

【総説】

AGE-RAGE系を標的とした糖尿病血管症の新たな治療戦略

Novel Treatment Strategies against Diabetic Angiopathy Targeting AGE-RAGE Axis

金沢大学大学院医学系研究科血管分子生物学
(生化学第二)

渡 邊 琢 夫

はじめに

近年、糖尿病患者数は増加の一途をたどっている。日本においては、40～74歳の中高年男女の30%以上が糖尿病有病者か予備軍と推定されている。糖尿病の三大合併症として、腎症、網膜症、神経症があげられるが、これらに共通するメカニズムのひとつとして血管障害が考えられている。そして、その主要な成因の1つが高血糖状態で加速的に形成・蓄積される終末糖化産物AGE (advanced glycation endproducts) とその受容体であるRAGE (receptor for AGE) の相互作用による細胞応答であると考えられている。本稿ではAGE-RAGE系が糖尿病の血管障害において占める意義を概説し、さらにAGE-RAGE系を標的とした治療戦略について述べる。

1. AGE-RAGE系

AGEはタンパク質がグルコースなどの還元糖と非酵素的に反応した結果生じる物質の総称であり、この反応は発見者の名をとってメイラード反応と呼ばれている。メイラード反応は前期反応と後期反応に分類され、可逆的な反応によってアマドリ転移化合物が生成されるまでが前期反応、前期反応生成物がAGEへと変化する縮合・脱水・開裂などの複雑かつ不可逆的な過程が後期反応と呼ばれる。生体内に存在するAGEとして、ペントシジン、クロスリン、イミダゾロン、CML、ピラリン、GAピリジン、GOLD、MOLDなどがある。これらのAGEの生成反応は酵素に依存しないため、循環血液中、細胞外マトリックス、細胞内など、生体内のいずれのコンパートメントでも起こりうる。

一方、細胞膜表面に存在しAGEと結合する受容体として、RAGEを筆頭に、マクロファータイプI・IIクラスAスカベンジャー受容体 (MSR-A)、クラスBスカベンジャー受容体ファミリーに属するCD36およびSR-BI、さらに、lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1 (LOX-1)、Galectin-3複合体、fasciclin, EGF-like, laminin-type EGF-like and link domain-containing scavenger receptor-1,2 (FEEL-1,2)、メガリン、Toll-like receptor 4 (TLR4) などが知られているが、これらの中でAGEの結合による細胞内シグナリングとその後の細胞反応について最も解析が進んでいるのがRAGEである。

RAGEは免疫グロブリンスーパーファミリーに属する1回膜貫通型のI型膜蛋白である。細胞外領域に3つの免疫グロブリン様ドメインを持ち、最もN末端側の可変領域様ドメイン (Vドメイン) にAGEが結合する。RAGEは肺胞上皮細胞、血管系細胞、免疫細胞など、広範な細胞・組織で発現が認められている。一般的に生理的な条件下での発現は低いが、AGEが蓄積している動脈硬化巣のような病変部位では発現が増強している。

さらに、RAGEはAGE以外にも、アルツハイマー病脳に蓄積するアミロイドβタンパク、炎症のメディエーターであるhigh mobility group box protein-1 (HMGB-1)、グラム陰性菌の菌体壁成分であるlipopolysaccharide (LPS) など、タンパク性・非タンパク性のさまざまなリガンドと結合するmulti-ligand receptorであることが知られている。その広い結合特性の構造的基盤は必ずしも明らかになっていないが、アルツハイマー病や炎症性疾患などの病態におけるRAGEの関与が示唆されている。

2. 糖尿病血管症におけるRAGEの役割

AGEが血管内皮細胞膜上のRAGEに結合すると、vascular endothelial cell growth factor (VEGF) やvascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) などの発現を誘導し、血管透過性や単球の内皮細胞への接着を亢進させるとともに、エンドセリン1やtumor necrosis factor-α (TNF-α) などの炎症性サイトカインの産出を亢進させ炎症を進展させる。また、プロスタサイクリン産出を阻害する一方、plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) を誘導して線溶活性を低下させることで血栓形成方向へ導く。

