

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 17 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460649

研究課題名(和文) AGE-RAGEシグナルを介した慢性炎症疾患としてのアルツハイマー病の病態解析

研究課題名(英文) A novel pathological mechanism of Alzheimer's disease as a chronic inflammation through RAGE signal activity.

研究代表者

勅使川原 匡 (Teshigawara, Kiyoshi)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号：40403737

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：アミロイドの蓄積によって発症するアルツハイマー病(AD)を慢性炎症疾患と捉え、AD病態の機序解明を目指した。加齢や高血糖で増加する終末糖化産物(AGE)の受容体(RAGE)を介した炎症反応が、AD患者の血中アミロイドや抗RAGE自己抗体によって相乗的に亢進させられることがAD病態の主要因であるという病態仮説を新規提唱し、これについて検討した。AD患者において、血漿中の抗RAGE自己抗体価が高値を示すことを見出したが、白血球のアミロイドによる炎症活性を示すには至らなかった。今後、AD患者の血漿検体を用いて主要な炎症関連因子群の産生量を解析し、AD患者の炎症活性病態について再検討していく。

研究成果の概要(英文)：Alzheimer's disease (AD), which is considered that the main pathology is caused by accumulation of amyloid in the brain, may have an aspect as chronic inflammation disease. We validated a novel mechanism of AD pathology that an inflammatory reaction through the receptor of advanced glycation end products (RAGE) is synergistically enhanced by increased amyloid and anti-RAGE autoantibody in AD patients. Increased antibody titer against RAGE was shown in plasma of the AD patients, while an enhancements of immunoreactivity and an amyloid binding to leukocytes were not detected in the AD patients. In future, we will evaluate whether examine plasma levels of the inflammatory factors are up-regulated or not in AD patients.

研究分野：薬理学

キーワード：アルツハイマー アミロイド RAGE AGE 慢性炎症 神経 ミクログリア アストロサイト

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病は、わが国の認知症の上位を占める神経変性疾患である。中核症状(記憶障害・言語障害など)や周辺症状(幻覚・徘徊など)が徐々に進行し、最終的に人格崩壊や寝たきり状態に至る。これまでに幾つかの病態仮説が提唱されてきた。

アルツハイマー病の患者脳では、アセチルコリンの活性低下や大脳皮質にコリン作動性神経を投射するマイネルト基底核の変性などがみられる。この病態(コリン作動性仮説)に基づいて、日本ではアセチルコリンエステラーゼ阻害を主作用とする治療薬が承認されている。近年、神経細胞死抑制作用をもつ NMDA 受容体拮抗阻害薬も承認された。しかし、これらの治療薬は認知症に対する対処療法薬であり、根本的な治療薬となっていない。

現在、最も有力視されるアルツハイマー病の発症原因は、脳内でのアミロイドの過剰産生を発端とした神経変性である。アミロイドは、アミロイド前駆体タンパク(APP)が二つのプロテアーゼ(β-セクレターゼ、γ-セクレターゼ(プレセニリン))に切断修飾されることで産生される。

アミロイド仮説は、脳内でアミロイドが重合・沈着して老人斑を形成し、神経細胞の減少・神経突起の委縮・シナプスの脱落などの神経変性を引き起こすという病態仮説である。一方、老人斑のようなアミロイドの不溶性凝集体よりも可溶性オリゴマーの方が細胞毒性が強く、アルツハイマー病の主原因ではないかと考えるオリゴマー仮説も提唱されている。また、アミロイドの産生亢進に伴って、神経細胞内の微小管結合タンパクの一つであるタウが過剰にリン酸化・蓄積されることで神経変性(神経原線維変化)を引き起こすというタウ仮説も強く支持されている。

しかし、いずれの病態仮説もアルツハイマー病の発症機序を説明するには不十分であり、実際、これらの病態仮説に基づいた新薬の臨床治験のほとんどが有効な治療成績を残せないまま終了している。

アルツハイマー病は、糖尿病などの慢性的な高血糖状態によって病態がより進行する。これは、生体内に最終糖化産物(AGE)が蓄積し、AGE 受容体(RAGE)を介して炎症反応や神経変性を亢進させることが一因と考えられている。また、アミロイドが RAGE に結合することで炎症反応を惹起すること、アルツハイマー病患者の血中において抗 RAGE 自己抗体価が高値であることなどが報告されており、アルツハイマー病の病態進行に RAGE シグナルが密接に関与する可能性が示唆される。

