非糖尿病コントロールラットに RAGE-アプタマーあるいは

コントロール DNA アプタマー(RAGE-アプタマーと塩基組成は同一だが、配列をスクランブルさせたコントロールアプタマー)を投与し、RAGE-アプタマーが糖尿病網膜症や腎症(網膜電図上の律動様の振幅の低下や潜時の延長、網膜血管への白血球の接着亢進や血管透過性の亢進、微量アルブミン尿の出現やポドサイトの消失、糸球体硬化病変や尿細管間質病変など)を抑制できるかどうかを検討する。加えて、頸動脈バルーン傷害や冠動脈結紮による急性心筋梗塞モデルにおいて、心血管系のリモデリングが RAGE-アプタマーの投与で抑制できるかどうかを検討する。さらに、ヌードマウスに植え付けた癌の増殖と転移が RAGE-アプタマーの投与で抑えられ、担癌動物の生存率が改善するかどうかについても検討するものとする。

3. 研究の方法

まず、「内皮細胞において AGE による酸化ストレスの産生と NF- κ B の活性化を抑える」RAGE 阻害作用を有する修飾 DNA アプタマーを開発する。ついで、ストレプトゾトシン糖尿病ラット(あるいはヌードマウス)の腹腔内に修飾 RAGE ならびにコントロールアプタマーを投与し、糖尿病網膜症・腎症、バルーン傷害あるいは冠動脈結紮による急性心筋梗塞後心血管リモデリング、癌の増殖と転移、担癌動物の生存率に及ぼす RAGE-アプタマーの効果について、生理学的、分子生物学的、病理学的解析を行う。我々は既に、内皮細胞において AGE が RAGE を介して認識され、酸化ストレスと NF- κ B の活性化を誘導させることで病的シグナルを伝達することを明らかにしてきている(JBC 2006, 281, 20213-20)。そこで AGE による酸化ストレス産生と NF- κ B の活性化を抑えるかどうかで阻害機能を有する RAGE-アプタマーを絞り込んでいく。KD 値が pM オーダーと RAGE との結合活性が高く、かつその機能を阻害する RAGE-アプタマーを開発し、動物実験に用いることとする。我々の研究室では、酸化ストレスの産生や NF- κ B の活性化を評価するいくつかの測定系が確立しており、スクリーニングを効率的に行っている。また、連携研究者の松井はアプタマーの調整に精通しており、これまでにいくつかの機能性アプタマーの大量精製に成

功してきた実績を有する(Microvas Res 2007,74,65-69)。ついで、ストレプトゾトシン糖尿病ラットに修飾 RAGE あるいはコントロールアプタマーを腹腔内に投与し、糖尿病網膜症・腎症に及ぼす RAGE-アプタマーの効果について、生理学的、分子生物学的、病理学的解析を加える。山岸は、長年、糖尿病血管合併症モデル動物の病態解析の研究に携わっており、準備は万全である。また、これまでの別のアプタマーを使った動物実験のデータから、RAGE-アプタマーを持続ポンプを用いて体重(g)あたり 30-300 fmol/hr の範囲で動物に投与する予定である。さらに平成 26 年 10 月から、バルーン傷害モデルおよび冠動脈結紮による急性心筋梗塞モデルを用いて、RAGE-アプタマーの心血管系リモデリングに及ぼす影響について検討する。連携研究者の植田は、バルーン傷害モデル、急性心筋梗塞モデルの作製ならびに解析に習熟しており(Am J Pathology 2007, 170, 2159-70; Am J Pathology 2011, 178, 591-8)。これらの実験により RAGE-アプタマーの糖尿病大血管症への保護的効果が明らかにされる。また、最終年では、糖尿病にしたヌードマウスにメラノーマを植え付ける我々が習熟してきた実験系を用いて(J Invest Dermatology 2004, 122, 461-7; Am J Pathology 2004, 165, 1865-74)、癌の増殖と転移、担癌動物の生存率に及ぼす RAGE-アプタマーの効果について検討を加える。

