

# Molecular Mechanisms of Diabetic Angiopathy : Roles of the receptor for advanced glycation endproducts in diabetes-induced vascular injury

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/7647">http://hdl.handle.net/2297/7647</a>

【総説】

糖尿病血管合併症の分子機構

—糖化蛋白受容体 (RAGE)の役割—

Molecular Mechanisms of Diabetic Angiopathy

— Roles of the receptor for advanced glycation endproducts in diabetes-induced vascular injury —

金沢大学医学系研究科血管分子生物学研究分野

米 倉 秀 人

I. はじめに

人間の体を走る血管の総延長は10万kmにも及ぶといわれている。この人体最大の臓器のひとつである血管の機能が障害されると、生命は重大な危機に曝される。糖尿病では高血糖 (高グルコース) が持続されることにより、毛細血管のような細小血管から冠動脈のような大血管までが様々な障害を受ける<sup>1)~3)</sup>。糖尿病では、この血管合併症が患者の生命予後と Quality of Life (QOL)を低下させる主な要因である。糖尿病の三大合併症と呼ばれるものが網膜症、腎症 (腎糸球体硬化症)、神経症であるが、このうち網膜症と腎症は網膜と腎臓 (特に糸球体) の細小血管が直接障害され、神経症も細小血管障害が大きな要因として考えられている。さらに、糖尿病は細動脈以上の大血管の動脈硬化を強く促進することも知られており、軽度の糖尿病でも、虚血性心疾患、脳血管障害や下肢の血管閉塞などの大きなリスクファクターとなる。逆にいえば、血管障害の発生を防ぐことができれば、糖尿病はそれほど怖い病気ではなくなると言える。血管障害に関わる分子機構としては、ポリオール代謝経路の活性化、プロテインキナーゼCの活性化、ミトコンドリア機能異常、ヘキソサミン経路の活性化などが提唱されている<sup>1)~3)</sup>が、個体レベルでの明確な証明は未だ不完全である。血管分子生物学研究分野では、グルコースなどによる非酵素的蛋白修飾によって生成する糖化蛋白質 (Advanced Glycation Endproducts, AGE) と、その受容体である RAGE (Receptor for AGE) の相互作用が血管障害の発症に重要であるという仮説<sup>1)~3)</sup>の下、研究を進めている (図1)。本稿では、糖尿病血管症の分子機構に関する筆者らの最近の研究成果を概説する。

II. Advanced Glycation Endproducts (AGE)

糖化蛋白 (Advanced Glycation Endproducts, AGE), は、蛋白がグルコースやそれ由来する化合物と非酵素的に反応して生ずる構造体の総称である (図2)。AGEの特徴として、褐色、蛍光、架橋形成による高分子化などが挙げられるが、必ずしもこれらの特徴を持たないものも多い。AGEの生成反応は生体内において、蛋白質が高いグルコース濃度にさらされるところであれば、循環血液中、細胞外マトリックス、細胞内のいずれでも起こりうる。糖尿病患者の組織にAGEが蓄積されていることが見出されてから、高血糖状態によるAGE形成は糖尿病合併症の発症・進展を説明する有力な分子機構として注目されてきた。そして、我々の研究を含めた最近の研究により、AGE

の細胞表面受容体を介する情報伝達経路が糖尿病血管合併症に深く関わっていることが明らかにされてきた<sup>1)~3)</sup>。

AGEの生成過程は一般にメイラード反応と呼ばれ、グルコースなどの還元糖のカルボニル基と蛋白質のアミノ基が非酵素的に反応し、シッフ塩基を形成することにより開始される (図2)。シッフ塩基からアマドリ化合物が生成されるが、ここまでは可逆的な反応であり、前期反応と呼ばれる。糖尿病患者の血糖コントロールに用いられているヘモグロビンA1c (HbA1c) は前期反応によって形成されたアマドリ化合物のひとつである。その後アマドリ化合物がAGEへと変化する非可逆的な過程は後期反応と呼ばれる。後期反応は縮合・開裂・架橋形成などを含む複雑な過程であり、その反応によって極めて多様な化学構造をもつ修飾基が形成される<sup>1)~3)</sup>。これらの化学構造は、多くがまだ構造未決定であり、ペントシジン、クロスリン、カルボキシメチルリジン (CML) など、いくつかのAGE化合物の構造が決定されているだけである。現在では、代謝中間体などに由来する短鎖アルデヒド (glyceraldehyde, glycolaldehyde など) からAGEが生成され、血液中に存在することが明らかにされている<sup>1)~3)</sup>。

