

機関番号：13301

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） Genesis and physiologic significance of secretory RAGE - a new vasoprotective factor

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

研究成果の概要（和文）

(1) 分泌型 RAGE (receptor for AGE) の生成に関わると推定されるシスエレメントとトランス因子候補が同定された。(2) 分泌型 RAGE を過剰発現するトランスジェニックマウスを作製し、RAGE がアミロイドβの脳への移行に関わることを証明した。(3) RAGE と、リポポリサッカライド誘発炎症、およびホスファチジルセリンによって仲介されるアポトーシス細胞除去との関わりも明らかにされた。

研究成果の概要（英文）

First, we identified *cis*-acting regulatory elements and a putative *trans*-acting factor that may participate in the production of secretory RAGE. Second, we created a secretory RAGE-overexpressing transgenic mouse model, and demonstrated with it that RAGE accounts for the transition of amyloid- β into the brain. Further, we also found that RAGE is involved in lipopolysaccharide-induced inflammation and in phosphatidyl serine-mediated apoptosis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
2008年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
2009年度	3,000,000	900,000	3,900,000
2010年度	3,000,000	900,000	3,900,000
計	13,800,000	4,140,000	17,940,000

研究分野：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、分泌型バリエーション、RNA スプライシング、遺伝子改変動物、アルツハイマー病、LPS 誘発ショック、アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

糖尿病患者の生命とQOLを脅かしているのは血管の傷害による腎症や網膜症などの合併症である。山本らは、血管細胞の細胞膜受容体である糖化タンパク受容体 (receptor for

advanced glycation endproducts, RAGE) が血管傷害機構の鍵であることを明らかにしてきた。すなわち、糖尿病の高血糖状態で加速度的に増加・蓄積する糖化タンパク (advanced glycation endproducts, AGE) が、血管細胞

表面のRAGE（膜型RAGE）に結合し、この膜型RAGEの活性化によって引き起こされる様々な細胞応答が結果的に血管を傷害すると考えられる。山本らは、RAGE過剰発現マウスでは糖尿病腎症が増悪し（J. Clin. Invest. 2001）、逆にRAGEノックアウトマウスでは糖尿病腎症の進行が著しく抑制されること（Diabetes 2006）を示し、糖尿病合併症におけるAGE-RAGE系の重要性を立証してきた。

さらに、山本らは、RAGE遺伝子mRNAの選択的スプライシングによって生成する、分泌型RAGEタンパク（endogenous secretory RAGE, esRAGE）が血管細胞などから分泌され、ヒト血液中に存在することを見い出し（Biochemical J. 2003）、特許を取得した。AGEとの結合に必要なリガンド結合部位は、分泌型RAGEと細胞表面受容体として機能している膜型RAGEとの間で共通であるため、分泌型RAGEは細胞外でAGEを捕捉して膜型RAGEへの結合を競合的に阻害し、結果的に細胞を保護する作用をもつ。

2. 研究の目的

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。

3. 研究の方法

（1）RAGEバリエーションの生成機構：（i）シスエレメント候補配列を含むミニ遺伝子を作製する。（ii）シスエレメント候補配列に変異を導入する。（iii）配列特異的プライマーを用いた定量的RT-PCR法でスプライシング産物を検出、定量する。

（2）RAGEバリエーションの生理的意義の検討：（i）アルブミンプロモーターの下流にesRAGE cDNAを連結したトランスジーンを作製する。（ii）トランスジーンを受精卵に移入し、esRAGE過剰発現系統を得る。（iii）esRAGEトランスジェニックマウス、野生型マウス、RAGE遺伝子欠損マウスに¹²⁵Iで標識したアミロイドβ₁₋₄₂を投与し、脳への移行を調べる。

4. 研究成果

（1）ヒトRAGE遺伝子転写産物のオルタナティブスプライシングに関わると推定されるRNA上のシスエレメントとトランス因子が同定された。

（2）当該エレメントを含むミニ遺伝子で作製と、endogenous secretory RAGE（esRAGE）と膜結合型RAGEを峻別できる定量的RT-PCR法の確立にも成功した。

