

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09443

研究課題名(和文) 終末糖化産物受容体によるグルココルチコイド代謝・作用調節とその機序の解明

研究課題名(英文) RAGE of adrenocortical cell accelerates corticosterone production in mice

研究代表者

庄司 拓仁 (SHOJI, TAKUHITO)

兵庫医科大学・医学部・講師

研究者番号：40624044

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、終末糖化産物受容体(RAGE)が生理的役割としてHPA axisに関与するという仮説を提唱し、RAGEを介したコルチコステロン(CS)産生・分泌に関し、その機序を含めて解析した。野生型マウス(WT)では副腎皮質にRAGE発現を認めた。WTと比較して、RAGE欠失マウスでは、副腎重量は有意に大きく、副腎皮質細胞腫大が認められ、蓄尿中CS量、およびLipopolysaccharide (LPS) 負荷後の血清CS濃度は有意に低値であった。副腎皮質Y-1 cellを用いた実験系では、LPSによるCS産生・分泌増加にRAGEが関連し、このシグナル伝達系としてERKシグナルの関与が考えられた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined the involvement of receptor for advanced glycation end products (RAGE) in hypothalamic-pituitary-adrenal axis. In vivo, adrenal gland of Ager $-/-$ mice was significantly heavier than that of Ager $+/+$ mice though without significant differences in body weight. Histological examination showed that RAGE was exclusively expressed in adrenocortical cells, and that adrenocortical cells in Ager $-/-$ mice exhibited hypertrophic change as compared with those in Ager $+/+$ mice. The amount of corticosterone in 24-hour urine in Ager $-/-$ mice was significantly less than that in Ager $+/+$ mice. Changes in serum corticosterone concentration following lipopolysaccharide (LPS) injection serum corticosterone concentration of Ager $-/-$ mice were significantly lower than those of Ager $+/+$ mice. In vitro, RAGE expressed in adrenocortical cell appears to accelerate LPS-induced corticosterone production in mouse, where ERK 1/2 MAP kinase signaling may partly play a role.

研究分野：医学

キーワード：RAGE 副腎皮質 コルチコステロン 炎症 LPS

1. 研究開始当初の背景

(1) グルココルチコイドはその不足状況下では副腎不全、過剰状況ではクッシング徴候を呈するため、グルココルチコイド代謝調節は、生物が生存するために極めて重要である。

(2) グルココルチコイドの産生・分泌機序は今なお不明な点が多く、解明が待ち望まれている。またこの機序への炎症機転との関連は特に不明である。

2. 研究の目的

(1) 近年 TNF α や IL-6 など、炎症性サイトカインによるグルココルチコイド産生・分泌が注目されてきており、この作用機序として TLR2 や TLR4 の関与が報告されている。しかし、現在まで終末糖化産物受容体 (Advanced Glycation End-products (RAGE)) が関与するとの報告は全くない。本研究では RAGE がグルココルチコイドの産生・分泌に関与するという仮説を提唱し、その機序を検討する。

3. 研究の方法

(1) 副腎における RAGE の発現とグルココルチコイドの基礎分泌との関連

(2) 炎症性刺激に対するグルココルチコイド産生・分泌に対する RAGE の関与

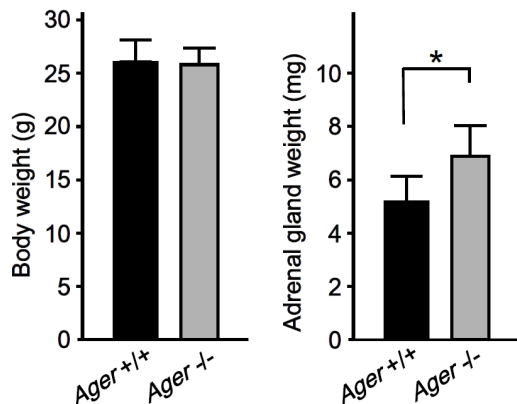
(3) 副腎皮質細胞におけるグルココルチコイド産生・分泌にかかわる RAGE シグナル伝達系の解明

