

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 24 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861143

研究課題名(和文) 脳血管保護因子：内在性分泌型RAGEの機能解明と治療への応用

研究課題名(英文) Endogenous secretory RAGE as a potential protective factor against ischemic cerebrovascular diseases

研究代表者

清水 有 (Shimizu, Yu)

金沢大学・大学病院・医員

研究者番号：90646689

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：パターン認識受容体として知られる細胞表面一回膜貫通型受容体Receptor for Advanced Glycation End-products (RAGE)は、虚血性脳血管障害の神経細胞死に関わる。しかしRAGEには分泌型可溶性のスプライシングバリエーションが存在し、我々は内在性分泌型RAGE (endogenous secretory RAGE, esRAGE)と命名した。esRAGEは、膜型RAGEのデコイとして働き、脳虚血による神経細胞死を抑制した。また、esRAGEが血管内皮細胞の細胞表面のヘパラン硫酸プロテオグリカンと相互作用し、脳血管障害に対する保護因子として作用することを証明した。

研究成果の概要(英文)：Receptor for Advanced Glycation End-products (RAGE) is a pattern-recognition receptor and plays a role in the development of neuronal cell death during and after brain ischemia. RAGE has a splicing variant form, which is soluble and named as endogenous secretory RAGE (esRAGE). esRAGE is considered to work as a decoy-type receptor and attenuate ischemia-induced neuronal cell damages. In this study, we proved that esRAGE can be associated with heparan sulphate proteoglycans (HSPG) on brain endothelial cells and act as a potential protective factor against the ischemic cerebrovascular diseases.

研究分野：脳神経外科

キーワード：esRAGE 神経細胞死 パラバイオーシス 血液脳関門

1. 研究開始当初の背景

虚血性脳血管障害が生じると神経細胞が脱落し、生活に支障を来す後遺症が残る。実験的にも、両側の総頸動脈を一時的に閉塞したモデルにおいて、脳梗塞巣が生じなくても、3-4 日後に遅発性に神経細胞死が起こる現象が報告されている。つまり、ごく軽度の脳虚血においても神経細胞数の減少と機能障害が生じうる

このような遅発性神経細胞死のメカニズムにはさまざまな説がある。内皮障害による血管障害、炎症細胞の浸潤、グリア細胞の活性化、そして、それらに伴う炎症によりニューロンが様々なストレスを受け最終的に神経細胞死が生じると考えられている。つまり、血管保護因子の補充などによって血管内皮細胞を保護することは神経細胞死の抑制・軽減に繋がる可能性があると考えられる。ここで、我々は RAGE に注目した。Receptor for Advanced Glycation End-products (RAGE) は血管内皮細胞・炎症細胞にも発現し、炎症・動脈硬化・糖尿病血管合併症など血管障害性の膜型・シグナル伝達型受容体として知られている。このような血管障害性の膜型 RAGE にはスプライシングバリエーションで、分泌性可溶性になる endogenous secretory RAGE、以下 esRAGE が存在することが分かり、RAGE のデコイ受容体として、様々な血管障害に対して保護的に働く因子であると考えられている。

2. 研究の目的

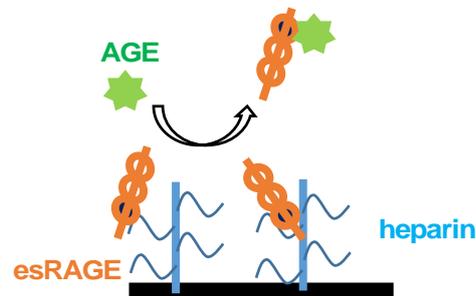
パターン認識受容体として知られる細胞表面一回膜貫通型受容体 Receptor for Advanced Glycation End-products (RAGE) は、脳血管障害による脳虚血時の神経細胞死に重要な役割を果たすことが知られている。RAGE には RNA スプライシングバリエーションが存在し、なかでも内在性分泌型 RAGE (endogenous secretory RAGE, esRAGE) は膜型 RAGE に対するデコイ型受容体として働く。esRAGE は細胞外に分泌され、脳虚血による神経細胞死を抑制する脳保護因子である可能性がある。本研究では、esRAGE が血管内皮細胞の細胞表面のヘパラン硫酸プロテオグリカンと相互作用して存在し、虚血性脳血管障害に対する防御・保護因子として機能的に作用していることを検証する。

3. 研究の方法

脳梗塞、遅発性神経細胞死の軽減に関して、血管内皮保護因子と考えられる esRAGE の神経細胞保護因子としての有効性を検討する。実験方法としては、esRAGE が血管内皮細胞表面のヘパラン硫酸プロテオグリカンと結合して血管内皮細胞表面に存在していることや、血管内皮細胞をこえて脳実質へ移行するかどうかの確認、パラバイオシスと esRAGE 投与を用いた脳虚血モデル(BCCAO モデル、MCAO モデル)の作成、esRAGE の有効性の検討を行った。

4. 研究成果

(1) プラスチックプレート上にヘパリンを結合させ、その後 50 ng/ml の濃度の精製レコンビナントヒト esRAGE と RAGE リガンドとして知られている advanced glycation end-products、AGE を同時に加えアッセイを行った。まず、esRAGE 単独投与では esRAGE のシグナルが検出され、非糖化のコントロールである BSA 添加では変化がみられなかったが、3 種類の AGE-BSA の添加によって濃度依存的にそのシグナルの低下が観察された。つまり、esRAGE の V ドメイン(AGE の結合サイトとしても知られている)でヘパリンとも結合していると考えられる。



