

令和 3 年 5 月 26 日現在

機関番号：11101

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16220

研究課題名（和文）RAGEとマクロファージ極性変化を標的とした糖尿病性神経障害の新規治療法の開発

研究課題名（英文）Development of novel treatment approach for diabetic polyneuropathy targeting RAGE signaling and macrophage polarization

研究代表者

遅野井 祥（Osonoi, Sho）

弘前大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号：40816261

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：糖尿病性神経障害（DPN）に対する根治的な治療法は確立されていない。本研究では新規治療標的となる病態機序として、終末糖化産物とその受容体RAGEのシグナルおよびマクロファージを介した炎症に着目した。糖尿病RAGE欠損マウス、マクロファージのRAGEを欠損する糖尿病骨髄細胞特異的RAGE欠損マウスはDPNの発症・進展が抑制された。詳細な解析により、RAGEシグナルの活性化が末梢神経に浸潤するマクロファージを炎症性形質に分化させ、炎症性サイトカインによる神経のインスリン感受性の低下、軸索輸送障害を介して神経障害を惹起するという病態機序を解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究により、マクロファージにおけるRAGEシグナルがDPNの発症・進展に関与し、その抑制がDPNの新規治療法となる可能性が示された。DPNは最も有病率が高く、早期に発症する糖尿病性合併症であり、進行期には下肢の壊疽や心臓血管自律神経障害の合併により予後を左右する。有効な治療法を開発することで患者のQOLや予後の改善、医療経済負担の削減が期待される。

研究成果の概要（英文）：Radical treatment for diabetic neuropathy (DPN) has not been established. In this study, we focused on the signaling of advanced glycation end products and their receptors, RAGE, and macrophage-mediated inflammation as pathological mechanisms for novel therapeutic targets. Diabetic RAGE-deficient mice and diabetic bone marrow cell-specific RAGE-deficient mice, which lack macrophage RAGE, showed reduced development and progression of DPN. Through detailed analysis, we elucidated the pathological mechanism by which activation of RAGE signaling induces macrophages infiltrating peripheral nerves to differentiate into pro-inflammatory phenotype and induces neuropathy through decreased insulin sensitivity of nerves by inflammatory cytokines and impaired axonal transport.

研究分野：糖尿病性合併症

キーワード：糖尿病性神経障害 マクロファージ 終末糖化産物 RAGE 軸索輸送

1. 研究開始当初の背景

糖尿病性神経障害 (DPN) は糖尿病患者の QOL を著しく低下させ、時には致命的となる糖尿病性合併症であるが、根治的な治療法は確立されておらず、新規の治療標的となる病態機序の解明が模索されている。高血糖に伴う終末糖化産物 AGEs の産生、AGEs 等を認識する受容体 RAGE のシグナルは糖尿病性合併症の成因の一つであり、DPN の発症・進展における関与が報告されているが詳細な機序は解明されていない。AGEs-RAGE シグナルの亢進が臓器障害を来す機序は炎症を介することが判っており、2 型糖尿病の脂肪組織においては催炎症性マクロファージ (M₁) である M1 の集積を来してインスリン抵抗性の形成に関わる。また、これまでに実験的 DPN の坐骨神経においてはマクロファージの浸潤が増加することが報告されていたが、その病態形成における意義は不明であった。これらのことから、申請者は高血糖に伴う AGEs-RAGE シグナルの亢進はマクロファージ関連の炎症を介して DPN を発症・進展させるのではないかという仮説を立てた。

