

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月19日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659430

研究課題名（和文）RAGE 阻害薬吸入による COPD 治療の試み

研究課題名（英文）Application of RAGE inhibitor inhalation for COPD

研究代表者

山本 博（YAMAMOTO HIROSHI）

金沢大学・医学系・教授

研究者番号：00115198

研究成果の概要（和文）：（1）マウスマクロファージの培養系を用いて、リガンド添加による RAGE シグナルが cAMP 依存性シグナル伝達経路によって抑制されることを明らかにした。（2）cAMP 依存性シグナルは、MMP9 を活性化し膜結合型 RAGE のシェディングを促進することにより、膜結合型 RAGE を減少させ可溶性 RAGE を増加させることを明らかにした。（3）cAMP 依存性シグナルが RAGE リガンド-RAGE 系シグナルを抑制するメカニズムとして、cAMP 依存性シグナルによる膜結合型 RAGE のシェディング促進が、シグナル伝達に関わる膜結合型 RAGE を減少させる一方、デコイ受容体として働く可溶性 RAGE を増加させることが考えられた。

研究成果の概要（英文）：(1) We found that ligand-dependent RAGE signal was suppressed by cAMP-dependent signaling pathway, using mouse macrophage culture system. (2) We showed that cAMP-dependent signal caused activation of MMP9 that accelerated shedding of membrane-bound form RAGE, which resulted in decrease of membrane-bound form RAGE and increase of soluble form RAGE. (3) The mechanism of the suppression of ligand-dependent RAGE signal by cAMP-dependent signal was supposed that the acceleration of shedding of membrane-bound form RAGE via cAMP-dependent signal resulted in decrease of membrane-bound form RAGE functioning signal transducer and increase of soluble form RAGE functioning decoy receptor.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合 計
交付決定額	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：血管分子生物学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：閉塞性肺疾患, RAGE, cAMP, MMP9

1. 研究開始当初の背景

慢性閉塞性肺疾患（COPD）の慢性炎症はステロイド抵抗性であり、未だに COPD に対して有効な抗炎症薬はない。炎症を促進する機能をもつ細胞表面受容体 RAGE (receptor for advanced glycation endproducts) が、

（1）正常肺で多量に発現していること、

（2）COPD 肺で RAGE とそのリガンドの発現が亢進していること、などから、RAGE

が COPD の病態に関与し COPD 治療薬の分子標的になりうる可能性に着目した。

2. 研究の目的

本研究では、（1）培養細胞系を用い、RAGE リガンド-RAGE 系シグナルによる細胞応答について MMP 活性など COPD の病態の観点から明らかにし、さらに（2）RAGE ノックアウトマウスなどを用いて COPD の病態

への RAGE の関与を *in vivo* で解析し、(3) 申請者らが新規に開発した RAGE 阻害薬の気道内投与による COPD 治療効果をマウスモデルで検討することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) II 型肺胞上皮系ヒト肺腺がん由来細胞株である A549 とヒト気管上皮由来細胞株である BEAS-2B について、RAGE の発現パターンを、膜結合型 RAGE と分泌型 RAGE の 2 つのスプライシング・バリエーションごとに定量的に検討し、ヒト血管内皮由来細胞株である HMVEC, ECV304 などと比較した。

(2) マウスマクロファージ培養系に RAGE のリガンドとアデニル酸シクラーゼ賦活薬であるフォルスコリン、cAMP アナログである 8-bromo-cAMP などを添加し、RAGE リガンド-RAGE 系シグナル伝達経路と cAMP 依存性シグナル伝達経路との関連を解析した。

(3) 上記 (2) と同様の系を用い、MMP 活性と膜結合型 RAGE のシェディングについて cAMP 依存性シグナルの関与を検討した。

4. 研究成果

(1) A594 および BEAS-2B における RAGE mRNA の発現量は、いずれも、肺組織における RAGE の高発現から予想されたほど高くはなく、HMVEC より高い値を示したものの、ECV304 と同程度であった。また、膜結合型 RAGE と分泌型 RAGE の比については、膜結合型が優位であったが、膜結合型/分泌型の比は ECV304 と明らかな差を認めなかった。すなわち、A594, BEAS-2B とも、肺組織由来細胞株として期待された RAGE の高発現、高い膜結合型/分泌型比という特性は認められなかった。

