

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450152

研究課題名(和文)食品に含まれるRAGEシグナル阻害成分の同定と阻害機構の解明

研究課題名(英文) Identification of RAGE inhibitory components in foods and elucidation of its inhibitory mechanism

研究代表者

棟居 聖一 (Munesue, Seiichi)

金沢大学・医学系・助教

研究者番号：10399040

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：マルチリガンド受容体として知られるRAGE(receptor for advanced glycation end-products)は種々のリガンドと結合して細胞内シグナルを誘導し、その結果、糖尿病血管障害、がん、炎症、アルツハイマー病等の病態を悪化させる。それゆえ、RAGEシグナルを阻害することは、RAGE関連疾患の予防・治療にとって重要である。研究代表者らはRAGEシグナル阻害成分が含まれる醤油由来の低分子画分を分離・精製し、その成分を明らかにした。さらに、RAGEの多量体形成に及ぼす細胞外領域を明らかにするためリガンド結合部位等を欠損させた組換えRAGEを作製しCOS7細胞に導入した。

研究成果の概要(英文)：Receptor for advanced glycation end products (RAGE) is a pattern recognition receptor, which has been implicated in the pathogenesis of diabetic complications, inflammation, Alzheimer's disease, and cancer. Therefore it is important for RAGE relation diseases to inhibit RAGE signaling. In this study, we isolated and identified RAGE signaling inhibitory components derived from Japanese soy sauce low molecular fraction. Furthermore cos7 cells were transfected with a plasmid containing full length RAGE cDNA and V1, C1, C2 domain-deleted RAGE cDNAs to clear the essential domain for RAGE multimerization.

研究分野：生化学

キーワード：RAGE food function

1. 研究開始当初の背景

終末糖化産物受容体 RAGE (Receptor for advanced glycation endproducts) は当初、終末糖化産物 AGE (Advanced glycation endproducts) の 1 回膜貫通型細胞膜受容体として同定された (Schmidt AM. et al, J Biol Chem, 267,1992)。AGE とはタンパク質が非酵素的に還元糖により糖化、修飾されるメイラード反応により生成される最終産物の総称である。この AGE は糖尿病患者やその病変部に蓄積しており、AGE の RAGE との相互作用は糖尿病合併症に関与することが明らかにされている。さらに最近では、RAGE は AGE のみならずアルツハイマー病において脳に蓄積するアミロイド-β蛋白質、癌転移や炎症との関連が明らかにされている。HMGB-1/amphoterin、免疫細胞から分泌される炎症仲介分子 S100/calgranuin、白血球の細胞表面にあるβ2 インテグリン Mac-1、グラム陰性菌外膜の構成物質である lipopolysaccharide (LPS)、アポトーシス細胞上の Phosphatidylserine など様々なリガンドと結合することが明らかにされ、マルチリガンド受容体として糖尿病合併症以外の疾患にも関与する可能性が示唆されている。

本研究室においても、これまでに、各種病態における RAGE の役割について解明を進めてきた。糖尿病血管障害に関して、RAGE トランスジェニックマウスおよび RAGE ノックアウトマウスを作製することにより、AGE-RAGE 相互作用が糖尿病血管障害の発症・進展に重要であることを明らかにしてきた (Yamamoto Y. et al, J Clin Invest, 108, 2001)。さらに、膜貫通タンパクと考えられていた RAGE に、分泌型のスプライスパリアントが存在することを明らかにし、内在性分泌型 RAGE (endogenous secretory RAGE, esRAGE) と名付け、特許を取得した (特許第 3837494 号「可溶性 RAGE タンパク質」および Yonekura H. et al, Biochem J, 370, 2003)。また、アルツハイマー病に関して、アルツハイマー病患者の海馬神経細胞における esRAGE の発現量が有意に低下していること (特許出願 2006-155378, Nozaki I. et al, Arch Histol Cyto, 70, 2007)、および肝臓で esRAGE を過剰発現し血中 esRAGE 濃度が高く維持されるトランスジェニックマウスにおいて、尾静脈に投与したアミロイド-βの脳への移行は、対照マウスと比較して有意に減少することを明らかにした (Sugihara T. et al, J Alzheimer's Dis, 28, 2012)。

これらの研究により RAGE とリガンドとの相互作用により誘導されるシグナルは種々の病態を悪化させることが明らかとなった。このことから、RAGE シグナルの阻害は RAGE 関連疾患の予防・治療に有効な手段であることが示唆された。

2. 研究の目的

マルチリガンド受容体として知られる

RAGE (Receptor for advanced glycation endproducts) は種々のリガンドと結合して細胞内シグナルを誘導し、その結果、糖尿病血管障害、がん、炎症、アルツハイマー病等の病態を悪化させる。それゆえに、RAGE シグナルを阻害することはこれらの病態の予防・治療にとって重要である。申請者らは最近、日本古来の発酵調味料である醤油の低分子画分(分子量 5,000 以下)に RAGE シグナルを阻害する成分があることを初めて明らかにした (Munesue S. et al. Food Funct. 4,2013)。本申請研究ではこの醤油の中に含まれる RAGE シグナル阻害成分を明らかにし、さらにはその阻害機構を解明する。

