

受賞対象論文

Gao Y, Wake H, Morioka Y, Liu K, Teshigawara K, Shibuya M, Zhou J, Mori S, Takahashi H, Nishibori M : Phagocytosis of Advanced Glycation End Products (AGEs) in Macrophages Induces Cell Apoptosis. *Oxid Med Cell Longev* (2017) 2017, 8419035.

高 遠

Yuan Gao



岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 薬理学

Department of pharmacology, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences

<プロフィール>

昭和62年生まれ

平成23年6月 ハルビン医科大学薬学部臨床薬学科卒業

平成23年10月 O-NECUS プログラム短期留学（岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 薬理学）

平成24年9月 O-NECUS プログラム短期留学修了

平成24年9月 ハルビン医科大学第一臨床医学部大学院修士課程入学

平成26年10月 ハルビン医科大学第一臨床医学部大学院修士課程修了

平成26年10月 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科博士課程入学

平成30年9月 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科博士課程修了

平成30年11月 南カリフォルニア大学ケック医学校 ジルカ神経遺伝学研究所 ポスドク

現在に至る

研究の背景と経緯

2013年、薬理学教室でONECUS交換留学生として勉強させていただくことになりました。その際に初めて基礎研究に従事しました。最初に、マクロファージ細胞を用いて、細胞培養に必要な手法と技術について学び、論文を読んで研究テーマを考えました。当時一緒に研究した先輩は違う構造の終末糖化産物(advanced glycation end products : AGEs)を用いて、AGE1-AGE5のマクロファージによる取り込み現象を観測していました。また、マクロファージ細胞に作用が一番強いAGEsはAGE2とAGE3という結果を得ていました。そこから、先輩が精製したAGEsと終末糖化産物認識抗体(anti-AGE antibody)を用いてマクロファージによる終末糖化産物の取り込み実験を行いました。

AGEは、簡単に言うと、タンパク質の糖質による修飾から最終的に生まれる物質の総称です。これまでに報告されている生体内の主なAGEsとして、蛍光性かつ架橋性を持つペンチジン、非蛍光性かつ架橋性のメチルグリオキサールリジンダイマー(MOLD)、非蛍光性かつ非架橋性のカルボキシメチルリジン(CML)やピラリンが挙げられます¹⁾。これらのAGEsに関する研究は、皮膚や糖尿病及びその合併症、脳、

呼吸器などで進んでいるようです。例えば、皮膚を構成する主要な細胞外マトリクスであるコラーゲンは、加齢と共に糖化が進むことで伸展性を失い、結果として皮膚のしわやたるみの形成につながるとされています。また、AGEとなったコラーゲンは、活性酸素種(reactive oxygen species : ROS)を生成し、骨細胞死や骨密度低下を引き起こすことが知られています²⁾。糖尿病による高血糖状態で産生されるAGEsが、糖尿病性血管合併症の原因物質として機能するのではないかとする考えがあり、長く注目されてきました³⁾。

糖化ストレスによって血中や組織中にAGEsが蓄積すると、生体内では生理的機能の低下や障害が進展します。近年の研究ではAGEsの受容体として、receptor for advanced glycation end products(RAGE)を介した細胞内のシグナル伝達経路やAGEsをトラップして除去する受容体の存在が確認されています^{4,5)}。しかし、AGEsは受容体に作用する以外に細胞内で形成されるか、一旦生体内で形成されたAGEsがどのような運命を辿るのか、どのように処理され消去されるのか、どのような細胞が処理に与っているのか、またその細胞の運命等は明らかになっていません。

研究を始めた当初、生物活性の強いことがこれまでの研究で明らかにされているAGE2とAGE3の

J774.1細胞への取りこみの基本的動態とその過程の解析を試みました。まず、実験の条件：AGEsの濃度、AGEs作用時間、細胞内の抗原を検出するため細胞膜の破壊、抗体の特異性または温度の影響を考えました。免疫細胞学的に、取り込まれたAGEsの細胞質での結合場所を可視化し、受容体阻害薬を用いた解析も行いました。

