

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2010

課題番号：19390085

研究課題名（和文）新規血管保護因子 - 分泌型 RAGE の発現機構と病態生理の解明

研究課題名（英文）The regulatory mechanism of expression and the pathophysiology of a novel vasoprotective factor, esRAGE

研究代表者

山本 博（YAMAMOTO HIROSHI）

金沢大学・医学系・教授

研究者番号：00115198

研究代表者の専門分野：生化学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：RAGE, 糖尿病合併症、デコイ受容体、RNA スプライシング、ノックインマウス

#### 1. 研究計画の概要

申請者らは、糖尿病血管傷害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するとともに、選択的スプライシングにより生成する分泌型RAGEタンパクを発見した。分泌型RAGEはデコイ受容体として機能し血管保護作用をもつと推定される。本研究計画は、分泌型RAGE 過剰発現マウスと分泌型RAGEを発現しないマウスの両方を作製し、糖尿病をはじめとする各種病態における分泌型RAGEの重要性を検証するとともに、分泌型RAGE生成にいたるスプライシング機構の解明と、当該スプライシングへの薬剤効果を評価するハイスループットスクリーニング系の開発を基に、分泌型RAGEの発現制御に基づく新たな糖尿病合併症の予防・治療薬の探索を目指すものである。

#### 2. 研究の進捗状況

(1) 分泌型RAGE過剰発現マウスの作製と解析：マウスアルブミン遺伝子のプロモーターの下流にヒト分泌型RAGE cDNAをつないだ融合遺伝子を作製し、マウス受精卵雄性前核に顕微注入後、受精卵を仮親に移植して、分泌型RAGEを過剰発現するトランスジェニックマウスのラインを得た。ヒトesRAGE過剰発現マウスのラインについて、RAGEのリガンドの1つである<sup>125</sup>I-アミロイド を尾静脈から注入し、その体内動態を対照マウスと比較した。その結果、ヒトesRAGE過剰発現マウスにおいて脳へのアミロイド の移行が遅延する傾向が認められた。

(2) 分泌型RAGEノックインマウスの作製と解析：マウスRAGE遺伝子の全長を膜型RAGEのcDNA配列によって置換したターゲティングベクターを構築し、マウスES細胞に導入し、相同組換えES細胞のクローンを得た。相同組換えES細胞とマウス胚細胞との細胞凝集塊を仮親の子宮に移植し、キメラマウスを得、ノックインのgerminal transmission を確認した。

(3) 選択的スプライシング機構の解明と分泌型/膜型RAGE生成比のハイスループットアクセシ系の開発：CMVプロモーターの下流にEGFPおよびヒトRAGE遺伝子のエクソン8以降の配列を融合させたミニ遺伝子発現ベクターを作製し、293T細胞株に一過性に導入した。膜型および分泌型RAGEに対応するスプライシング産物の生成比をqRT-PCR法とウェスタンブロット法により検討した結果、このミニ遺伝子が内在性RAGE遺伝子産物の選択的スプライシングをよく再現することが明らかになった。ミニ遺伝子に種々の変異を挿入し、選択的スプライシングへの影響を検討した結果、選択的スプライシングを制御するシス配列およびその配列に結合するトランス因子としてhnRNP-Hが同定された。hnRNP-Hの細胞内での発現量によって、選択的スプライシング産物の生成比率が変化することが確認された。RAGEの選択的スプライシングを再現できるRAGEミニ遺伝子を、ゲノムに安定的に組み込んだ培養細胞株を樹立した。

#### 3. 現在までの達成度

おおむね順調に進展している。

（理由）

上記進捗状況に記した通り、研究目標(1)(2)(3)のいずれも、概ね当初計画通り進展

し、下記(5)に記載の成果を生んだから。

#### 4. 今後の研究の推進方策

(1) 分泌型 RAGE 過剰発現マウスの作製と解析:分泌型 RAGE 過剰発現マウスで糖尿病腎症の解析を行う。糖尿病腎症の軽減が認められれば、esRAGE の血管保護作用が in vivo で実証される。