後天性の失明の主要な原因疾患である糖尿病網膜症においては、AGE-RAGEシグナルは網膜毛細血管内皮細胞のVEGF産生誘導により血管新生を活性化する一方、支持細胞である周皮細胞の脱落を引き起こすため、結果的に脆弱な新生血管が作られる。このような毛細血管は破綻しやすく、一度破綻すればその部分は血栓形成により血流が途絶し、無灌流野ができてしまう。そして血流低下により低酸素状態に置かれた血管細胞からのVEGF分泌がさらに亢進するという悪循環に陥る。

Yamamotoらは遺伝子改変動物を用いて、糖尿病腎症におけるRAGEの機能的役割について検討した。血管内皮でRAGEを過剰発現するトランスジェニックマウスを

作製し、これと、膵 β 細胞特異的に誘導型一酸化窒素合成酵素 (inducible nitric oxide synthetase, iNOS) を発現し過剰NOによる β 細胞破壊で糖尿病を発症するトランスジェニックマウスと交配させた。その結果得られたRAGE過剰発現糖尿病マウスは、対照糖尿病マウスに比べ、腎重量の増加、糸球体肥大、糸球体硬化、尿中アルブミン排泄の亢進、血清クレアチニン値の上昇など糖尿病腎症指標が増悪の所見を呈した¹⁾。一方、全身でRAGE遺伝子を欠いたRAGEノックアウトマウスを作製して糖尿病を誘発すると、糖尿病腎症は発生しなかった²⁾。これらの結果からRAGEが糖尿病腎症の発症において中心的な役割を担っていることが示された。

3. AGE-RAGE系による細胞内シグナル

RAGEを介した細胞内シグナル経路はいくつか報告されている (図1)。現在最も詳細に検討されているのがras/MAPキナーゼを介した転写因子NF- κ Bの活性化である。NF- κ BはVEGFやVCAM-1の発現誘導、およびTNF α 、IL1b、IL6、MCP1などのサイトカインの分泌を促す。またこのシグナル生成には細胞内ドメインが必要であることが示されている。N-acetyl cysteineなどのラジカルスカベンジャーで処理することによりRAGEリガンド結合によるras/MAPキナーゼ経路の活性化が抑制されることから、これらの経路の活性化には活性酸素種 (reactive oxygen species, ROS) が関与していると考えられる。近年WautierらによってNADPH oxidaseがこのRAGE依存性のROS生成に関与していることが報告された。NADPH oxidaseの触媒サブユニットであるgp91^{phox}を欠失したマウスのマクロファージではRAGE依存性のtissue factorの誘導が認められなかった³⁾。

また、RAGEを介するシグナルによって、アクチンフィラメント制御に関わり細胞遊走を制御するRac1やCdc42が活性化されること、その活性化にもRAGEの細胞内ドメインが必要であることは以前から報告されていたが、Hudsonらはyeast two-hybrid法を用いて、細胞質分裂や細胞の極性形成、アクチン重合による細胞運動に関わることが知られているdiaphanous-1 (Dia-1) が、そのFH1ドメインを介してRAGEの細胞内ドメインと直接結合し細胞内シグナルを引き起こすことを明らかにした。siRNA法によりDia-1の発現を抑制したところ、RAGE依存性のRac1、Cdc42の活性化および細胞遊走が抑制された⁴⁾。

また、細胞表面受容体では、ホモダイマー/オリゴマー化によってシグナルを生成する例が少なくないが、RAGEにおいても、リガンド結合によりホモダイマー形成が促進され細胞内シグナルが生成されるという報告が出されている⁵⁾。これは次のような我々の観察とも一致している。すなわち、RAGE結合部位を多数もち複数のRAGE分子をブリッジすることができる高分子/多価リガンドは細胞内RAGEシグナルを惹起するのに対し、1個のRAGE分子にしか結合できない低分子/1価リガンドはシグナルを惹起せず、むしろ高分子/多価リガンドのシグナルを抑制する。しかし一方、リガンド非依存性にRAGEがホモダイマー/オリゴマー化していることを示す報告もある。さらに、前述のDia-1について言えば、Dia-1はRAGEが単量体でも結合することが示唆されており、RAGEのホモダイマー/オリゴマー化とシグナル生成の関連について詳細な検討が待たれる。