(2) RAGE リガンドのマウスマクロファージ培養液中への添加により MCP-1 の分泌亢進が見られた。この MCP-1 分泌亢進は RAGE 欠失マウスのマクロファージでは見られないことから、RAGE を介するシグナルによるものであると考えられた。また、RAGE リガンド添加による MCP-1 分泌亢進がフォルスコリンや 8-bromo-cAMP によって抑制されたことから、cAMP 依存性シグナルは RAGE リガンド-RAGE 系シグナルを抑制すると考えられた。

(3) RAGE リガンドの添加によりマウスマクロファージにおける膜結合型 RAGE の発現増加が見られたが、この増加はフォルスコリンによって抑制された。また、フォルスコ

リンによりマクロファージ培養液中で可溶性 RAGE の増加が見られた。これらのフォルスコリンの効果は MMP 阻害剤によって抑制された。さらに、フォルスコリンによるマクロファージの MMP9 活性化が認められた。これらのことから、cAMP 依存性に活性化された MMP9 により、膜結合型 RAGE のシェディングが促進されていると考えられた。

(4) 以上のことから、cAMP 依存性のシグナルは、MMP9 を活性化し膜結合型 RAGE のシェディングを促進することにより、シグナル伝達に関わる膜結合型 RAGE を減少させる一方、デコイ受容体として働く可溶性 RAGE を増加させ、結果的に RAGE リガンド-RAGE 系シグナルを抑制することが考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 18 件)

1. Dong H, Watanabe T, Yamamoto H: (9 番目) 他 6 名: Induction of receptor for advanced glycation end-products by insufficient leptin action triggers pancreatic β -cell failure in type 2 diabetes. *Genes to Cells* DOI: 101111/gtc. 12036 (2013) Apr;18(4):302-1

2. Takeuchi A, Watanabe T, Yamamoto H: (7 番目) 他 5 名: Low-molecular weight heparin suppresses RAGE-mediated expression of the malignant phenotype in human fibrosarcoma cells. *Cancer Science* in press (2013) DOI: 101111/cas.12133

3. Takahashi HK, Yamamoto H: (8 番目) 他 7 名: Role of cell-cell interactions in HMGB1 cytokine activity in human PBMCs and mouse splenocytes. *Eur J Pharmacol* in press(2013)

4. Monden M, Yamamoto H: (13 番目) 他 14 名: Receptor for Advanced Glycation End Products Regulates Adipocyte Hypertrophy and Insulin Sensitivity in Mice: Involvement of Toll-Like Receptor 2. *Diabetes* 62 (2) 478-89 (2012) 査読有 DOI:10.2337/db-1116

5. Saito H, Yamamoto Y, Yamamoto H: Diabetes alters the subsets of mouse endothelial progenitor cells that reside in blood, bone marrow and spleen. *Am J Physiol Cell Physiol* 302: C892-901 (2012) 査読有 doi: 10.1152/ajpheart.00907

6. Yamamoto Y, Yamamoto H: Controlling RAGE to conquer diabetic vascular complications. *J Diabetes Invest* 3(2):107-14(2012) 査読有 doi: 10.1089/ten.TEA.2010.0312.

7. Kitade H, Yamamoto H: (8 番目) 他 11 名: CCR5 plays a critical role in obesity-induced adipose tissue inflammation and insulin

resistance by regulating both macrophage recruitment and M1/M2 status. *Diabetes* 61:1680-1690 (2012) 査読有
doi: 10.2337/db11-1506.

8. Sugihara T, Yamamoto H (12番目) 他10名: Endogenous secretory receptor for advanced glycation end-products inhibits amyloid-beta1-42 uptake into mouse brain. *J Alzheimer's Dis* 28(3):709-720(2012) 査読有
doi: 10.3233/JAD-2011-110776.

9. Kamide T, Yamamoto H (10番目) 他9名: RAGE mediates vascular injury and delayed neuronal death after global cerebral ischemia. *Neurochem Int* 60: 220-228 (2012) 査読有
doi: 10.1016/j.neuint.2011.12.008.

10. Okuma Y, Yamamoto H (12番目) 他14名: Anti-high mobility group box-1 antibody therapy for traumatic brain injury. *Ann Neurol* 72:373-384(2012) 査読有
doi: 10.1002/ana.23602.

11. Yamamoto Y, Yamamoto H. Interaction of receptor for advanced glycation end products with advanced oxidation protein products induces podocyte injury. *Kidney Int* 82:733-735(2012) 査読有
doi: 10.1038/ki.2012.163.

