

様式 C-19

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

・平成24年 5月19日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590304

研究課題名（和文）RAGEオリゴマー化と γ -セクレターゼによる新たなシグナル受容機構の解明

研究課題名（英文）A novel signal reception mechanism by oligomerization of RAGE and gamma-secretase

研究代表者

渡邊 琢夫 (WATANABE TAKUO)

金沢大学・医学系・准教授

研究者番号：40303268

研究成果の概要（和文）：（1）ある種の γ -セクレターゼ阻害剤が、 γ -セクレターゼ活性の阻害以外の機序によってRAGEシグナリングを抑制することが示された。（2）cAMPがMMP9の活性化を介して、膜型RAGEのシェディングを促進し、膜型RAGEの減少による効果と、遊離された細胞外ドメインのおとり受容体としての効果の両者によって、RAGEシグナルを抑制することを明らかにした。（3）cAMPシグナルを増強するPDE阻害剤のRAGE関連疾患に対する治療薬としての可能性を、マウスの腸疾患モデルを用いて検討し、当該薬剤が病態の進行を抑制する可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：(1) We found a gamma-secretase inhibitor suppressed RAGE signaling by unknown mechanism other than inhibition of gamma-secretase activity. (2) We clarified that the cAMP exerts the inhibitory effects on RAGE signaling by enhancement of MMP9-mediated RAGE shedding that leads to decrease of membrane-bound form RAGE and increase of decoy/soluble form RAGE. (3) We showed the possibility that the PDE inhibitor, which cause enforcement of cAMP signaling could suppress the inflammatory bowel disease using mouse model.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生化学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：RAGE、オリゴマー化、 γ -セクレターゼ、マトリックスメタロプロテアーゼ、cAMP、PDE阻害剤

1. 研究開始当初の背景：

（1）我々は糖尿病血管合併症などの鍵となる分子が細胞膜の糖化タンパク受容体RAGE (receptor for advanced glycation endproducts)であることを明らかにしてきたが、RAGEを介するシグナル伝達の全体像は必ずしも明らかではなかった。

（2）研究開始当初、我々はRAGEシグナリ

ングに先立ってRAGEがオリゴマー化すること、さらにNotchシグナリングやアミロイド β タンパクの生成に関わる γ -セクレターゼがRAGEを介するシグナリングにも関与している可能性を見いだしていた。

2. 研究の目的：

本研究計画では、

(1) RAGE シグナリングにおけるオリゴマー化と γ -セクレターゼ活性の機能的相関を解析し、

(2) これらを含む RAGE によるシグナル生成機構の全体像を明らかにすると共に、

(3) 適当な薬剤でこれらのシグナル伝達系を制御することによる RAGE 関連疾患の治療の可能性を探ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) RAGE シグナリングの評価はルシフェラーゼをレポーター遺伝子として持つ培養細胞系を用いたほか、RAGE シグナルにより発現・分泌が促進されるサイトカインなどの ELISA 法による定量を行った。

(2) RAGE 遺伝子の発現、選択的スプライシングにより生成する膜型 RAGE と分泌型 RAGE の発現は定量的 RT-PCR 法、ウェスタンブロット法、ELISA 法などを用いた。

(3) マウスの腸炎モデルはデキストラン硫酸ナトリウム投与により作製した。病態の解析としてマウス腸の形態的観察に加え、腸組織における RAGE の発現およびサイトカイン量の測定、免疫細胞の分画などを行った。

4. 研究成果

(1) ある種の γ -セクレターゼ阻害剤による RAGE シグナリングの一定の抑制効果が見られたが、この効果は、 γ -セクレターゼ活性の直接的な阻害以外の機序による可能性が示唆された。

(2) cAMP が MMP9 の活性化を介して、膜型 RAGE のシェディングを促進し、膜型 RAGE の減少による効果と、シェディングによって遊離された細胞外ドメインがおとり受容体として RAGE リガンドを補足する効果の両者によって、RAGE シグナルを抑制することを明らかにした。

(3) PDE 阻害剤の RAGE 関連疾患に対する治療薬としての可能性を、マウスの腸疾患モデルを用いて検討し、当該薬剤が病態の進行を抑制する可能性が示された。

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 20 件) すべて査読有

1. Kitade H, Sawamoto K, Nagashimada M, Inoue H, Yamamoto Y, Sai Y, Takamura T,

Yamamoto H, Miyamoto KI, Ginsberg HN, Mukaida N, Kaneko S, Ota T.: CCR5 Plays a Critical Role in Obesity-Induced Adipose Tissue Inflammation and Insulin Resistance by Regulating Both Macrophage Recruitment and M1/M2 Status. Diabetes Epub (2012)

