

ラット脳挫傷モデルにおける終末糖化産物の意義
(要約)

日本大学大学院医学研究科博士課程
外科系脳神経外科学専攻

岸 匡蔵

修了年 2024 年

指導教員 大島 秀規

1. 本文

頭部外傷は全外傷のうち下肢外傷に次ぐ 2 位とされている (1)。頭部外傷による救命率は上昇しているが、高次脳機能障害をはじめとした頭部外傷による後遺症という問題が出てきている。

頭部外傷では二次性の反応が起こり、細胞障害を引き起こし、長期的に脳の萎縮をきたすとされている(2)。スポーツ外傷においては 2016 年に米国立神経疾患・脳卒中研究所が慢性外傷性脳症 (chronic traumatic encephalopathy : CTE) として、病理学的診断基準を定めた(3)。これらの病態はアミロイド β タンパク ($A\beta$) やタウ蛋白が不規則に沈着し、生成された reactive oxygen species (ROS) によって、細胞障害が引き起こされるためと考えられている(3-5)。これらの $A\beta$ やタウ蛋白の異常凝集はアルツハイマー病の原因とされており、実際に頭部外傷はアルツハイマー型認知症の危険因子としての報告が散見される(6)。 $A\beta$ 周囲に終末糖化産物 (Advanced glycation end products : AGEs) の存在が確認されている(7,8)。この AGEs は老化を増長し、様々な疾患を引き起こす物質として抗加齢医学の分野で注目されている。抗加齢医学の観点では AGEs は体内に蓄積し、加齢と関連する様々な疾患を誘発する物質と考えられている。特に AGEs が ROS を生成し、酸化ストレスや細胞死を誘導するとされている(9)。脳に関連する AGEs の研究は、急性期脳梗塞やくも膜下出血による脳血管攣縮との関連が報告されている(10,11)。これらの報告は、血液中の AGEs の受容体である Receptor of AGEs (RAGE) の発現を調べたものである。頭部外傷において、脳組織中に AGEs 及び RAGE の発現を調べた研究はなく、AGEs が脳に与える変化を調べた研究も存在しない。重症頭部外傷患者において、 $A\beta$ の沈着が早いものでは受傷後 2 時間より認められることが報告されている(12)。AGEs は外傷早期から脳組織に発現し、その脳組織に蓄積した AGEs が、慢性的に神経細胞やグリア細胞に酸化ストレスや細胞死を誘導することで、長期的な脳萎縮や認知機能の低下をきたす可能性がある。外傷では肺挫傷において、血液中の RAGE が急性期バイオマ

ーカーとして検討された報告もある(13-15)。中等度以上の脳挫傷では急性期に肝臓での糖産生亢進による高血糖や、二次性脳損傷による酸化ストレスの上昇が引き起こされるため、糖化反応と酸化反応が起き、体内で AGEs が産生されると想定される。頭部外傷によって急性期に産生される AGEs が神経細胞やグリア細胞に蓄積され、長期的に脳萎縮などの変化を引き起こす原因の一つになる可能性がある。そこで AGEs の脳組織への集積については、ラット頭部外傷モデルを用いて AGEs の発現を観察する。

週齢 6~7 週の雄性 Sprague-Dawley ラットを使用し、cortical contusion injury (CCI) を用いて、重症群と軽症群を作成した(16, 17)。Goodman らの報告では海馬への直接打撃を来さないが、皮質の脳挫傷及び海馬への二次性脳損傷を来す外傷の強度とされている(18)。なお、Naïve 群は無処置とした。CCI から 3 日後、7 日後、30 日後、180 日後に Western blotting 用および脳組織染色用の検体をそれぞれ摘出した。ELISA 用の検体採取は CCI から同一個体で 3 日後、7 日後、30 日後、180 日後にラットの頸部皮下静脈叢から 0.5ml 採血して採取した。免疫染色用の脳組織は、150 倍希釈抗 AGE 抗体 (bs-1158R: Bioss, USA) を用い、発色は DAB Substrate Kit (ab64238: abcam, USA) を用いて行った後に、光学顕微鏡で挫傷周囲の AGEs の有無を確認した。Western blotting は、RC DC Protein assay Kit (5000122JA: Bio-Rad, USA) を用いて総タンパク量を測定した。濃度の測定には吸光度計 (Model680: Bio-Rad, USA) を使用した。一次抗体反応は、1,000 倍希釈の抗 AGE 抗体 (bs-1158R: Bioss, USA)、5000 倍希釈の抗 RAGE 抗体 (GTX23611: GeneTex, USA) および内因性コントロールとして 20,000 倍希釈の抗 beta-Actin 抗体 (GTX109639: GeneTex, USA) を使用した。二次抗体反応には抗ウサギ IgG 抗体 (AP182P: Millipore, USA) を使用し、検出器 (ChemiDocXRS: Bio-Rad, USA) にてバンドを検出した。Western blotting の結果は、各タンパクのバンドの濃度を測定し、陽性コントロールである beta Actin との比 (%) として表示した。血液中の AGE、RAGE の定量には ELISA を行い、吸光度を測定した。