4. RAGEの分子多様性

RAGEは遺伝子の選択的スプライシングなどによって

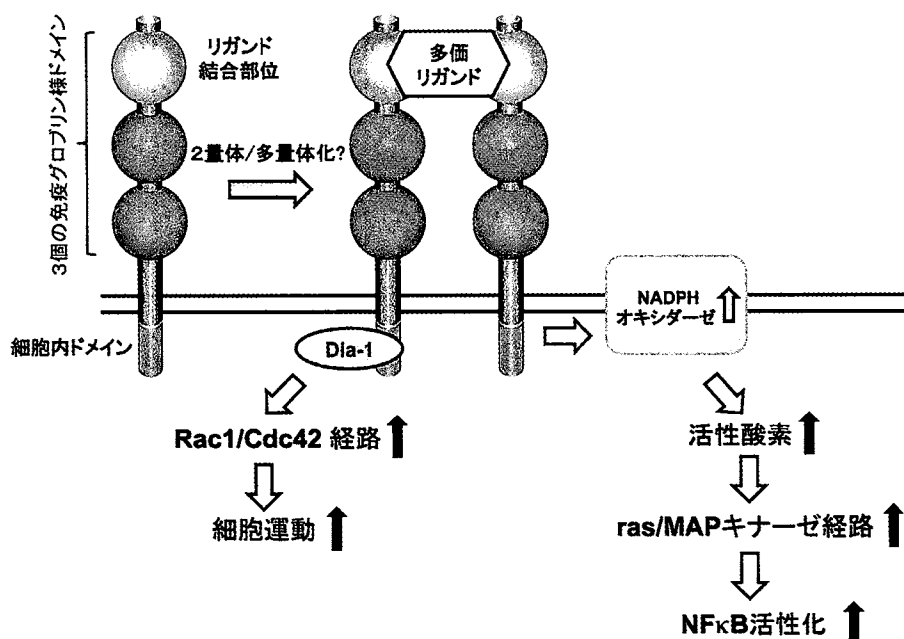


図1. RAGEを介する細胞内シグナル伝達経路

いくつかのバリエーションが存在する (図2)。以前から知られている全長膜結合型 (膜型) RAGE (membrane-bound RAGE, mRAGE) の他、我々は膜貫通領域以下のC末端領域が全く異なるアミノ酸配列に置き換えられたスプライシングバリエーションを見出し、内在性分泌型RAGE (endogenous secretory RAGE, esRAGE) と名付けた⁶⁾。esRAGEは細胞外でAGEを捕捉することにより細胞表面のRAGEとの相互作用を阻害するデコイ受容体として機能し、mRAGEを介するシグナルを抑制する。多くの場合、mRAGEによって細胞内に伝えられるシグナルは炎症や細胞傷害を促進する方向に働くため、それを抑制するesRAGEは細胞保護的な作用を持つ。esRAGE特異的C末端領域に対する抗体を用いた免疫染色の結果、esRAGEは血管内皮細胞、神経細胞、甲状腺小胞、膵β細胞、肝細胞などで強く発現していることが明らかとなっている⁷⁾。

また近年、選択的スプライシングにより生成するesRAGEのみならず、mRAGEがmatrix metalloproteinase 9 (MMP9) や a disintegrin and metalloproteinase 10 (ADAM10) などのタンパク分解酵素によって細胞膜直上で切断 (ectodomain shedding) され、細胞外ドメインが (狭義の) 可溶性RAGE (soluble RAGE, sRAGE) として遊