25 年度計画・方法

我々は、すでに RAGE の可変領域を含む可溶性 RAGE 蛋白発現ベクターを構築している(J Atherosclerosis Thromb 2011, 18, 670-83)。このベクターを 293T 細胞にトランスフェクションし、可溶性 RAGE 蛋白を大量に精製する。同蛋白をカップリング法を用いてアガロースビーズに固定化する。既報の SELEX 法により(Microvas Res 2007,74,65-69)、ランダムな塩基配列の一本鎖 DNA のプールから、可溶性 RAGE 蛋白の可変領域に結合する高親和性のアプタマーをカラム操作を繰り返すことにより探索する。ついで、候補アプタマーの中から、RAGE 阻害機能を有するアプタマーを絞り込んでいく。具体的には、100 μ g/ml の AGE に内皮細胞を 4 時間暴露させ、酸化ストレス(DCFDA 法、DHE 法などで計測)と NF- κ B の活性化(ルシフェラーゼ活性や活性型 p65 の免疫染色法などで計測)を完全に抑える DNA アプタマーを同定していく。最後に、当該アプタマーが RAGE の可変領域に実際に強固に結合するかどうか Biacore を用いて確認し、同アプタマーに 2'-フッ化ピリミジン化、PEG 鎖化で安定化修飾を行う。平成 26 年初頭から動物実験を開始する。6 週齢の Sprague-Dawley (SD) rat に 60mg/kg のストレプトゾトシンを腹腔内に投与して、糖尿病モデルラットを作製する。投与 24 時間後に血糖を測定し、血糖が 250mg/dl 以上となったものを糖尿病モデルとする。このラ

ットに腹腔内に用量をふった RAGE-アプタマーあるいはコントロールアプタマーを投与し(30-300 fmol/hr、浸透圧ポンプで持続的に投与)、経時的に(約5ヶ月間)以下の項目について評価し、非糖尿病コントロールラットと比較検討する。ストレプトゾトシン糖尿病ラットは、3ヶ月目以降は少量のインスリン投与(2単位皮下投与/週)を併用し、長期にわたる観察が可能となる様、最低限の血糖コントロールに努める。なお、効果の解析は、26年度以降に行う。

26年度計画・方法

(1) 糖尿病網膜症に対する効果解析

Fluorescein で標識したコンカナバリン A レクチンにより網膜血管へ接着した白血球を可視化し、その程度を定量化する(1、3ヶ月目)。

Fluorescein による蛍光造影眼底検査で、血管透過性亢進の程度を定量化する(1、3ヶ月目)。

血管透過性の亢進と網膜血管への白血球の接着には、VEGF や ICAM-1 の発現亢進が重要であることが知られている。そこで、real-time PCR ならびに western blot を用いて、両因子発現に及ぼす RAGE-アプタマーの影響について検討する(1、3ヶ月目)。

トリプシン消化標本にて、周皮細胞の選択的消失や acellular capillary の程度を組織学的に定量評価する(5ヶ月目)。

網膜電図を用いて、視細胞から誘発される a 波、Muller 細胞あるいは双極細胞から誘発される b 波の振幅の低下や b 波上の律動様小波の潜時の延長に及ぼす RAGE-アプタマーの影響について検討する(1、3ヶ月目)。

(2) 糖尿病腎症に対する効果解析

腎機能、腎重量、血圧などに及ぼす影響を検討する(1、3、5ヶ月目)。

尿中微量アルブミン量、蛋白尿ならびに尿中ネフリン排泄や尿細管障害マーカー排泄に及ぼす影響を測定する(1、3、5ヶ月目)。

微量アルブミン尿の出現やポドサイトの障害には、酸化ストレスの産生や炎症反応が関わることが知られている。そこで、酸化ストレスマーカーである 8-OHdG の尿中排泄量や腎組織における VEGF、MCP-1 の発現を ELISA 法や real-time PCR ならびに western blot を用いて検討する(1、3ヶ月目)。

組織学的に糸球体硬化症や尿細管間質病変に及ぼす AGE-アプタマーの効果について検討する。合わせてポドサイトロスの程度や足突起の癒合についても形態学的な検討を加える(3、5ヶ月目)。

また、糖尿病網膜症、腎症いずれにおいても RAGE-アプタマーの投与により、組織での AGE や RAGE の発現レベルが低下し、情報伝達を担う分子である NADPH オキシダーゼの発現や NF- κ B の活性化が抑制されているかどうかを免疫染色法、real-time PCR、western blot、酵素法などで検討する(3、5ヶ月目)。

