

令和5年度(第28回)
弘前大学医学部学術賞
奨励賞受賞論文

OSONOI S, MIZUKAMI H, TAKEUCHI Y, SUGAWA H, OGASAWARA S, TAKAKU S, SASAKI T, KUDO K, ITO K, SANGO K, NAGAI R, YAMAMOTO Y, DAIMON M, YAMAMOTO H, and YAGIHASHI S. RAGE activation in macrophages and development of experimental diabetic polyneuropathy, *JCI insight*, volume 7(23), 2022, e160555, doi: 10.1172/jci.insight.160555.

マクロファージにおける RAGE の活性化と実験的糖尿病性多発神経炎の発症、進展に関する研究

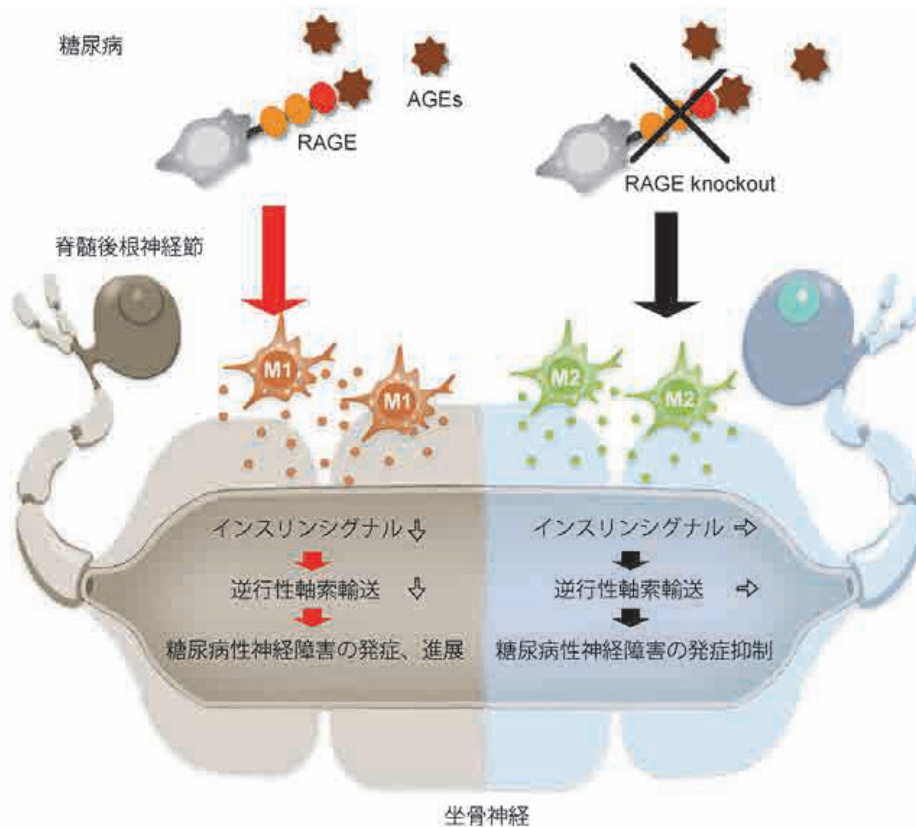
(RAGE activation in macrophages and development of experimental diabetic polyneuropathy)

弘前大学大学院医学研究科 内分泌代謝内科学講座
弘前大学大学院医学研究科 分子病態病理学講座
遅野井 祥

糖尿病性多発神経障害 (DPN) は最も早期に発症し、罹患頻度の高い糖尿病性細小血管症である。DPN は四肢末梢の痺れ、疼痛や感覚の低下等の感覚神経症状、多様な自律神経症状により患者の QOL を著しく低下させる。さらに、十余年から数十年の罹病期間に伴い病態が進行すると、足壊疽や無痛性心筋梗塞等の重篤な疾患の合併を催し、直接的に生命予後を悪化させる。そのため早期の治療介入が理想的だが、現在利用可能な治療法は神経障害性疼痛に対する対症療法のみである。発症および進行を予防するための根治的治療法を開発するために、DPN の病態機序を詳細に解明し、治療標的を同定するための基礎研究の発展が急務である。

DPN の主な病理所見は末梢神経軸索の変性および脱落である。その病態機序は、細小血管障害による虚血に加え、神経細胞およびシュワン細胞の代謝障害、酸化ストレス、炎症等の要因が複雑に作用する神経障害と考えられているが、その全貌は未解明である¹⁾。糖尿病における軽度の慢性炎症状態はマクロファージ (M ϕ) の機能異常を一つの起点しており、それに伴う酸化ストレスや細胞代謝障害があらゆる糖尿病性合併症の病態に関わる。M ϕ は古典的には促炎症性 M1 と炎症抑制性 M2 との 2 つの極性に亜分類され、2 型糖尿病の脂肪組織においては M1 優勢の極性化がインスリン抵抗性の形成に関わる²⁾。M1 への極性化を促す要因としては Interferon γ 、グラム陰性桿菌に由来する Lipopolysaccharide、脂質代謝異常に伴う酸化 Low-density lipoprotein 等が知られているが、糖尿病状態において M1 が誘導される機序には議論がある²⁾。我々は、慢性高血糖状態において全身に蓄積する終末糖化産物 (Advanced glycation end products : AGEs) とその受容体 RAGE のシグナルが M1 への極性化を促し、炎症を介する DPN の病態形成に関わるのではないかという仮説を立て、実験動物、培養細胞を用いた解析による病態研究を展開してきた。