3. 研究の方法

申請者らは醤油由来の低分子画分(分子量 5,000 以下)に RAGE シグナル阻害効果があること、この画分は AGE の RAGE への結合を競合的に阻害することを明らかにした。そこで培養細胞を用いて組換えヒト esRAGE を作製・精製した後、次に esRAGE 親和性カラムにより醤油由来の低分子の中で RAGE に親和性を示す成分を精製する。この成分を質量分析にかけて醤油低分子中に存在する RAGE 阻害成分の実体を明らかにする。

リガンドの細胞外領域への結合と RAGE 多量体形成の関係を明らかにするため、ヒト RAGE 細胞外領域を部分的に欠損させた組換え体を COS7 細胞により作製する。

4. 研究成果

醤油低分子成分の中で RAGE に結合する成分を精製し、質量分析によりその実体の解明

1. 組換えヒト esRAGE の単離・精製とヒト esRAGE カラムの作製

RAGE 親和性カラム作製のために組換えヒト esRAGE を作製した。ヒト血管内皮細胞からヒト esRAGE の cDNA を得て、ヒト esRAGE 発現ベクターを作成し、発現ベクターを COS7 細胞に導入して安定発現株を得た後、細胞外に分泌された esRAGE を含む培養上清を集めた。ヘパリンカラムとヒト esRAGE 特異的抗体(既に本研究室で作製済み)カラムを用いて精製を行い、得られた組換えヒト esRAGE タンパクを樹脂に固相化し、ヒト esRAGE 親和性カラムを作製した。

2. 醤油低分子中に含まれる RAGE 結合成分の精製・同定

醤油低分子画分の中から RAGE(esRAGE)親和性カラムに結合する成分を集めた。ヒト esRAGE 親和性カラムに醤油低分子画分を添加し結合画分を塩で溶出した後、逆相クロマトグラフィー(Cosmocil 75C18-OPN column)により脱塩を行い、この画分を醤油低分子画分中に含まれる RAGE 結合成分とした。この画分を質量分析にかけ RAGE 結合性の RAGE シグナル阻害画分を得た。

種々の細胞外領域欠損 RAGE の作製

リガンドの細胞外領域への結合と RAGE 多量体形成の関係を明らかにするため、ヒト RAGE 細胞外領域を部分的に欠損させた組換え体を COS7 細胞により作製した。組換え体の C 末端に His タグを連結した。ヒト血管内皮細胞からそれぞれの組換え RAGE の cDNA を得て、変異 RAGE 発現ベクターを作成し、それを COS7 細胞に導入して安定発現株を得た。

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 6 件)

Abouzed TK, Munesue S, Harashima A, Masuo Y, Kato Y, Khailo K, Yamamoto H, Yamamoto Y. Preventive Effect of Salicylate and Pyridoxamine on Diabetic Nephropathy. J Diabetes Res. 2016; 1786789:1-10. 査読有

Takeuchi A, Yamamoto N, Shirai T, Hayashi K, Miwa S, Munesue S, Yamamoto Y, Tsuchiya H. Clinical relevance of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma expression in myxoid liposarcoma. BMC Cancer. 2016;16:442. 査読有

Yamaguchi T, Fushida S, Yamamoto Y, Tsukada T, Kinoshita J, Oyama K, Miyashita T, Tajima H, Ninomiya I, Munesue S, Harashima A, Harada S, Yamamoto H, Ohta T. Tumor-associated macrophages of the M2 phenotype contribute to progression in gastric cancer with peritoneal dissemination. Gastric Cancer. 2016;19:1052-1065. 査読有

Sakai S, Tajima H, Miyashita T, Nakanuma SI, Makino I, Hayashi H, Nakagawara H, Kitagawa H, Fushida S, Fujimura T, Saito H, Munesue S, Yamamoto Y, Ohta T. Sivelestat sodium hydrate inhibits neutrophil migration to the vessel wall and suppresses hepatic ischemia-reperfusion injury. Dig Dis Sci. 2014;59:787-794. 査読有

Kuretani A, Kawamura R, Munesue S, Yamamoto Y, Honda J, Yamamoto H. Maltitol endows foods with lower 3-deoxyglucosone content and less RAGE agonism as a sweetener against sucrose. Glycative Stress Res. 2014;1:25-31. 査読有

Motoyoshi S, Yamamoto Y, Munesue S, Igawa H, Harashima A, Saito H, Han D, Watanabe T, Sato H, Yamamoto H. cAMP ameliorates inflammation by modulation of macrophage receptor for advanced glycation end-products. Biochem J. 2014;463:75-82. 査読有

[学会発表](計 13 件)

棟居 聖一、原島 愛、武内 章彦、佐藤 聡、

中島 慎吾、田沼 靖一、山本 靖彦、RAGE 障害薬の腫瘍悪性形質に及ぼす効果の検討, 第 26 回日本メイラード学会 (筑波)2016 年 11 月 11 日~12 日

原島 愛、棟居 聖一、山本 靖彦、ヒト Glyoxalase1(GLO1)の新規ホモポリマー遺伝子多型による転写調節機構, 第 26 回日本メイラード学会 (筑波)2016 年 11 月 11 日~12 日

