

RAGE シグナル遮断抗体療法による糖尿病合併症防止手段開発への挑戦

杉浦 英恵 (医薬保健学域医学類 4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 S100 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。RAGE の細胞外領域は N 末端側から免疫グロブリン様 V ドメイン、C1、C2 ドメインより構成され、V ドメインは主にリガンドとの結合、C1 ドメインは Zn²⁺ を介した RAGE の多量体形成さらにはそれに引き続く細胞内シグナル伝達に関与するのではないかと推定されている⁷。

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⁸。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ことが知られている⁹。このため sRAGE は糖尿病合併症の進展にむしろ抑制的に働くと考えられる。これらの背景から sRAGE の機能を阻害せず、膜結合型 RAGE 多量体化に引き続くシグナル伝達のみを阻害する治療法の開発が求められる。本研究では複合体形成領域に対する抗 RAGE C1 ドメイン抗体を用いて、ヒト RAGE 発現培養細胞における NFκB 活性阻害作用、RAGE の複合体形成抑制作用を評価し抗体の有効性と作用機序の確立を検証する。

2. 方法

i. 抗体およびリガンド

抗 RAGE C1 ドメイン抗体は C1 ドメインのペプチド配列 (PLVPNEKGVV) を化学合成し、これを抗原としてウサギを免疫することにより作製した。免疫後、得られた血清を免疫源であるペプチドアフィニティーカラムで精製した。S100b、LPS (*Escherichia coli* 055:B5) は Sigma-Aldrich 社から購入した。AGE-BSA はグリセルアルデヒド由来 AGE-BSA を既報の方法に基づき調整した。レコンビナント HMGB1 は昆虫細胞で作製しゲル濾過カラムで精製したものを用いた。精製レコンビナント HMGB1 のエンドトキシンレベルは <2.0 pg/μg であることを確認している。

ii. エンドトキシンの除去および定量

抗体希釈液およびリガンド希釈液中のエンドトキシンの除去は EndoTrap®blue (J.K.インターナショナル) を用い、手順は標準プロトコールに従った。エンドトキシンの定量はエンドスペシーES-24S セット (生化学バイオビジネス株式会社) を用い、プロトコールに従っておこなった。検量線の作成にはエンドトキシン標準品 CSE-L セット (生化学バイオビジネス株式会社) を用いた。ジアゾカップリングによる呈色反応にはトキシカラーDIA セット (生化学バイオビジネス株式会社) を用いた。

iii. プレートアッセイ

非変性条件下で96ウェルELISAプレート (BD Falcon) に精製ヒトRAGEタンパク (sRAGE) 1 μ gを固定し、1% BSA/PBSを用いて室温で1時間ブロッキングをおこなった。その後、一次抗体として抗RAGE C1ドメイン抗体およびコントロール抗体 (normal rabbit IgG, SC-3888) (Santa Cruz Biotechnology) (1 μ g/ml) を添加し、室温で1時間インキュベートした後、二次抗体としてHRP融合anti-rabbit IgG (Amersham) を添加して室温で1時間インキュベートした。HRP活性は基質である3,3',5,5'-tetramethylbenzidineを添加して呈色反応を行い、生成された3,3',5,5'-tetramethylbenzidine diimineの吸光度から測定した。

iv. 細胞培養

NF κ B 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、G418 (500 mg/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。

v. 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、抗 RAGE C1 ドメイン抗体およびコントロール抗体 (3.0, 1.0, 0.1 μ g/ml) を添加し、37°Cで 10 分間インキュベートした。その後、S100b (10 μ g/ml)、LPS (1 ng/ml)、AGE-BSA (50 μ g/ml) あるいは HMGB1 (4 μ g/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。

vi. Blue native-PAGE および western blotting

精製 sRAGE タンパク (3 μ g) と抗体 (3 μ g) を 37°C、Ca²⁺Mg²⁺Zn²⁺ 存在下で 5 分間インキュベートした後、S100b(3 μ g)を添加してさらに 37°Cで 30 分間インキュベートした。その後、Blue native-PAGE (14~16%) で展開し、RAGE 抗体 (RAGE 細胞外領域を認識する抗体) で sRAGE を検出した。

3. 結果

i. RAGE 細胞外領域に対する抗 RAGE C1 ドメイン抗体の結合の解析

抗 RAGE C1 ドメイン抗体が非変性条件下で 96 ウェルプレートに固定した精製ヒト RAGE タンパク

(sRAGE)を認識できるかどうかをプレートアッセイにより調べた。その結果、抗 RAGE C1 ドメイン抗体が sRAGE に結合することが確認できた (Fig. 1)。