III. AGEの細胞表面受容体—糖化蛋白受容体 RAGE (Receptor for AGE)

AGEは少なくとも次の二つの経路を介して糖尿病合併症の発症・進展に関与している可能性が考えられている。一つは、細胞機能を担う蛋白質にAGE化が occuring 正常な機能を果たせなくなることによる、直接的な蛋白修飾・構造変化に伴う細胞障

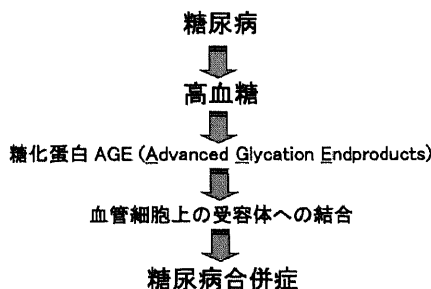


図1. 糖尿病血管合併症の発症メカニズムに関する我々の仮説。高血糖状態により糖化蛋白 advanced glycation endproducts, 略してAGEが生成され、それが血管細胞上の受容体と結合することによって、血管細胞に異常を引き起こす。

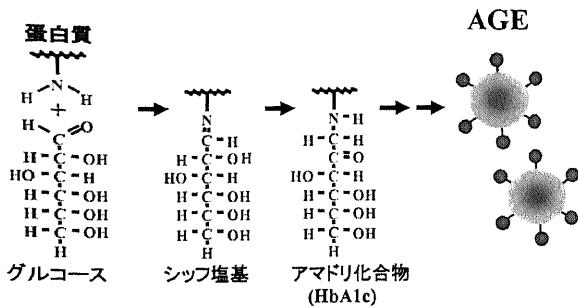


図2. 糖化蛋白 AGE (Advanced Glycation Endproducts)の形成. 高血糖状態でグルコース濃度が高いと、蛋白質のリジン、アルギニンのアミノ基とグルコースのアルデヒド基が非酵素的に反応を起こす。さらにそれは、各種の反応を経て、蛋白質上にAGEと呼ばれる多様な化合物を形成する。アマドリ化合物の代表的なものがヘモグロビンA1c (HbA1c)である。

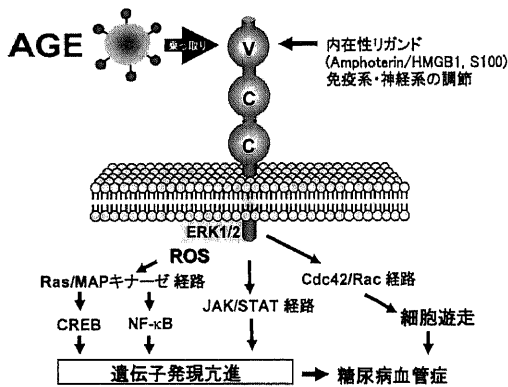


図3. 糖化蛋白受容体 RAGE (Receptor for AGE)の構造とシグナリング経路.