2. 研究の目的

AGEs-RAGE シグナルの亢進が DPN を発症・進展させる機序を解明し、新規の治療標的を同定することを目的とした。

3. 研究の方法

実験 全身性 RAGE 欠損マウスを用いた DPN の病態機序の解明

8 週齢の C57BL/6 (WT) と全身性 RAGE 欠損マウス (RN) を実験に使用し、ストレプトゾトシンの腹腔注射により糖尿病 (DM) を発症させた。糖尿病発症 8 週後に神経伝導速度 (NCV) を測定した。逆行性軸索輸送を評価するために後脚足底に 5% Fluoro-gold (FG) 5 μ l を皮下注射した。5 日後、吸入麻酔下に 5 単位のインスリンを静注し、10 分後に坐骨神経 (SN)、脊髄後根神経節 (DRG)、後脚足底の皮膚を摘出した。SN と DRG には H&E 染色、免疫染色 (IHC) および蛍光免疫染色 (IF) による病理学的解析、Western blotting (WB) による蛋白発現解析、定量的 PCR による遺伝子発現解析を行った。足底皮膚には IF により表皮内神経密度 (IENFD) の定量を行った。

実験 骨髄特異的 RAGE 欠損マウスの作出に基づく DPN の発症・進展における M₁-RAGE シグナルの関与の解明

10 週齢の WT に 9.5 Gy の放射線を照射して骨髄を破壊した。WT あるいは RN の大腿骨から採取した骨髄細胞を尾静注により移植し BMWT および BMRN を作出した。骨髄移植 8 週後に実験と同様に糖尿病を発症させ、DPN の表現型を解析した。

実験 M₁ とシュワン細胞およびニューロンの共培養系を用いた神経機能障害機序の解明

M₁ はマウス白血病細胞由来単球細胞株の RAW264.7 と WT の大腿骨から採取・誘導した骨髄 M (BMDM) を使用した。シュワン細胞はマウス不死化シュワン細胞株 IMS32、ニューロンは WT の DRG から分散培養した初代培養 DRG ニューロンを使用した。M₁-IMS32 共培養系では非刺激 M (M₀) あるいは AGEs、IL-4 により分化させた催炎症性 M の M1、抗炎症性 M の M2 と IMS32 を 12 時間間接共培養し、インスリンシグナル分子のリン酸化を WB により解析した。M₁-DRG 共培

養系では M0 あるいは M1 とニューロンを 12 時間直接共培養した。軸索内小胞を LysoTracker により蛍光標識し、Time-lapse 撮影により軸索輸送を可視化、定量した。

4. 研究成果

実験

糖尿病発症 8 週時点で WT-DM は NCV が低下し DPN を発症したが、RN-DM は DPN の発症が抑制された。WT-DM の SN では M 関連の炎症マーカーである TNF、iNOS の mRNA の発現が増加し、iNOS に対する IHC で標識した M1 の浸潤数が増加した。一方で、RN-DM では M1 の浸潤数は増加せず、M2 関連のマーカーである CD163、Arginase1 の mRNA の発現が増加し、CD206 に対する IHC で標識した M2 の浸潤数が増加した。SN における M1/M2 比は WT-DM で最大となった。SN におけるインスリンシグナル分子のリン酸化を WB により解析したところ、WT-DM においてインスリン刺激に対する AKT および GSK3 のリン酸化反応が減弱していた。RN-DM ではそれらが RN-non DM と同等に維持されていた。DRG の H&E 染色切片で DRG ニューロンの形態解析を行ったところ、WT-DM で細胞体面積の低下を認めたが、RN-DM では RN-non DM と同等に維持されていた。DRG に FG に対する IF を施し、FG の陽性率を逆行性軸索輸送の指標とした。FG 陽性率は WT-DM で低下したが、RN-DM では RN-non DM と同等に維持されていた。

実験

骨髄破壊、骨髄移植により BMRN の骨髄における RAGE mRNA の発現は 70-80%低下した。BMWT-DM は実験の WT-DM と同様の DPN 表現型を示した。BMRN-DM では non DM と比して神経伝導速度が低下したものの、BMWT-DM より有意に高値であり、DPN の進展が抑制されていた。M の極性、インスリンシグナルの感受性、DRG ニューロンの形態、FG の輸送能について、BMRN-DM は RN-DM と同様に non DM と同等に維持されていた。