ii. 抗 RAGE C1 ドメイン抗体による RAGE シグナル抑制作用の解析

抗 RAGE C1 ドメイン抗体による RAGE シグナル抑制作用を、ヒト RAGE 過剰発現ラット C6 グリオーマ細胞を用いた NFκB 活性化抑制作用の解析によりおこなった。その結果 S100b、LPS、AGE-BSA の添加により NFκB 活性の有意な上昇を認めたが、抗 RAGE C1 ドメイン抗体による活性上昇の抑制効果は得られなかった (Fig. 2)。また、HMGB1 によっては NFκB の有意な活性上昇が認められなかった (Fig. 2)。このことから、抗 RAGE C1 ドメイン抗体による RAGE シグナル抑制作用は不十分であると考えられた。

iii. 抗 RAGE C1 ドメイン抗体による RAGE 複合体形成抑制作用の解析

抗 RAGE C1 ドメイン抗体による RAGE 複合体形成抑制作用を Blue native-PAGE および western blotting により解析した。その結果、S100b の存在の有無に関わらず sRAGE は主に 4 量体を形成していることが推定された (既報の EMBO Rep 12(4):358-364, 2011 に準じる結果であった) (Fig. 3)。抗 RAGE C1 ドメイン抗体の添加によって約 50 kDa に位置する sRAGE 単量体と考えられるバンドのシグナルは増強していたが、4 量体と考えられる約 200 kDa に位置するバンドのシグナルは大きな影響を受けていなかった。また、約 500 kDa のシグナルは sRAGE と抗 RAGE C1 ドメイン抗体の複合体形成物、あるいは一部 sRAGE/S100b の多量体複合体形成物であると考えられた。このことから、抗 RAGE C1 ドメイン抗体は RAGE 多量体形成を抑制する作用はあるものの、その効果は限定的で、完全な抑制効果を発揮するには極めて多量の抗体量が必要であると推定された。

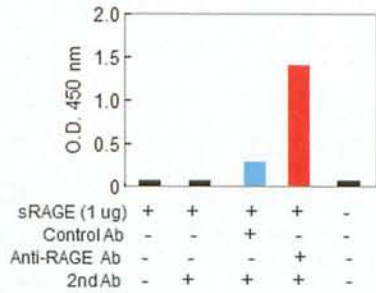


Fig. 1. プレートアッセイを用いた抗 RAGE C1 ドメイン抗体の組み換えヒト RAGE タンパクへの結合確認実験
Anti-RAGE Ab, 抗 RAGE C1 ドメイン抗体 (1 μg/mL); 2nd Ab, 二次抗体 HRP 結合 anti-rabbit IgG 抗体 (1 μg/mL)。

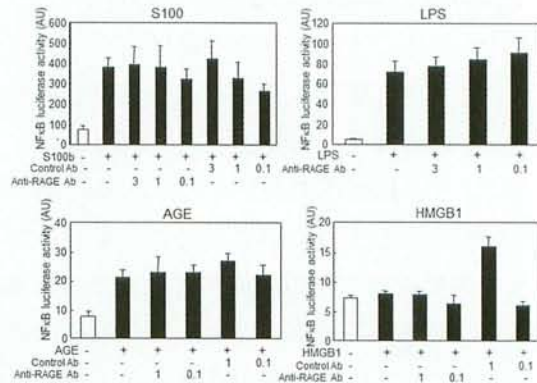


Fig. 2. 抗 RAGE C1 ドメイン抗体による RAGE 細胞内シグナル抑制効果の検討
S100b, 10 μg/mL S100b; LPS, 1 ng/mL LPS; AGE, 50 μg/mL AGE-BSA; HMGB1, 4 μg/mL HMGB1; control Ab, non-immune IgG (μg/mL); Anti-RAGE Ab, 抗 RAGE C1 ドメイン抗体 (μg/mL)。

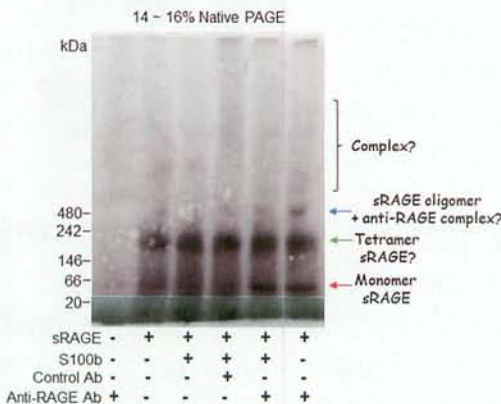


Fig. 3. Blue native-PAGE および、western blotting を用いた抗 RAGE C1 ドメイン抗体による RAGE 複合体形成抑制作用の検討
sRAGE, 3 μg 精製レコンビナント可溶性 RAGE; S100b, 3 μg S100b; control Ab, 3 μg non-immune IgG; Anti-RAGE Ab, 3 μg 抗 RAGE C1 ドメイン抗体。

4. 考察と結論

本研究により RAGE C1 ドメインの Zn²⁺結合領域に対する抗 RAGE C1 ドメイン抗体は RAGE の細胞外領域を認識するものの、リガンドとの相互作用による

