

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 10 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2016

課題番号：25860644

研究課題名(和文)肺気腫におけるRAGEの役割の検討

研究課題名(英文)the role of RAGE in COPD

研究代表者

早稲田 公一(KOICHI, WASEDA)

岡山大学・大学病院・助教

研究者番号：10648059

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：RAGEは血球系細胞および支持組織の両方に発現しており、特に気道組織に高発現していることが報告されている。RAGE KOマウスでは野生型マウスに比較し気道炎症および気腫化が有意に抑制されることがわかった。また、血球系細胞のみにRAGEを発現するマウス、支持組織細胞のみにRAGEを発現するキメラマウスを骨髄移植により作製し、これらキメラマウスでPPE投与により惹起される肺気腫および気道炎症の程度を比較検討した結果、気道炎症および気腫化の発症のためには、支持組織へのRAGEの発現がより重要であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Pulmonary emphysema is characterized by persistent inflammation and progressive alveolar destruction. The receptor for advanced glycation end-products (RAGE) is a multiligand cell surface receptor reported to be involved in the process of acute alveolar epithelial cell injury. RAGE-sufficient (RAGE(+/+)) mice and RAGE-deficient (RAGE(-/-)) mice were treated with intratracheal elastase. Neutrophilia in bronchoalveolar lavage fluid was reduced in elastase-treated RAGE(-/-) mice on Day 4, and was associated with decreased levels of some kind of cytokines. Static lung compliance values and emphysematous changes in the lung tissue were decreased in RAGE(-/-) mice on Day 21. Experiments using irradiated, bone marrow-chimeric mice identify the importance of RAGE expressed on lung structural cells in the development of elastase-induced pulmonary inflammation and emphysema. Thus, RAGE represents a novel therapeutic target for preventing pulmonary emphysema.

研究分野：呼吸器

キーワード：RAGE COPD

1. 研究開始当初の背景

肺気腫は持続する炎症および肺胞の破壊を特徴とする病態である。肺に集積した好中球やマクロファージから放出されたエラストラーゼが肺組織を破壊して気腫化をもたらす、いわゆるエラストラーゼ・アンチエラストラーゼ不均衡説や、肺胞上皮細胞や血管内皮細胞のアポトーシスの関与などが注目されているが、どのようなメカニズムで肺気腫が発症するかはまだ不明な点が多い。Receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) は、免疫グロブリンスーパーファミリーに属する膜型受容体で、advanced glycation endproducts (AGE) の受容体として同定された。細胞表面に存在し、神経細胞、内皮細胞、平滑筋細胞および単核細胞に発現している。糖尿病や動脈硬化性病変では接着分子の発現を誘導し、血管内皮細胞の増殖の促進、動脈硬化部位での発現増強などが報告されており (J Clin Invest.2001;108:261)、これらの酸化ストレスを伴う慢性炎症性疾患での病態に関与する可能性が示唆されている。成長に従い全身臓器への RAGE の発現は減弱するが、肺は例外的に RAGE の強い発現を認める。このように、RAGE は気道への発現が強く、急性肺障害などの急性肺胞上皮細胞障害の病態に RAGE やそのリガンドである high mobility group box chromosomal protein-1 (HMGB-1) が関与していると報告されている (Am J Respir Crit Care Med.2004;170:1310)。デコイレセプターとして作用する可溶性 RAGE(sRAGE) の投与により RAGE をブロックした結果、マウスにおいて急性肺障害および好中球性気道炎症の抑制効果が得られている (Am J Respir Crit Care Med. 2008;178:356)。

慢性閉塞性肺疾患患者の気道では、RAGE およびそのリガンドである HMGB-1 の発現が有意に上昇していると近年報告された (Am J Respir Crit Care Med. 2010;181:917)。また、気管支肺胞洗浄液 (bronchoalveolar lavage: BAL) 液中の好中球数の著明な増加を認める COPD および喘息患者において、BAL 液中の sRAGE の濃度が低下していると報告されている (Eur Respir J.2012;39:721)。

これらの報告から、喫煙に伴う好中球性気道炎症とその後に進展する肺気腫の形成にも、RAGE が重要な役割を担っていることが予想される。

2. 研究の目的

肺気腫における RAGE およびそのリガンドである high mobility group box chromosomal protein-1 (HMGB-1) の役割を、マウス肺気腫モデルを用いて明らかにする。RAGE とそのリガンドをコントロールする

ことが、肺気腫の治療に有効である可能性がある。

マウス肺気腫モデルを用いて、RAGE とそのリガンドである HMGB-1 の肺気腫および気道炎症への関与を明らかにする。RAGE は血球系細胞だけでなく、肺胞上皮細胞や平滑筋細胞などの支持組織にも発現しており、いずれへの発現が PPE により惹起される気道炎症および気腫化に寄与しているのかを、キメラマウスを作成して評価する。デコイレセプターとして働く可溶性 RAGE (sRAGE) を投与することにより RAGE をブロックし、気腫進展の抑制効果が得られるかどうかを検証する。また RAGE のリガンドである HMGB-1 を抗 HMGB-1 抗体投与により抑制し、気道炎症および気腫化の抑制効果を検討し、将来的な臨床応用を視野に肺気腫治療への応用を試みる。