本研究の動物実験には RAGE 欠損マウス (RN) と対照として C57BL6 マウス (WT) を使用した。これらのマウスにストレプトゾトシン (STZ) を腹腔内注射し、糖尿病 (DM) を発症させ、8 週間の観察後に解析を行った。WT-DM は non DM に比して神経伝導速度 (NCV) が有意に低下し DPN を発症した



が、RN-DMではNCVがnon DMと同等に維持され、DPNの発症が抑制された。WT-DMの坐骨神経(SN)にはnon DMと比して有意に多くのM1が浸潤していたが、RN-DMのSNに浸潤しているM1の数はnon DMと同等である一方でM2が有意に多く浸潤していた。M1/M2比の変化は脂肪組織におけるインスリン抵抗性の病態に関わることから、我々はSNにおけるインスリンシグナルに着目して解析を継続した。インスリン刺激に対するシグナル分子のリン酸化はWT-DMにおいてnon DMと比して有意に低下していたが、RN-DMではnon DMと同等であった。これらの結果から、RN-DMにおけるDPNの発症抑制には、SNにおけるインスリン作用が関与している可能性が考察された。

インスリンは末梢神経の成長・維持・生存、および多面的な機能の調節に関わり、とりわけ、神経細胞の恒常性に必須である逆行性軸索輸送(Retrograde axonal transport: RAT)を制御している³⁾。我々はマウスの足底から逆行性神経トレーサーであるFluoro-gold (FG)を注入することで軸索末梢から脊髄後根神経節(DRG)に向かうRATの輸送効率を解析した。WT-DMではDRGにおけるFG陽性細胞の割合が低下しており、RATの輸送効率の低下が示唆された。一方で、RN-DMではDRGにおけるFG陽性細胞の割合はnon DMと同等であった。本表現型に対するMφの直接的な貢献を検証するために、初代培養DRGニューロン(DRGN)とMφ細胞株RAW264.7を用いたin vitroの解析を行った。まず、細胞内酸性小胞を蛍光標識するlysotrackerによりDRGNをLive染色することで、RATをリアルタイムに観察するTime-lapse imaging法を構築した。DRGNの単培養にインスリン受容体阻害薬を添加するとRATの速度と頻度が有意に低下したことから、インスリンシグナルが直接的にRATを制御することを確認した。AGEsによりM1形質を誘導したRAW264.7とDRGNを共培養すると、RATの速度と頻度が有意に低下した。また、M1関連のサイトカインであるTNF α を添加するとRATの速度と頻度が有意に低下した。TNF α はTNF受容体-JNKシグナルを介してインスリンシグナルを阻害するが、JNK阻害薬の添加によりRATの速度と頻度は回復した。これらの実験結果より、M1関連の炎症がインスリンシグ

ナルの阻害を介して、RAT を障害する可能性が示唆された。

最後に、AGEs-RAGE シグナルによる M1 への極性化が、in vivo の表現型を形成する直接的な要因である可能性を再検証するために、骨髄細胞特異的 RAGE 欠損マウス (BMRN) を用いた解析を行った。放射線照射により骨髄細胞を破壊した WT に RN から採取した骨髄細胞を移植することで BMRN を作成し、WT の骨髄細胞を移植した BMWT を対照とした。STZ による糖尿病発症の 8 週後、BMRN-DM では NCV の低下が部分的に抑制された。BMWT-DM の SN には non DM と比して有意に多くの M1 が浸潤していたが、BMRN-DM の SN では M1 の数は non DM と同等であり、M2 が有意に多く浸潤していた。インスリン刺激に対するシグナル分子のリン酸化は BMWT-DM において non DM と比して有意に低下していたが、BMRN-DM では non DM と同等であった。BMWT-DM では DRG における FG 陽性細胞の割合が低下していたが、RN-DM では non DM と同等であった。これらは、M ϕ における RAGE シグナルの活性化が DPN の表現型形成に直接的に関与している可能性を指示する実験結果であった。

本研究により末梢神経細胞自体だけでなく、M ϕ の RAGE シグナルが DPN の発症、進展に重要な役割を果たすことが解明された。RAGE シグナルの活性化に起因する M1 関連の炎症が SN のインスリンシグナルを減弱させ、RAT を障害する。その結果、DRGN の細胞体面積の低下や NCVs の遅延を引き起こすと考えられた⁴⁾。本研究の強みは骨髄細胞特異的 RAGE 欠損マウスを用いることで、M ϕ の直接的な病態への関与を証明したこと、DPN における RAT 障害を詳細に解析したことにある。一方で、ヒトの DPN の病態に対する相同性の検証や、具体的な標的機序の同定については今後の課題である。

【引用文献】

- 1) Feldman EL, et al. New Horizons in Diabetic Neuropathy: Mechanisms, Bioenergetics, and Pain. *Neuron* 2017;93(6):1296-313.
- 2) Shapouri-Moghaddam A, et al. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J Cell Physiol.* 2018;233(9):6425-40.
- 3) Baptista FI, et al. Impairment of Axonal Transport in Diabetes: Focus on the Putative Mechanisms Underlying Peripheral and Central Neuropathies. *Mol Neurobiol.* 2019;56(3):2202-10.
- 4) Osonoi S, Mizukami H, Takeuchi Y, Sugawa H, Ogasawara S, Takaku S, et al. RAGE activation in macrophages and development of experimental diabetic polyneuropathy. *JCI Insight.* 2022;7(23):e160555.