実験

M -IMS32 共培養系において、M1 と共培養後の IMS32 ではインスリン刺激に対する AKT のリン酸化が低下したが、M2 と共培養後の IMS32 では AKT のリン酸化が M0 と同等に維持された。M -DRG 共培養系では M0 と比して M1 と共培養したニューロンの軸索において、逆行性輸送の頻度と速度が低下した。

【結論】

全身性の RAGE シグナル欠損は DPN の発症を抑制する。しかし、RAGE 阻害薬は副作用により臨床応用が困難である。一方で、本研究により M 特異的な RAGE の欠損によっても全身性 RAGE 欠損と類似した DPN の進展抑制作用があることが示された。また、AGEs-RAGE シグナルの亢進が DPN を発症・進展させる機序として、炎症を介する末梢神経のインスリンシグナルの減弱、逆行性軸索輸送の障害が関わることを解明した。以上より本研究から、M の RAGE シグナルの抑制が DPN の新規治療標的となる可能性が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Moon Joon Ho, Kim Yeong Gi, Kim Kyuho, Osonoi Sho, Wang Shuang, Saunders Diane C., Wang Juehu, Yang Katherine, Kim Hyeongseok, Lee Junguee, Jeong Ji-Seon, Banerjee Ronadip R., Kim Seung K., Wu Yingjie, Mizukami Hiroki, Powers Alvin C., German Michael S., Kim Hail	4. 巻 69
2. 論文標題 Serotonin Regulates Adult -Cell Mass by Stimulating Perinatal -Cell Proliferation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Diabetes	6. 最初と最後の頁 205 ~ 214
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2337/db19-0546	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Takahashi Masaya, Miyatsuka Takeshi, Suzuki Luka, Osonoi Sho, Himuro Miwa, Miura Masaki, Katahira Takehiro, Wakabayashi Yuka, Fukunaka Ayako, Nishida Yuya, Fujitani Yoshio, Takeda Satoru, Mizukami Hiroki, Itakura Atsuo, Watada Hirotake	4. 巻 10
2. 論文標題 Biphasic changes in -cell mass around parturition are accompanied by increased serotonin production	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-61850-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Umetsu Satoko, Mizukami Hiroki, Saito Takeshi, Uchida Chiaki, Igawa Akiko, Kudo Kazuhiro, Itabashi Chieko, Osonoi Sho, Danyang Guo, Sasaki Takanori, Yagihashi Soroku, Hakamada Kenichi	4. 巻 10
2. 論文標題 Diabetes, an independent poor prognostic factor of non-B non-C hepatocellular carcinoma, correlates with dihydropyrimidinase-like 3 promoter methylation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-57883-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Itabashi Chieko, Mizukami Hiroki, Osonoi Sho, Takahashi Kazuhisa, Kudo Kazuhiro, Wada Kanichiro, Inaba Wataru, Danyang Guo, Uchida Chiaki, Umetsu Satoko, Igawa Akiko, Ogasawara Saori, Ryuzaki Masaki, Komeda Kouji, Ishibashi Yasuyuki, Yagihashi Soroku, Nakaji Shigeyuki	4. 巻 10
2. 論文標題 Normal High HbA1c a Risk Factor for Abnormal Pain Threshold in the Japanese Population	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Endocrinology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fendo.2019.00651	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Guo Danyang, Mizukami Hiroki, Osonoi Sho, Takahashi Kazuhisa, Ogasawara Saori, Kudo Kazuhiro, Sasaki Takanori, Yagihashi Soroku	4. 巻 107