離することも明らかとなってきている。このシェディングによって生成した「狭義のsRAGE」を後述の「広義のsRAGE」と区別するためcleaved RAGE (cRAGE) と呼ぶ場合もあり、本稿ではこの呼称を採用する。cRAGEはesRAGE同様デコイ受容体として細胞保護的に働く。

これらのRAGEの各分子種の発現量は細胞種、組織によって異なると考えられ、これらのバランスがRAGEシグナルを修飾することにより糖尿病合併症になり易さの個人差を生み出している可能性がある。我々はmRAGEとesRAGEを生成する選択的スプライシングが、RAGE pre-mRNAのエクソン9B内の配列にRNA結合タンパクheterogenous nuclear ribonucleoprotein-H (hnRNP-H) が結合することによって制御されていることを明らかにした⁸⁾。またcRAGEを生成するectodomain sheddingがcAMPシグナルによって活性化されることも明らかにしている。

また、臨床検体中における可溶性RAGEを測定するELISAキットの開発・上市以来、疾患と可溶性RAGE血中濃度の関連が次々と報告されている。我々が開発したesRAGEを特異的に測定できるELISA系⁹⁾を用いた研究では、血中esRAGEの低値が、メタボリック症候群¹⁰⁾、粥状硬化、糖尿病網膜症⁹⁾等の疾患のリスク因子である可能性が指摘されている。これは、esRAGEの細胞保護的な機能を反映している可能性が考えられ、esRAGE/sRAGEのバイオマーカーとしての有効性が示唆されている。esRAGE測定系とは別に、総ての可溶性RAGEを測定するELISA系も市販されており、これはesRAGEとcRAGE両方を検出する。(この系によって測定されたものも通常“sRAGE”と表記されるので、前述の(狭義の)sRAGE (=cRAGE) と区別して考えなければならない。) この系を用いて、アルツハイマー病患者の血中sRAGE濃度が対照群より低値であることなどが報告されている。

