

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：34519

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16248

研究課題名(和文) RAGEによる視床下部の炎症調節機構とそれに伴う摂食、代謝への影響の解明

研究課題名(英文) Effect of RAGE on feeding and metabolism by the inflammation regulation mechanism of the hypothalamus

研究代表者

小西 康輔 (Konishi, Kosuke)

兵庫医科大学・医学部・講師

研究者番号：90532367

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：終末糖化産物(advanced glycation end-products, AGE)受容体であるRAGE(receptor for AGE)は炎症のメディエーターとして働き、血管内皮炎症、糖尿病、肥満、脳内炎症との関与が報告されている。今回、我々が報告した、血管内皮細胞におけるRAGEおよび可溶性RAGE(sRAGE)と炎症シグナルの制御機構の研究成果は『RAGEおよびその切断機序が視床下部の炎症を調節することにより、摂食行動、基礎代謝バランスの攪乱に関与し、肥満・糖尿病の発症に関与する』という仮説を支持する結果と考える。

研究成果の学術的意義や社会的意義

終末糖化産物(advanced glycation end-products, AGE)受容体であるRAGE(receptor for AGE)は炎症のメディエーターとして働き、血管内皮炎症、糖尿病、肥満の病態に関与する。今回、我々が報告した、血管内皮細胞におけるRAGEおよび可溶性RAGE(sRAGE)と炎症シグナルの制御機構の研究成果を踏まえると、RAGEおよびその切断機序が脳内炎症の調節を介して、摂食行動、基礎代謝バランスの攪乱に関与し、肥満・糖尿病の発症に関与する可能性が示唆される。今回の成果は、慢性疾患における脳内炎症のメカニズムの解明とその予防戦略の構築に寄与できると考える。

研究成果の概要(英文)：RAGE(receptor for advanced glycation end-products, AGE) acts as a mediator of inflammation and has been reported to be associated with vascular endothelial inflammation, diabetes, obesity and intracerebral inflammation. We reported the results of research on RAGE and soluble RAGE (sRAGE) and inflammatory signal control mechanism in vascular endothelial cells. It supports the hypothesis that "RAGE and its shedding regulate inflammation of the hypothalamus and are involved in the development of obesity and diabetes through feeding behavior and basal metabolic balance."

研究分野：糖尿病

キーワード：RAGE esRAGE 脳内炎症 肥満

1. 研究開始当初の背景

生体の摂食行動とエネルギーバランスは、主に脳視床下部において調節され、肥満の病因における視床下部炎症の意義が注目されている。げっ歯類においては、2-4週間の高脂肪食負荷により視床下部における astrocyte、microglia の増加を伴う炎症性変化が認められ、同様の変化はヒトの肥満との関連が報告されている⁽¹⁾。一方、終末糖化産物の受容体 (RAGE) は炎症シグナルとも深く関連し、RAGE が Toll-like receptor 2 との相互作用により、肥満、インスリン抵抗性、メタボリックシンドロームとの関連があることも報告されている⁽²⁾。RAGE は細胞表面で切断されることが知られており、切断により放出された可溶性 RAGE (soluble RAGE, sRAGE) の濃度の低下は冠動脈疾患、総死亡、糖尿病の発症のリスクファクターとして注目されている。RAGE は血管内皮細胞だけでなく、脳組織においてもアストロサイトやミクログリアに多量に発現⁽³⁾⁽⁴⁾しているが RAGE と視床下部炎症の関連は検討されていない。

2. 研究の目的

「RAGE およびその切断機序が視床下部の炎症を調節することにより、摂食行動、基礎代謝バランスの攪乱に関与し、肥満・糖尿病の発症に関与する」という仮説を検証し、その病態機序を明らかにすることである。本研究により、視床下部における RAGE 調節機序とその視床下部炎症、摂食行動、基礎代謝における意義や、糖尿病・肥満など代謝疾患の予防の関連に迫ることを目的としている。

3. 研究の方法

(1) 血管内皮細胞における RAGE 切断のメカニズムの検討

①ヒト微小血管内皮細胞 (HMVEC) およびヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) にアデノウイルスを用いてヒト RAGE、または対照として β -galactosidase を過剰発現させた。TNF α 投与後 24 時間で medium と細胞を回収した。JNK、p38 MAP kinase、Erk、ATF4 の蛋白発現をウェスタンブロット法を用いて検討する。炎症反応 (TNF α) に対する metalloproteinase (MMP)-9 の遺伝子発現を real-time RT-PCR 法で、活性化を zymography により検討する。また、MMP-2, 9, a disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein (ADAM) 10, 17, ATF4 の発現を siRNA を用いてノックダウンし、RAGE 切断のメカニズムに関与するかを検討する。