2. 研究の目的

本研究は、アミロイドが神経変性を引き起こす主要因が AGE-RAGE 系炎症シグナ

ルに対する相乗的亢進作用にあると考え、アルツハイマー病の「自己免疫仮説」という病態仮説の新規提唱を目的とする。

3. 研究の方法

(1) アルツハイマー病患者の白血球の表現型解析

アルツハイマー病患者の血液検体を用いて、増加した血中アミロイドが白血球の RAGE に結合し、慢性的な炎症状態を引き起こしている可能性を臨床的に検証した。採取した血液からは、血漿成分、多核顆粒球(好中球)、及び単核球(単球、リンパ球)を分離した。本実験は、岡山大学倫理委員会の承認を得ておこなった。

分離した白血球を用いて、白血球に発現する RAGE タンパク、及び細胞膜表面に結合したアミロイドをそれぞれ定量した。解析はフローサイトメーター(FACS Calibur、BD)を用いた。白血球の免疫活性状態の指標として、CD11b や CD62L などの細胞膜タンパクの発現も同様に定量解析した。

(2) 神経細胞の突起伸長に対する HMGB1 (High Mobility Group Box 1) の影響についての検討

RAGE リガンドの一つである HMGB1 (High Mobility Group Box 1) の神経突起伸長に対する影響を検討した。初代培養系大脳皮質神経細胞に組換えヒト HMGB1 タンパク、または抗 HMGB1 中和抗体を投与した。

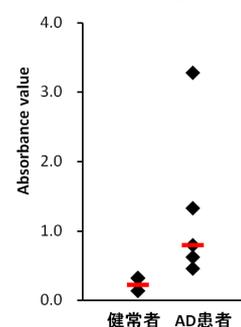
胎児期から新生児期にかけての幼若ラットの脳組織を採取し、各種抗体による免疫染色をおこなった。また、新生児ラット側脳室に抗 HMGB1 抗体を投与し、4 週齢になるまで飼育した後、Y 字迷路試験によって記憶行動を評価した。

4. 研究成果

(1) 申請者らの研究室では、RAGE と AGE の試験管内結合測定系において、アミロイドが RAGE と AGE の結合親和性を高めることを見出している(特願 2010-214019 (2010))。加えて、抗 RAGE モノクローナル抗体を 4 クローン作製したところ、全ての抗体が RAGE に対するアゴニスト活性をもっていた。また、アルツハイマー病 (AD) 患者の血中において、極めて高い抗 RAGE 自己抗体価を示す症例を見出した(図 1)。

これらの結果は、アルツハイマー病においてアミロイドと AGE による相乗的な RAGE の過剰刺激という病態モデルの可能性を示唆している。また、RAGE はアゴニスト活性によって発現量が増加することが報告されており、抗

図1: ヒト血清中の抗RAGE自己抗体価

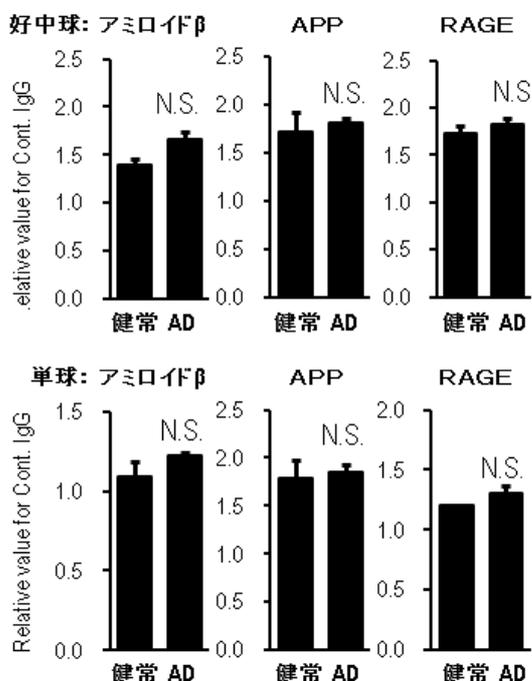


RAGE 自己抗体の産生亢進が RAGE のシグナル活性をさらに増加させている可能性も考えられる。

(2) 血液検体から単離した白血球を用いた FACS 解析によって、細胞膜表面に結合したアミロイド、細胞膜に発現しているアミロイド前駆体タンパク (APP) 及び RAGE を検出した。各値を健常者と AD 患者とで比較したが、統計的な差はみられなかった (図 2)。CD11b や CD62L などの細胞膜タンパクについても同様に解析したが、AD 患者の白血球における明らかな活性化はみられなかった。