免疫染色では外傷後7日をピークに挫傷の周囲に AGEs 陽性細胞が観察された。これらの発現の定量を、脳組織においては Western blotting で、血液中においては Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) で行った。Western blotting では外傷後3日の AGEs は軽症群、重症群ともに Naïve 群と比較し有意に上昇していた ($p < 0.001$)。また外傷後7日、30日、180日の AGEs は軽症群、重症群ともに上昇しており、各群で有意な差を認めた ($p < 0.001$)。ELISAによる血液中の AGEs は測定時期によって有意な変化を認めた ($p < 0.001$)。日数毎に各群 (重症群、軽症群、Naïve 群) で比較すると、外傷後3日で重症群、軽症群共に Naïve 群と比較し有意に差を示した ($p < 0.001$)。外傷後7日で重症群と軽症群、重症群と Naïve 群で有意な差を認めた ($p < 0.01$)。外傷後30日で重症群、軽症群共に Naïve 群と比較し有意に差を示した ($p < 0.05$)。ELISAによる血液中の RAGE は血液中の RAGE は測定時期によって有意な変化を認めた ($p < 0.05$)。日数ごとの比較では外傷後7日で重症群と Naïve 群で有意な差を認めた ($p < 0.01$)。

AGEs は生体内で糖類がタンパク質のアミノ基と脱水、縮合などの反応を経て生成されたものである。加齢や高血糖の他に食事や喫煙など外因性に由来する AGEs も存在する(19)。これらの AGEs の蓄積は心血管病や癌、骨粗鬆症などの疾患を引き起こす原因の一つとされている(20, 21)。AGEs はその構造によって Nε-(carboxymethyl)lysine (CML)、ペントシジンなど数種類が確認されている(22)。CML は腎炎、網膜症などを併発した糖尿病患者において血中濃度が上昇していることが報告され(23, 24)、血清ペントシジンは心血管イベントで上昇することが報告されている(25)。この AGEs は細胞膜に存在する RAGE と結合することで、細胞に反応を起こす。RAGE は AGEs に特異的な受容体ではなく、マルチリガンドのパターン認識受容体であり、細胞膜貫通型と可溶型に分けられる。細胞膜貫通型 RAGE は AGEs の結合により疾病のプロモーターとなるとされている。可溶型 RAGE (soluble RAGE : sRAGE) は細胞膜から切離された状態で、細胞膜貫通型 RAGE の1つである full length RAGE の結合を阻害する decoy (疑似体)として作

用し RAGE の機能を中和するとされている。また C 末端が切断されたタイプを endogenous secretory RAGE (esRAGE) という。esRAGE は血液中を循環し AGE と結合し、細胞表面の full length RAGE の活性化を予防するアンタゴニストとして働く(26)。AGEs は RAGE に結合し、NF- κ B などの細胞シグナル伝達系を活性化し炎症を引き起こすとされ(27-28)、他にも NADPH オキシターゼを活性化することにより、活性酸素種 (ROS) を増大させることも示されている(29)。このような AGEs と RAGE の反応は糖尿病、アルツハイマー病など様々な疾患に関連すると考えられている。AGEs は炎症などの反応を比較的長期に引き起こし、生体の変化をもたらす。脳神経系の急性疾患においては脳梗塞及び脳出血での RAGE の測定を Yokota らが報告している(10)。Aida らはくも膜下出血の脳血管攣縮のマーカーとしての sRAGE の有用性を報告している(11)。RAGE は AGEs だけではなく S100、HMGB1、amyloid- β -peptide などと結合し、活性酸素や NF- κ B 依存性の炎症反応を引き起こす。脳組織が障害を受けるとこれらのリガンドが RAGE に結合し反応が始まるため RAGE は上昇するが、sRAGE は decoy として RAGE の機能を中和する働きをするため、消費されていき、急性期に減少すると考えられている。sRAGE の減少は炎症のバイオマーカーとなりえるとされている(30)。

脳神経系の慢性疾患における AGEs はアルツハイマー型認知症との関連が挙げられ、A β の周囲に AGEs の存在が報告されている(7, 8)。またアルツハイマー型認知症では血液中の sRAGE は健常者よりも減少するとされている(31)。A β は酸化ストレスを引き寄せるとされるが(32)、AGEs もその働きを増幅させることが考えられている。アルツハイマー型認知症と病態は異なるが、頭部外傷においても脳組織に A β の発現は確認されており、AGEs も発現が確認されれば、アルツハイマー型認知症のように酸化ストレスを引き起こし、長期的な脳萎縮などにつながると考えた。