②RAGE Tg/Tg マウス (7~12 週齢, homogeneous: Tg/Tg, heterogeneous: Tg/Wt) に対して、lipopolysaccharide (LPS) 1mg/kg BW を腹腔内投与し、2, 10, 24 時間に血清 TNF α と sRAGE 濃度を測定した。

(2) RAGE Tg/Tg マウスにおける高脂肪食負荷時の視床下部炎症の評価

準備実験により、高脂肪食飼育時に RAGE Tg/Tg マウスでは野生型と比較して、摂餌量が低下し視床下部領域のミクログリア活性化が抑制されることを見出しており、野生型または RAGE Tg/Tg マウスを通常食または高脂肪食により既報に基づいて飼育し⁽²⁾、摂餌量、体重、血糖、血

中インスリン、血中レプチンの測定と、パラホルムアルデヒド灌流固定後に脳組織を採取し、弓状核を中心とした視床下部領域の免疫組織学的解析を行う。免疫組織学的解析の標的は、ミクログリア(Iba1)、アストロサイト(GFAP)、RAGE、炎症性リガンド(TNF α 、M-CSF など)、炎症シグナル(p-JNK, c-Jun)、摂食調節にかかわる POMC・AgRP ニューロンとする。また、脳凍結組織を用いて、炎症性リガンド、炎症シグナルの遺伝子発現を real-time PCR 法により評価する。

(3) RAGE^{-/-}マウスにおける高脂肪食負荷時の視床下部炎症の評価

RAGE 発現のない RAGE^{-/-}マウスを用いて、①と同様の高脂肪食負荷による視床下部炎症惹起に対する RAGE の影響を検討する。

(4) esRAGE 発現アデノウイルスの脳室内投与による遺伝子導入マウスにおける評価

既報の RAGE⁽²⁾ 及び esRAGE 発現アデノウイルス⁽⁵⁾を、野生型および RAGE^{-/-}マウスの脳室内に投与し、脳組織特異的に RAGE, sRAGE を過剰発現するモデルマウスを作製する。本マウスを用いて①・②の実験と同様に高脂肪食負荷による視床下部炎症惹起に対する sRAGE の影響を検討する。

4. 研究成果

(1) 血管内皮炎症における RAGE 切断機序の検討

糖尿病性血管合併症にかかわる終末糖化産物受容体 (RAGE) は、脳内においてもこれらの細胞表面に発現し、炎症の波及に關与する可能性がある。我々はまず、血管内皮細胞における RAGE の切断機序を検討した。ヒト血管内皮細胞にアデノウイルスを用いて RAGE を過剰発現させると、TNF α による MMP-9 発現は著明に増加し、RAGE が炎症増幅に

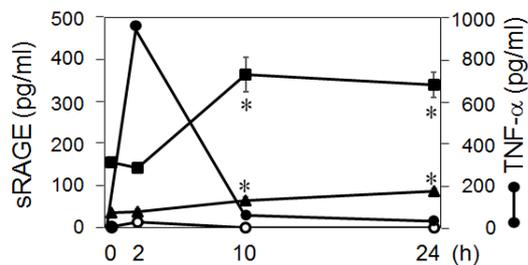


図 3 : 血中 sRAGE 濃度の推移

関与することが示された。血管内皮にヒト RAGE を過剰発現した endo hRAGE-Tg/Tg マウスでは、LPS 1mg/kg の腹腔内投与により、血清 TNF α は 2 時間をピークに上昇し、sRAGE は 10、24 時間後に有意な上昇を認めた。Tg/Tg マウスに 10 μ g/kg の TNF α を腹腔内投与すると、投与後 10-24 時間で血清 sRAGE 濃度は有意に上昇した(図 3)。RAGE を過剰発現させたヒト血管内皮細胞においても、TNF α は時間・用量依存的に RAGE shedding を誘導した。TNF α による RAGE shedding は、MMP-9、ADAM10 のノックダウンにより抑制された。TNF α による MMP-9 の発現増加は JNK 依存的で、TNF α による RAGE shedding は JNK 阻害により部分的に抑制された。また TNF α は小胞体ストレスに關連する ATF4 の発現を一過性に誘導し、ATF4 のノックダウンにより、ADAM10 の活性化、RAGE shedding は著明に抑制された。一方、ATF4 は TNF α による MMP9 発現亢進には影響しなかった。以上の結果を報告している⁽⁶⁾。