2. Kamide T, Kitao Y, Takeichi T, Okada A, Mohri H, Schmidt AM, Kawano T, Munesue S, Yamamoto Y, Yamamoto H, Hamada J, Hori O.: RAGE mediates vascular injury and inflammation after global cerebral ischemia. Neurochem Int. 60: 220-228 (2012)

3. Saito H, Yamamoto Y, Yamamoto H.: Diabetes alters subsets of endothelial progenitor cells that reside in blood, bone marrow, and spleen. Am J Physiol Cell Physiol. 302: C892-901 (2011)

4. Win MT, Yamamoto Y, Munesue S, Saito H, Han D, Motoyoshi S, Kamal T, Ohara T, Watanabe T, Yamamoto H.: Regulation of RAGE for attenuating progression of diabetic vascular complications. Exp. Diabetes Res. Epub (2011)

5. Sugihara T, Munesue S, Yamamoto Y, Sakurai S, Akhter N, Kitamura Y, Shiba k, Watanabe T, Yonekura H, Hayashi Y, Hamada J, Yamamoto H :Endogenous Secretory Receptor for AGE Inhibits Amyloid- β ₁₋₄₂ Uptake into Mouse Brain J. Alzheimer's Dis. 28: 709-710 (2011)

6. Takagi T, Taguchi O, Toda M, Ruiz DB, Bernabe PG, D'Alessandro-Gabazza CN, Miyake Y, Kobayashi T, Aoki S, Chiba F, Yano Y, Conway EM, Munesue S, Yamamoto Y,

Yamamoto H, Suzuki K, Takei Y, Morser Y, Gabazza EC: Inhibition of allergic bronchial asthma by thrombomodulin is mediated by dendritic cells. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 183: 31-42 (2011)

7. Riazzy M, Chen JH, Yamamoto Y, Yamamoto H, Duronio V, Steinbrecher UP.: OxLDL-mediated survival of macrophages does not require LDL internalization or signalling by major pattern recognition receptors. *Biochem Cell Biol.* 89: 387-395 (2011)

8. Forbes JM, Söderlund J, Yap FY, Knip M, Andrikopoulos S, Ilonen J, Simell O, Veijola R, Sourris KC, Coughlan MT, Forsblom C, Slattery R, Grey ST, Wessman M, Yamamoto H, Bierhaus A, Cooper ME, Groop PH.: Receptor for advanced glycation end-products (RAGE) provides a link between genetic susceptibility and environmental factors in type 1 diabetes. *Diabetologia* 54: 1586-1587 (2011)

9. He M, Kubo H, Morimoto K, Fujino N, Suzuki T, Takahashi T, Yamada M, Yamaya M, Maekawa T, Yamamoto Y, Yamamoto H.: Receptor for advanced glycation end products binds to phosphatidylserine and assists in the clearance of apoptotic cells. *EMBO Rep.* 12: 358-364 (2011)

10. 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. *J. Immunol.* 186: 3248-3257 (2011)

11. Hamada Y, Kitazawa S, Kitazawa R, Kono K, Goto S, Komaba H, Fujii H, Yamamoto Y, Yamamoto H, Usami M, Fukagawa M: The effects of receptor for advanced glycation end products (RAGE) on bone metabolism under physiological and diabetic condition. *Endocrine in press* (2010)

12. Iichmann A, Burgdorf S, Scheurer S, Waibler Z, Nagai R, Wellner A, Yamamoto Y, Yamamoto H, Henle T, Kurts C, Kalinke U, Vieths S, Toda M: Glycation of a food allergen by the Maillard reaction enhances its T-cell immunogenicity: Role of macrophage scavenger receptor class A type I and II. *J. Allergy Clin. Immunol.* 125:175-183 (2010)

13. Matsuoka N, Itoh T, Watarai H, Sekine-Kondo E, Nagata N, Okamoto K, Mera T, Yamamoto H, Yamada S, Maruyama I, Taniguchi M, Yasunami Y: High-mobility group box 1 is involved in the initial events of early loss of transplanted islets in mice. *J. Clin. Invest.* 120:735-743 (2010)

14. Ueno H, Koyama H, Shoji T, Kurato M, Fukumoto S, Tanaka S, Otsuka Y, Mima Y, Morioka T, Mori K, Shioi A, Yamamoto H, Inaba M, Nishizawa Y: Receptor for advanced glycation end-products (RAGE) regulation of adiposity and adiponectin is associated with atherogenesis in apo E-deficient mouse. *Atherosclerosis* 211: 431-436 (2010)

15. Sourris KC, Morley AL, Koitka A, Samuel P, Coughlan MT, Penfold SA, Tomas MC, Bierhaus A, Nawroth PP, Yamamoto H, Allen TJ, Walther

T, Hussain T, Cooper ME, Forbes JM: Receptor for AGEs(RAGE) blockade may exert its renoprotective effects in patients with diabetic nephropathy via induction of the angiotensin type 2 (AT2) receptor. *Diabetologia* 53: 2442-2451 (2010)