(2) バルーン傷害後血管リモデリングに対する効果解析

糖尿病ならびにコントロールラットにバルーン傷害モデルを作製後、修飾 RAGE-アプタマーあるいはコントロール DNA アプタマーを投与し、2、4週間目に屠殺し、障害部位血管を摘出する。ヘマトキシリン-エオジン染色後、血管内腔面積、内膜/中膜比を測定し、RAGE-アプタマーにより血管リモデリングが抑制されるかどうかを検討する。

次いで組織学的にマクロファージの浸潤や平滑筋細胞の増殖・遊走が抑えられているかどうか、マクロファージや平滑筋細胞に特異的なマーカーを用いて定量化する。さらに血管リモデリングに関わることが知られている MCP-1 や PDGF-B の発現を real-time PCR ならびに western blot を用いて検討する。あわせて組織での AGE や RAGE の発現レベルが低下し、情報伝達を担う分子である NADPH オキシダーゼの発現や NF- κ B の活性化が抑制されるかどうかも検討する(2、4週間目)。

(3) 急性心筋梗塞後リモデリングへの効果解析

糖尿病ならびにコントロールラットに冠動脈左前下行枝の結紮を行い、急性心筋梗塞モデルを作製後、修飾 RAGE-アプタマーあるいはコントロール DNA アプタマーを投与し、1、2、8週間目に心機能をエコーで評価し(収縮能を ejection fraction で、また拡張能を E/A で)、血中 BNP や MMP-2 レベルの測定を行う。さらに障害心室を摘出し、RAGE-アプタマーにより心筋リモデリングが抑制されるかどうか形態学的に計測する。また、梗塞部位とその周辺部位におけるマクロファージの浸潤、心筋アポトーシス、線維化が抑えられているかどうかを TUNEL 法や Sirius red 染色法を用いて定量化する。さらに心筋リモデリングに関わることが知られている MMP-2,9 や TGF- β の発現レベルを real-time PCR ならびに western blot を用いて調べる。あわせて AGE、RAGE や酸化ストレスマーカーである 8-OHdG レベルが低下し、情報伝達を担う分子である NADPH オキシダーゼや NF- κ B の活性化が抑制されるかどうかについても免疫染色法などを用いて検討する。

(4) 癌への効果解析

糖尿病ならびにコントロールヌードマウスの皮内に G361 メラノーマ細胞を 100 万个注入した腫瘍異種移植片モデルを作製する。同モデルに修飾 RAGE-アプタマーあるいはコントロール DNA アプタマーを投与し、3ヶ月間経過観察を行い、腫瘍の増大、肺への転移、生存率に及ぼす RAGE-アプタマーの影響について解析を行う。また、45日目に腫瘍移植片を取り出し、腫瘍のアポトーシスと腫瘍内血管新生、マクロファージの浸潤に対する RAGE-アプタマーの効果についても検討を加える。さらに腫瘍の増大、転移には AGE-RAGE による VEGF や MMP-2,9 の誘導が重要と考えられることから、これら因子の発現レベ

ルを real-time PCR ならびに western blot を用いて計測する。あわせて腫瘍内新生血管、マクロファージ、腫瘍細胞における AGE、RAGE、8-OHdG レベルを免疫染色法などを用いて定量化する。

4. 研究成果

終末糖化産物を認識し病的シグナルを伝達する受容体 (RAGE) の機能を阻害する DNA アプタマー (RAGE アプタマー) の糖尿病モデル動物や担癌動物に投与した。RAGE アプタマーは、ストレプトゾトシンで誘発した糖尿病ラットの腎症及び、ヒトメラノーマ細胞を移植したヌードマウスにおいて、いずれも抑制する効果を示した。さらに、RAGE アプタマーの投与を開始した時期は、腎症と腫瘍の病態が増悪してからであったにも関わらず、RAGE アプタマーが抑制効果を示したことは、将来の臨床応用に向けて重要な知見が得られたといえる。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山岸 昌一 (YAMAGISHI SHO-ICHI)

久留米大・医学部・教授

研究者番号: 40281026

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

松井 孝憲 (MATSUI TAKANORI)

久留米大・医学部・講師

研究者番号: 10425233

植田 晋一郎 (UEDA SHIN-ICHIRO)

久留米大・医学部・助教

研究者番号: 00412502