我々は、糖尿病など RAGE 発現上昇により、血管内皮の炎症シグナルが増幅され、動脈硬化や心血管疾患の進展につながる可能性があること、生体には過度の炎症による防御機転が存在し、炎症シグナルが複数のシグナル伝達を介して細胞膜の RAGE 蛋白を切断し、血中に RAGE を放出することを示した。放出された RAGE は正常な細胞外ドメインを有し、デコイ作用により RAGE シグナルを抑制するネガティブフィードバック機構が存在する可能性がある。これらの血管内皮における炎症と RAGE 相互調節系は、糖尿病性血管合併症だけでなく血管炎症が関与する多くの病態の有用な標的と考えられ、今後の標的療法にもつながる重要な知見と考えている。

血管内皮細胞における RAGE および可溶性 RAGE (sRAGE) と炎症シグナルの制御機構(図 4)を踏まえると、「RAGE が BBB の血管内皮細胞の炎症を介して脳内炎症を惹起する」という仮説が想定される。

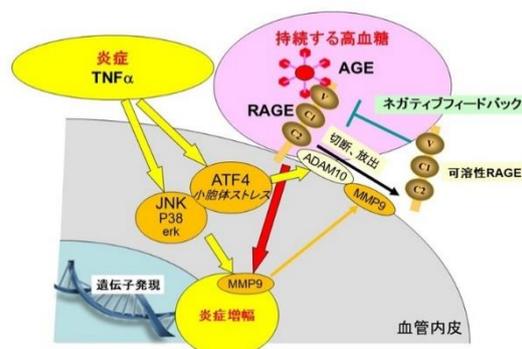


図 4：血管内皮炎症における RAGE 切断機序

(2) RAGE Tg/Tg マウスにおける高脂肪食負荷

負荷 12 週間における 1 匹当たりの 1 週間での平均摂取カロリーの比較を行った(図 5)。野生型マウスにおいて、高脂肪食負荷群 (HFD) の方が普通食群 (NC) よりも摂取カロリーは有意に増加した。しかし、RAGE Tg/Tg マウスにおいては、両群において有意差はなく、RAGE Tg/Tg マウスの摂取カロリーは野生型と比較し低下していた。さらに、RAGE Tg/Tg マウスにおいては、視床下部の炎症が誘発されるどころか、予想に反して逆に抑制されていた(図 1)。我々は、最近、血管内皮細胞表面の RAGE により炎症シグナルが著明に増強し、RAGE が炎症機転増幅に関与すること、過剰な炎症シグナルは細胞表面 RAGE 切断を誘導すること、さらに本現象のメカニズムを明らかにした⁽⁶⁾。すなわち、RAGE の切断、sRAGE 放出、sRAGE のデコイ作用による RAGE シグナル抑制機転が炎症機序と関連し(図 4)、炎症関連疾患の病態に深く関与することが想定される。今回の結果から、sRAGE による RAGE シグナル抑制の機序がこのモデルマウスの病態機序に関連している可能性が示唆された。実験終了後に採血を施行し、サンプルを収集しており、今後、血清レプチン濃度の測定やレプチンの脳室内投与によりレプチン抵抗性への影響を検討予定である。

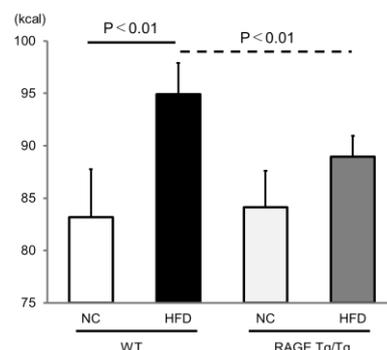


図 5：摂取カロリーの比較

(3) RAGE-/-マウスにおける高脂肪食負荷

次に、RAGE-/-マウスの脳サンプルを用いて②と同様に Iba-1 陽性細胞(ミクログリア)に関し

で解析を行った(図6)。野生型マウスにおいて、HFD 負荷により Iba-1 陽性細胞の増加を認めたが、RAGE^{-/-}マウスでは、抑制されていた。脳内炎症の抑制が起こっていると考えた。一方、1 匹当たりの 1 週間での平均摂取カロリーの比較を行ったところ(図7)、野生型マウスにおいて、HFD 群の方が NC 群よりも摂取カロリーは有意に増加した。しかし、RAGE Tg/Tg マウスとは異なり、RAGE^{-/-}マウスの摂取カロリー量は、むしろ増加していた。