2. 論文標題 Beneficial effects of combination therapy of canagliflozin and teneligliptin on diabetic polyneuropathy and -cell volume density in spontaneously type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Metabolism	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.metabol.2020.154232	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Osonoi Sho, Mizukami Hiroki, Itabashi Chieko, Wada Kanichiro, Kudoh Kazuhiro, Igawa Akiko, Ogasawara Saori, Ishibashi Yasuyuki, Daimon Makoto, Yagihashi Soroku, Nakaji Shigeyuki	4. 巻 21
2. 論文標題 Increased Oxidative Stress Underlies Abnormal Pain Threshold in a Normoglycemic Japanese Population	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 8306 ~ 8306
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21218306	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kudoh Kazuhiro, Mizukami Hiroki, Itabashi Chieko, Fuke Nobuo, Osonoi Sho, Takeuchi Yuki, Wada Kanichiro, Igawa Akiko, Ogasawara Saori, Ishibashi Yasuyuki, Hakamada Kenichi, Yagihashi Soroku, Nakaji Shigeyuki	4. 巻 8
2. 論文標題 Lipopolysaccharide-binding protein is a distinctive biomarker of abnormal pain threshold in the general Japanese population	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMJ Open Diabetes Research & Care	6. 最初と最後の頁 1739 ~ 1739
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/bmjdr-2020-001739	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Mizukami Hiroki, Osonoi Sho, Takaku Shizuka, Yamagishi Shin-Ichiro, Ogasawara Saori, Sango Kazunori, Chung Sookja, Yagihashi Soroku	4. 巻 2
2. 論文標題 Role of glucosamine in development of diabetic neuropathy independent of the aldose reductase pathway	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Brain Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/braincomms/fcaa168	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計17件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Sho Osonoi, Hiroki Mizukami, Saori Ogasawara, Kazunori Sango, Kazuhisa Takahashi, Yasuhiko Yamamoto, Hiroshi Yamamoto, Soroku Yagihashi
2. 発表標題 Deficit of Retrograde Axonal Transportation Was Mediated via Activation of Macrophage RAGE Signaling in Experimental Diabetic Polyneuropathy
3. 学会等名 American Diabetes Association 79th Scientific Sessions (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 遅野井 祥, 水上 浩哉, 進藤 陸生, 高橋 和久, 小笠原 早織, 三五 一憲, 山本 靖彦, 山本 博, 八木橋 操六
2. 発表標題 RAGE欠損マウスは抗炎症性マクロファージ優位の浸潤により糖尿病性神経障害の発症が抑制される
3. 学会等名 第108回日本病理学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 遅野井 祥, 水上 浩哉
2. 発表標題 糖尿病性神経障害の病期と病態
3. 学会等名 第34回日本糖尿病合併症学会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 遅野井 祥, 水上 浩哉, 進藤 陸生, 高橋 和久, 小笠原 早織, 三五 一憲, 山本 靖彦, 山本 博, 八木橋 操六
2. 発表標題 糖尿病性神経障害におけるM1マクロファージ浸潤は逆行性軸索輸送を減弱させる
3. 学会等名 第62回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 遅野井 祥, 水上 浩哉, 進藤 陸生, 佐々木 崇矩, 高橋 和久, 小笠原 早織, 三五 一憲, 山本 靖彦, 山本 博, 八木橋 操六
2. 発表標題 糖尿病性神経障害ではRAGE依存性炎症により坐骨神経逆行性軸索輸送が障害される
3. 学会等名 令和元年度糖尿病性神経障害を考える会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sho Osonoi, Hiroki Mizukami, Saori Ogasawara, Kazunori Sango, Kazuhisa Takahashi, Yasuhiko Yamamoto, Hiroshi Yamamoto, Soroku Yagihashi