（3）esRAGEを過剰発現し高濃度で循環血液中に放出するトランスジェニックマウスを作製した。

（4）内在性RAGEリガンドの一つであるアミロイドβ₄₂の脳への移行がesRAGEトランスジェニックマウスとRAGE遺伝子欠損マウスで有意に減少していた。

（5）細菌細胞壁の構成成分であるリポポリサッカライド（LPS）もRAGEリガンドであり、分泌型RAGEはLPS誘発ショックモデルにおける炎症と生存を改善することが見い出された。

（6）東北大学久保博士のグループとの共同研究で、RAGEがホスファチジルセリンを認識し、アポトーシス細胞除去に寄与することも見い出された。

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26件）すべて査読有

1. Sugihara T, Munesue S, Yamamoto Y, Sakurai S, Akhter N, Kitamura Y, Shiba K, Watanabe T, Yonekura H, Hayashi Y, Hamada J, Yamamoto H: Endogenous Secretory Receptor for AGE Inhibits Amyloid-β₁₋₄₂ Uptake into Mouse Brain (投稿中) (2011)
2. Takagi T, Taguchi O, Toda M, Ruiz DB, Bernabe PG, D'Alessandro-Gabazza CN, Miyake Y, Kobayashi T, Aoki S, Chiba F, Yano Y, Conway EM, Munesue S, Yamamoto Y, Yamamoto H, Suzuki K, Takei Y, Morser Y,

- Gabazza EC: Inhibition of allergic bronchial asthma by thrombomodulin is mediated by dendritic cells. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 183: 31-42 (2011)
3. Hamada Y, Kitazawa S, Kitazawa R, Kono K, Goto S, Komaba H, Fujii H, Yamamoto Y, Yamamoto H, Usami M, Fukagawa M: The effects of receptor for advanced glycation end products (RAGE) on bone metabolism under physiological and diabetic condition. *Endocrine* in press (2010)
 4. Iichmann A, Burgdorf S, Scheurer S, Waibler Z, Nagai R, Wellner A, Yamamoto Y, Yamamoto H, Henle T, Kurts C, Kalinke U, Vieths S, Toda M: Glycation of a food allergen by the Maillard reaction enhances its T-cell immunogenicity: Role of macrophage scavenger receptor class A type I and II. *J. Allergy Clin. Immunol.* 125:175-183 (2010)
 5. Matsuoka N, Itoh T, Watarai H, Sekine-Kondo E, Nagata N, Okamoto K, Mera T, Yamamoto H, Yamada S, Maruyama I, Taniguchi M, Yasunami Y: High-mobility group box 1 is involved in the initial events of early loss of transplanted islets in mice. *J. Clin. Invest.* 120:735-743 (2010)
 6. Ueno H, Koyama H, Shoji T, Kurato M, Fukumoto S, Tanaka S, Otsuka Y, Mima Y, Morioka T, Mori K, Shioi A, Yamamoto H, Inaba M, Nishizawa Y: Receptor for advanced glycation end-products (RAGE) regulation of adiposity and adiponectin is associated with atherogenesis in apo E-deficient mouse. *Atherosclerosis* 211: 431-436 (2010)
 7. Sourris KC, Morley AL, Koitka A, Samuel P, Coughlan MT, Penfold SA, Tomas MC, Bierhaus A, Nawroth PP, Yamamoto H, Allen TJ, Walther T, Hussain T, Cooper ME, Forbes JM: Receptor for AGEs (RAGE) blockade may exert its renoprotective effects in patients with diabetic nephropathy via induction of the angiotensin type 2 (AT2) receptor. *Diabetologia* 53: 2442-2451 (2010)
 8. Li J, Qu X, Yao J, Caruana G, Ricardo SD, Yamamoto Y, Yamamoto H, Bertram JF: Blockade of endothelial-mesenchymal-transition by a Smad3 inhibitor delays the early development of streptozotocin-induced diabetic nephropathy. *Diabetes* 59: 2612-2624 (2010)
 9. Ohe K, Watanabe T, Harada S, Munesue S, Yamamoto Y, Yonekura H, 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.* 147: 651-659 (2010)
 10. Sakatani S, Yamada K, Homma C, Munesue S, Yamamoto Y, Yamamoto H, Hirase H: Deletion of RAGE causes hyperactivity and increased sensitivity to auditory stimuli in mice. *PLoS ONE* 4(12:e8309): 1-7 (2009)
 11. Sun L, Ishida T, Yasuda T, Kojima Y, Honjo T, Yamamoto Y, Yamamoto H, Ishibashi S, Hirata K, Hayashi Y: RAGE mediates oxidized LDL-induced pro-inflammatory effects and atherosclerosis in non-diabetic LDL receptor-deficient mice. *Cardiovascular Research* 82: 371-381 (2009)
 12. Sakatani S, Seto-Ohshima A, Shinohara Y, Yamamoto Y, Yamamoto H, Itohara S,

