

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：32682

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05832

研究課題名(和文) コラーゲン架橋分子ピリジノリンおよび受容体RAGEの生理的・病理的意義の解析

研究課題名(英文) Analysis of physiological and pathological roles of a collagen crosslink pyridinoline and its receptor RAGE

研究代表者

渡邊 寛人 (Watanabe, Hirohito)

明治大学・農学部・専任教授

研究者番号：20270895

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：われわれは3-ヒドロキシピリジニウム(3HP)構造をもつ糖化タンパク質(AGE)が受容体RAGEに結合することを見出すとともに、3HP構造を含むコラーゲン架橋ピリジノリンがRAGEの内在性リガンドとして機能しうることを明らかにしている。本研究ではRAGEの病理学的役割をさらに明確なものとするため、3HP構造をもつ新奇AGEの構造・特性の解明を目指した。その結果、ラクトアルデヒドから形成されるリジン修飾構造として新奇AGEがRAGEを介した細胞毒性を発揮することを明らかにした。さらにピリジノリンが破骨細胞分化を抑制することを見出し、RAGEの新たな生理学的役割を示唆する成果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではラクトアルデヒドから新奇RAGE結合性AGEが形成されることを見出し、その毒性発現機構の一部を明らかにした。本成果は炎症時や代謝異常で増大するラクトアルデヒドにより糖尿病合併症に類似した疾患が発症しうることを示したものであり、RAGEの病理学的な役割をさらに明確にしたものと考えられる。さらにRAGEの生理的リガンドと考えられるピリジノリンが骨代謝に關与する細胞群に作用しうることを初めて明らかにした。本成果は骨代謝の新たな制御機構の存在を示唆した点で基礎生物学的に意義をもつものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We have found that advanced glycation end products (AGEs) with a 3-hydroxypyridinium (3HP) structure bind to RAGE. We have also shown that pyridinoline, a collagen crosslink containing a 3HP moiety, can function as an endogenous ligand for RAGE. In this study, in order to clarify the pathological role of RAGE, we aimed to elucidate the structure and characteristics of novel AGE with 3HP structure. We identified a novel lysine-adduct formed from lactaldehyde, and showed that the novel AGE elicits RAGE-dependent cytotoxicity. Furthermore, we analyzed the physiological effects of pyridinoline on bone metabolism. We found that pyridinoline suppresses osteoclast differentiation, indicating the novel physiological role of RAGE.

研究分野：食品科学

キーワード：メイラード反応 コラーゲン ピリジノリン RAGE

1. 研究開始当初の背景

糖尿病患者においてはメイラード反応によりタンパク質側鎖に多種多様な修飾構造 (advanced glycation end product; AGE) が形成される。AGE はその受容体 RAGE (Receptor for AGE) との結合を介して糖尿病合併症 (DC) 発症を惹起するが、多様な AGE 構造群のうちどの構造が RAGE に結合し作用するかは不明であった。

われわれは、 α -ヒドロキシアルデヒドから毒性の高い AGE が生じるとの報告を基に、グリセルアルデヒド由来の各種 AGE 構造の毒性および RAGE 結合性を解析した結果、3-ヒドロキシピリジニウム (3HP) 構造を有する AGE が RAGE との結合・作用に必要なことを見出した。しかしながらグリセルアルデヒド以外のカルボニル化合物からも 3HP 構造を有する AGE が形成されると推定されることから、RAGE の病理学的意義を解明するためにそれら AGE の同定が課題となっていた。

一方、われわれは細胞外マトリクス (ECM) 成分であるコラーゲンに特有の架橋分子であり、3HP 構造をもつピリジノリン (PYR) が RAGE に認識されることを明らかにした。PYR はコラーゲン分解によって遊離することから、RAGE の本来の、すなわち生理学的な機能はコラーゲン分解の感知であると推定された。しかしながら、PYR の生理作用について解析した例は皆無であり、RAGE の PYR 認識の意義も不明であった。

2. 研究の目的

以上の背景から、本研究においては DC 発症に関与しうる新たな RAGE リガンドすなわち新奇 AGE 構造を同定することを目的とした。それに加えてわれわれが見出した RAGE の生理的リガンドである PYR の作用を明らかにすることを目指した。具体的には代謝異常や炎症により増大することが報告されているラクトアルデヒドから形成される AGE に関して、単離・構造および作用の解析を行った。それに加えてコラーゲン分解をとまなう骨代謝における PYR の作用を解析した。

これらの解析により、DC などの疾患発症における RAGE の病理学的な意義が明らかになるとともに、コラーゲン分解感知を起点とした RAGE の新たな生理的意義の解明、ひいては新たな生理現象の理解に貢献しうると考えた。

3. 研究の方法

(1) ラクトアルデヒド由来 AGE の単離と構造の解析

ラクトアルデヒドから 3HP 構造を有する AGE が形成されるか検討するため、20mM N^{α} -アセチリジンと 40mM ラクトアルデヒドを 0.2M リン酸緩衝液 (pH 7.4) 中で 37°C、4 日間反応させた。反応液を Sep-Pak C18 カートリッジ (Waters) に供し、50% アセトニトリルで目的物を溶出させた。これを乾固して水に再溶解したものを HPLC カラム (Inertsil ODS-4、ジーエルサイエンス) に供し、3HP 含有生成物を 290nm の吸収により検出した。主要生成物を同様の HPLC に供することにより精製した。

精製した AGE を LC-ESI-QTOF-MS (Agilent Technologies 6520) に供して分子量および組成式を解析した。さらに NMR 解析 (日本電子 ECP-500) に供して構造を同定した。以下この AGE をアセチル化 LAPL (lactaldehyde-derived pyridinium-type lysine adduct) と称することとした。