3. 研究の方法

(1) RAGE KO マウスの解析

Porcine pancreatic elastase (PPE) により惹起されたマウス肺気腫モデルを用いる。RAGE が気道炎症および気腫化に必須であるかどうかを証明するため、RAGE KO マウスを用い、PPE 投与後に Cst (静肺コンプライアンス)、気道炎症、BAL 液中のサイトカインレベルを測定し、また肺組織の評価を行うことにより、野生型マウスを比較検討する。メスの C57BL/6 マウスおよび RAGE KO マウスに対し、day0 に経気道的に PPE を投与することにより肺気腫モデルを作成し、気道炎症、Cst、肺組織および BAL 液中の炎症細胞数の評価、好中球関連ケモカインと炎症サイトカインの測定を day1、day4 および day21 に行う。気腫化は、形態学的評価のほか、MLI (平均肺胞径) による定量的評価、Cst 測定による呼吸機能定量評価も行う。Cst は Flexi Vent (SCIREQ) を用いて測定する。

(2) RAGE 発現の気道炎症、気腫化における責任細胞の検索

気道への RAGE およびそのリガンドの発現の検討:

気道局所における RAGE の発現を、野生型マウスに経気道的に PPE を投与したのち、免疫染色にて評価する。血球系細胞への RAGE の発現をフローサイトメトリーで検討する。RAGE のリガンドである HMGB1 濃度を BAL 液や肺ホモジネートで測定する。

キメラマウスを用いた RAGE 発現が気道炎症、気腫化におよぼす役割の検討:

RAGE が血球系あるいは支持組織のみに発現したキメラマウスを作成する。RAGE

KO マウスに放射線照射を行った後、ドナーの野生型マウスからの骨髄を移植し、血球系のみ RAGE を発現するキメラマウスを作成する。同様に、支持組織のみ RAGE を発現するキメラマウスを作成する。コントロールとしてドナー、レシピエントともに野生型マウス、RAGE KO マウスであるマウスを作成する。上記 4 群のマウスに経気道的に PPE を投与し、気道炎症、気腫化の発症のためには、RAGE 発現が血球系と支持組織のどちらに必須かを評価する。

(3) sRAGE 投与による気道炎症、気腫化への抑制効果の検討

PPE により惹起されたマウス肺気腫モデルを用いて、デコイレセプターとして RAGE をブロックする作用を有する可溶性 RAGE (sRAGE) 投与による気道炎症、気腫化の抑制効果を検討する。野生型マウスに経気道的に PPE を投与したのち、day1, day7 および day14 に sRAGE を投与し、気道炎症、Cst, 肺組織および BAL 液中の炎症細胞数、好中球関連ケモカインと炎症サイトカインを day1, day4 および day21 に測定して気道炎症、気腫化の抑制効果の評価をする。また、PPE を投与した野生型マウスに、day21, day28 に sRAGE を投与し、day35 に Cst および肺組織の評価を行い、sRAGE の投与により、完成した肺気腫を改善させることができるかを評価する。

(4) 抗 HMGB-1 抗体の気道炎症、気腫化への抑制効果の検討

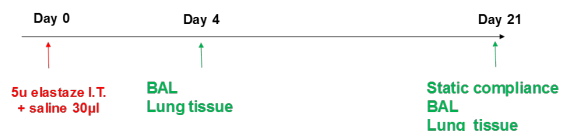
野生型マウスに経気道的に PPE を投与したのち、day1, day7 および day14 に抗 HMGB-1 抗体を投与し、気道炎症、Cst, 肺組織および BAL 液中の炎症細胞数、好中球関連ケモカインと炎症サイトカインを day1, day4 および day21 に測定して気道炎症、気腫化の抑制効果の評価をする。また、PPE を投与した野生型マウスに、day21, day28 に抗 HMGB-1 抗体を投与し、day35 に Cst および肺組織の評価を行い、抗 HMGB-1 抗体の投与により、完成した肺気腫を改善させることができるかどうかを評価する。

4. 研究成果

RAGE KO (RAGE^{-/-}) マウスおよび野生型 (RAGE^{+/+}) マウスに経気道的に PPE を投与し、気道炎症および気腫化を評価したところ、RAGE KO マウスでは野生型マウスに比較し気道炎症および気腫化が有意に抑制されることがわかった。

Animals: female C57BL/6 and RAGE^{-/-} mice, 8-12w

Experimental Protocol:

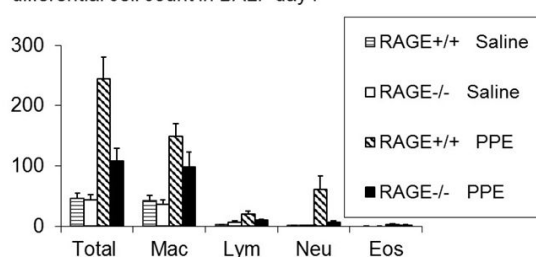


Lung compliance: Lung static compliance in anesthetized and ventilated animals.

