

令和 2 年 4 月 21 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09646

研究課題名(和文) COPD肺組織修復における終末糖化産物受容体(RAGE)の機能

研究課題名(英文) The Role of Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE) in Lung Fibroblast repair function

研究代表者

伊狩 潤 (Ikari, Jun)

千葉大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：50734604

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)：肺線維芽細胞の遊走は肺組織修復に重要だが、COPDでは低下している。近年、RAGEのCOPD病態への関与が示唆されている。本研究では、RAGEの肺線維芽細胞遊走能における機能を検討した。RAGEリガンド(HMGB1、S100A12、CML)存在下で、ヒト肺線維芽細胞(HFL-1)の遊走能を、ケモタキシスアッセイ法により解析した。HMGB1はHFL-1遊走能を亢進する一方、S100A12は抑制した。HMGB1の効果はRAGE非依存的で、S100A12の効果はRAGE、p38-MAPK依存的であった。S100A12-RAGE-p38-MAPK経路はCOPD修復異常の一因を担う可能性が示唆される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

RAGEは新規バイオマーカーとして注目を集めており、その機能を明らかにする事は新たなCOPDの診断法や治療への展開が期待できる。これまで、申請者はCOPD修復メカニズムの異常に着目した研究を行ってきた。組織修復の観点から治療を探索することは既に疾患が進行したCOPD患者の治療や疾患の進展抑制に資する可能性がある。我々の知る限りRAGEのCOPD肺組織修復メカニズムへの関与を実証した研究は認めず、本研究の成果と考える。本研究により、RAGEのCOPD組織修復への関与が明らかになり、S100A12-RAGE-p38経路制御による肺組織修復異常の制御を介した新規COPD治療の基盤になる成果と考える。

研究成果の概要(英文)：The migration of lung fibroblasts plays a pivotal role in wound repair and fibrotic processes in the lung. Although the receptor for advanced glycation end products (RAGE) has been implicated in the pathogenesis of lung diseases, its role in lung fibroblast migration is unclear. The current study examined the effect of three different RAGE ligands, namely, HMGB1, S100A12, and CML, on human lung fibroblast (HFL-1) migration. HMGB1 augmented, whereas S100A12 inhibited. CML did not affect HFL-1 migration. The effect of HMGB1 was not through RAGE. However, the effect of S100A12 was mediated by RAGE. Moreover, S100A12 mediated HFL-1 migration through p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK). In conclusion, S100A12 inhibits lung fibroblast migration via RAGE-p38 MAPK signaling. This pathway could represent a therapeutic target for pulmonary conditions characterized by abnormal tissue repair and remodeling.

研究分野：慢性閉塞性肺疾患、気管支喘息、間質性肺炎

キーワード：COPD RAGE 肺線維芽細胞 遊走能 組織修復 S100A12 p38

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

慢性閉塞性肺疾患 (COPD) は喫煙を主因とする進行性気流障害をきたす疾患で、2020 年までに世界の死因第 3 位になると予測されることから、新たな治療法の開発は喫煙の課題である。近年、終末糖化産物受容体 (receptor for advanced glycation end-products, RAGE) の遺伝子多型が COPD 患者の呼吸機能と関連することが報告された (Hancock et al. Nat Genet, 2010)。また、大規模臨床試験において COPD 患者血清中の可溶性 RAGE (sRAGE) 濃度が気流閉塞や肺気腫と逆相関する事や、患者肺において RAGE の発現が著明に増加していることが明らかになった (Cheng et al. Am J Respir Crit Care Med. 2013, Yonchuk et al. Am J Respir Crit Care Med 2015)。COPD の一因として、肺組織修復能の低下が考えられている。肺線維芽細胞は、細胞外マトリックスの産生等を介して組織修復を促進し、肺組織の恒常性維持に極めて重要な役割を果たす (Tuder et al. Proc Am Thorac Soc, 2006)。Togo らは、COPD において肺線維芽細胞の組織修復能 (遊走能) が低下し、気流閉塞と関連することを報告した (Togo et al. Am J Respir Crit Care Med 2008) 以上より COPD では、肺線維芽細胞の機能変容が組織修復能低下の一因と推測される。しかしながら、これまで、COPD における RAGE の役割、特に肺線維芽細胞の組織修復能における役割は不明である。