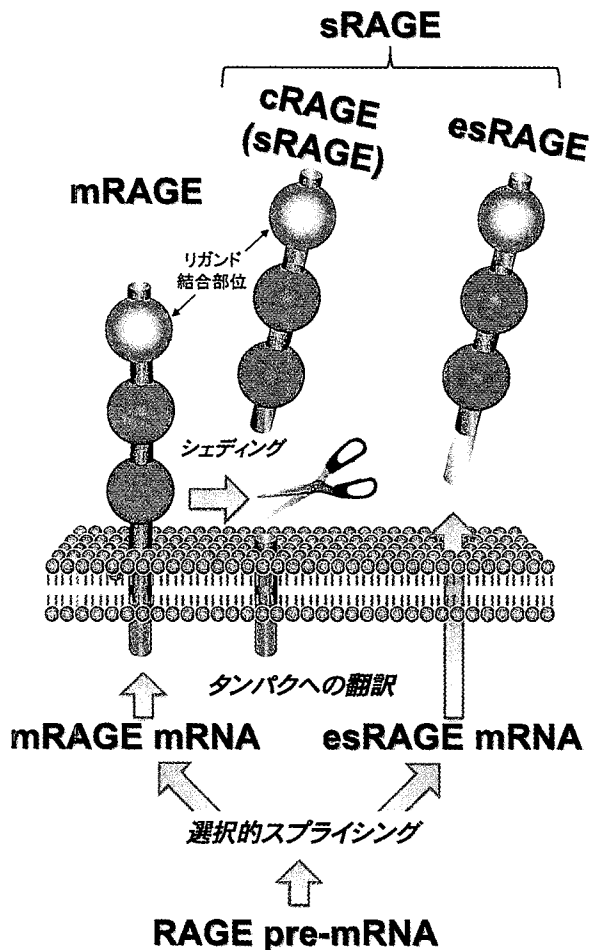


図2. RAGEの分子多様性

5. AGE-RAGE系を標的とする治療薬

AGEとRAGE (この場合mRAGE) の結合によって引き起こされるシグナルが糖尿病血管障害の発症・進展を引き起こすのであれば、このAGE-RAGE axisを標的とした治療戦略としてどのような可能性が考えられるだろうか。まず、AGEそのものを標的とする場合、(1) AGEの形成を阻害する戦略 (AGE形成阻害薬) や、(2) すでに生成・蓄積したAGEを分解する戦略 (AGE分解薬) が考えられる。また、AGEとRAGEの結合による細胞応答を標的とする場合、(3) その結合を阻害する戦略 (AGE-RAGE結合阻害薬、可溶性RAGE誘導薬) や、(4) RAGE以降のシグナル伝達を遮断する戦略 (RAGE後情報遮断薬) が考えられる (図3)。以下、これらの機序をもつ薬剤について概説する。

(1) AGE形成阻害薬

a. 合成化合物

AGE形成阻害作用を持つ化合物として代表的なもの

に、アミノグアニジンやOPB-9195がある。これらはAGE形成に関わる反応性カルボニル化合物を捕捉することによってAGE形成を阻害するほか、AGE形成を促進するラジカルの生成を触媒する金属イオンを、金属キレート形成によって不活性化する作用も有していると考えられている。アミノグアニジンは、1型糖尿病患者を対象とした第Ⅲ相臨床試験により腎症指標などの改善傾向が認められたが、副作用の懸念から2型糖尿病患者を対象とした臨床試験は中止されている¹¹⁾。また、OPB-9195はアミノグアニジンよりも強いAGE形成阻害作用を持つが、開発は中断されている。これらのAGE形成阻害剤はカルボニル化合物であるピリドキサールリン酸の捕捉によるビタミンB6欠乏症の副作用があり、この点が臨床応用への大きな障害となっている。

アミノグアニジンの副作用であるNO合成酵素阻害作用を持たないAGE形成阻害薬として開発されたALT-946は、ラットの糖尿病腎症モデルで腎保護作用が報告されている。また、LR-90は抗炎症作用を併せ持つAGE形成阻害薬であり¹²⁾、ラットの2型糖尿病モデルなどにおいて腎保護作用が報告されている。

b. ビタミンとその誘導体

ピリドキサミンはビタミンB₆化合物のひとつであり、カルボニル化合物捕捉作用や抗酸化作用などによってAGE形成を阻害すると考えられている。糖尿病腎症患者を対象にした第Ⅱ相臨床試験では腎障害抑制効果が報告されている¹³⁾。

ベンフォチアミンはチアミン(ビタミンB₁)の脂溶性・吸収性を高めた誘導体であり、ペントースリン酸経路のトランスケターゼを活性化する。これにより、解

糖系の中間体であるフルクトース6-リン酸とグリセルアルデヒド3-リン酸がペントースリン酸経路によって代謝される結果、グリセルアルデヒド3-リン酸からのカルボニル化合物・AGEの形成が抑制されるのみならず、糖尿病合併症の誘因となるグリセルアルデヒド3-リン酸によるPKC活性化、フルクトース6-リン酸によるヘキソサミン経路の代謝亢進、さらにグルコースによるポリオール経路の代謝亢進がいずれも抑制されると考えられている¹³⁾。2型糖尿病患者を対象とした短期投与臨床試験では、高AGE食による血管内皮機能障害の改善、高AGE食後のアディポネクチン低下の抑制などが報告されており、糖尿病腎症への効果を調べる第Ⅳ相臨床試験も2009年に終了し、その結果が待たれている。

c. アンジオテンシン変換酵素阻害薬 (ACEI) およびアンジオテンシンⅡ受容体拮抗薬 (ARB)

レニン・アンジオテンシン系を抑制するACEIおよびARBは、その降圧作用だけでは説明できない腎保護効果があることが知られていたが、これらの薬剤はペントシジン生成抑制効果を示すことが見出された¹⁴⁾。このAGE形成阻害機序は金属キレート形成作用、ラジカル捕捉による抗酸化作用によるものと考えられている。