2. 発表標題 Suppression of Neuropathy Development in Diabetic Rage-Deficient Mice Is Associated with Absence of M1/M2 Macrophage Skewing in the Sciatic Nerve
3. 学会等名 American Diabetes Association 78th Scientific Sessions (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 遅野井 祥, 水上 浩哉, 高橋 和久, 小笠原 早織, 三五 一憲, 山本 靖彦, 山本 博, 八木橋 操六
2. 発表標題 糖尿病性神経障害におけるマクロファージ浸潤とDRGニューロン萎縮の関係について
3. 学会等名 第61回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 遅野井 祥, 水上 浩哉, 高橋 和久, 小笠原 早織, 三五 一憲, 山本 靖彦, 山本 博, 八木橋 操六
2. 発表標題 糖尿病性神経障害におけるM1マクロファージ浸潤は逆行性軸索輸送を減弱させる
3. 学会等名 第62回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 遅野井 祥, 水上 浩哉, 高橋 和久, 小笠原 早織, 三五 一憲, 山本 靖彦, 山本 博, 八木橋 操六
2. 発表標題 糖尿病性神経障害における浸潤マクロファージ極性とDRGニューロンの萎縮の関係について
3. 学会等名 第33回日本糖尿病合併症学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 遅野井 祥, 水上 浩哉, 高橋 和久, 小笠原 早織, 三五 一憲, 山本 靖彦, 山本 博, 八木橋 操六
2. 発表標題 RAGEシグナルは糖尿病性神経障害における坐骨神経逆行性輸送に関与する
3. 学会等名 第33回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sho Osonoi, Takanori Sasaki, Yuki Takeuchi, Saori Ogasawara, Kazuhiro Kudo, Koichi Ito, Kazunori Sango, Yasuhiko Yamamoto, Hiroshi Yamamoto, Soroku Yagihashi, Hiroki Mizukami
2. 発表標題 RAGE Dependent Macrophage Activation Aggravates Retrograde Axonal Transport via Attenuated Insulin Signaling of Peripheral Nerves in Experimental Diabetic Polyneuropathy
3. 学会等名 American Diabetes Association 81th Scientific Sessions (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 遅野井 祥、佐々木 崇矩、竹内 祐貴、小笠原 早織、工藤 和洋、伊藤 巧一、三五 一憲、山本 靖彦、山本 博、八木橋 操六、水上 浩哉
2. 発表標題 糖尿病性神経障害においてRAGEシグナルはマクロファージを活性化し、末梢神経のインスリン抵抗性と逆行性軸索輸送障害を惹起する
3. 学会等名 第64回日本糖尿病学会年次学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 遅野井 祥、佐々木 崇矩、小笠原 早織、工藤 和洋、伊藤 巧一、三五 一憲、山本 靖彦、山本 博、八木橋 操六、水上 浩哉
2. 発表標題 マクロファージのRAGEシグナルは糖尿病性神経障害の発症、進展に関与している
3. 学会等名 第35回糖尿病合併症学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 遅野井 祥、佐々木 崇矩、小笠原 早織、工藤 和洋、伊藤 巧一、三五 一憲、山本 靖彦、山本 博、八木橋 操六、水上 浩哉
2. 発表標題 骨髄特異的RAGE欠損マウスにおける糖尿病性神経障害の表現型について
3. 学会等名 第31回日本末梢神経学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 遅野井 祥、水上 浩哉、進藤 陸生、佐々木 崇矩、高橋 和久、小笠原 早織、三五 一憲、山本 靖彦、山本 博、八木橋 操六
2. 発表標題 糖尿病性神経障害におけるM1マクロファージの浸潤はJNK経路の活性化とインスリンシグナルの減弱を介して逆行性軸索輸送を障害する
3. 学会等名 第30回日本末梢神経学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sho Osonoi, Hiroki Mizukami, Saori Ogasawara, Takanori Sasaki, Kazunori Sango, Kazuhisa Takahashi, Yasuhiko Yamamoto, Hiroshi Yamamoto, Soroku Yagihashi,
2. 発表標題 Activated Macrophage via RAGE Signaling Induces Insulin Resistance and Deficit of Retrograde Axonal Transport in Diabetic Polyneuropathy
3. 学会等名 第1回弘前メディカルサイエンスフォーラム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 遅野井 祥, 水上 浩哉, 高橋 和久, 小笠原 早織, 三五 一憲, 山本 靖彦, 山本 博, 八木橋 操六
2. 発表標題 糖尿病性神経障害における浸潤マクロファージ極性とDRGニューロンの萎縮の関係について
3. 学会等名 平成30年度糖尿病性神経障害を考える会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------