生活習慣病の増悪化因子 「HMGB1, AGEs-RAGE系」に対する 創薬プラットフォーム構築

森 秀治¹⁾, 高橋 英夫²⁾, 豊村 隆男¹⁾

要約: HMGB1 や AGEs といった RAGE リガンドによって、単球、マクロファージ、血管内皮細胞が刺激を受けると、MAP キナーゼ群の活性化、ROS 産生増大、低分子量 G タンパク質の活性化などを介して NF- κ B を中心とした転写因子リン酸化が誘導される。その結果、炎症性サイトカイン (IL-1, IL-6, TNF- α など)、ケモカイン (MCP-1 など)、細胞接着因子 (ICAM-1 など)、マトリックスメタロプロテアーゼなどの様々な炎症関連因子の発現亢進を引き起こし、このことが炎症、糖尿病合併症、腫瘍増殖をはじめとする様々な病態形成の分子基盤となっていることが示唆されている。本稿では、「HMGB1, AGE-RAGE系」を分子標的にした創薬のための種々の方策について講じるとともに、特に AGEs-RAGE 反応を抑制し得る新たな分子標的薬の開発の第一ステップとして、固相法に基づいた AGEs-RAGE 間結合アッセイの構築ならびに結合遮断活性を示す創薬シーズの探索例について述べる。

1. HMGB とは

HMGB1 (high mobility group box-1) は、従来はクロマチン構成分子の一つで DNA の立体構造の維持に重要な役割を果たす DNA 結合タンパク質として存在し、特定遺伝子の転写調節機能を示す分子量 29 kD の核内タンパク質として知られていた。しかし、Wang と Tracey は LPS 誘導性敗血症ショックモデルにおいて、HMGB1 が敗血症病態の進展における遅発性の致死性メディエーターであることを見出し(1)、この報告以降、代表的 Damps (danger-associated molecular patterns) 分子としての HMGB1 の炎症・免疫亢進作用と病態生理学的意義に注目が高まっている。

HMGB1 は、通常は核内因子として存在するにもかかわらず、障害を受けて壊死に陥った組織や細胞から放出されることにより、あるいは刺激を受けて活性化した単球や樹状細胞、マクロファージから細胞外に分泌されることにより、病巣局所ひいては循環血液中に現れ、炎症性サイトカイン様因子としての機能を発揮する(2)。

細胞外に放出された HMGB1 は、活性化した炎症細胞や血管に多く発現する RAGE (receptor for advanced glycation end products) や TLR-2/4 (Toll-like receptor-2/4) を受容体として刺激する。たとえば、HMGB1 は 50-183 位の領域に RAGE との相互作用部位を持ち、HMGB1 刺激にともなって、MAPK/NF- κ B 経路を活性化し、様々な炎症性因子 (TNF- α , IL-1, IL-6 など) の産生増大、活性酸素産生亢進などを誘導する(3, 4)。RAGE は、単球、マクロファージ、血管内皮細胞を含む様々な細胞表面に発現するパターン認識受容体の一つであり、HMGB1 の他に後述の AGEs (終末糖化産物: advanced glycation end products) などの複数の因子をリガンドとし、そのことから炎症病態、糖尿病合併症、アルツハイマー病、全身性アミロイドーシス、腫瘍増殖などの様々な病態の基盤分子として潜在的に関与している可能性が示唆されている(5, 6)。

2. AGEs とは

AGEs は、還元糖 (あるいは糖代謝物) によるタンパク質への非酵素的糖化反応産物であり、加齢に依存した生体組織での蓄積や糖尿病合併症や動脈硬化などの加齢関連疾患における有意な AGEs 産生増加が報告

キーワード: AGEs, HMGB1, RAGE, 炎症, サイトカイン

¹⁾ 就実大学 薬学部 (〒703-8516 岡山市中区西川原 1-6-1)

²⁾ 近畿大学 医学部 (〒589-8511 大阪狭山市大野東 377-2)

E-mail: morimori@shujitsu.ac.jp (森), hkt@med.kindai.ac.jp (高橋), toyomura@shujitsu.ac.jp (豊村)