(2) AGE分解薬

一度形成されたAGEの架橋構造を切断するAGE分解薬として、PTBや、PTBの水溶液中での安定性を高めた誘導体であるALT-711(アラゲプリウム)などがある。これらが実際に生体内でAGE架橋構造を切断するのか、むしろAGE形成阻害薬として作用しているのか議論のあるところではあるが、これらの投与により組織での

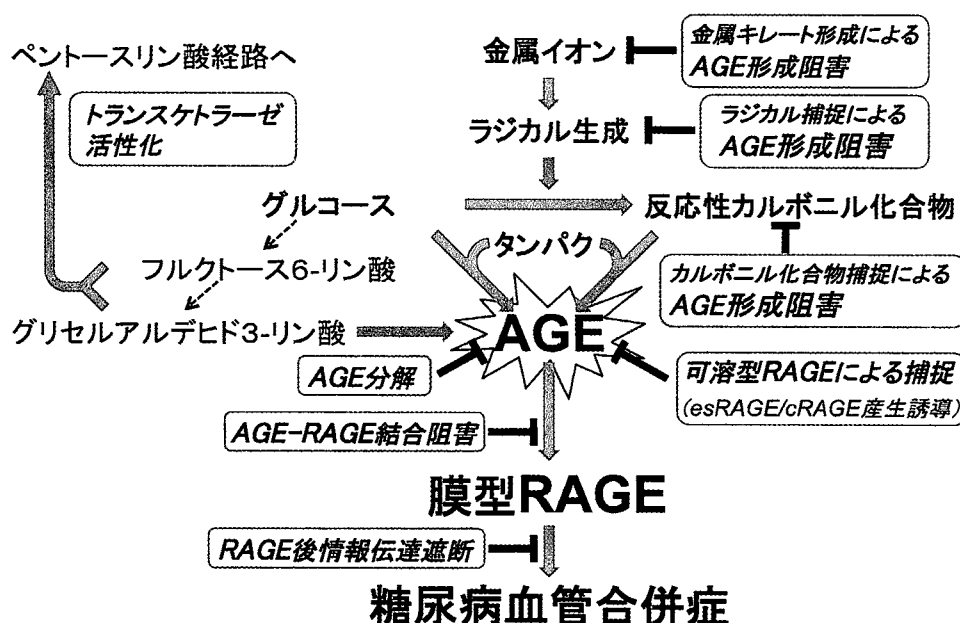


図3. AGE-RAGE系を標的とする治療戦略

AGE蓄積が抑制されることが報告されている。ALT-711は糖尿病ラットで腎臓へのAGE蓄積、腎機能低下を抑制することが報告されているが、その効果の一部はALT-711が持つPKC α 活性化抑制作用によることが示唆されている¹²⁾。ALT-711を用いた臨床試験では、収縮期高血圧や拡張期心不全などで有効性が示されている。

(3) RAGEを標的とする薬剤

a. AGE-RAGE結合阻害薬

RAGEのリガンド結合部位をブロックすることによりAGEとRAGEの結合を阻害し、RAGEを介する細胞応答を抑制しようという試みも為されている。Myintらは、低分子ヘパリンがRAGEのアンタゴニストとして糖尿病腎症を予防・治療する可能性を示した²⁾。また、経口投与可能な低分子AGE-RAGE結合阻害薬としてはTTP488が開発中であり、2型糖尿病腎症患者を対象とした第Ⅱ相臨床試験が2009年に終了し、その結果が待たれている。

b. 可溶性RAGE誘導薬および組換え可溶性RAGE

選択的スプライシングにおけるesRAGE生成の誘導、あるいはシェディングの活性化によるcRAGEの産生促進は、いずれも可溶性RAGEを増加させ、シグナル伝達を担う膜貫通型RAGE (mRAGE) を減少させる。このような作用を持つ薬剤は、可溶性RAGEによるリガンド捕捉作用と膜貫通型RAGEによるシグナルの抑制という2つの機序によってRAGEの関わる病態を改善する可能性があり、その開発が期待されている。機序は不明であるが、ACEIなどいくつかの薬剤で血中の可溶性RAGEが増加するという報告もある。