の3点に関し、in vivo マウス実験系 (RAGE 野生型マウスと RAGE 欠失マウス) として LPS 負荷マウスモデル、in vitro 細胞実験系 (マウス副腎皮質細胞 Y-1 cell) としてアデノウイルスを用いて Lac-Z / RAGE の強制発現を行った後に、LPS 10 ng/mL を添加した。

4. 研究成果

(1) RAGE 野生型マウスと比較して RAGE 欠失マウスの副腎重量は有意に大きい

In vivo 実験では、12 週齢の マウスで実験を行った。野生型マウスと比較して RAGE 欠失マウスは、副腎重量は有意に大きく (RAGE KO 副腎: 6.7 \pm 0.37mg、RAGE WT 副腎: 4.9 \pm 0.26mg、p < 0.01) この差

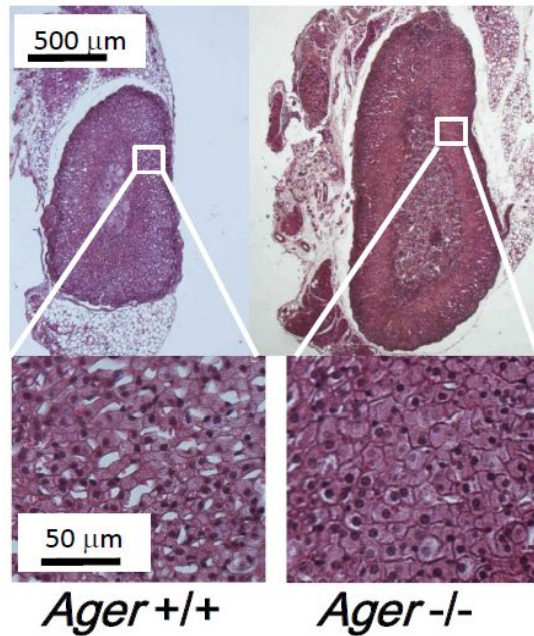


は体重で補正しても同様であった。(RAGE WT 0.19 \pm 0.01 (mg Adrenal/g BW), RAGE KO: 0.26 \pm 0.02 (mg Adrenal/g BW), P < 0.01)

(2) RAGE 蛋白質は副腎皮質細胞に発現を認める

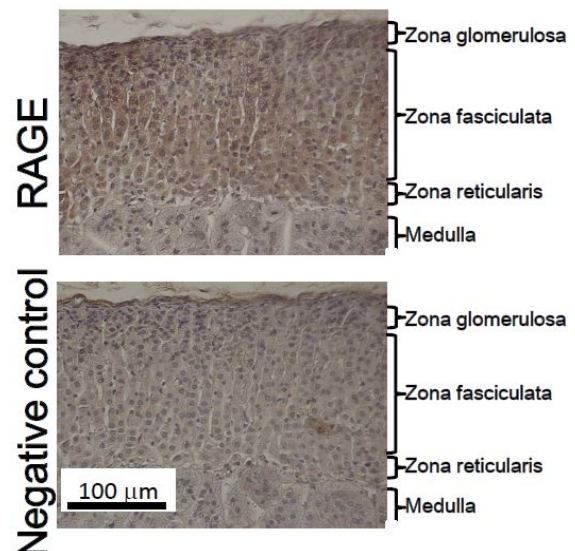
RAGE 野生型マウスと比較して RAGE 欠失マウスでは副腎皮質細胞の腫大が認められた。

