

細胞膜上での RAGE 切断によって糖尿病血管合併症を制御する

杉浦 英恵 (医薬保健学域医学類 5年)

指導教員

山本 博 (医薬保健研究域医学系 血管分子生物学 教授)

1. 背景と目的

糖尿病はインスリン作用不足による慢性高血糖を特徴とする疾患であり、その生命予後・生活の質は神経症、腎症、網膜症に代表される合併症に依存する。糖尿病合併症の発症進展メカニズムの一つとして、生体高分子の非酵素的糖化反応による後期糖化反応生成物 (advanced glycation end-products, AGE) の形成とこれを認識する受容体 RAGE (receptor for AGE) の相互作用が重要である^{1,2}。RAGE は免疫グロブリンスーパーファミリーに属する一回膜貫通タンパク質であり、AGE 以外にも炎症メディエーターである S100B タンパク³、high mobility group B-1 (HMGB1)⁴、リポポリサッカライド (LPS)⁵ などを認識し、細胞内酸化ストレスの増強とそれに引き続く転写因子 NFκB の活性化に代表される細胞内シグナル伝達を引き起こす⁶。

一方、RAGE には細胞内シグナル伝達を引き起こす膜結合型の他に、細胞外領域切断 (ectodomain shedding) によって産生される可溶性 RAGE (soluble RAGE, sRAGE) の存在が知られている (Fig. 1)。RAGE の ectodomain shedding は matrix metalloproteinase 9 (MMP9) や a disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10 (ADAM10) などのタンパク分解酵素によって引き起こされる⁷。このメカニズムによって生成された sRAGE はリガンド結合部位を持つため、細胞外でリガンドを捕捉し細胞表面の RAGE との相互作用を阻害することでデコイ受容体として働く⁶。したがって、この shedding 機構を増強することは、細胞内シグナル伝達を引き起こす膜結合型 RAGE の量を減少させると同時に、デコイ受容体として働く sRAGE の量を増加させるというダブルの RAGE 抑制効果を生み出すことに繋がる。このような背景から、RAGE shedding 機構の増強は糖尿病血管合併症の進展に抑制的に働くと考えられる。今後、RAGE ectodomain shedding という新規メカニズムに着目した画期的な薬剤が、糖尿病血管合併症の進展に対し劇的な抑制効果を発揮する可能性が期待され、そのような薬剤の開発が望まれている。さらに、未だ全容が解明されていない RAGE 細胞内シグナル伝達機構や新たな RAGE 発現調節機構の解明が将来の糖尿病治療の躍進に繋がる可能性が期待される。

このような背景のもと、RAGE shedding 機構を増強し細胞内シグナル伝達を抑制する薬剤を見出すことを目的として研究を行った。

2. 方法

i. 細胞培養

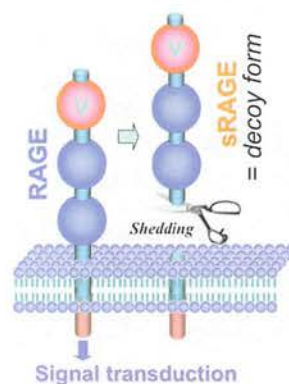


Fig. 1. RAGE sheddingとデコイ受容体 sRAGE形成

NFκB プロモーター配列の下流に luciferase の cDNA 配列を組み込んだベクターで形質転換したヒト RAGE 過剰発現ラット C6 グリオーマ細胞は、10%牛胎児血清 (Fetal Bovine Serum, FBS)、G418 (500 μg/mL) を添加したペニシリン・ストレプトマイシン含有 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) を用いて培養した。

ii. 候補薬剤およびリガンド

候補薬剤には、resveratrol (100 μM)、Pyr-41 (50 μM)、bezafibrate (200 μM)、JW74 (10 μM)、pioglitazone (10 μM)、PRIMA-1 (10 μM)、A-350619 (1 μM)、AICAR (1 mM)、VO-OHpic (1 μM) (いずれも Sigma-Aldrich 社)、anisomycin (10 μM)、SP600125 (80 μM)、(いずれも和光純薬株式会社)、rapamycin (50 nM) (CALBIOCHEM)、TGF-β (10 ng/mL) (Miltenyi Biotec) を選択した。Screen-well® FDA Approved Drug Library (2 mg/mL) BML-2841J Version 1.6J は Enzo Life Sciences から購入した。RAGE リガンドである S100B は Sigma-Aldrich 社から購入した。