NFκB シグナルの活性化を抑制できないことが明らかとなった。また、Blue native-PAGE および western blotting の結果から、抗 RAGE C1 ドメイン抗体は RAGE 複合体形成抑制作用を有するものの、その効果は限定的であることが示唆された。これまでに *in vitro* において RAGE が 4 量体およびさらに大きな多量体を形成することが報告されており、今回の結果はこの報告に準じるものであった。しかしながら、生理的な条件においては細胞膜上の RAGE の発現レベルはごくわずかであり、今回の実験に用いた様な無細胞系で単位体積当たりには占める RAGE の分子数が多い条件ではリガンド無しでもオリゴマーを形成するという可能性も否定できない。実験系も含めた今後の検討課題である。

RAGE 細胞内シグナル活性化のメカニズムとして以下のことが予想される。まずは RAGE リガンドにより RAGE 細胞内領域の構造が変化してシグナル伝達の起点となるアダプタータンパク質 (未知) が動員され、シグナル伝達を開始される。それと同時に、細胞外領域においては、さらにリガンドの結合によって多量体形成⇌解離の平衡反応が熱力学的により安定な多量体形成の方向にシフトし、これがさらなる多量体化を引き起こし、より多くのアダプタータンパク質が動員されるというメカニズムである。このような positive feedback 機構は、RAGE を介した炎症性シグナル伝達増幅メカニズムの重要な要素であると考えられる。このような機構に対して、抗 RAGE C1 ドメイン抗体の作用は、RAGE 複合体の構造をダイナミックに変化させシグナル伝達を抑制するには不十分であり、劇的な分子挙動を制御するための有効な手段の開発が必要と考えられた。

本研究により、RAGE C1 ドメインの Zn²⁺結合領域に対する抗 RAGE C1 ドメイン抗体は RAGE シグナル伝達抑制作用を十分に示さないことが明らかとなった。また、抗 RAGE C1 ドメイン抗体による RAGE 複合体形成抑制作用は極めて限定的である可能性が考えられた。このことから、RAGE シグナル伝達を完全に抑制するためには極めて多量の抗体あるいは複合体化によるシグナル伝達というダイナミックな分子挙動の変化を制御する有効な手段の開発が必要であると考えられた。

5. 今後の研究課題と糖尿病合併症治療に向けた新たな挑戦

これまでに完全長膜型 RAGE が 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細胞膜直上で切断 (shedding) され、sRAGE 形成が生じることが報告されている⁸(Fig. 4)。前述の通り、sRAGE は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ことが知られている⁶。つまり、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全長膜結合型 RAGE の量を減少させると同時に、デコイ

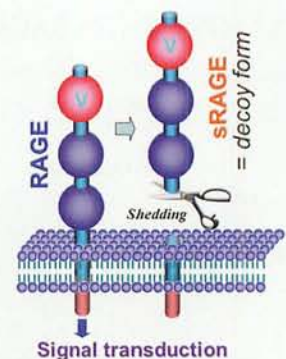


Fig.4. RAGE sheddingとデコイ受容体 sRAGE形成

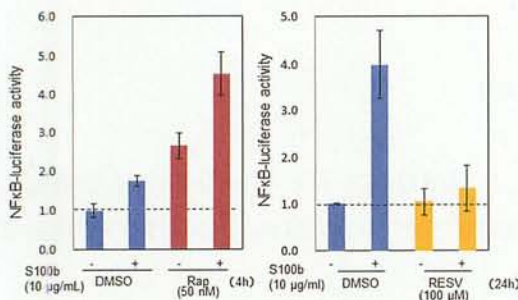


Fig. 5. RAGE sheddingを誘導し、RAGE細胞内シグナル伝達を抑制する薬剤のスクリーニング

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 RAGE shedding のメカニズムの解明と shedding を増強させる薬剤の開発が重要となってきている。このような背景のもと、今後は RAGE の細胞外領域を酵素によって切断する shedding を引き起こし RAGE 細胞内シグナル伝達を

抑制する薬剤の候補をスクリーニングすることとした。

まずは先行例として、赤ワインの成分でポリフェノールの一種である天然の抗酸化物質レスベラトロール (Resv 100 μ M)、mTOR 活性を抑制し免疫抑制、抗がん作用、抗老化作用が知られているラパマイシン (Rap 50 nM) をヒト RAGE 過剰発現ラット C6 グリオーマ細胞の NF κ B 活性化を指標にアッセイを行った。その結果、レスベラトロールが S100b 刺激による NF κ B 活性化を有意に抑制し、逆にラパマイシンは有意に NF κ B 活性化を増強することが分かった (Fig. 6)。今後も引き続き作用機序の異なる 10 種類を超える薬剤でスクリーニングを行い、陽性と判定された、あるいは興味深い結果を示したものに関しては詳細にその分子メカニズムの解明を行う計画である。

6. 謝辞

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。

7. 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, Slaterry 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. Koch M, Chitayat S, Dattilo BM, Schiefner A, Diez J, Chazin WJ, Fritz G. Structural basis for ligand recognition and activation of RAGE. 2010 *Structure* 18(10): 1342-52.
8. 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.