RAGEはイムノグロブリンスーパーファミリーに属す膜貫通型受容体で、1992年にコロンビア大学のグループがAGE結合蛋白としてウシ肺から分離した。内在性のリガンドとして、Amphoterin/HMGB1、S-100などが同定されている。AGEが形成されると、AGEがRAGEに結合して常時アクティブな状態にし、細胞に障害を与える。

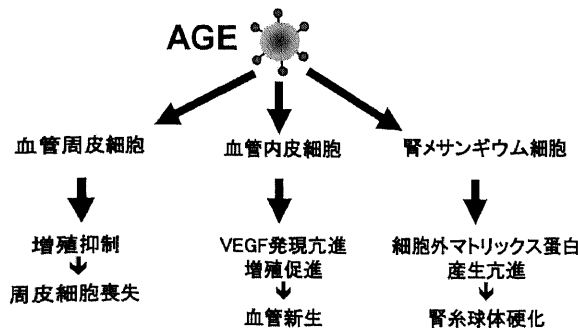


図4. 血管内皮細胞、周皮細胞、腎糸球体メサンギウム細胞へのAGEの作用. 筆者らの初期の細胞培養系での知見をまとめた。

害である。もう一つは、AGEを結合する細胞表面レセプターが引き起こす細胞応答による経路である。現在のところ、AGEが結合する細胞表面の受容体は数種類が知られている<sup>1)</sup>が、この中で機能的解析が進んでおりもっとも重要と考えられるのがRAGEである。次節以降で詳しく述べるように、AGEとの結合によりさまざまな細胞応答を引き起こし、糖尿病血管合併症の発症・進展に深く関与していることが明らかとなってきている<sup>1)~3)</sup>。

RAGE蛋白は、米国コロンビア大学のグループにより1992年に分離同定された<sup>4)</sup>。RAGEはイムノグロブリンスーパーファミリーに属する一回膜貫通型の細胞表面受容体であり、細胞外領域に3つの免疫グロブリン様ドメインを持つ(図3)。そして最もN末端にある免疫グロブリン可変領域様ドメイン(Vドメイン)にAGEが結合する。細胞内領域は約40アミノ酸残基からなるが、既知のモチーフは見当たらない。RAGEの発現は血管内皮細胞、血管平滑筋細胞、血管周皮細胞および腎メサンギウム細胞などの血管系細胞やマクロファージなど、広範な組織で認められている。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発現が増強している。RAGEの天然のリガンドとして、HMGB-1/amphoterinやS100/calgranulinなどが同定されており、正常状態では、これらにより免疫系の調節や神経機能の調節が行われていると考えられている<sup>1),3)</sup>。糖尿病状態でAGEが形成されると、AGEがRAGEを乗っ取って常時アクティブな状態にしてしまい、細胞に障害をあたえたと考えられる(図3)。RAGEシグナリングはまだまだ不明な部分が多いが、リガンド結合によるROS(活性酸素種)産生を経て、ras/MAPキナーゼ経路を介した転写因子NF-κBの活性化が重要であると考えられている<sup>1),3)</sup>。また、Cdc42やRacを介した経路の活性化も報告されている。血管系細胞へのAGE刺激によるこれらの活性化により、血管細胞が障害を受けると考えられる。

IV. AGE-RAGE系の血管系細胞への作用

細小血管は、内皮細胞と周皮細胞とにより構成されている。我々はまず、細胞培養系を用いて、AGEが血管細胞に、合併症に特徴的な細胞変化を引き起こすことを見出した(図4)。具体的には、AGEは内皮細胞表面のRAGEと結合することにより、血管内皮増殖因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)の発現を誘導し、血管透過性の亢進と内皮細胞自身の増殖促進・管腔形成促進を引き起こす<sup>1)~3),5)</sup>。これは、血管透過性亢進、血管新生によって特徴づけられる糖尿病網膜症の病理変化に対応する。さらにAGEは、血管周皮細胞に対しては増殖を抑制する<sup>1)~3),6)</sup>。これも、糖尿病網膜症の初期に見られる周皮細胞の脱落に対応している。一方、腎糸球体メサンギウム細胞に対してAGEは細胞外マトリックス蛋白の産生を促進し、これは糖尿病腎症に見られる糸球体硬化に対応する<sup>1)~3)</sup>。

最近筆者らは、種々のAGE分子種を作製し表面プラスモン共鳴法によってRAGEとの結合活性を検討してみたところ、全てのAGE分子種がRAGEに結合する訳ではないこと、glyceraldehydeおよび glycolaldehyde由来 AGE分子種がRAGEと強く結合するとともに、強い血管細胞傷害作用を示すことを明らかにした<sup>1),2),6)</sup>。これは、AGEの中にも、いわゆる悪玉AGEとそうでないものが存在することを示している。