iii. エンドトキシンの定量

刺激として用いた S100B および DMSO 中のエンドトキシンの定量はトキシカラ-LS-50M セット (生化学工業株式会社) を用い、プロトコールに従って行った。検量線の作成には Endotoxin (Escherichia coli) CONTROL STANDARD ENDOTOXIN (CSE) (CAPE COD) を用いた。ジアゾカップリングによる呈色反応には Pyrocolor Diazo Reagents DIA150-MP (CAPE COD) を用い、培養液中の最終濃度が <0.5 EU/ml であることを確認した。

iv. RAGE 細胞内シグナル活性の解析

RAGE 細胞内シグナル活性は、ヒト RAGE 過剰発現ラット C6 グリオーマ細胞を用いた luciferase assay によりおこなった。96 穴プレートに C6 グリオーマ細胞を撒き、37°C で 24 時間インキュベートした後、薬剤を加えて調整した無血清培養液に交換し、37°C で 4 時間または 24 時間インキュベートした。その後、S100B (10 μg/ml) を添加し、37°C で 4 時間インキュベートした後、Luciferase Assay System (Promega) を用いてプロトコールに従って luciferase 活性を測定した。luciferase 活性は BCA™ Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いた BCA 法でタンパク濃度を算出することによって補正した。

3. 結果

i. RAGE shedding を誘導し、RAGE 細胞内シグナル伝達を抑制する薬剤の検定

候補薬剤によって S100B の刺激による RAGE 細胞内シグナル活性化が抑制されるかどうかを、C6 グリオーマ細胞の NFκB 活性を指標にアッセイしたところ、resveratrol、anisomycin、Pyr-41、SP600125、PRIMA-1 で NFκB 活性化シグナル伝達抑制作用が認められた (Fig. 2)。そのうち resveratrol、Pyr-41、SP600125 では S100B の刺激による NFκB 活性化は抑制されたが、NFκB 基底発現レベルは抑制されなかった。一方、anisomycin、PRIMA-1 では NFκB 基底発現レベルも抑制された。

NFκB 活性化シグナル抑制作用が認められた薬剤について、RAGE 細胞内シグナル伝達抑制効果が ectodomain shedding 依存的であるかということ、Human sRAGE ELISA Kit (R & D systems) を用

いて培養液中 sRAGE 濃度の経時的上昇作用を調べることににより検証した。その結果、PYR-41、SP600125 で sRAGE 濃度の経時的上昇作用が認められたが、培養液中 sRAGE 濃度は極めて低く、今回の結果からは shedding 増強作用の評価は困難であると判断された。

ii. FDA Approved Drug Library を用いた薬剤 screening

FDA Approved Drug Library の 640 種類の薬剤について、i. と同様に NFκB 活性化シグナル抑制作用を解析した。1st screening として、薬剤の最終濃度はいずれも 1 μg/mL とし、細胞毒性がないことを確認して実験に用いた。その結果、102 種類の薬剤で有意な NFκB 活性化シグナル抑制作用が認められた (Fig. 3)。これらの薬剤を作用機序および臨床的効果に基づいて分類すると、ステロイドを含む抗炎症薬が 23 種類と最多であり、以下抗腫瘍薬 14 種類、交感神経調節薬 13 種類、気管支拡張薬 8 種類、利尿薬 4 種類、抗菌薬、抗ウイルス薬、高脂血症治療薬、血管拡張薬が各々 3 種類であった。その他、抗精神病薬や抗うつ薬、降圧薬など臨床における汎用性が高い薬剤でも NFκB 活性化シグナル抑制作用が認められた (Table. 1)。