- Hirase H: Neural activity dependent release of S100B from astrocytes enhances kainate-induced gamma oscillations in vivo. *J. Neuroscience* 28(43): 10928-10936 (2008)
13. Ruster C, Bondeva T, Franke S, Tanaka N, Yamamoto H, Wolf G: Angiotensin upregulates RAGE expression on podocytes: Role of AT2 receptors. *Am. J. Nephrol.* 29:538-550(2008)
14. Matsumoto S, Yoshida T, Murata H, Harada S, Fujita N, Nakamura S, Yamamoto Y, Watanabe T, Yonekura H, Yamamoto H, Ohkubo T, Kobayashi Y: Solution structure of the variable-type domain of the receptor for advanced glycation end products: New insight into AGE-RAGE interaction. *Biochemistry* 47(47) 12299-12311(2008)
15. Nozaki I, Watanabe T, Kawaguchi M, Akatsu H, Tsuneyama K, Yamamoto Y, Ohe K, Yonekura H, Yamada M, Yamamoto H: Reduced expression of endogenous secretory receptor for advanced glycation endproducts in hippocampal neurons of Alzheimer's disease brains. *Arch. Histol. Cytol.* 70: 279-290 (2007)
16. Yamamoto H, Watanabe T, Yamamoto Y, Yonekura H, Munesue S, Harashima A, Ohe K, Hossain S, Saito H, Murakami N: RAGE in diabetic nephropathy. *Curr. Mol. Med.* 7: 752-757 (2007)
17. Koyama H, Yamamoto H, Nishizawa Y: RAGE and soluble RAGE: potential therapeutic targets for cardiovascular diseases. *Mol. Med.* 13(11-12): 625-635 (2007)
18. He M, Kubo H, Ishizawa K, Hegab AE, Yamamoto Y, Yamamoto H, Yamaya M: The role of the receptor for advanced glycation end-products in lung fibrosis. *Am. J. Physiol. Lung Cull. Mol. Physiol.* 293(6): L1427-36 (2007)
19. Osawa M, Yamamoto Y, Munesue S, Murakami N, Sakurai S, Watanabe T, Yonekura H, Uchigata Y, Iwamoto Y, 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)
20. Yamamoto Y, Miura J, Matsuki H., Tamei H., Obata K., Sakurai S, Watanabe T, Uchigata Y, Iwamoto Y, Koyama H, Yamamoto H. Assaying soluble forms of receptor for advanced glycation endproducts. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* s27: e33-e34 (2007)
21. Yamamoto Y, Yonekura H, Watanabe T, Sakurai S, Li H, Harashima A, Myint KM, Osawa M, Takeuchi A, Takeuchi M, Yamamoto H: Short-chain aldehyde-derived ligands for RAGE and their actions on endothelial cells. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 77S: S30-S40 (2007)
22. Takeuchi A, Yamamoto Y, Tsuneyama K, Cheng C, Yonekura H, Watanabe T, Shimizu K, Tomita K, Yamamoto H, Tsuchiya H. Endogenous secretory receptor for advanced glycation end-products as a novel prognostic marker in chondrosarcoma. *Cancer* 109: 2532-40 (2007)
23. Kaji Y, Usui T, Ishida S, Yamashiro K, Moore CB Tara, Moore J, Yamamoto Y, Yamamoto H, Adamis AP: Inhibition of diabetic leukostasis and blood-retinal barrier breakdown with a soluble form of a receptor for advanced glycation end products. *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 48: 858-6(2007)