凍結保存されている血漿検体を用いて、今後、いくつかの炎症関連因子の発現量を解析することで、AD 患者の白血球の活性化状態を再検討する予定である。

図2:アルツハイマー患者から単離した白血球のFACS解析



(3) 初代培養系大脳皮質神経細胞に組換え HMGB1 タンパクまたは抗 HMGB1 中和抗体を長期間投与 (5日間または20日間) した。その後、神経細胞の突起伸長やシナプス形成に対する影響を免疫染色によって検討したが、明らかな変化はみられなかった。

(4) 胎生 17 日目～生後 1 日目のラット脳組織 (大脳皮質・海馬・視床) において、HMGB1 を検出した。大脳皮質における HMGB1 の発現量は経時的に減少傾向にあり、これまでの既報 (Mol Neurobiol. (2012)) と同様な結果が得られた。海馬は、出生後も HMGB1 を比較的高発現していた。HMGB1 が高発現している時期・領域は、大脳皮質の発生期の神経新生が盛んな時期や生後も神経新生の盛んな海馬視床領域と一致しており、神経細胞の発達に HMGB1 が何かしらの生理的役割をもつ可能性

を示唆している。

(5) 抗 HMGB1 中和抗体を新生児ラットの側脳室内に投与し、その後、4 週齢のラットに対して Y 字迷路試験をおこなった。しかしながら、ラットの空間作業記憶 (交替行動率) と自発行動量に統計的に有意な変化はみられなかった。

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 4 件)

1) Izushi Y, Teshigawara K, Liu K, Wang D, Wake H, Takata K, Yoshino T, Takahashi HK, Mori S, Nishibori M. Soluble form of the receptor for advanced glycation end-products attenuates inflammatory pathogenesis in a rat model of lipopolysaccharide-induced lung injury. *J Pharmacol Sci.* in press(2016). 査読有.

2) Montes VN, Subramanian S, Goodspeed L, Wang SA, Omer M, Bobik A, Teshigawara K, Nishibori M, Chait A. Anti-HMGB1 antibody reduces weight gain in mice fed a high-fat diet. *Nutr Diabetes.* 5:e161(2015). 査読有.

3) Okuma Y, Liu K, Wake H, Liu R, Nishimura Y, Hui Z, Teshigawara K, Haruma J, Yamamoto Y, Yamamoto H, Date I, Takahashi HK, Mori S, Nishibori M. Glycyrrhizin inhibits traumatic brain injury by reducing HMGB1-RAGE interaction. *Neuropharmacology.* 20(85):18-26(2014). 査読有.

4) Takahashi H, Sadamori H, Teshigawara K, Niwa A, Liu K, Wake H, Mori S, Yoshino T, Nishibori M. Histamine inhibits high mobility group box 1-induced adhesion molecule expression on human monocytes. *Eur J Pharmacol.* 718(1-3):305-13(2013). 査読有.

【学会発表】(計 29 件)

1) 高遠、和氣秀徳、劉克約、勅使川原 匡、森 秀治、西堀 正洋、ヒト血管内皮細胞における Histidine rich glycoprotein (HRG) の保護効果、日本薬理学会 (横浜、2016 年 3 月 9-11 日)

2) 王 登莉、劉克約、和氣秀徳、勅使川原 匡、森 秀治、西堀 正洋、抗 HMGB1 抗体による脳内出血の治療、日本薬理学会 (横浜、2016 年 3 月 9-11 日)

3) 富麗、劉克約、和氣秀徳、勅使川原 匡、

森 秀治、西堀 正洋、ピロカルピン誘導性てんかんモデルマウスにおける抗 HMGB1 抗体の炎症抑制効果、日本薬理学会（横浜、2016 年 3 月 9-11 日）

4) 森岡 祐太、和氣 秀徳、勅使川原 匡、劉 克約、森 秀治、西堀 正洋、ストレプトゾトシン誘発糖尿病ラットにおける Advanced glycation end-products の検出、日本薬理学会（横浜、2016 年 3 月 9-11 日）