本研究において挫傷脳周囲に外傷 3 日、7 日、30 日、180 日すべてで AGEs 陽性細胞が観察された。顕微鏡における同倍率での観察範囲内では 7 日、30 日で増加を認めてい

る。Western blotting で脳組織の AGEs の定量を行い、AGEs は 3 日、7 日、30 日、180 日で CCI 群は重症群、軽症群共に Naïve 群と比較し、有意な増加を認めていた。7 日、30 日、180 日については重症群と軽症群でも有意な差を認めた。脳挫傷後に挫傷脳周囲に現れる炎症性サイトカインやそれに関連するマイクログリアなどは、急性期を過ぎれば減少する(33-35)。しかし AGEs は特に重症群で外傷後 180 日と長期的に観察された。AGEs は新陳代謝の遅い、またはされない細胞に蓄積するとされている(36)。AGEs は非常に毒性の強い物質であるため、発現すると免疫機能が働く。新陳代謝の早い細胞であれば AGEs が体内に発現すると、マクロファージがそれを除去しようと働く。しかし皮膚や血管において、マクロファージは AGEs だけでなく周囲のコラーゲンなども除去しようとしてしまう。結果的にそれを修復するための TGF- β などの増殖因子が発生し皮膚や血管内費が厚くなるため老化につながると考えられている。本研究における免疫染色において AGEs 陽性細胞は挫傷脳の周囲に集中しており、海馬や対側脳などの挫傷脳から離れた部位には発現がほとんどみられていなかった。挫傷の周囲はアポトーシスした壊死細胞であり代謝されない細胞であることから、AGEs が蓄積したものと考えられた。また本研究では脳組織における RAGE の発現の検討も行っているが、全ての群でバンドの発現を認めず、本研究において RAGE は脳組織内で発現を確認することができなかった。

血液中の AGEs 及び RAGE の上昇は、脳組織中に発現した AGEs との関連については疑問が残る。脳組織染色において AGEs 陽性細胞は挫傷脳周囲以外には見られておらず、脳挫傷によって破壊された脳血液関門から AGEs が血中に移行したとは考えにくい。脳挫傷における血液中の AGEs 及び RAGE の上昇は脳挫傷による全身での炎症性変化による影響が考えられる。

本研究で観察した期間は180日であるが、より長期的に観察しAGEsがさらに変化する可能性は大いに考えられる。本研究ではAGEs自体が脳皮質、または脳全体に対してどのような作用があるかは解明できておらず、まずはそこを解明するのが課題と考える。

結論としてはラットCCIモデル重症群及び軽症群で脳挫傷周囲にAGEs陽性細胞の発現を認めた。AGEs陽性細胞は受傷後から180日まで脳挫傷周囲に蓄積を認め、Naïve群と比較し有意に増加していた。RAGEは本研究では脳組織に発現を確認できなかった。血液中にも脳挫傷後の全身性の反応と考えられるAGEs及びRAGEの増加を認めた。