H&E staining

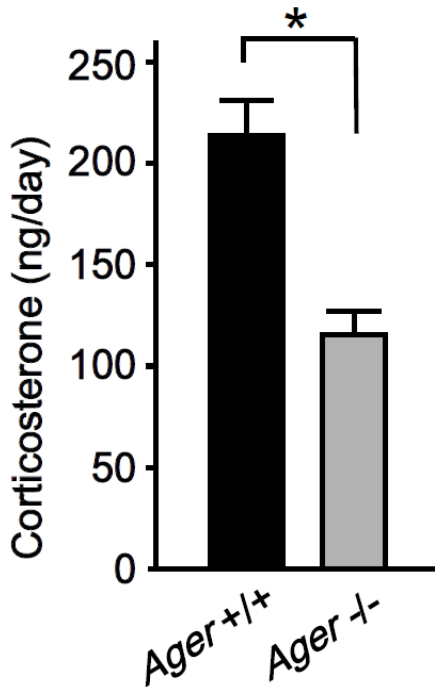


また、RAGE 野生型マウス副腎では、副腎皮質で RAGE 蛋白質の発現を認めた。副腎皮質は球状層・束状層・網状層の 3 層に分かれるが、RAGE 蛋白質は 3 層いずれにも存在することが示唆された。

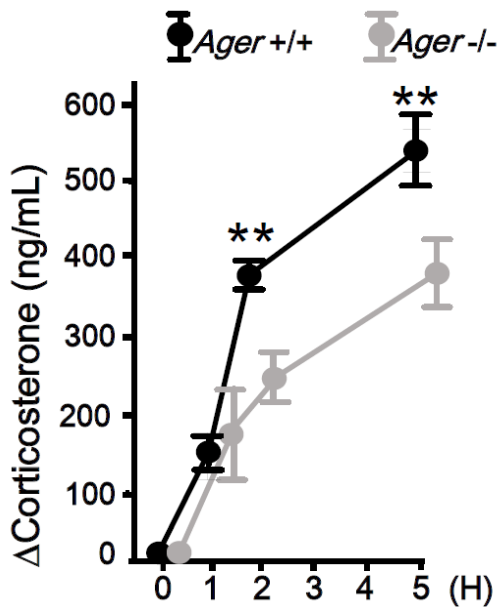
Ager^{+/+}, Adrenal gland



(3) RAGE 野生型マウスと比較して RAGE 欠失マウスのコルチコステロン産生量は有意に少ない
 RAGE 野生型マウスと比較して RAGE 欠失マウスの1日尿中コルチコステロン量は、有意に低値であった。(RAGE KO: 114.2 ± 12.3 ng/日、RAGE WT: 217.5 ± 19.5 ng/日、 $p < 0.01$)



さらに Lipopolysaccharide (LPS) 負荷試験での血清 CS 濃度は、野生型マウスと比較して、RAGE 欠失マウスは有意に低値であった。



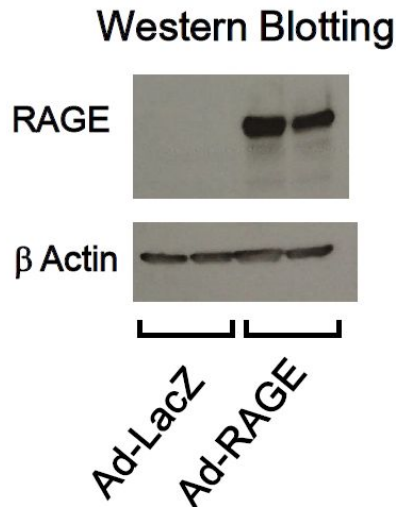
(4) RAGE 野生型マウスと RAGE 欠失マウスのステロイドホルモン合成にかかわる遺伝子発現
 副腎 RNA を用いた Real time-PCR では、ステロイドホルモン合成にかかわる StAR,

CYP11A1, HSD3B1, POR, CYP11B1 では有意差を認めなかった。

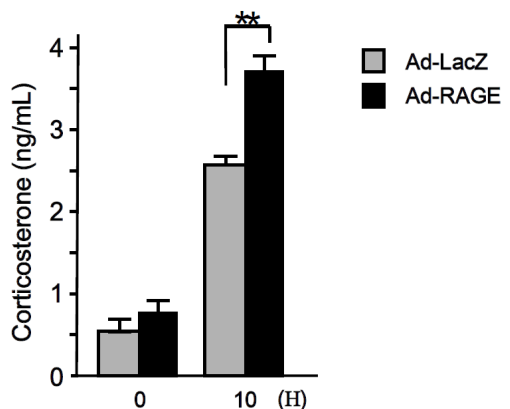
Gene expression of the steroidogenic genes in adrenal glands (%)

