

# 令和3年度 学内研究助成金 研究報告書

研究種目	■奨励研究助成金	□研究成果刊行助成金
	□21世紀研究開発奨励金 (共同研究助成金)	□国際共同研究推進助成金
研究課題名	血管新生を標的とした炎症性腸疾患に対する創薬シーズの開発	
研究者所属・氏名	研究代表者：医学部薬理学教室・講師・西中 崇 共同研究者：なし	

## 1. 研究目的・内容

炎症性腸疾患は慢性炎症による腸管粘膜病変を特徴とする疾患であり、病変部位で観察される異常な血管新生が炎症のトリガーとして想定されている。本研究では、血管新生の促進因子として、終末糖化産物 (advanced glycation end-products、AGEs) に着目し、血管内皮細胞においてその機序について解析を行った。さらに、AGEs の作用を抑制する海藻由来硫酸化多糖類フコイダンの効果についても検討を加え、創薬シーズとしての可能性を検証した。

## 2. 研究経過及び成果

マウス血管内皮細胞株 **b.End5** 細胞において、グリコールアルデヒドとアルブミン(BSA)で調製した AGE(AGE-3)は、スカベンジャー受容体(LOX-1、CD163)の発現上昇、mTOR シグナルの誘導を介して血管新生の指標であるマトリゲルにおける管腔形成を促進した。フコイダンは AGE-3 によるスカベンジャー受容体の発現上昇、mTOR シグナル活性化、管腔形成に対して抑制作用を示した。

一方、mTOR 阻害剤ラパマイシンやその上流である PI3K 阻害剤 LY294002 は AGE-3 による管腔形成は抑制するが、スカベンジャー受容体の発現上昇には影響しなかった。よって、フコイダンはシグナル阻害剤とは異なる機序で AGE-3 による管腔形成促進作用を抑制していることが示唆された。

AGE-3 に対するフコイダンの抑制機序を明らかにするために、AGE-3 / フコイダンの細胞内取り込みを解析した。蛍光標識した AGE-3 あるいはフコイダンを細胞に処置すると、各蛍光シグナルの増加が認められ、細胞内に取り込まれていることが示唆された。フコイダンは AGE-3 の蛍光強度を低下させることから、AGE-3 の細胞内取り込みを抑制することが示唆された(図1)。

AGE-3 による管腔形成促進に対する細胞内取り込みの関与を検討したところ、クラスリン依存性エンドサイトーシス阻害剤の chlorpromazine によって AGE-3 細胞内取り込みと管腔形成促進作用が抑制された。しかし、スカベンジャー受容体 LOX-1、CD36、CD163 に対する中和抗体を混ぜ合わせたカクテル抗体は、管腔形成促進作用に対して抑制作用を示したが、AGE-3 の細胞内取り込みは抑制しなかった。

以上の結果から、フコイダンは AGE-3 が血管内皮細胞に作用する初期段階である細胞内取り込みあるいはスカベンジャー受容体への結合を抑制することが示唆された。AGE-3 の管腔形成促進作用に対する細胞内取り込みの関与についてはいまだ不明であり、今後の課題である。

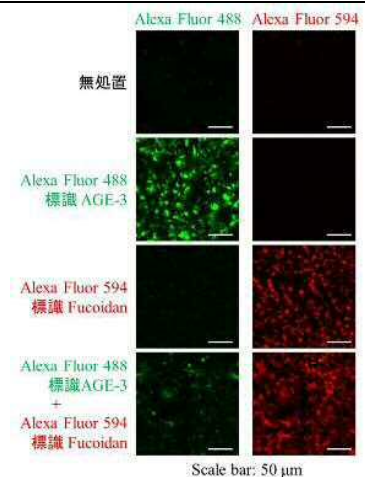


図1. 蛍光標識 AGE-3 / フコイダンの細胞内取り込み

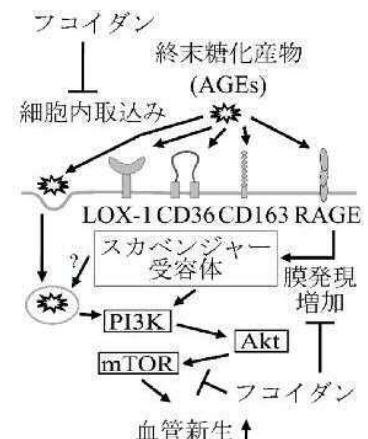


図2. AGEs による血管新生に対するフコイダンの抑制機序

### 3. 本研究と関連した今後の研究計画

デキストラン硫酸ナトリウム誘発の炎症性腸疾患動物モデルにおいて、その病態形成における AGEs の関与ならびにフコイダンの有効性について解析を行う。

本研究と並行して AGEs の化学的特性の解析を進めている。研究で使用している AGE-3 は高分子量のタンパク質となっており、そのためスカベンジャー受容体を介した作用を示すことが考えられる。予備検討において、AGEs の調製するカルボニル化合物の種類を変えることで、別の生理作用を示すことを確認している。今後は、AGEs の調製に使用するカルボニル化合物の種類や濃度の違いによる影響を考慮し、生体内において疾患の病態形成に関与することが示唆される物質に焦点をあて、AGEs の生理的な意義について明らかにしていきたい。

### 4. 成果の発表等

発表機関名	種類 (著書・雑誌・口頭)	発表年月日(予定を含む)
Experimental Cell Research	英文雑誌	2021年11月1日
第95回日本薬理学会年会	口頭発表	2022年3月7日
第139回日本薬理学会近畿部会	口頭発表	2021年6月26日