(2) 次に、ヒトの脳血管内皮培養細胞を用いて実験を行った。まず、培養細胞にヘパリンを加えることで、培養上清中の esRAGE 濃度の上昇することを観察した。次に培地中に精製レコンビナントヒト esRAGE タンパクを添加し、十分洗浄後、ヘパリンを同様に培地中に加えることで、より培養上清中の esRAGE 濃度の上昇し、ヘパリンを分解するヘパリチナーゼ処理によって esRAGE 濃度の上昇を確認した。esRAGE を緑のシグナルで表した場合、esRAGE を添加し、内皮細胞表面に esRAGE を結合させた後に培地で洗浄、その後ヘパリンを加えることで細胞表面上の緑のシグナルが著明に減少することを確かめることで、esRAGE が内皮細胞表面上に結合して存在し、ヘパリンによってリリースされる現象が起きていることが確認した。このことにより esRAGE は血管内皮細胞表面のヘパラン硫酸プロテオグリカンに結合して血管内皮細胞表面に存在していることが示唆された。

(3) 2匹のマウスの腹膜・皮膚をつなぎ合わせ血流を循環させるモデルであるパラバイオーシスを行った後、BCCAOモデルを作成した。7日後に脳を取り出し海馬のCA1領域を観察した。ニッスル染色を行うと、esRAGE過剰発現マウスとパラバイオーシスしたWTマウスは、WTマウスとパラバイオーシスしたWTマウスに比べ神経細胞死が抑制されていた。また、タネル染色を行い、同部位のアポトーシスした細胞の数を計測すると、esRAGE過剰発現マウスとパラバイオーシスしたWTマウスは、WTマウスとパラバイオーシスしたWTマウスに比べ優位にアポトーシスが抑制されていた。これにより、esRAGEは神経細胞保護効果があることが証明された。

(4) esRAGEタンパクが実際に血管内皮細胞表面に存在しているかどうかを確かめるために、還流固定後、BCCAOを行う前に、脳を摘出し、esRAGEの免疫蛍光染色をヒトesRAGE特異抗体を用いて行った。WTマウス-WTマウスの組み合わせの陰性コントロールではシグナルは全く観察されず、陽性コントロールであるesRAGE Tgマウスの海馬CA1領域の血管では陽性シグナルが観察され、esRAGE過剰発現マウスとパラバイオーシスしたWTマウス、RAGEノックアウトマウスにおいてもesRAGEタンパクが脳血管内皮細胞上に存在した。次に、海馬の神経細胞を観察すると、esRAGE過剰発現マウスとパラバイオーシスしたWTマウスではシグナルが観察されたがRAGEノックアウトマウスでは神経細胞周囲にシグナルは検出されなかった。これは、esRAGEが血管内皮細胞の血液脳関門を通過して神経細胞周囲に到達するためにRAGEが重要な役割を果たしているのではないかと考え次の実験を行った。

(5) 内皮細胞、ペリサイト、アストロサイトで構成された血液脳関門キットを用いて実験を行った。キットの脳側にesRAGEを添加し、RAGEの発現の有無で血液脳関門を通過し血管側へ移行するesRAGEの量が変化するかどうか調べた。内皮細胞のRAGEをsiRNAでノックダウンさせた群では血管側への移行は確認できなかったが、RAGEが発現しているコントロール群ではesRAGEが移行していることが確認された。これにより、esRAGEの血液脳関門通過にはRAGEが重要な役割を果たしているのではないかということが示唆された。

(6) 今後、esRAGEの血液脳関門通過におけるRAGEの働きについてさらに研究を重ねていく予定である。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 8 件)

1. 清水 有 脳虚血において内在性分泌型 RAGE はデコイ受容体として機能し神経細胞を保護する 第 16 回日本加齢医学会総会優秀演題賞講演 2016 年 6 月 11 日 パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

2. 清水 有 内在性分泌型 RAGE の虚血性神経細胞死抑制効果の検討 第 34 回日本生化学会北陸支部会 2016 年 5 月 28 日 金沢大学(石川県・金沢市)

3. 清水 有 内在性分泌型 RAGE は脳虚血から神経細胞を保護する 第 30 回糖尿病合併症学会 2015 年 11 月 28 日 ウィンク愛知(愛知県・名古屋市)

4. 清水 有 内在性分泌型 RAGE は血液脳関門を越えて神経細胞を保護する 第 24 回日本メイラード学会 2014 年 11 月 7 日 熊本市国際交流会館(熊本県・熊本市)

5. 清水 有 内在性分泌型 RAGE は血管脳関門を越えてデコイ受容体としての神経細胞保護作用を発揮する 第 87 回日本生化学会総会 2014 年 10 月 18 日 京都国際会議場(京都府・京都市)

6. 清水 有 脳血管保護因子としての内在性分泌型 RAGE の機能解明 脳幹合同セミナー 2014 年 8 月 31 日 金沢大学(石川県・金沢市)

7. 清水 有 脳血管保護因子としての内在性分泌型 RAGE の機能解明 第 23 回日本メイラード学会 2013 年 11 月 29 日 ナレッジキャピタル コングレコンベンションセンター(大阪府・大阪市)

8. 清水 有 内在性分泌型 RAGE の脳血管保護因子としての機能と解明 第 86 回日本生化学会総会 2013 年 9 月 13 日 パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：

取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清水 有 (Shimizu, Yu)
金沢大学・附属病院・医員
研究者番号：90646689

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：