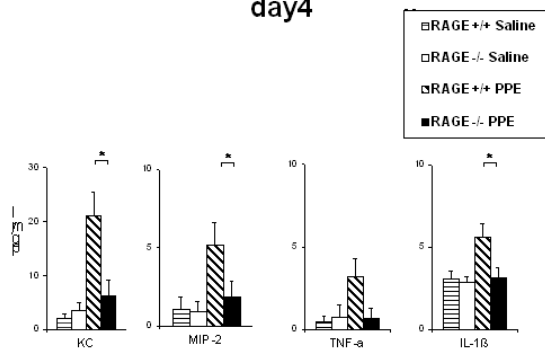
Bronchoalveolar lavage (BAL): Leukocytes were differentiated and quantified on cytocentrifuged slides.

Cytokine levels in BAL: Levels of cytokines measured by ELISA.

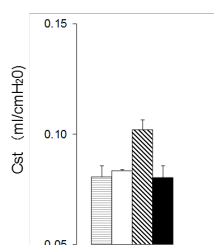
differential cell count in BALF day4



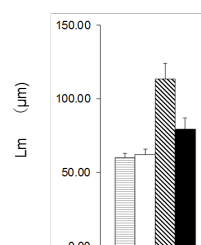
Cytokines and Chemokines in BALF day4



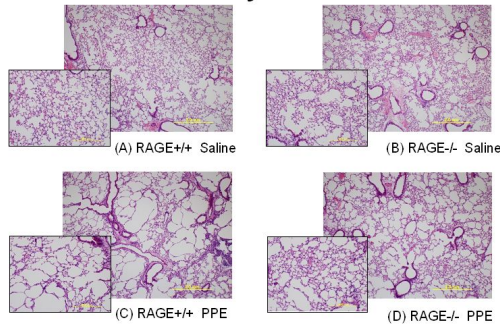
Lung Static Compliance -day21-



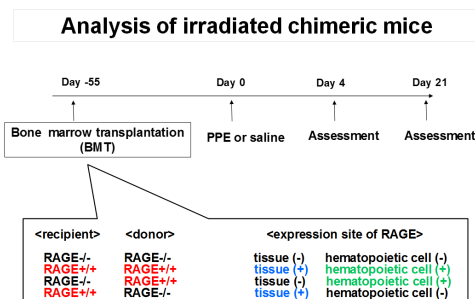
Mean Linear Intercepts -day21-



Morphometric assessment (HE)
-day21-



次に、血球系細胞のみに RAGE を発現するマウス、支持組織細胞のみに RAGE を発現するキメラマウスを骨髓移植により作製し、これらキメラマウスで PPE 投与により惹起される肺気腫および気道炎症の程度を、RAGE KO マウスおよび野生型マウスと比較検討したところ、支持組織のみに RAGE を発現させたマウスでは野生型マウス同様に気道炎症および気腫を生じたが、血球系に RAGE を発現させたマウスでは RAGE KO マウスに比べて有意な気道炎症、気腫化を生じなかった。これらの結果から、気道炎症および気腫化の発症のためには、支持組織への RAGE の発現がより重要であることが示唆された。



さらに、臨床への応用を目的として、デコイレセプターとして RAGE をブロックする作用を有する可溶性 RAGE (sRAGE) の投与、また RAGE のリガンドの一つである HMBG-1 をブロックする抗 HMBG-1 抗体の投与により気道炎症および気腫化を抑制できるかどうか検討を重ねたが、これらに関しては有意差をもった効果を得られなかった。

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1件)

Waseda K, Miyahara N, Taniguchi A, Kurimoto E, Ikeda G, Koga H, Fujii U, Yamamoto Y, Gelfand EW, Yamamoto H, Tanimoto M, Kanehiro A. 査読有、Am J Respir Cell Mol Biol. 2015, 482-491, DOI:10.1165/rcmb.2014-00270C, Emphysema requires the receptor for advanced glycation endproducts triggering on structural cells.

[学会発表](計1件)

早稲田公二、肺気腫進展における終末糖化産物受容体(RAGE)発現の重性、呼吸器学会総会、2013年4月19日、東京国際フォーラム(東京都千代田区)

6. 研究組織

(1)研究代表者

早稲田 公一(WASEDA, Koichi)
岡山大学病院・助教
研究者番号：10648059

(2)研究協力者

宮原 信明(MIYAHARA, Nobuaki)
岡山大学大学院保健学研究科・教授
研究者番号：70335610