	Ager +/+	Ager -/-
18S	100.0 ± 3.4	104.1 ± 3.1
StAR/18S	100.0 ± 5.9	87.2 ± 8.2
CYP11A1/18S	100.0 ± 3.6	95.4 ± 5.1
HSD3B1/18S	100.0 ± 4.7	96.2 ± 6.1
POR/18S	100.0 ± 7.4	89.0 ± 6.1
CYP11B1/18S	100.0 ± 5.2	92.2 ± 4.0

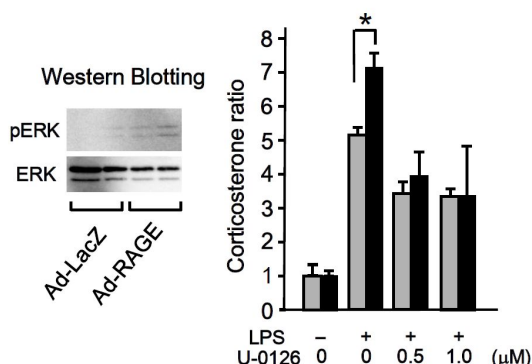
(5) RAGE は LPS 誘発性コルチコステロン産生を増加させる
 マウス副腎皮質細胞 Y-1 cell にアデノウイルスを用いて Lac-Z / RAGE(20 MOI)の強制発現を行い、RAGE 蛋白の発現の確認を Western Blotting で行った。



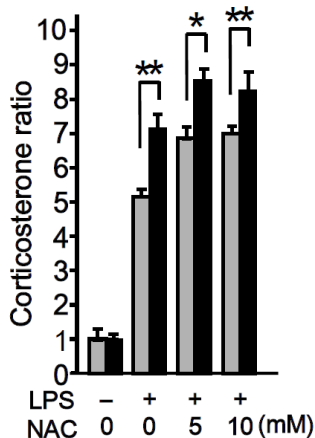
アデノウイルスを用いて Lac-Z / RAGE の強制発現を行った後に、LPS 10 ng/mL を添加した。LacZ 群強制発現と比較して、RAGE 強制発現群ではコルチコステロン濃度の有意な増加を認めた。



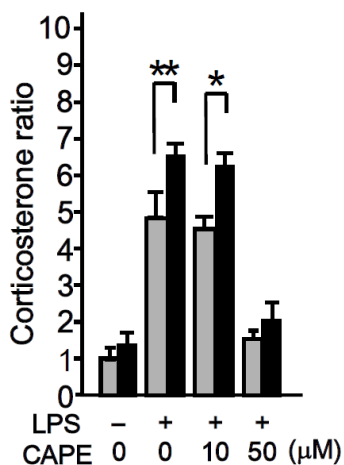
(6) ERK 阻害は RAGE による LPS 誘発性コルチコステロン産生増加をブロックする



(7) NF-κB 阻害は RAGE による LPS 誘発性コルチコステロン産生増加をブロックしない



(8) 抗酸化剤は RAGE による LPS 誘発性コルチコステロン産生増加をブロックしない



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 1 件)

庄司拓仁、小山英則 他 マウス副腎の終末糖化産物受容体(RAGE)はコルチコステロン分泌に關与する 第 90 回 日本内分泌学会学術総会 (ポスター) 2017.

〔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

庄司 拓仁 (SHOJI, Takuhito)
 兵庫医科大学・医学部・講師
 研究者番号：40624044

(2) 研究分担者

小山 英則 (KOYAMA, Hidenori)
 兵庫医科大学・医学部・教授
 研究者番号：80301852

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

門田 真砂世 (MONDEN, Masayo)