### 2. 研究の目的

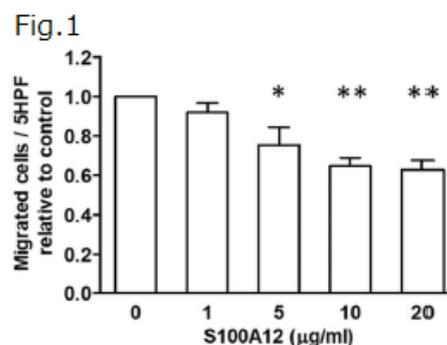
我々は、遺伝素因や喫煙暴露により増強した RAGE シグナルが肺線維芽細胞の組織修復能を抑制し、COPD を進展する可能性を着想した。本研究では、RAGE の肺組織修復 (遊走能) における役割を解析し、COPD 病態生理解明、治療応用の基盤となる基礎的研究を行うことを目的とした。具体的には RAGE の肺線維芽細胞組織修復能における生理的な役割とその分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

本研究では RAGE シグナルの肺線維芽細胞修復メカニズムにおける生理機能の解析を行った。In vitro でヒト肺線維芽細胞 (HFL-1) 細胞を、10cm dish に  $1 \times 10^6$  個播種し (day0)、Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)、10% ウシ血清 (FBS) 存在下で培養した。Day2-4 各日に Trypsin EDTA により細胞を剥離し DMEM に回収した。HFL-1 細胞の遊走能を Boyden blind well chamber technique を用いて評価した。Chamber 上段には HFL-1 細胞 ( $5 \times 10^5$  /ml) と COPD との関連が報告されている RAGE リガンド各種 (HMGB1、A100A12、CML) を加え、chamber 下段には遊走因子としてファイブロネクチン ( $5 \mu\text{g/ml}$ ) を使用し、6 時間後のチャンバー下段への HFL-1 細胞の遊走能を評価した。なお、全ての実験において HFL-1 細胞は passage 13-20 の間で使用した。まず、HFL-1 細胞を、複数の RAGE リガンド (アミロイド  $\beta$  蛋白、S100 蛋白、HMGB-1 等) の存在下で培養し、細胞遊走能 (ケモタキシスアッセイ) を評価した。上記解析結果が RAGE シグナル依存性であることを RAGE 受容体の阻害実験 (阻害抗体) により検証した。一部の RAGE リガンドは Toll 様受容体 4 (TLR4) も刺激するため、TLR4 の阻害実験も並行した。RAGE の下流には NF- $\kappa$ B、MAPK、などの転写因子があり、これらの阻害薬を用いて修復能に関連する分子を同定した。また、組織修復に重要なシグナル伝達因子である PKA、COX、PTEN 等の経路と RAGE シグナルとの関係も同時に解析した。また、ウェスタンブロットにより、S100A12 による p38 リン酸化の有無を解析した。

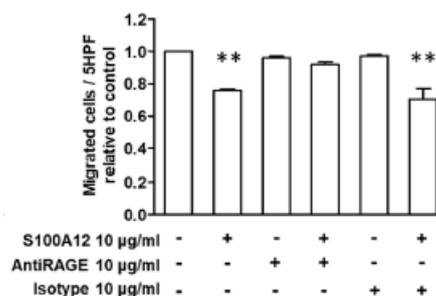
### 4. 研究成果

- ① まず複数の RAGE リガンドを用いて、HFL-1 細胞遊走における RAGE シグナルの作用を検討した。その結果、HMGB1 は濃度依存性に HFL-1 の遊走能を亢進する一方、S100A12 は HFL-1 の遊走能を抑制した (Fig. 1)。また、その効果は刺激後 3 時間で認められた。CML は遊走能に影響を与えなかった。以上より、RAGE リガンドによる HFL-1 細胞遊走能への効果は RAGE リガンドの種類により、異なることが明らかになった。