24. Kobayashi S, Kubo H, Suzuki R, Ishizawa K, Yamada M, He M, Yamamoto Y, Yamamoto H, Sasano H, Sasaki H and Suzuki S: Endogenous secretory receptor for advanced glycation end products in non-small cell lung carcinoma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 175: 184-9 (2007)
25. Koyama H, Shoji T, Fukumoto S, Shinohara K, Shoji T, Emoto M, Mori K, Tahara H, Ishimura E, Kakiya R, Tabata T, Yamamoto H, Nishizawa Y: Low circulating endogenous secretory receptor for AGEs (esRAGE) predicts cardiovascular mortality in patients with end-stage renal disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 27:147-53 (2007)
26. Miura J, Yamamoto Y, Osawa M, Watanabe T, Yonekura H, Uchigata Y, Yamamoto H, Iwamoto Y: Endogenous secretory receptor for advanced glycation endproducts levels are correlated with serum pentosidine and CML in patients with type 1 diabetes. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 27: 253-4 (2007)

[学会発表] (計 36 件)

1. Soh Motoyoshi, Yasuhiko Yamamoto, Seiichi Munesue, Takuo Watanabe, Hiroshi Yamamoto: cAMP Exerts Anti-Inflammatory Effects by Controlling RAGE Isoform Biogenesis. 70th American Diabetes Association Scientific Sessions June 25-29 (2010) Orland USA (会場: オーランドコンベンションセンター)
2. Yamamoto H, Watanabe T, Yamamoto Y, Yonekura H, Munesue S, Ohe K, Sugihara T¹, Saito H, Motoyoshi S, Han D, Win MTT, Abou-Zed TK, and Ohara T: Enemies and friends within in the pathogenesis and prevention of diabetic vascular complications. 4th International HMGBl Symposium - Signals of Tissue Damage. June 20-23 (2010) Helsinki, Finland (会場: ヘルシンキ大学)

3. Yamamoto H, Watanabe T, Yamamoto Y, Yonekura H, Munesue S, Ooe K, Sugihara T, Saito H, Motoyoshi S, and Han D: Mechansims for the development of diabetic angiopathy and its prevention: Enemies and friends within. 2nd International Symposium on Adipobiology and Adipopharmacolgy Oct. 23-25 (2009) Varna, Bulgaria (会場: The Festival and Congress Center)

[図書] (計 8 件)

1. 山本 博、久保田浩之、杉原崇大、山本靖彦: 糖化による疾患と抗糖化食品・素材 序編-2、1 編-5、1 編-12 2010 年 12 月(株)シーエムシー出版
2. 竹田亮祐、宮森 勇、山本 博: 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 年 7 月 24 日(株)前田書店
3. Yamamoto H, Yonekura H, Nata K,: The mosaic evolution of the pancreatic polypeptide gene 107-124 *Molecular biology of the islets Langerhans* (digitally printed ver. 2008)

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

名称: esRAGE 過剰発現マウス
 発明者: 渡邊琢夫、山本博、山本靖彦、棟居聖一、杉原崇大、米倉秀人、櫻井繁
 権利者: 国立大学法人金沢大学
 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

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リーセット及びプローブ
 発明者: 山本博、米倉秀人、渡邊琢夫、山本靖彦、棟居聖一、大江和代
 権利者: 国立大学法人金沢大学
 種類: 特願

番号：2009-087418
出願年月日：平成21年3月31日
国内外の別：国内

〔その他〕
ホームページ等
Hiroshi Yamamoto
<http://maeda-shoten.com/yamamoto/index.html>

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

渡邊 琢夫 (WATANABE TAKUO)
金沢大学・医学系・准教授
研究者番号：40303268

(3) 連携研究者

山本 靖彦 (YAMAMOTO YASUHIKO)
金沢大学・医学系・講師
研究者番号：20313637

棟居 聖一 (MUNESUE SEIICHI)
金沢大学・医学系・助教
研究者番号：10399040