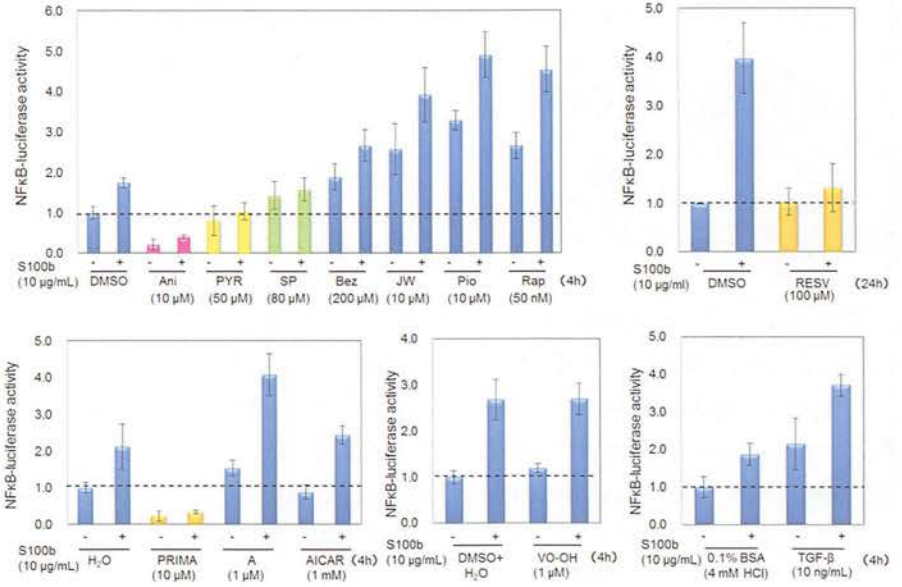


Fig. 2. RAGE sheddingを誘導し、RAGE細胞内シグナル伝達を抑制する薬剤のscreening

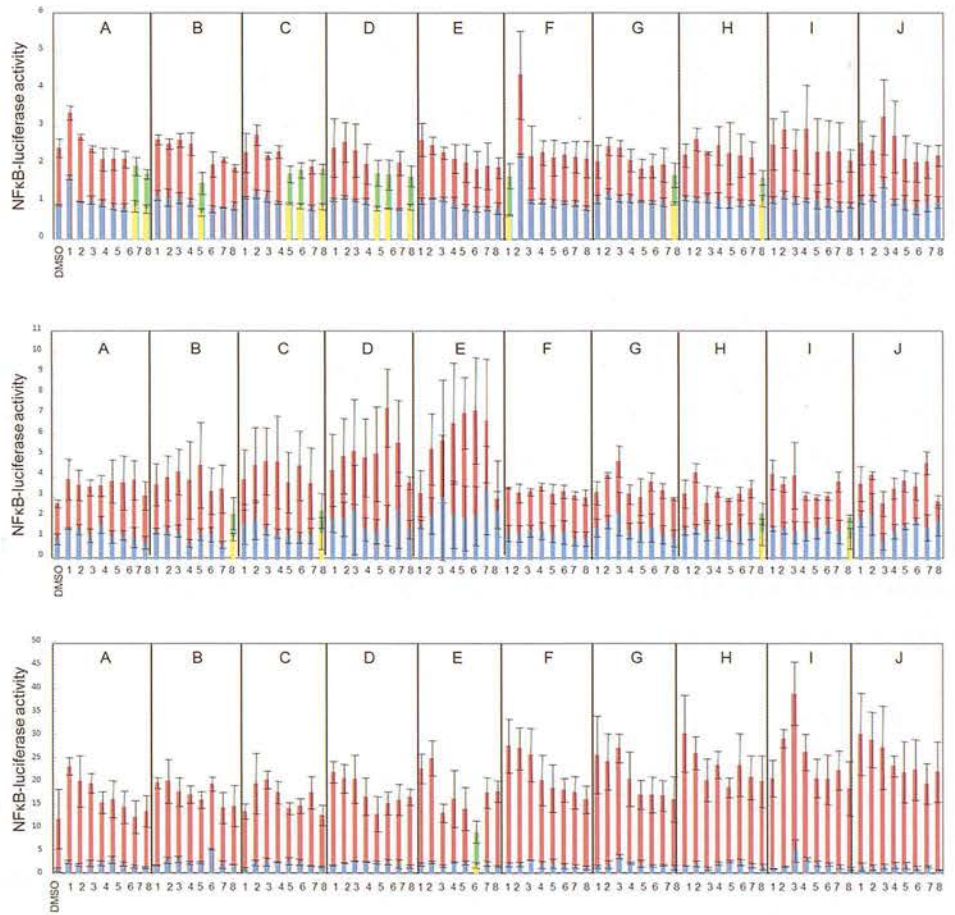


Fig. 3. Screen-Well® FDA Approved Drug Library BML-2841J Version 1.6Jを用いた、薬剤によるNFκB活性化シグナル抑制作用の解析 (結果の一部を抜粋)
NFκB活性化シグナル抑制作用が認められなかった薬剤についてはS100Bタンパク (-)を青、S100Bタンパク (+)を赤で示し、NFκB活性化シグナル抑制作用が認められた薬剤についてはS100Bタンパク (-)を黄、S100Bタンパク (+)を緑で示した。

4. 考察と結論

本研究により、RAGE ectodomain shedding を増強し、RAGE 細胞内シグナル伝達を抑制する可能性のある薬剤を多数見出すことができた。

これまでに糖尿病血管合併症の発症・進展における RAGE 細胞内シグナル伝達活性化の重要性が明らかとなり、RAGE を標的とした様々な手段の開発が試みられている。その具体的手段として、RAGE のリガンド結合部位を特異的に遮断する方法や RAGE 発現量を抑制する方法が試みられている。一方、RAGE には分子多型が存在し、このうち ectodomain shedding によって産生される sRAGE はデコイ受容体として糖尿病血管合併症の進展に抑制的に働くことが明らかとなっている。したがって、sRAGE の機能を阻害せず、炎症性シグナル伝達を引き起こす膜結合型 RAGE の機能を特異的に抑制する、従来とは異なる新たな手段の開発が望まれている。RAGE ectodomain shedding の増強は膜結合型 RAGE の発現抑制と sRAGE の産生促進という 2 つの作用を生み出し、糖尿病血管合併症の発症・進展を劇的に抑制する可能性が期待される。