### V. RAGE 過剰発現マウスおよびノックアウトマウス

以上の *in vitro* の実験から、AGE-RAGE系が糖尿病血管合併症の発症に重要であると結論した。そこで次に、RAGEのトランスジェニックマウスとノックアウトマウスを作製して、個体レベルでの検証を行った<sup>1),3),7)</sup>。

まず、血管内皮細胞でヒトRAGEを過剰発現するトランスジェニックマウスを作製した<sup>1),7)</sup>。このRAGE過剰発現マウスを糖尿病モデルマウスと交配して糖尿病を誘発し、腎症の病態を解析した(図5A)。その結果、RAGEを過剰発現する糖尿病マウスは、野生型の糖尿病マウスに比べ、顕著に腎症が増悪された。すなわち、形態的には腎肥大、糸球体肥大、糸球体硬化が、機

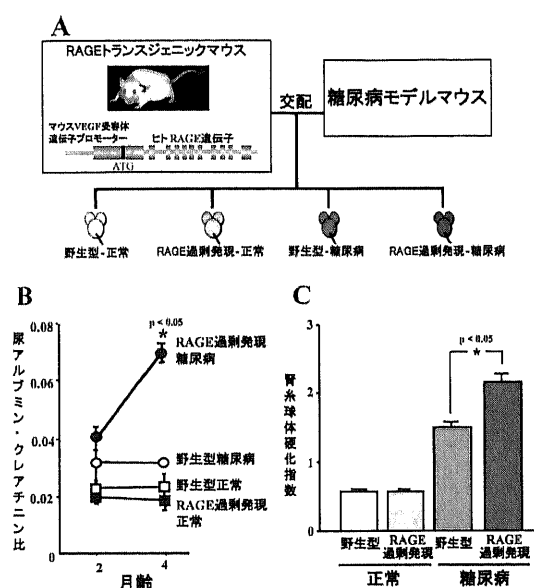


図5. RAGE過剰発現トランスジェニックマウスの作製と合併症の解析。

(A) マウス VEGF 受容体 2 (flk-1) 遺伝子プロモーターの制御下にヒト RAGE 遺伝子を結合してマウス受精卵に導入し、血管細胞で RAGE を過剰発現するトランスジェニックマウスを作製した。この RAGE 過剰発現マウスと、膵  $\beta$  細胞での iNOS 過剰発現による  $\beta$  細胞破壊により糖尿病を発症する糖尿病モデルマウスと交配し、糖尿病を誘発した。(B, C) RAGE 過剰発現トランスジェニックマウスの腎症の解析。尿アルブミン(B)、腎糸球体硬化(C)。

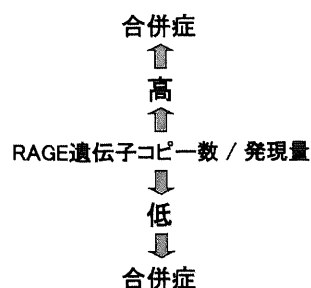


図6. RAGE 遺伝子コピー数/発現量と糖尿病合併症発症との関係。

RAGE 過剰発現トランスジェニックマウスと RAGE 遺伝子ノックアウトマウスの解析の結果をまとめた。

能的には尿中アルブミンの上昇、血清クレアチニン値の顕著な上昇が認められた<sup>7)</sup>。図5Bにアルブミン尿と糸球体硬化の解析結果を示した。

筆者らは次に、RAGE 遺伝子ノックアウトマウスを作製した<sup>1),3)</sup>。RAGE ノックアウトマウスは正常に誕生・発育し、形態的・機能的異常は認められなかった。作製した RAGE ノックアウトマウスを前述の糖尿病モデルマウスと交配して糖尿病を誘発し、腎症を解析した結果、RAGE 過剰発現マウスとは逆に、腎症の発症が顕著に抑制された(投稿中)。RAGE ノックアウトマウスでは、遺伝子のコピー数の減少に対応して、腎肥大、アルブミン尿、糸球体硬化、血清クレアチニン値などすべての