研究成果の内容

1. マクロファージにおけるAGEsの取り込みは時間と濃度依存性がある

この結果、AGE2とAGE3は、J774.1マクロファージ細胞表面にまず結合し、時間と濃度依存的に細胞内へ取り込まれることが明らかとなりました。低温状態（4℃）では、AGE2とAGE3の取り込みが大体細胞表面に結合してAGEsの蛍光検出が低いのにに対し、37℃の状態インキュベーションすると、AGE2とAGE3は細胞表面と細胞全体に分布し、蛍光検出は4℃より強く示されました。37℃の状態4℃よりこの取り込み現象は促進することが明らかとなりました。また、Triton-X100/PBSを加え、室温で10分間浸透処理したマクロファージのAGEs蛍光染色は、Triton-X100/PBSなしの条件より強くなりました。Triton-X100/PBSを使うと、細胞膜を破壊して膜内のタンパク質が検出できます。その結果、AGE2とAGE3が細胞表面に結合し、細胞膜経由で細胞質に取り込まれたということが分かりました。さらに、時間経過と濃度依存性の実験から、時間とAGEs濃度が増加すると、細胞内にAGEsが蓄積する可能性があることも示唆されました。共焦点顕微鏡による観察から、細胞質に取り込まれたAGE2とAGE3は、細胞内に局在すると推定されました。

2. マクロファージにおけるAGEの取り込みに及ぼすエンドサイトーシス阻害薬の影響

エンドサイトーシス阻害薬サイトカラシンD、クロルプロマジン、PFS-ZM1を用いた解析から、サイトカラシンDはタンパク質合成を阻害し、細胞輸送を妨げて、AGE2とAGE3の取り込みを抑制することが分かりました。クラスリン依存性エンドサイトーシス阻害薬としてクロルプロマジンは、AGE2とAGE3がマクロファージに取り込まれるという過程において抑制作用は見られませんでした。AGE2とAGE3の細胞質へ

の取り込みは、クラスリン非依存性のプロセスである可能性が強く示唆されました。一方、FPS-ZM1は、AGEsの受容体（RAGE）の高親和性阻害剤です。FPS-ZM1はRAGEとの高い親和性によりRAGEと結合して、AGEのRAGEとの結合を抑制し、AGE活性化受容体と下流シグナル経路も阻害することができます。FPS-ZM1を添加されたマクロファージは、RAGE受容体が特異的に遮断されました。しかしながら、FPS-ZM1は予想に反しAGE2とAGE3の細胞内への取り込みを促進しました。

3. マクロファージ取り込まれたAGE2とAGE3は細胞内ROSの産生を促進し細胞アポトーシスを誘導した

100ug/mlのAGE2とAGE3は24時間マクロファージ細胞を刺激して、その結果細胞内活性酸素が検出されました。また、マクロファージに取り込まれたAGE2およびAGE3はマクロファージアポトーシスタンパク質カスパーゼ3を活性化することによってアポトーシスを引き起こすことが分かりました。Caspase-3とcleaved caspase-3の量はAGEsの添加濃度依存性があります。同時に、細胞膜表面へのホスファチジルセリンの転移も検出されました。しかも、免疫蛍光細胞学的観察から、ホスファチジルセリン陽性細胞とAGEs取り込み細胞は重なることが明らかになりました。検出されたホスファチジルセリンとAGEsはまた、AGEの細胞内取り込みがアポトーシスを引き起こし得ることを実証しました。

4. マクロファージに取り込まれたAGE2とAGE3はNF-κBの活性化を誘導する

AGEsがマクロファージに取り込まれた後細胞内にシグナル伝達する経路を解明するために、細胞質NF-κBを活性化するかどうかを検討しました。その結果、AGEs処理されたマクロファージでは、細胞全体にわたる4-Hydroxynoneanal陽性像が観察されました。さらに細胞質のNF-κBの核内移行も免疫蛍光染色とウエスタン・ブロットング結果で得られました。これらの結果は、AGE2やAGE3のJ774.1マクロファージ細胞への取り込み、あるいはRAGE刺激が、NF-κB活性化に繋がるカスケードを駆動する可能性を示唆します。