(2) 分泌型 RAGE ノックインマウスの作製と解析:分泌型 RAGE ノックインマウスを得、糖尿病腎症の解析を行う。膜型 RAGE のみを発現するマウスで糖尿病腎症の増悪が認められれば、esRAGE の血管保護作用がさらに確かとなる。

(3) 選択的スプライシング機構の解明と分泌型/膜型 RAGE 生成比のハイスループットアッセイ系の開発:RAGE ミニ遺伝子を安定的に組み込んだ培養細胞株を用い、分泌型/膜型 RAGE 生成比のハイスループットアッセイ系を開発する。

#### 5. 代表的な研究成果

(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 36 件)

1. Matsuoka, N., Itoh, T., Watarai, H., Sekine-Kondo, E., Nagata, N., Okamoto, K., Mera, T., Yamamoto, H., Yamada, S., Maruyama, I., Taniguchi, M. and Yasunami, Y.: High-mobility group box 1 is involved in the initial events of early loss of transplanted islets in mice. *J. Clin. Invest.* Feb 1. pii: 41360. doi: 10.1172/JCI41360. (2010) 査読有

2. Ohe, K., Watanabe, T., Harada, S., Munesue, S., Yamamoto, Y., Yonekura, H., and 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.* in press (2010) 査読有

3. Sun, L., Ishida, T., Yasuda, T., Kojima, Y., Honjo, T., Yamamoto, Y., Yamamoto, H., Ishibashi, S., Hirata, K. and Hayashi, Y.: RAGE mediates oxidized LDL-induced pro-inflammatory effects and atherosclerosis in non-diabetic LDL receptor-deficient mice. *Cardiovas. Res.* 82, 371-381 (2009) 査読有

4. Matsumoto, S., Yoshida, T., Murata, H., Harada, S., Fujita, N., Nakamura, S., Yamamoto, Y., Watanabe, T., Yonekura, H., Yamamoto, H., Ohkubo, T. and Kobayashi, Y.: Solution structure of the variable-type domain of the receptor for advanced glycation end products. *Biochemistry* 47(47), 12299-12311(2008) 査読有

5. Osawa, M., Yamamoto, Y., Munesue, S., Murakami, N., Sakurai, S., Watanabe, T., Yonekura, H., Uchigata, Y., Iwamoto, Y. and Yamamoto, H.: De-N-glycosylation or G82S mutation of RAGE sensitizes its interaction with advanced glycation endproducts. *Biochim.*

*Biophys. Acta* 1770(10), 1468-1474 (2007) 査読有

[学会発表](計 26 件)

1. Yamamoto, H. Enemies and Friends Within in the Pathogenesis and Prevention of Diabetic Vasculopathy (Invited Lecture). 2009 International Conference on Vascular Biology. 29 Oct. 1 Nov. 2009 Zhunan, Taiwan

2. Yamamoto, H. Mechanisms for the Development of Diabetic Angiopathy and Its Prevention (Invited Lecture). 2<sup>nd</sup> International Symposium on Adipobiology and Adipopharmacology. 23-25 Oct. 2009 Varna, Bulgaria

[図書](計 5 件)

1. 山本博ほか, 前田書店, 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 132 頁

[産業財産権]

出願状況(計 2 件)

1. 名称: esRAGE 過剰発現マウス

発明者: 山本 博ほか

権利者: 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

2. 名称: RAGE 遺伝子の 2 種類のスプライシングバリエーションを区別して増幅可能なプライマーセット及びプローブ

発明者: 山本 博ほか 5 名

権利者: 金沢大学および金沢医科大学

種類: 特願

番号: 2009-87418

出願年月日: 平成 21 年 3 月 31 日

国内外の別: 国内

取得状況(計 4 件)

1. 名称: Soluble RAGE Protein

発明者: 山本 博, 渡邊琢夫, 山本靖彦ほか 2 名

権利者: 金沢大学

種類: United State Patent ほか

番号: US 7,485,697 B2 ほか

取得年月日: 2008 年 5 月 7 日(ドイツ、英国、フランス)、2009 年 2 月 3 日(米国)

国内外の別: 国外

[その他]

1. 山本 博: 日本糖尿病合併症学会 Expert Investigator Award (2008)

2. 山本靖彦: 日本糖尿病合併症学会 Young Investigator Award (2009)