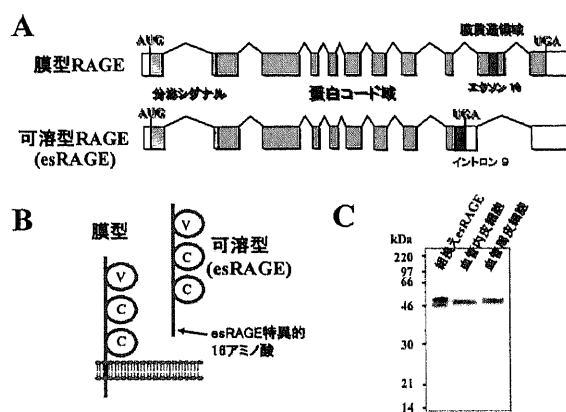


図7 内在性可溶性 RAGE (endogenous secretory RAGE, esRAGE) の発見。

(A) 膜結合型 RAGE と可溶性 RAGE (esRAGE) mRNA の構造。(B) 膜結合型 RAGE と可溶性 RAGE 蛋白質の構造。(C) 血管細胞による esRAGE の産生。初代培養ヒト血管内皮細胞と周皮細胞の培養液を、esRAGE 特異的 16 アミノ酸に対する抗体を用いてウエスタンブロットにより解析した。組換え esRAGE: esRAGE cDNA を導入した COS-7 細胞の培養液。

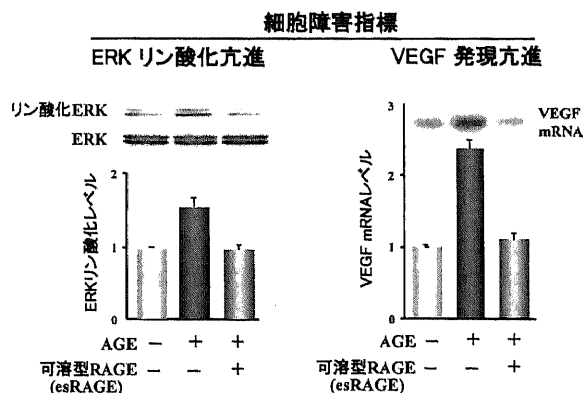


図8. 内在性可溶性 RAGE (esRAGE) の血管細胞保護作用。

初代培養ヒト血管内皮細胞の培養液中に AGE-BSA を加えると、ERK のリン酸化と血管内皮増殖因子 (VEGF) 発現が亢進される。esRAGE が共存すると、両者は抑制される。

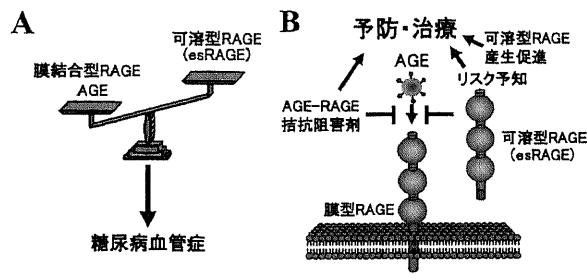


図9. 糖尿病血管合併症発症のリスク (A) と血管合併症克服へのストラテジー (B).

指標が顕著に改善された。

以上より、AGE-RAGE系が糖尿病腎症の発症・進展に機能的に関与していることがはじめて個体レベルで立証された。また、RAGE遺伝子のコピー数や発現量が高いと合併症にかかりやすく、低いとかかりにくくなることが示された(図6)。

#### VI. 内在性可溶性RAGE (esRAGE) の発見と意義

我々は2003年に、ヒトの血管内皮細胞がそれまでまったく知られていなかった分泌型のRAGE (endogenous secretory RAGE, esRAGE) を発現していることを発見した<sup>1)~3),8)</sup>。この内在性の可溶性RAGEは、これまで述べてきた細胞障害作用を持つ細胞膜結合型のRAGEとはまったく逆の作用を持つRAGEのアイソフォームである。