(2) ラクトアルデヒド由来 AGE の作用の解析

LAPL の作用として細胞毒性を解析した。ラット PC12 細胞を 96 well プレートにて培養し、アセチル化 LAPL を添加して 72 時間後の細胞生存率をトリパンブルー排除法によって評価した。

さらに LAPL の RAGE 結合性を解析した。組換え RAGE タンパク質を調製し、アセチル化 LAPL との結合性を表面プラズモン共鳴解析 (Biacore X100、GE ヘルスケア) によって評価した。

(3) 破骨細胞の分化および骨吸収能に対する PYR の作用の解析

PYR はウシアキレス腱の塩酸加水分解物を各種クロマトグラフィーに供することによって精製した。マウス RAW264.7 細胞を RANKL 共存下で培養し、破骨細胞へと分化させた。培養後の細胞分化をファロイジン染色による細胞融合度で評価した。さらに骨基質上で破骨細胞を培養し、骨吸収活性を吸収窩面積により評価した。

PYR を培養期間中終濃度 100 μ M で作用させ、細胞分化、骨吸収活性に与える影響を解析した。

(4) 骨芽細胞の分化に対する PYR の作用の解析

マウス MC3T3-E1 細胞をアスコルビン酸および β -グリセロリン酸存在下で培養し、骨芽細胞へと分化させた。

培養期間中 PYR を終濃度 50 μ M で作用させ、分化に対する影響を解析した。分化度は遺伝子発現変化およびアリザリンレッド染色により評価した。

4. 研究成果

(1) ラクトアルデヒド由来 AGE の単離と構造の解析

N^α-アセチルリジンとラクトアルデヒドの反応により形成される AGE を解析した。その結果 290nm に極大吸収をもつ主要な生成物を見出した。これを精製し、LC-MS 解析に供した結果、その分子量は 281.1、組成式は C₁₄H₂₁N₂O₄ であることが明らかとなった。

NMR 解析の結果、精製された化合物は 3HP 構造を有する新奇 AGE であることが明らかとなった (図 1)。ピリジニウム環を有することから見出した新奇 AGE 構造の名称を LAPL とし、α-アミノ基がアセチル化された本精製物をアセチル化 LAPL と称することとした。

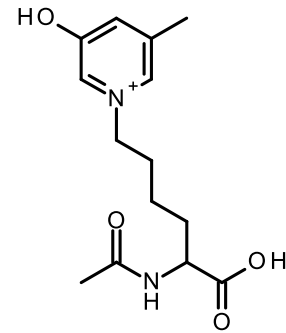


図 1 アセチル化 LAPL の構造

(2) ラクトアルデヒド由来 AGE の作用の解析

PC12 細胞に対する細胞毒性を評価したところ、10 μ M アセチル化 LAPL を 72 時間添加することにより、細胞生存率は有意に低下した。一方、アセチル化 LAPL 作用時に RAGE のリガンド結合領域 (V domain) を共存させると、細胞生存率は回復した。このことから LAPL 構造が RAGE を介して細胞毒性を発揮することが示唆された。

次に RAGE との直接的な結合性を評価するため、表面プラズモン共鳴解析を行ったところ、アセチル化 LAPL は組換え RAGE に特異的に結合することが明らかになった。

(3) 破骨細胞の分化および骨吸収能に対する PYR の作用の解析

PYR の共存下で破骨細胞を培養し、ファロイジン染色により解析した結果、PYR の作用により長径 250 μ m 以上の巨大な破骨細胞数が有意に減少することが明らかとなった。このことから PYR により破骨細胞分化における重要な段階である細胞融合が抑制されることが示された。さらに骨基質上で培養し骨吸収活性を解析した結果、PYR 共存下で培養することにより、吸収窩面積は著しく減少した。PYR の作用により分化が抑制された結果、骨吸収活性が低下したものと考えられた。

(4) 骨芽細胞の分化に対する PYR の作用の解析

PYR の共存下で骨芽細胞を 25 日間培養し、アリザリンレッド染色により骨形成能を解析した結果、PYR の作用により染色度は有意に低下した。このことから長期間の作用において PYR は骨芽細胞分化を抑制することが示唆された。一方、分化初期段階の作用を明らかにするため、分化 7 日目の遺伝子発現を解析した結果、分化初期のマーカーである *osterix* の発現は PYR の共存により有意に増大した。一方、21 日目の遺伝子発現を解析した結果、分化後期のマーカーである *osteocalcin* の発現は PYR の共存により有意に低下した。これらのことから PYR の骨芽細胞分化への作用は初期段階と後期段階で異なることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Fujimoto Shiori, Murakami Yoto, Miyake Haruna, Hayase Fumitaka, Watanabe Hirohito	4. 巻 83
2. 論文標題 Identification of a novel advanced glycation end product derived from lactaldehyde	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1136-1145
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/09168451.2019.1585745	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岡田楓夏、三宅春奈、関口陽香、村上庸人、早瀬文孝、渡辺寛人
2. 発表標題 コラーゲン架橋分子ピリジノリンは破骨細胞分化を抑制する
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 村上庸人、藤野峻行、倉知遼太郎、長谷川俊樹、臼井照幸、早瀬文孝、渡辺寛人
2. 発表標題 糖化タンパク質受容体RAGEの新奇内因性リガンドとしてのコラーゲン架橋分子ピリジノリンの同定
3. 学会等名 第51回日本結合組織学会学術大会
4. 発表年 2019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
---------	---------