我々は、血管内皮特異的 RAGE 欠損マウスの作成に成功している。また、ミクログリア特異的 RAGE 欠損マウスの作成にも着手しており、今後、この 2 つのモデルマウスを用いた、同様の研究を展開することを模索している。

(4) esRAGE 発現アデノウイルスの投与による遺伝子導入マウスにおける実験

作製していた esRAGE 発現アデノウイルスを用いる実験を計画していたが、アデノウイルスを増殖する段階において、実験室、設備の問題から実験が遅れることとなった。現在は、順調に上記のアデノウイルスを増殖させることができしており、脳室内投与する前に腹腔内投与によって、esRAGE が血中でどのように推移するのかを投与濃度を 3 群に分けて検討した。どの濃度であっても、血中濃度は投与後 14 日の時点で検出感度以下まで低下した(図8)。RAGE Tg/Tg マウスは、常に血管内皮において RAGE の切断が起きており、血中 sRAGE 濃度は 500~1000pg/ml を推移することが分かっている。よって、腹腔内投与する場合は、 1.0×10^9 ifu でマウスに投与する予定である。脳室内投与に関しては、今後、投与量の検討を行うことを予定している。

<引用文献>

- (1) Thaler JP et al: J Clin Invest 122(1):153-162, 2012
- (2) Monden M, Koyama H, et al: Diabetes 62: 478-489, 2013
- (3) Kim J, et al: J Neurochem 134: 927-42, 2015
- (4) Origlia N, et al: J Neurosci. 34: 8749-60, 2014
- (5) Shoji T, Koyama H, et al. Diabetes 55:2245-55, 2006
- (6) Miyoshi A et al:FASEB J 33:3575-89, 2019

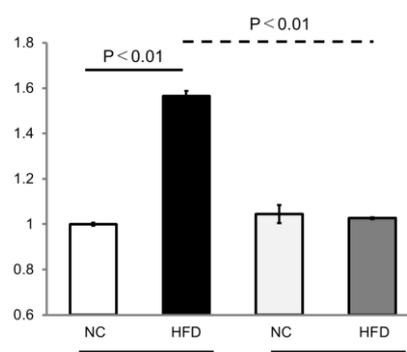


図6: Iba-1 陽性細胞の比

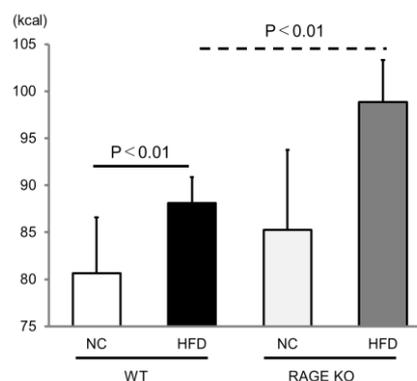


図7: 摂取カロリーの比較

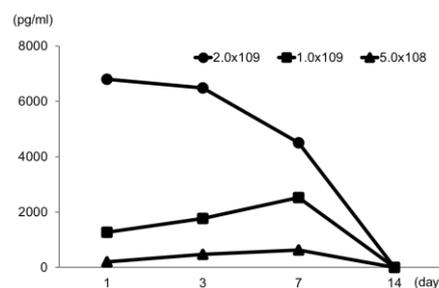


図8: 血中 esRAGE 濃度の推移

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 0件）

1. 著者名 Miyoshi A, Koyama S, Sasagawa-Monden M, Kadoya M, Konishi K, Shoji T, Inaba M, Yamamoto Y, Koyama H.	4. 巻 33
2. 論文標題 JNK and ATF4 as two important platforms for tumor necrosis factor- α -stimulated shedding of receptor for advanced glycation end products.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 FASEB JOURNAL	6. 最初と最後の頁 3575-3589
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1096/fj.201701553RR	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------