これまでに当研究室において cAMP 上昇薬が RAGE ectodomain shedding を増強することが明らかとなっている（投稿中）。しかし、cAMP は多様な生理活性をもつため、より RAGE shedding 特異的で副作用の少ない薬剤の開発が望まれている。まずは先行例として、RAGE シグナルへの関与が報告されている分子や炎症、ストレス、発がんなどに関与する分子を選び、これらの機能を調節する薬剤を 13 種類選択し、これらの薬剤による RAGE シグナル抑制作用を解析した。その結果、ポリフェノールの一種で抗酸化作用をもつ resveratrol、炎症やストレスに関与する JNK、p38 などの MAPK ファミリーの活性化薬 anisomycin、タンパク質の分解に関わるユビキチン活性化酵素 1 の阻害薬 PYR-41、JNK の選択的阻害薬 SP600125、変異型 p53 の選択的再活性化薬 PRIMA-1 の 5 種類の薬剤で抑制作用が認められた。

続いて、さらに多くの候補薬剤を見出すために FDA Approved Drug Library の 640 種類の薬剤を対象に RAGE シグナル抑制作用の screening を行ったところ、102 種類の薬剤で抑制作用が認められた。

今回 RAGE シグナル抑制作用認められた薬剤については、明らかな作用機序の特性および分子構造上の特徴は見いだせなかったが、今後の検証によって従来の作用メカニズムとは異なる新規メカニズムが明らかとなり RAGE shedding 増強作用との関わりが明らかになる可能性が期待される。また、RAGE shedding 増強薬の開発の過程で、特徴的な RAGE シグナル調節作用をもつものが見出されれば未だ全容が明らかにされていない RAGE シグナル伝達機構を解明するための重要な手掛かりとなる可能性がある。