Schmidtらのグループは遺伝子組み換えによってRAGEの細胞外ドメインのみからなる組換え可溶性RAGEを作製し、これを投与することにより、apoE欠損糖尿病マウスの動脈硬化やdb/dbマウスの腎病変が抑制されることを示した¹⁵⁾。現在、RAGEの細胞外ドメインにIgGの一部を融合タンパクとして薬物動態を改善したTTP4000が作製され、臨床試験が準備されている。

(4) RAGE後情報伝達遮断薬

このカテゴリーの薬剤は、RAGE後の情報伝達経路の解明が道半ばであるため、RAGE特異的な作用を持つものはないといってよい。RAGE特異的とは言えないが、強い抗酸化作用をもつ α リポ酸はリガンド-RAGE結合後の細胞内情報伝達遮断作用が報告されている。この作用はRAGEシグナルの一部に必要なROSの生成を抑制することによると考えられており、さらに α リポ酸はおそらくその抗酸化作用によるAGE形成阻害作用も併せ持ち、糖尿病神経症に対する有効性が示されている。

(3) および(4)のようにRAGEを標的とする薬剤の特徴は、糖尿病合併症以外にもRAGEが関与する様々な病態への効果が期待される点である。例えば、アルツハイマー病においてはRAGEとアミロイド β タンパクとの結合が病態に関与していると考えられており、TTP488による中等度アルツハイマー病患者を対象とした第Ⅱ相臨床試験も2010年に終了し、その結果が待たれている。

おわりに

AGEとその受容体であるRAGEが糖尿病血管症に重要な役割を果たしていることが明らかになってから久しく、動物実験レベルでは腎症などの糖尿病血管症におけるAGE阻害薬の有効性が示されている。しかしながら、ACEIやARBなど他に主作用を持つ既成医薬品を除けば、AGEあるいはRAGEを標的にした薬剤は未だ臨床応用されておらず、一日も早い実用化が望まれる。

文 献

- 1) Yamamoto Y, Kato I, Doi T, et al: J Clin Invest 108: 261-268, 2001
- 2) Myint KM, Yamamoto Y, Doi T, et al: Diabetes 55: 2510-2522, 2006
- 3) Wautier MP, Chappey O, Corda S, et al: Am J Physiol Endocrinol Metab 280: E685-E694, 2001
- 4) Hudson BI, Kalea AZ, Del Mar Arriero M, et al: J Biol Chem 283: 34457-34468, 2008
- 5) Zong H, Madden A, Ward M, et al: J Biol Chem 285: 23137-23146, 2010
- 6) Yonekura H, Yamamoto Y, Sakurai S., et al: Biochem J 370: 1097-1109, 2003
- 7) Cheng C, Tsuneyama K, Kominami R, et al: Mod Pathol 18: 1385-1396, 2005
- 8) Ohe K, Watanabe T, Harada S, et al: J Biochem 147: 651-659, 2010
- 9) Sakurai S, Yamamoto Y, Tamei H, et al: Diabetes Res Clin Pract 73: 158-165, 2006
- 10) Koyama H, Shoji T, Yokoyama H, et al: Arterioscler Thromb Vasc Biol 25: 2587-2593, 2005
- 11) Thomas MC, Forbes JM, MacIsaac R, et al: Curr Drug Targets 6: 453-474, 2005
- 12) Goh SY, Jasik M, Cooper ME: Expert Opin Emerg Drugs 13: 447-463, 2008
- 13) Hammes HP, Du X, Edelstein D, et al: Nat Med 9: 294-299, 2003
- 14) Miyata T, van Ypersele de Strihou C, Ueda Y, et al: J Am Soc Nephrol 13: 2478-2487, 2002
- 15) Wendt, T, Tanji N, Guo J, et al: J Am Soc Nephrol 14: 1383-1395, 2003