この内在性可溶性RAGEは、RAGE遺伝子から選択的スプライシングにより生成されるもので、イントロン9の一部が残り、膜貫通領域をコードするエクソン10が抜けることで、分泌性の可溶性RAGEをコードするようになる(図7A,B)。我々はこれを endogenous secretory RAGE, esRAGE と命名した<sup>1)~3),8)</sup>。esRAGEはイントロン9の配列が加わることで、このアイソフォームに特有の16アミノ酸の配列をC末端に持つようになり、ここに対する特異抗体を用いることで他のフォームと分別して検出・定量ができる。実際に初代培養の血管内皮細胞と周皮細胞の培養液中にesRAGEが分泌されていることが確認された(図7C)。また、ヒト組織を免疫化学染色によって調べると、血管内皮表面がesRAGE特異抗体で染色され、確かにヒト血管にesRAGEが存在することも証明された<sup>9)</sup>。我々が発見したこの可溶性RAGE(esRAGE)は、AGEの血管障害作用をブロックする作用を持っている<sup>1)~3),8)</sup>。図8に示すように、esRAGEは細胞培養系において、AGEによる内皮細胞障害の指標であるERKリン酸化亢進とVEGF発現亢進を抑制する。

さらに我々は、ヒトの血液中に可溶性RAGEが実際に存在していることを見出した<sup>1)~3),8)</sup>。そして、esRAGEを測定するELISAキットを開発し(2004年国内および米国で販売開始)、血中esRAGE濃度と糖尿病合併症との関連を解析した結果、合併症を持つ糖尿病患者の血中esRAGE濃度は、合併症を発症していない患者に比べて有意に低いことが示された<sup>10)</sup>。これは、esRAGEが合併症罹患リスクの予知因子となり得ることを示している<sup>1)~3),8),10)</sup>。我々はesRAGEについて、国内、米国、ヨーロッパで特許を出願した(可溶性RAGEタンパク質、特開2003-

125786; US 2005/0033017 A1; EP 1 380 593 A1)。さらに最近、動脈壁厚度と血中可溶性RAGE濃度が逆相関を示すこと、すなわち血中の可溶性RAGE濃度が低いと動脈硬化にもなりやすいということを示す結果を得ている<sup>11)</sup>。

#### VII. おわりに

以上のようにAGEとその受容体RAGEは、糖尿病血管合併症の発症進展に深く関わっていることが明らかになってきた。これまでに得られたデータは、図9Aに示すように膜結合型RAGEあるいはリガンドであるAGEが優勢になると合併症の危険性が増し、esRAGEが優勢であれば危険性が下がることを示している。つまり、糖尿病合併症のリスク予知と予防・治療において、RAGEを標的とすることが有効であることを強く示唆している。

現在我々は、合併症に至るRAGEシグナリングの全容の解明を目指すとともに、esRAGE測定による合併症リスク予知法の検討とRAGE拮抗薬剤を目指したRAGE-AGE結合阻害化合物のスクリーニングを行っている。また、esRAGEが産生されるための選択的スプライシングの機構の解明を進めており、これが解明されれば、esRAGE mRNA生成を促進する薬剤の開発につながると期待している。最終的には、血中esRAGE濃度を測定することで糖尿病合併症への罹患リスクを予知し、危険性のある患者はより厳重なチェックとコントロールを行い、場合によっては現在開発中のRAGE拮抗薬あるいはesRAGEの産生を増加させるような薬剤を投与して、合併症の予防・治療を行うというストラテジーの開発を目指して、研究を続けている(図9B)。

#### 謝 辞

本研究は、山本博教授の全般的な指導の下、金沢大学医学系研究科血管分子生物学研究分野のスタッフ、大学院生をはじめ、徳島大学、東北大学、北陸大学、東京女子医科大学、大阪市立大学、大阪大学、富山医科大学、第一ファインケミカル(株)などの多くの共同研究者との共同研究で達成されたものです。