5) 和氣 秀徳、森 秀治、高橋 英夫、劉 克約、勅使川原 匡、西堀 正洋、敗血症時好中球微小循環イメージング、日本薬理学会（横浜、2016 年 3 月 9-11 日）

6) Fu L, Liu K, Wake H, Teshigawara K, Mori S, Nishibori M. The effects of anti-HMGB1 antibody on pilocarpine-induced epilepsy in mice. 7th International Symposium DAMPS and HMGB1. (Germany, Bonn, University Hospital Bonn, Sep 10-12/2015)

7) Wang D, Liu K, Wake H, Teshigawara K, Mori S, Nishibori M. Anti-HMGB1 therapy for intracerebral hemorrhage. 7th International Symposium DAMPS and HMGB1. (Germany, Bonn, University Hospital Bonn, Sep 10-12/2015)

8) 和氣 秀徳、森 秀治、劉 克約、勅使川原 匡、西堀 正洋、敗血症病態における高ヒスチジン糖タンパク質（HRG）の好中球形態と微小循環に対する影響、日本薬理学会近畿部会（岐阜、2015 年 6 月 26 日）

9) 寺尾 欣也、和氣 秀徳、森岡 祐太、勅使川原 匡、劉 克約、高橋 英夫、森 秀治、西堀 正洋、Tissue factor（TF）誘発 DIC モデルにおける Histidine-rich glycoprotein（HRG）の動態及び治療効果について、日本薬理学会近畿部会（岐阜、2015 年 6 月 26 日）

10) 和氣 秀徳、森 秀治、高橋 英夫、劉 克約、勅使川原 匡、西堀 正洋、高ヒスチジン糖タンパク質（HRG）の敗血症時血管内好中球流動性に対する効果、日本薬理学会（名古屋、2015 年 3 月 18-20 日）

11) 森岡 祐太、大西 香織、友野 靖子、森 秀治、和氣 秀徳、劉 克約、勅使川原 匡、西堀 正洋、ラットリンパ節法による ALE 特異モノクローナル抗体の作製、日本薬理学会（名古屋、2015 年 3 月 18-20 日）

12) Masahiro Nishibori, Hidenori Wake, Shuji Mori, Keyue Liu, Yuta Morioka, Kiyoshi Teshigawara, Masakiyo Sakaguchi, Kosuke Kuroda, Hideo Takahashi, Aiji Ohtsuka, Tadashi Yoshino, Hiroshi

Morimatsu. Histidine-rich glycoprotein prevents septic lethality through neutrophil regulation. Sepsis Symposium (France, Paris, Pasteur Institute, Dec 03-05/2014)

13) 和氣 秀徳、森 秀治、劉 克約、勅使川原 匡、西堀 正洋、循環好中球制御不全による敗血症性 ARDS と HRG 補充効果、日本薬理学会近畿部会（和歌山、2014 年 10 月 24 日）

14) 和氣 秀徳、森 秀治、高橋 英夫、劉 克約、勅使川原 匡、西堀 正洋、好中球活性化制御に着目した敗血症病態解析と治療法開発、日本生化学会（京都、2014 年 10 月 15-18 日）

15) 豊村 隆男、和氣 秀徳、勅使川原 匡、劉 克約、高橋 英夫、西堀 正洋、森 秀治、破骨細胞様細胞の分化培養における非炎症性物質の影響、日本生化学会（京都、2014 年 10 月 15-18 日）

16) 森 秀治、和氣 秀徳、劉 克約、勅使川原 匡、高橋 英夫、西堀 正洋、豊村 隆男、HMGB1 結合因子による AGEs-RAGE 結合阻害解析、日本生化学会（京都、2014 年 10 月 15-18 日）

17) 寺尾 欣也、和氣 秀徳、森岡 祐太、勅使川原 匡、劉 克約、森 秀治、高橋 英夫、西堀 正洋、Endotoxin 血症併発急性膵炎に対する Histidine Rich Glycoprotein（HRG）の効果、日本薬理学会 近畿部会（岡山、2014 年 6 月 20 日）