原稿受領日: 2013 年 8 月 30 日, 依頼原稿

Title: Platform for drug discovery targeting HMGB1, AGEs-RAGE response

Author: Shuji Mori, Hideo Takahashi, Takao Toyomura

されている。近年、AGEs は還元糖のみならず糖代謝物とも反応することによって複数種の AGEs が生成することが報告され(7,8), これらは主に AGEs 受容体である RAGE を介してマクロファージや血管系細胞などを刺激し、様々なサイトカイン様活性を発揮することで組織リモデリングや炎症病態の形成に関与するとされている(図1)。現に、RAGE を過剰発現させた糖尿病モデルでは合併症の増悪化が認められ、逆に RAGE ノックアウトモデルでは病態進行が極めて遅いことが知られ、RAGE 刺激を介した生体反応を抑制することが病態の予防や治療にとって極めて重要であることが示唆されている。HMGB1 の場合に類似して、AGEs による RAGE 刺激によって細胞内で活性酸素産生増大、MAP キナーゼ活性化、低分子量 G タンパク質の活性化を介して、NF- κ B を中心とした転写因子リン酸化が誘導され、結果として炎症性サイトカイン (IL-1, IL-6, TNF- α など)、ケモカイン (MCP-1 など)、細

胞接着因子 (ICAM-1 など)、マトリックスメタロプロテアーゼなどの様々な炎症関連因子の発現亢進を引き起こす(9,10) (図2)。

3. 分子標的としての HMGB1, AGEs-RAGE 系

上述のように、HMGB1 や AGEs による RAGE 刺激は、炎症や酸化ストレスを背景としたメタボリックシンドローム、糖尿病性血管合併症、動脈硬化などをはじめとする様々な病態の進展に関与することが示唆されていることから、これらの病態の未然防止・治療を目的にして「HMGB1, AGEs-RAGE 系」を分子標的にした創薬に注目が集まっている。

現時点で HMGB1, AGEs-RAGE 系が関係する疾患に対する予防と治療のために、図3に示すような方策が考えられている。すなわち HMGB1 に関しては、①活性化細胞からの HMGB1 放出の阻害、②放出された HMGB1 の中和、③受容体 (RAGE など) 刺激のブロックなどが考えられ、また AGEs に関しては、④AGEs 生成の阻害、⑤生成した AGEs の選択的分解、⑥AGEs 受容体 (RAGE など) 刺激のブロックなどが挙げられている。

この中で、我々は HMGB1 に対する特異的単クローン抗体を作成し、抗体投与が脳梗塞、脳外傷、アテローム性動脈硬化などの様々な疾患病態モデルに対して高い治療効果を発揮することを明らかにしているが(図3の②)、その詳細は最近の論文や総説等(11-14)で述べているため、本稿では割愛する。

従って、ここでは AGEs-RAGE 系に焦点を絞り、AGEs 遮断薬開発の現状や課題と共に、我々が取り組んでいる AGEs-RAGE 結合に基づく創薬プラットフォームの構築とこれを応用した AGEs 遮断薬のシーズ探

図1 AGEs による炎症・免疫の過剰亢進

図2 AGEs-RAGE 系のシグナル伝達と病態生理

素について紹介する。AGE-RAGE系の遮断に基づく疾患制御を目的として、AGEsの生成阻害薬の開発は古くから行われ、糖化反応の進行にともなって生じるカルボニル化合物を捕まえるタイプの薬物（いわゆるカルボニル捕捉型）（図3の④）として、これまでにアミノグアニジンやピリドキサミン（ビタミンB₆アナログ）などが報告されている。たとえば、STZ誘導性糖尿病モデルラットにおいて、ピリドキサミンの投与は皮膚コラーゲンのカルボキシメチルリジンやカルボキシエチルリジンの含量低下をもたらし、実際に腎障害の改善（血漿クレアチニン濃度、尿中アルブミン排泄量など）も認められている(15)。加えて、ピリドキサミンによって網膜症の進行が有意に抑制（無細胞毛細血管数の減少、ラミニン発現低下など）されることも報告されている(16)。次に、生成したAGEsを選択

的に分解する方策（図3の⑤）として、N-phenacylthiazolium bromideの使用例が報告(17)されており、これによってAGEsに含まれるジカルボニル構造体の分解に成功したとされているが、現時点では還元糖や糖代謝物による糖化反応によって生じる複数種のAGEsすべてを分解可能か、あるいは分解によってRAGEシグナルの低下がどの程度生じるかについては不明である。

Loredanaらは、STZ誘導性糖尿病マウスにおいて可溶性RAGEがAGEs-RAGE間の結合を抑えることによって糖尿病合併症に対する治療効果を発揮することを報告している(18)（図3の⑥）。このモデルでは、可溶性RAGE投与によってアテローム性動脈硬化容積の縮小、障害スコアの軽減、各種炎症性パラメータの正常化（単核性食細胞の遊走、MCP-1発現低下、VCAM-1発現低下、Cox-2活性抑制、MMP-9活性抑制、組織因子発現低下など）が認められている。このように可溶性RAGEといった高分子物質による病態制御の可能性が明らかにされているものの、臨床的応用の観点からみた場合には免疫原性や製造コストなどの問題が残されている。