#### 文 献

1. 渡辺琢夫, 米倉秀人, 山本靖彦, 櫻井 繁, 山本 博. 糖尿病の分子機構—AGE-RAGE系を中心として—. 生化学 75: 1361-1370, 2003.
2. Sakurai S, Yonekura H, Yamamoto Y, Watanabe T, Tanaka N, Li H, Rahman AK, Myint KM, Kim CH, Yamamoto H. The AGE-RAGE system and diabetic nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* 14 Suppl 3: S259-263, 2003.
3. Yonekura, H., Yamamoto, Y., Sakurai, S., Watanabe, T., Yamamoto, H. Roles of the receptor for advanced glycation endproducts in diabetes-induced vascular injury. *J. Pharmacol. Sci.* 97, 305-311, 2005.
4. Neeper M, Schmidt AM, Brett J, Yan SD, Wang F, Pan Y-CE, Elliston K, Stern D, Shaw A. Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins. *J. Biol. Chem.* 267: 14998-15004, 1992.
5. Yamagishi S, Yonekura H, Yamamoto Y, Katsuno K, Sato F, Mita I, Ooka H, Satozawa N, Kawakami T, Nomura M, Yamamoto H. Advanced glycation end products-driven angiogenesis in vitro. Induction of the growth and tube formation of human microvascular endothelial cells through autocrine vascular

endothelial growth factor. *J Biol Chem.* 272: 8723-8730, 1997.

6. Yonekura H, Yamamoto Y, Sakurai S, Yasui K, Petrova GP, Abedin MdJ, Li H, Watanabe T, Makita Z, Takeuchi M, Yamamoto H. RAGE engagement and vascular cell derangement by short chain sugar-derived advanced glycation endproducts. In: *The Maillard Reaction in Food Chemistry and Medical Science (Excerpta Medica International Congress Series 1245)*, S. Horiuchi, N. Taniguchi, F. Hayase, T. Kurata, T. Osawa, eds., Elsevier Science B. V., Amsterdam, The Netherlands, pp. 129-135, 2002.

7. Yamamoto Y, Kato I, Doi T, Yonekura H, Ohashi S, Takeuchi M, Watanabe T, Yamagishi S, Sakurai S, Takasawa S, Okamoto H, Yamamoto H. Development and prevention of advanced diabetic nephropathy in RAGE-overexpressing mice. *J Clin Invest.* 108: 261-268, 2001.

8. Yonekura H, Yamamoto Y, Sakurai S, Petrova RG., Abedin MJ, Li H, Yasui K, Takeuchi M, Makita Z, Takasawa S, Okamoto H, Watanabe T, Yamamoto H. Novel splice variants of the receptor for advanced glycation end-products expressed in human vascular endothelial cells and pericytes, and their putative

roles in diabetes-induced vascular injury. *Biochem J.* 370: 1097-1109, 2003.

9. Cheng C, Tsuneyama K, Kominami R, Shinohara H, Sakurai S, Yonekura H, Watanabe T, Takano Y, Yamamoto H, Yamamoto Y. Expression profiling of endogenous secretory receptor for advanced glycation end products in human organs. *Mod. Pathol.* 18: 1385-1396, 2005.

10. Sakurai S, Yamamoto Y, Tamei H, Matsuki H, Obata K, Li H, Miura J, Osawa M, Uchigata Y, Iwamoto Y, Watanabe T, Yonekura H, Yamamoto H. Development of an ELISA system for a circulating decoy receptor for AGE and its application to type I diabetic patients. *Diabetes Res. Clin. Pract.* in press, 2006.

11. Koyama H, Shoji T, Yokoyama H, Motoyama K, Mori K, Fukumoto S, Emoto M, Shoji T, Tamei H, Matsuki H, Sakurai S, Yamamoto Y, Yonekura H, Watanabe T, Yamamoto H, Nishizawa Y. Plasma level of endogenous secretory receptor for advanced glycation endproducts (esRAGE) is associated with components of the metabolic syndrome and atherosclerotic arterial wall thickness. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25: 2587-2593, 2005.