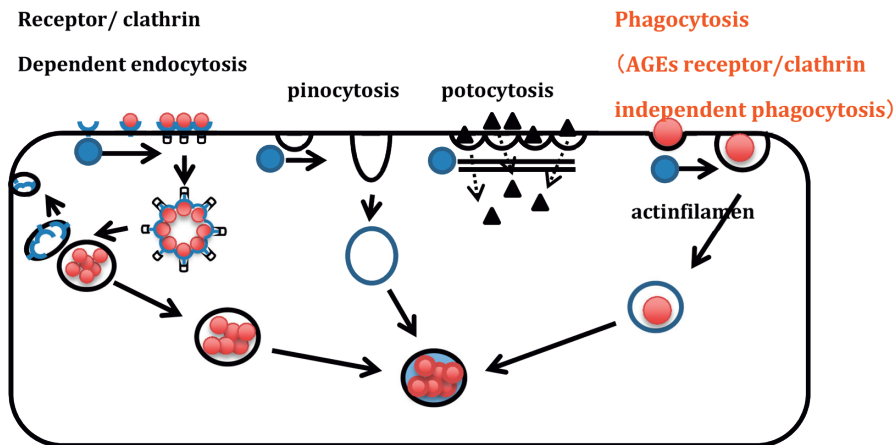


図 AGEs の細胞内取り込み機構の概要

研究成果の意義

本研究において、AGEs がマクロファージにより能動的にエンドサイトーシスで取り込まれることが分かりました (図)。マクロファージに取り込まれて細胞アポトーシスを誘導するとともに、生体内環境から排除された可能性があることが分かりました。一方、AGEs-RAGE 結合阻害薬で RAGE 系を抑制すると、AGE 取り込みとともに NF- κ B の活性化と細胞アポトーシスが進行する可能性があり、病態生理を考える上で重要な知見が得られました。

今後の展開や展望

次の研究では、マクロファージに取り込まれた AGE によって生成される炎症性因子に焦点を当てることにより、AGE がマクロファージに泡様細胞を形成させるメカニズムを理解し、阻害薬を使用して AGE を阻害できるかどうか、酸化ストレスと炎症性物質放出を検出します。その上で、AGE の代謝を促進し、または AGE の泡沫細胞を形成するのを効果的に阻害できる薬剤を探索します。

文 献

- 1) Ramasamy R, Yan SF, Schmidt AM : The diverse ligand repertoire of receptor for advanced glycation endproducts and pathways to the complications of diabetes. *Vascul Pharmacol* (2012) 57, 160-167.
- 2) Radoff S, Cerami A, Vlassara H : Isolation of surface binding protein specific for advanced glycosylation end products from mouse macrophage-derived cell line RAW 264.7. *Diabetes* (1990) 39, 1510-1518.
- 3) Nachtigal M, AL-Assaad Z, Mayer EP, Kim K, Monsigny M : Galectin-3 expression in human atherosclerotic lesions. *Am J Pathol* (1998) 152, 1199-1208.
- 4) Ishibashi Y, Matsui T, Ohta K, Tanoue R, Takeuchi M, et al. : PEDF inhibits AGE-induced podocyte apoptosis via PPAR-gamma activation. *Microvasc Res* (2013) 85, 54-58.
- 5) Matsui T, Yamagishi S, Takeuchi M, Ueda S, Fukami K, et al. : Irbesartan inhibits advanced glycation end product (AGE)-induced proximal tubular cell injury in vitro by suppressing receptor for AGEs (RAGE) expression. *Pharmacol Res* (2010) 61, 34-39.

令和元年 8 月 27 日 受稿

〒700-8558 岡山市北区鹿田町 2-5-1

電話 : 086-235-7138 FAX : 086-235-7138

E-mail : yakuri@md.okayama-u.ac.jp