我々はAGEs-RAGE反応系を抑制し得る新たな分子標的薬の開発の第一ステップとして、固相法に基づいたAGEs-RAGE間の簡便な結合アッセイの確立を行った。本法はAGEsで固相化したマイクロプレートに、順に組換え体RAGE（C末端Hisタグ付加）、発色プローブ（Ni-NTA-POD）、酵素基質を反応させることによって、最終的に比色法にてAGEsとRAGE間の結合量を見積もる方法である（図4）。この際に、組換え体RAGEの反応時に被検物質を共存させ、結合量（吸光

図3 HMGB1, AGEs-RAGE系制御の方策

図4 AGEs-RAGE間結合アッセイの構築と応用

度)の減少から AGEs-RAGE 間の結合遮断活性の有無を探索することが可能となる。この AGEs-RAGE 間結合アッセイでは、生理的条件下で各種 AGEs に対して組換え体 RAGE は濃度依存的に結合し、遮断物質探索に適した条件を検討したところ、AGEs は 0.6~6.7 $\mu\text{g/mL}$ 、組換え体 RAGE は 2.67 $\mu\text{g/mL}$ 、発色プローブは 2,000 倍希釈が最適であることが明らかとなっている。

4. AGEs-RAGE 結合遮断活性を示す化合物の探索

本結合アッセイを用いて、化学ライブラリーや天然物抽出液などを被検物質として結合遮断活性を持った物質の網羅的な探索を行ったところ、ヘパリン、ヘパラン硫酸鎖ならびにその構造誘導体が、濃度依存的に AGEs-RAGE 結合を抑制することが明らかとなった。この結果を基にして結合抑制活性を示す最小構造体の絞り込みを行ったところ、ヘパリンをヘパリチナーゼによって分解した後の単離・精製によって得られる硫酸化二糖類のうちの $\Delta\text{DiHS-NS}$ が $\mu\text{g/mL}$ オーダーで濃度依存的に結合抑制を示すことが明らかとなった(図 5)。 $\Delta\text{DiHS-NS}$ に関して RAGE シグナル遮断の有無や生体内安定性などの解決されるべき問題があるが、その分子量は 417.3 と低分子であり、今後、可溶性 RAGE に代わり得る低分子タイプの AGEs-RAGE 遮断薬を開発する上での新たな創薬シーズとしての活用が期待されるもの

と思われる。

5. おわりに

HMGB1, AGEs-RAGE 系は、糖尿病合併症をはじめとして様々な生活習慣病や組織リモデリング病態の基盤因子として病態生理学的に重要な役割を有している。現時点で HMGB1, AGEs-RAGE 系を分子標的にした医薬品は未だ存在しないが、様々な視点から HMGB1, AGEs-RAGE 制御の方策が活発に試みられており、HMGB1, AGEs-RAGE 系制御に基づく病態制御に向けてさらなる研究展開が期待される。

著者の利益相反：開示すべき利益相反はない。

文 献

- 1) Wang H, et al. Science. 1999;285:248-251.
- 2) Andersson U, et al. Annu Rev Immunol. 2011;29:139-162.
- 3) Bianchi ME, et al. Immunol Rev. 2007;220:35-46.
- 4) Harris HE, et al. Nat Rev Rheumatol. 2012;8:195-202.
- 5) Sims GP, et al. Annu Rev Immunol. 2010;28:367-388.
- 6) Rouhiainen A, et al. Methods Mol Biol. 2013;963:239-263.
- 7) Sato T, et al. Curr Mol Med. 2006;6:351-358.
- 8) Takeuchi M, et al. Curr Drug Targets. 2010;11:1468-1482.
- 9) Goldin A, et al. Circulation. 2006;114:597-605.
- 10) Yan SF, et al. Circ Res. 2003;93:1159-1169.
- 11) Okuma Y, et al. Ann Neurol. 2012;72:373-384.
- 12) Kanellakis P, et al. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2011;31:313-319.
- 13) 西堀正洋, 他. 日薬理誌. 2009;34:271-275.
- 14) 森秀治, 他. 薬学雑誌. 2009;129:25-31.
- 15) Degenhardt TP, et al. Kidney Int. 2002;61:939-950.
- 16) Stitt A, et al. Diabetes. 2002;51:2826-2832.
- 17) Vasan S, et al. Nature. 1996;382:275-278.
- 18) Loredana G, et al. Circulation. 2002;106:2827-2835.

図 5 $\Delta\text{DiHS-NS}$ の構造と AGEs-RAGE 結合遮断活性 (AGE2 ◆, AGE3 ■, AGE4 ▲, AGE5 ×)