12. Kamal T, Yamamoto Y, Munesue S, Yamamoto H: Significance of advanced glycation end-products(AGE) and the receptor for AGE(RAGE) in diabetic nephropathy. *Diabetic nephropathy*:97-108(2012) 査読有

13. Watanabe T, Yamamoto H (14番目) 他12名: Septic shock is associated with receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) ligation of LPS. *J Immunol* 186 (5): 3248-3257 (2011) 査読有
doi: 10.4049/jimmunol.1002253.

14. He M, Kubo H, Yamamoto H (10番目) 他7名: RAGE binds phosphatidylserine and mediates clearance of apoptotic cells. *EMBO Rep* 12(4): 358-364 (2011) 査読有
doi: 10.1038/embor.2011.28

15. Yamamoto Y, Yamamoto H: RAGE-mediated inflammation and diabetic vascular complications. *J Diabetes Invest* 2(3): 155-157 (2011) 査読有

16. Riaz M, Chen JH, Watanabe T, Yamamoto H, Duronio V, Steinbrecher UP: OxLDL mediated survival of macrophages does not require LDL internalization or signaling by major pattern recognition receptors. *Biochem Cell Biol* 89(4): 387-395 (2011) 査読有
doi: 10.1139/O11-035.

17. Myat TTW, Yamamoto H (10番目) 他8名: Regulation of RAGE for attenuating progression of diabetic vascular complications. *Exp Diabetes Res* 894605(2011) 査読有
doi: 10.1155/2012/894605.

18. Takagi T, Yamamoto H (14番目) 他10名: Inhibition of allergic bronchial asthma by thrombomodulin is mediated by dendritic cells. *Am J Respir Crit Care Med* 183(1): 31-42 (2011) 査読有
doi: 10.1164/rccm.201001-0107OC.
[学会発表] (計 27 件)

1. Dong Han: Glucolipotoxicity and inappropriate leptin action induce pancreatic cell apoptosis and impair insulin secretion via RAGE induction 第

22 回日本メイラード学会 平成 24 年 (2012) 12 月 21 日東京農工大学 (東京)

2. 榑谷彩: 機能性甘味料マルチトールの AGEs 生成低減効果 第 22 回日本メイラード学会 平成 24 年 (2012) 12 月 21 日東京農工大学 (東京)

3. Myat ThuThuWin.: Optimizing a liquid culture system for monitoring lifespan by diet manipulations in *Caenorhabditis elegans* 第 85 回日本生化学会 平成 24 年 12 月 16 日マリンメッセ福岡 (福岡)

4. 山本靖彦: スンクスには腸管膜脂肪細胞が存在しない 第 85 回日本生化学会 平成 24 年 12 月 16 日マリンメッセ福岡 (福岡)

5. 棟居聖一: 食品由来 AGE による AGE-RAGE シグナルの阻害効果 第 85 回日本生化学会 平成 24 年 12 月 15 日マリンメッセ福岡 (福岡)

6. Yasuhiko Yamamoto: Population and subset of mouse endothelial progenitor cells were altered by diabetes in blood, bone marrow and spleen 第 9 回国際糖尿病連合西太平洋地区会議 Nov. 27(2012)京都国際会館 (京都)

7. Dong Han: Induction of RAGE accounts for pancreatic β -cell failure in type-2 diabetes. 第 9 回国際糖尿病連合西太平洋地区会議 Nov. 25 (2012) 京都国際会館 (京都)

8. 山本靖彦: Glucotoxicity と 細小血管症 第 27 回日本糖尿病合併症学会 平成 24 年 (2012) 11 月 3 日アクロス福岡 (福岡)

9. Seiichi Munesue: A RAGE antagonist activity of food-derived AGE. 11th International Symposium on the Maillard Reaction Sept.19 (2012) Lorraine University(France)

10. Yasuhiko Yamamoto: cAMP axis induces ectodomain shedding of RAGE and improves inflammation. 11th International Symposium on the Maillard Reaction Sept.18 (2012) Lorraine University(France)

11. Dong Han: RAGE induction accounts for pancreatic beta-cell failure in type-2 diabetes. 11th International Symposium on the Maillard Reaction Sept.17 (2012) Lorraine University(France)

12. Dong Han: RAGE contributes to pancreatic beta-cell failure in type-2 diabetes. 72th ADA June 17 (2012) Pennsylvania Convention Center(USA)