② 次に、①で認められた効果が、RAGE を介した  
ものか検討した。抗 RAGE 抗体 (中和抗体) を  
用いた検討では、HMGB1 による遊走増強効果は  
不変であったが、S100A12 による遊走抑制効果  
は有意に減弱した (Fig. 2)。TLR4 阻害薬を用  
いて同様の検討を行ったが、S100A12 による遊  
走抑制効果に変化を認めなかった。以上より、  
HMGB1 による遊走増強効果は RAGE 非依存性で  
あるが、S100A12 による遊走抑制は RAGE 依存  
的であることが明らかになった。

Fig. 2

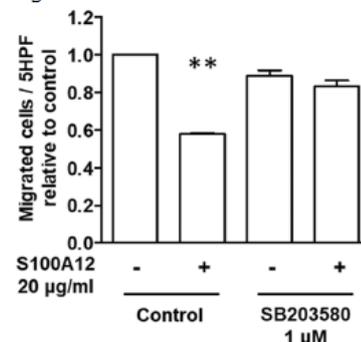


③ 次に、S100A12 による抑制効果の機能的メカニ  
ズムの解析を行った。まず、S100A12 自身による chemoattractant としての作用を検討した。

Boyden chamber の下層に S100A12 のみを加え遊走能を解析したところ、HFL-1 細胞の遊走は  
生じず、chemoattractant 作用は認めなかった。一方、ファイブロネクチン、S100A12 の両  
者を下層に加えると、S100A12 は遊走を有意に抑制した。以上より、S100A12 の遊走抑制効  
果は、chemotaxis、chemokinesis の片方もしくは両者を介した作用と考えられた。また、細  
胞遊走には細胞内アクチンフィラメント重合が重要であり、F-アクチン免疫染色により細胞  
内アクチンフィラメントの重合を評価したが、S100A12  
投与は、影響を与えず、遊走抑制効果はアクチンフィラ  
メント重合抑制による作用ではないと考えられた。

④ 次に S100A12 の作用機序について RAGE 下流シグナルの  
検討を行った。RAGE 下流シグナルの代表的な転写因子  
に NF-κB、p38 MAPK が知られており、両阻害薬を用い  
て、遊走能を検討した。結果、NF-κB 阻害剤では遊走  
能は変化しなかったが、p38 MAPK 阻害薬 (SB203580) 投  
与時に S100A12 による抑制効果が減弱した (Fig. 3)。  
また、一般的に肺線維芽細胞遊走に関わるとされる PKA、  
PTEN、COX 経路を同様に阻害したが、S100A12 による遊  
走抑制効果は不変であった。Western blot の検討では、  
S100A12 はファイブロネクチンによる p38 MAPK リン酸化を有意に増強し、S100A12 の遊走抑  
制作用には p38 を介したシグナル伝達が重要と考えられた。

Fig. 3



我々が知る限り、これまで複数の RAGE リガンドの肺線維芽細胞遊走能における効果を比較検  
討した研究はなく、S100A12 のみが RAGE 依存性に遊走能を抑制したことを示した点は当研究の  
新規性である。また、過去に RAGE シグナルと細胞遊走を検討した報告が散見されるが、いずれ  
も Wound closure assay を用いており、細胞増殖の影響が除外できない点が問題であった。今  
回、我々が用いた Boyden chamber assay は細胞増殖の影響がほぼなく、RAGE シグナルの細胞遊  
走への効果をより特異的に検証することができた。また、その生理的な遊走能抑制メカニズムは  
chemokinesis、chemotaxis であることも初めて実証した。さらに本研究では、その分子メカニ  
ズムを明らかにした。p38-MAPK は RAGE の下流シグナルとしてよく知られているが、肺線維芽細胞  
における役割は十分に分かっていなかった。RAGE リガンドである S100A12 は濃度依存的に肺線  
維芽細胞の遊走を抑制し、S100A12 の遊走抑制は RAGE-p38 MAPK 経路を介して起こることを明ら  
かにした。