さらに、RAGE は幅広いリガンド特異性により粥状動脈硬化症、炎症性疾患、敗血症、アルツハイマー病、がん転移など様々な病態に関与することが明らかとなっている。従って、本研究から見出された薬剤が糖尿病血管合併症以外の病態においても効果を発揮する可能性が考えられると同時に、今後の研究による RAGE シグナル伝達機構の解明によって未解明であった疾患の病態が明らかとなる可能性がある。

今後はこれまでの成果によって得られた研究基盤情報を基に、膜結合型 RAGE 特異的 shedding 誘導体の開発とその臨床応用および RAGE 細胞内シグナル伝達機構の解明に挑戦していきたい。

5. 謝辞

| RAGE-NFκBシグナル抑制作用が認められた薬剤 | |
|---------------------------|---------|
| ステロイド | 18種類 |
| 抗腫瘍薬 | 14種類 |
| 交感神経系調節薬 | 13種類 |
| 気管支拡張薬 | 8種類 |
| 抗炎症薬 | 5種類 |
| 利尿薬 | 4種類 |
| 抗菌薬 | 3種類 |
| 抗ウイルス薬 | 3種類 |
| 高脂血症治療薬 | 3種類 |
| 血管拡張薬 | 3種類 |
| 抗うつ薬 | 2種類 |
| 抗精神病薬 | 1種類 |
| 降圧薬 | 1種類 |
| And more... | 計 102種類 |

Table 1. Screen-well® FDA Approved Drug Library (2 mg/mL) BML-2841J Version 1.6Jを用いた 1st screeningでRAGE-NFκBシグナル抑制作用が認められた薬剤

本研究に対する学長研究奨励費の御助成に感謝致します。

本研究を進めるに当たり多大なご指導をいただいた血管分子生物学分野・山本 博教授、山本 靖彦准教授、多くの助言とご協力をいただいた棟居 聖一助教、本研究の土台となる知見と研究材料の提供をいただいた本吉 創研究員に感謝申し上げます。

また、どんな状況においても温かな励ましと笑いあふれる環境を提供して下さった血管分子生物学分野の皆様にも感謝申し上げます。

最後に、研究を進めるに当たり支えとなって下さったすべての方々に感謝申し上げます。

6. 参考文献

1. Yan SF, Ramasamy R, Naka Y, Schmidt AM. Glycation, inflammation, and RAGE: a scaffold for the macrovascular complications of diabetes and beyond. 2003 *Circ Res* 93(12): 1159-1169.
2. Yamamoto Y, Yamamoto H. Controlling RAGE to conquer diabetic vascular complications. 2012 *J Diabetes Invest* 3(2): 107-114.
3. Hofmann MA, Drury S, Fu C, Qu W, Taguchi A, Lu Y, Avila C, Kambham N, Bierhaus A, Nawroth P, *et al.* RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides. 1999 *Cell* 97(7): 889-901.
4. Hori O, Brett J, Slattery T, Cao R, Zhang J, Chen JX, Nagashima M, Lundh ER, Vijay S, Nitecki D, *et al.* The receptor for advanced glycation end products (RAGE) is a cellular binding site for amphotericin. Mediation of neurite outgrowth and co-expression of RAGE and amphotericin in the developing nervous system. 1995 *J Biol Chem* 270(43): 25752-25761.
5. Yamamoto Y, Harashima A, Saito H, Tsuneyama K, Munesue S, Motoyoshi S, Han D, Watanabe T, Asano M, Takasawa S, Okamoto H, Shimura S, Karasawa T, Yonekura H, Yamamoto H. Septic shock is associated with receptor for advanced glycation end products ligation of LPS. 2011 *J Immunol* 186(5): 3248-3257.
6. Bierhaus A, Humpert PM, Morcos M, Wendt T, Chavakis T, Arnold B, Stern DM, Nawroth PP. Understanding RAGE, the receptor for advanced glycation end products. 2005 *J Mol Med* 83(11): 876-886.
7. Zhang L, Postina R, Wang Y. Ectodomain shedding of the receptor for advanced glycation end products: a novel therapeutic target for Alzheimer's disease. 2009 *Cell Mol Life Sci* 66(24): 3923-3935.