13. 韓 冬: 2 型糖尿病の膵 β 細胞疲弊には RAGE が関わる 第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会 平成 24 年 (2012) 5 月 18 日パシフィコ横浜 (神奈川県)

14. 久保田浩之: 糖尿病腎症の進展に関する低分子量ヘパリンの効果の検討 第 55 回日本糖尿病学会年次学術集会 平成 24 年 (2012) 5 月 18 日パシフィコ横浜 (神奈川県)

15. H Saito: Dynamic alteration in a spatial

population of mouse endothelial progenitor cells by diabetes 第19回日本血管分子生物医学学会学術集会 平成23年(2011)12月9日東京ステーションコンファレンスサピアタワー(東京)

16.山本博:カルボニルストレス代謝制御の解明と統合失調症の診断・治療・予防法の創出 第44回精神神経系薬物治療研究報告会平成23年12月2日千里ライフサイエンスセンター生物(大阪)

17.山本靖彦:多機能受容体 RAGE の分子多様性とアンチエイジングへの応用 第14回日本補完代替医療学会学術集会 アンチエイジングと EBM 2011年11月5日石川県教育文化会館(石川)

18.山本博:カルボニルストレスの臨床応用・橋渡し研究 第21回日本メイラード学会平成23年10月28日東京ステーションコンファレンスサピアタワー(東京)

19.太田嗣人:肥満による炎症とインスリン抵抗性をリンクする CCR5 の意義-脂肪組織マクロファージの量及び質の調節への関与- 第26回糖尿病合併症学会平成23年10月15日大宮ソニックシティ(埼玉)

20.齊藤英仁:糖尿病によって引き起こされる血管内皮前駆細胞の動的変化 第84回日本生化学会平成23年(2011)9月24日京都国際会館(京都)

21.H Dong: Pattern recognition receptor RAGE in the pathogenesis of pancreatic beta cell failure in type 2 diabetes 第84回日本生化学会平成23年(2011)9月23日京都国際会館(京都)

22.山本博:糖尿病合併症の成因について MSD 学術講演会-糖尿病と関連疾患を考える会-平成23年8月6日金沢グランドホテル(金沢)

23.H Saito: Spatial Population Dynamics of mouse Endothelial Progenitor Cells in Diabetes. 71th ADA Scientific Sessions June 25 (2011) San Diego Convention Center (USA)

24.Tsuguhito Ota: CCR5 plays a critical role in the inflammatory adipose tissue response to high fat feeding and obesity by regulating both macrophage recruitment and M1/M2 status. 71th ADA June 25 (2011) San Diego Convention Center (USA)

25.大原拓郎:血管保護因子・分泌型 RAGE 生成の制御機構の解析 日本糖尿病学会平成23年5月19日札幌プリンスホテル(北海道)

26.齊藤英仁:マウス血管内皮前駆細胞の多様性と糖尿病による動的変化 日本糖尿病学会 平成23年5月19日札幌プリンスホテル(北海道)

27.澤本一樹:肥満によるインスリン抵抗性の発症には CCR5 による脂肪組織マクロファージの量の変化と質の調節が関わる 日本

糖尿病学会 平成23年5月19日札幌プリンスホテル(北海道)

〔図書〕(計5件)

1.杉浦英恵、山本靖彦 山本博:「AGE をターゲットとした糖尿病合併症の治療戦略」糖尿病合併症と治療薬 BIO Clinica 27(14)2012

2.棟居聖一、山本博:AGE-RAGE と糖尿病合併症予防 Medical Practice12(28)2011 2240-2243 4頁(株)文光堂

3.山本博 山本靖彦:「糖尿病学イラストレイテッド」第4章・2 最小血管症発症の分子機構 2012年3月 210-214 (株)羊土社

4.山本博、山本靖彦:血管生物医学事典 第4章 AGE 受容体 2011年12月10日 284-285 (株)朝倉書店

5.山本博:血管周皮細胞の役割・機能 週刊日本医事新報 2011年1月29日 78-79 (株)日本医事新報社

〔その他〕

ホームページ等

<http://biochem2.w3.kanazawa-u.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 博 (YAMAMOTO HIROSHI)

金沢大学・医学系・教授

研究者番号: 00115198

(2) 研究分担者

渡邊 琢夫 (WATANABE TAKUO)

金沢学院短期大学・教授

研究者番号: 40303268