Takeuchi A, Yamamoto Y, Munesue S, Yamamoto N, Hayashi K, Higuchi T, Abe K, Taniguchi Y, Tsuchiya H, Receptor for advanced glycation end-products induced osteosarcoma cancer stem-like cells with co-expression of CD133., Connect with colleagues (CTOS), Lisbon, Portugal(2016, Nov. 9-12)

清水有、山本 靖彦、原島 愛、棟居 聖一、大石正博、林康彦、中田光俊、北尾康子、堀修、山本 博、内在性分泌型 RAGE は脳虚血から神経細胞を保護する, 第 30 回日本糖尿病合併症学会 (名古屋), 2015 年 11 月 27~28 日

武内章彦、山本 憲男、林 克洋、三輪 真嗣、稲谷 弘幸、青木 裕、樋口 貴史、阿部 健作、棟居 聖一、山本 靖彦、土屋 弘行、粘液型脂肪肉腫における PPAR の発現と予後因子解析, 第 53 回日本癌治療学会学術集会 (京都), 2015 年 10 月 29 日~31 日

Shimizu Y, Munesue S, Yamamoto Y, Harashima A, Oishi M, Hayashi Y, Nakada M, Kitao Y, Hori O, Yamamoto H., Neuroprotective effects of endogenous secretory rAGE in ischemic cerebrovascular diseases., 12th International Symposium on the Maillard Reaction (ISMR) Tokyo, Japan(2015, Sep. 1-4)

Han D, Yamamoto Y, Munesue S, Harashima A, Yamamoto H., Insufficient leptin action induces RAGE expression and triggers pancreatic beta-cell failure type 2 diabetes., 12th International Symposium on the Maillard Reaction (ISMR) Tokyo, Japan(2015, Sep. 1-4)

Yasunami Y, Yamamoto Y, Munesue S, Yamamoto H., RAGE of donor islets is a novel target to improve the efficiency of islets transplantation., 12th International Symposium on the Maillard Reaction (ISMR) Tokyo, Japan(2015, Sep. 1-4)

シンポジウム 3「食餌療法のサイエンス-最新のエビデンスをふまえて-」タイトル「生体に対する食品 AGE の作用」棟居 聖一, 第 58 回日本糖尿病学会年次学術集会シンポジウム(下関)シンポジスト, 2015 年 5 月 21 日

清水有、山本 靖彦、原島 愛、棟居 聖一、林 康彦、北尾 康子、堀 修、山本 博、内在性分泌型 RAGE は血液脳関門を越えて神経細胞を保護する, 第 24 回日本メイラード学会

年会(熊本)2014年11月7日~8日

清水 有、山本 靖彦、原島 愛、棟居 聖二、大石 正博、林 康彦、北尾 康子、堀 修、山本 博、内在性分泌型 RAGE は血管脳関門を越えてデコイ受容体としての神経細胞保護作用を發揮する、第 87 回日本生化学会大会(京都)2014年10月15日~18日

山本靖彦、韓冬、棟居聖二、山本博、臍細、胞のレプチンシグナル不全は RAGE の発現誘導を介して臍細胞疲弊に関わる、第 14 回日本抗加齢医学会総会(大阪)2014年6月6~8日

棟居聖二、山本靖彦、原島愛、漆原涼太、齋藤英仁、本吉創、渡辺琢夫、山本博、食品由来 AGE による AGE-RAGE シグナルの阻害効果、第 57 回日本糖尿病学会年次学術集会(大阪)2014年5月22日~24日

〔図書〕(計 1 件)

棟居聖二、原島愛、山本靖彦、メイラード反応の機構・制御・利用、第 6 章 AGE 受容体 RAGE、宮沢陽夫監修、pp48-52 (シーエムシー出版)(2016)

〔産業財産権〕

出願状況(計 2 件)
特許出願

名称:オキシトシン検出のためのサンプルの前処理方法

発明者:東田陽博、山本靖彦、棟居聖二、原島愛、出口喜三郎

権利者:国立大学法人金沢大学

種類:特許出願

番号:2014-255756

出願年月日:2014年12月18日

国内外の別:国内

名称:オキシトシントランスポーター

発明者:東田陽博、山本靖彦、山本 博、棟居聖二、原島愛、堀 修、出口喜三郎

権利者:国立大学法人金沢大学

種類:特許出願

番号:2014-255721

出願年月日:2014年12月18日

国内外の別:国内

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〕

ホームページ等

金沢大学医薬保健学域医学系・血管分子生物学

<http://biochem2.w3.kanazawa-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

棟居 聖一 (MUNESUE Seiichi)

金沢大学・医学系・助教

研究者番号:10399040

(2) 研究分担者

山本 博 (YAMAMOTO Hiroshi)

金沢大学・その他部局・理事

研究者番号:00115198

山本靖彦 (YAMAMOTO Yasuhiko)

金沢大学・医学系・教授

研究者番号:20313637

(3) 連携研究者

なし()

研究者番号:

(4) 研究協力者

なし()