本研究の成果は呼吸器疾患の病態解明に寄与するものと考えられる。COPD では S100A12、RAGE と  
もに上昇しており、さらに肺線維芽細胞の遊走能が低下している。また COPD では p38 の活性化  
も生じている。よって、本研究の結果から RAGE 経路活性化が COPD 肺線維芽細胞組織修復能低下  
を引き起こしていることが推測できる。一方、肺線維症患者では RAGE 発現は低下し、肺線維芽  
細胞遊走能は上昇している。よって、RAGE 経路の低下が肺線維芽細胞の過剰な組織修復を誘発  
していることが推測できる。RAGE の呼吸器疾患における役割は不明であったが、その機能解明  
の礎となる成果が得られたと考えられる。

本研究の限界として、一種類の肺線維芽細胞での検討であることが挙げられる。将来的には  
primary adult lung fibroblast を用いた再現性の検討や COPD、IPF 患者肺線維芽細胞など患者  
肺組織を用いた検討が必要と考える。

以上より、本研究は、S100A12 は RAGE-p38 MAPK 経路を通じ肺線維芽細胞の遊走を抑制するこ  
とを明らかにし、COPD の組織修復異常に RAGE が関与している可能性を示した。組織修復の破綻  
は肺気腫形成と関連することから、RAGE シグナルの制御は COPD の新規治療標的になる可能性が  
ある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

|  |                       |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名<br>Nozomi Tanaka, Jun Ikari, Rie Anazawa, Masaki Suzuki, Yusuke Katsumata, Ayako Shimada, Eiko Suzuki, Yukiko Matsuura, Naoko Kawata, Yuji Tada, Koichiro Tatsumi | 4. 巻<br>8             |
| 2. 論文標題<br>S100A12 inhibits fibroblast migration via the receptor for advanced glycation end products and p38 MAPK signaling.  | 5. 発行年<br>2019年       |
| 3. 雑誌名<br>In Vitro Cell Dev Biol Anim.   | 6. 最初と最後の頁<br>656-664 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1007/s11626-019-00384-x  | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）  | 国際共著<br>-             |

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>伊狩 潤、田中望未、巽 浩一郎   |
| 2. 発表標題<br>肺線維芽細胞組織修復機構における advanced glycation endproducts receptor (RAGE) の役割 |
| 3. 学会等名<br>第60回日本呼吸器学会学術講演会（招待講演）  |
| 4. 発表年<br>2020年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>田中 望未、伊狩 潤、穴澤 梨江、鈴木 優毅、勝俣 雄介、島田 絢子、松浦 有紀子、川田 奈緒子、多田 裕司、巽 浩一郎 |
| 2. 発表標題<br>肺線維芽細胞遊走能における終末糖化産物受容体 (RAGE) の役割                            |
| 3. 学会等名<br>第58回日本呼吸器学会学術講演会   |
| 4. 発表年<br>2018年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>N. Tanaka, J. Ikari, R. Anazawa, M. Suzuki, Y. Katsumata, A. Shimada, Y. Matsuura, N. Kawata, Y. Tada, K. Tatsumi |
| 2. 発表標題<br>The Role of Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE) in Fibroblast Chemotaxis                          |
| 3. 学会等名<br>American Thoracic Society International Conference 2018（国際学会）   |
| 4. 発表年<br>2018年  |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|               | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                  | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)                     | 備考 |
|---------------|--|---|----|
| 研究<br>分担<br>者 | 多田 裕司<br><br>(Tada Yuji)<br><br>(50344990) | 千葉大学・大学院医学研究院・特任教授<br><br><br><br>(12501) |    |