18) 横山 隆太、豊村 隆男、和氣 秀徳、勅使川原 匡、劉 克約、高橋 英夫、西堀 正洋、森 秀治、AGEs 結合親和性に基づいた AGEs 遮断ペプチドの同定、日本薬理学会 近畿部会（岡山、2014 年 6 月 20 日）

19) 出石 恭久、和氣 秀徳、劉 克約、勅使川原 匡、高橋 英夫、森 秀治、西堀 正洋、Receptor for advanced glycation end product と肺障害、日本薬理学会（仙台、2014 年 3 月 19-21 日）

20) 衷 輝、勅使川原 匡、和氣 秀徳、劉 克約、西堀 正洋、炎症誘発因子 HMGB1 とインスリン抵抗性の関係についての検討、日本薬理学会（仙台、2014 年 3 月 19-21 日）

21) 和氣 秀徳、森 秀治、高橋 英夫、劉 克約、勅使川原 匡、西堀 正洋、高ヒスチジン糖タンパク（HRG）による敗血症治療の可能性、日本薬理学会（仙台、2014 年 3 月 19-21 日）

22) 劉 克約、王 登利、和氣 秀徳、勅使川

原匡、高橋 英夫、森 秀治、**西堀 正洋**、コラゲナーゼで誘発脳内出血モデルにおける抗 HMGB1 単クローン抗体の効果、日本薬理学会（仙台、2014 年 3 月 19-21 日）

23) **Nishibori M**, Okuma Y, **Liu K**, **Wake H**, Maruo T, **Teshigawara K**, Yamamoto Y, Yamamoto H, Ohtsuka A, Yoshino T, Otani N, Tomura S, Shima K, Takahashi H, Date I, Mori S. Anti-HMGB1 Monoclonal Antibody Therapy for Traumatic Brain Injury in Rats. Merinoff World Congress 2013:HMGB1 (USA, New York, Feinstein Institute for Medical Research, Oct 11-13/2013)

24) **Nishibori M**, **Liu K**, Okuma Y, **Wake H**, **Teshigawara K**, Takahashi H, Date I, Mori S. Protection of BBB disruption in ischemic and traumatic injuries by anti-HMGB1 monoclonal antibody. Signalling in the Blood-Brain Barriers (Hungary, Sümeg, Hotel Kapitány, Sep 12-14/2013)

25) 森 秀治、豊村 隆男、**和氣 秀徳**、**勅使川原 匡**、**劉 克約**、高橋 英夫、**西堀 正洋**、AGEs-RAGE 相互作用に基づいた遮断物質探索系への応用、日本生化学会（横浜、2013 年 9 月 11-13 日）

26) 豊村 隆男、**和氣 秀徳**、**勅使川原 匡**、**劉 克約**、高橋 英夫、**西堀 正洋**、森 秀治、マウスミクログリア細胞における炎症反応の憎悪化、日本生化学会（横浜、2013 年 9 月 11-13 日）

27) 春間 純、大熊 佑、**劉 克約**、**和氣 秀徳**、**袁 輝**、**勅使川原 匡**、伊達 勲、**西堀 正洋**、グリチルリチンは HMGB1 に結合し脳外傷を抑制する、日本薬理学会 近畿部会（名古屋、2013 年 7 月 12 日）

28) 森岡 祐太、周 京秀、渋谷 恵、**和氣 秀徳**、**劉 克約**、**勅使川原 匡**、森 秀治、**西堀 正洋**、マクロファージによる Advanced glycation end products の細胞内取り込み、日本薬理学会 近畿部会（名古屋、2013 年 7 月 12 日）

29) Okuma Y, **Liu K**, **Wake H**, **Teshigawara K**, Haruma J, Date I, **Nishibori M**. Glycyrrhizin therapy for traumatic brain injury. Shanghai BRAIN 2013 (China, Shanghai International Convention Center, May 20-23/2013)

【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】

研究室ホームページ

<http://www.okayama-u.ac.jp/user/pharmacology/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

勅使川原 匡 (TESHIGAWARA KIYOSHI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号：40403737

(2) 研究分担者

西堀 正洋 (NISHIBORI MASAHIRO)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：50135943

寺田 整司 (TERADA SEISHI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授
研究者番号：20332794

劉 克約 (LIU KEYUE)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号：40432637

和氣 秀徳 (WAKE HIDENORI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号：60570520

(3) 連携研究者

()
研究者番号：