16. Li J, Qu X, Yao J, Caruana G, Ricardo SD, Yamamoto Y, Yamamoto H, Bertram JF: Blockade of endothelial-mesenchymal-transition by a Smad3 inhibitor delays the early development of streptozotocin-induced diabetic nephropathy. *Diabetes* 59: 2612-2624 (2010)

17. Ohe K, Watanabe T, Harada S, Munesue S, Yamamoto Y, Yonekura H, Yamamoto H: Regulation of alternative splicing of the receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) through G-rich cis-elements and heterogenous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) H. *J. Biochem.* 147: 651-659 (2010)

18. Mi QS, Yan SL, Wang ZZ, Ding KH, Li C, Wang L, Zhou L, Yamamoto Y, Yamamoto H, Okamoto H, Isales C: Spontaneous bone loss in RIP-iNOS transgenic mouse: a mouse model for diabetes-mediated osteopenia/osteoporosis. *Cell Cycle* 8: 4179-4181 (2009)

19. Sakatani S, Yamada K, Homma C, Munesue S, Yamamoto Y, Yamamoto H, Hirase H: Deletion of RAGE causes hyperactivity and increased sensitivity to auditory stimuli in mice. *PLoS ONE* 4 (12:e8309): 1-7 (2009)

20. Sun L, Ishida T, Yasuda T, Kojima Y, Honjo T, Yamamoto Y, Yamamoto H, Ishibashi S, Hirata K, Hayashi Y: RAGE mediates oxidized

LDL-induced pro-inflammatory effects and atherosclerosis in non-diabetic LDL receptor-deficient mice. *Cardiovascular Research* 82: 371-381 (2009)

[学会発表] (計 36 件)

1. Soh Motoyoshi, Yasuhiko Yamamoto, Seichi Munesue, Takuo Watanabe, Hiroshi Yamamoto: cAMP Exerts Anti-Inflammatory Effects by Controlling RAGE Isoform Biogenesis. 70th American Diabetes Association Scientific Sessions June 25-29 (2010) Orland USA (会場: オーランドコンベンションセンター)

2. Yamamoto H, Watanabe T, Yamamoto Y, Yonekura H, Munesue S, Ohe K, Sugihara T¹, Saito H, Motoyoshi S, Han D, Win MTT, Abou-Zed TK, and Ohara T: Enemies and friends within in the pathogenesis and prevention of diabetic vascular complications. 4th International HMGB1 Symposium – Signals of Tissue Damage. June 20-23 (2010) Helsinki, Finland (会場: ヘルシンキ大学)

[図書] (計 6 件)

1. 山本 博、久保田浩之、杉原崇大、山本靖彦: 糖化による疾患と抗糖化食品・素材 序編-2、1編-5、1編-12 2010年12月(株)シーエムシー出版

2. 竹田亮祐、宮森 勇、山本 博: 生命への鍵「ステロイド」-その研究に貢献した生化学者と臨床家たち- 2009年7月24日 (株)前田書店

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: esRAGE 過剰発現マウス

発明者: 渡邊琢夫、山本博、山本靖彦、棟居

聖一、杉原崇大、米倉秀人、櫻井繁

権利者: 国立大学法人金沢大学

種類: 特願

番号: 2009-120572

出願年月日: 平成 21 年 5 月 19 日

国内外の別: 国内

○ 取得状況 (計 3 件)

名称: 早期肺癌の術後予後検査方法

発明者: 久保裕司, 小林誠一, 鈴木 貴,

鈴木 聡, 石沢興太, 山本 博, 米倉秀人,
渡辺琢夫, 山本靖彦
権利者：国立大学法人金沢大学
種類：特許
番号：第 4779115 号
登録年月日：平成 22 年 7 月 15 日
国内外の別：国内

名称：アルツハイマー病の診断方法
発明者：山本 博, 米倉秀人, 渡邊琢夫,
山本靖彦, 常山幸一, 赤津裕康, 川口 誠,
三浦 裕
権利者：国立大学法人金沢大学
種類：特許
番号：第 4933159 号
登録年月日：平成 24 年 2 月 24 日
国内外の別：国内

名称：RAGEポリペプチドの新規用途
発明者：山本 博、米倉秀人、渡邊琢夫、山
本靖彦、原島 愛、唐澤忠宏、志村敏史
権利者：国立大学法人金沢大学
種類：特許
番号：第 4951755 号
登録年月日：平成 24 年 3 月 23 日
国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡邊 琢夫 (WATANABE TAKUO)
金沢大学・医学系・准教授
研究者番号：40303268

(2) 研究分担者

山本 博 (YAMAMOTO HIROSHI)
金沢大学・医学系・教授
研究者番号：00115198

棟居 聖一 (MUNESUE SEIICHI)
金沢大学・医学系・助教
研究者番号：10399040