2. 引用文献

1. Kato Y. The age distribution of severe head injury in Japan Neurotrauma Data Bank: the changes among Project 1998, 2004, 2009, and 2015. *Shinkeigaisho*. 2019;42:160-7.
2. Kempuraj D, Thangavel R, Natteru PA, Selvakumar GP, Saeed D, Zahoor H, et al. Neuroinflammation Induces Neurodegeneration. *J Neurol Neurosurg Spine*. 2016;1(1).
3. Falcon B, Zivanov J, Zhang W, Murzin AG, Garringer HJ, Vidal R, et al. Novel tau filament fold in chronic traumatic encephalopathy encloses hydrophobic molecules. *Nature*. 2019;568(7752):420-3.
4. Omalu BI, DeKosky ST, Minster RL, Kamboh MI, Hamilton RL, Wecht CH. Chronic traumatic encephalopathy in a National Football League player. *Neurosurgery*. 2005;57(1):128-34; discussion -34.
5. Omalu BI, Hamilton RL, Kamboh MI, DeKosky ST, Bailes J. Chronic traumatic encephalopathy (CTE) in a National Football League Player: Case report and emerging medicolegal practice questions. *J Forensic Nurs*. 2010;6(1):40-6.
6. Ikonomic MD, Uryu K, Abrahamson EE, Ciallella JR, Trojanowski JQ, Lee VM, et al. Alzheimer's pathology in human temporal cortex surgically excised after severe brain injury. *Exp Neurol*. 2004;190(1):192-203.
7. Plassman BL, Havlik RJ, Steffens DC, Helms MJ, Newman TN, Drosdick D, et al. Documented head injury in early adulthood and risk of Alzheimer's disease and other dementias. *Neurology*. 2000;55(8):1158-66.
8. Angeloni C, Maraldi T, Vauzour D. Redox signaling in degenerative diseases: from molecular mechanisms to health implications. *Biomed Res Int*. 2014;2014:245761.
9. Złotek U, Świeca M, Jakubczyk A. Effect of abiotic elicitation on main health-promoting compounds, antioxidant activity and commercial quality of butter lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Food Chem*. 2014;148:253-60.
10. 横田千晶. 脳卒中急性期におけるバイオマーカー：脳卒中と AGE-RAGE. *脳循環代謝*. 2015;26(2):51-6.
11. Aida Y, Kamide T, Ishii H, Kitao Y, Uchiyama N, Nakada M, et al. Soluble receptor for advanced glycation end products as a biomarker of symptomatic vasospasm in subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg*. 2019:1-9.
12. Kawai N, Shishido H, Hatakeyama T, Tamiya T. Cerebral amyloid β deposition and cognitive impairment after traumatic brain injury: Alzheimer's disease secondary to TBI. *Shinkeigaisho*. 2017;40:96-104.
13. Xu W, Song Y. Biomarkers for patients with trauma associated acute respiratory distress syndrome. *Mil Med Res*. 2017;4:25.

14. Negrin LL, Ristl R, Halat G, Heinz T, Hajdu S. The impact of polytrauma on sRAGE levels: evidence and statistical analysis of temporal variations. *World J Emerg Surg.* 2019;14:13.
15. Dixon A, Kenny JE, Buzzard L, Holcomb J, Bulger E, Wade C, et al. Acute respiratory distress syndrome, acute kidney injury, and mortality after trauma are associated with increased circulation of syndecan-1, soluble thrombomodulin, and receptor for advanced glycation end products. *J Trauma Acute Care Surg.* 2023.
16. Badaut J, Adami A, Huang L, Obenaus A. Noninvasive magnetic resonance imaging stratifies injury severity in a rodent model of male juvenile traumatic brain injury. *J Neurosci Res.* 2020;98(1):129-40.
17. Bajwa NM, Lee JB, Halavi S, Hartman RE, Obenaus A. Repeated isoflurane in adult male mice leads to acute and persistent motor decrements with long-term modifications in corpus callosum microstructural integrity. *J Neurosci Res.* 2019;97(3):332-45.
18. Goodman JC, Cherian L, Bryan RM, Jr., Robertson CS. Lateral cortical impact injury in rats: pathologic effects of varying cortical compression and impact velocity. *J Neurotrauma.* 1994;11(5):587-97.
19. Yamagishi S, Ueda S, Okuda S. Food-derived advanced glycation end products (AGEs): a novel therapeutic target for various disorders. *Curr Pharm Des.* 2007;13(27):2832-6.
20. Yamagishi S, Matsui T. Pathologic role of dietary advanced glycation end products in cardiometabolic disorders, and therapeutic intervention. *Nutrition.* 2016;32(2):157-65.
21. Baye E, Kiriakova V, Uribarri J, Moran LJ, de Courten B. Consumption of diets with low advanced glycation end products improves cardiometabolic parameters: meta-analysis of randomised controlled trials. *Sci Rep.* 2017;7(1):2266.
22. Meerwaldt R, Graaff R, Oomen PHN, Links TP, Jager JJ, Alderson NL, et al. Simple non-invasive assessment of advanced glycation endproduct accumulation. *Diabetologia.* 2004;47(7):1324-30.
23. Wang Y, Luo W, Han J, Khan ZA, Fang Q, Jin Y, et al. MD2 activation by direct AGE interaction drives inflammatory diabetic cardiomyopathy. *Nat Commun.* 2020;11(1):2148.
24. Sukino S, Nirengi S, Kawaguchi Y, Kotani K, Tsuzaki K, Okada H, et al. Effects of a Low Advanced Glycation End Products Diet on Insulin Levels: The Feasibility of a Crossover Comparison Test. *J Clin Med Res.* 2018;10(5):405-10.
25. Kremers SHM, Remmelzwaal S, Schalkwijk CG, Elders PJM, Stehouwer CDA, van Ballegooijen AJ, et al. The role of serum and dietary advanced glycation endproducts in relation to cardiac function and structure: The Hoorn Study. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2021;31(11):3167-75.

26. Koyama H, Yamamoto H, Nishizawa Y. RAGE and soluble RAGE: potential therapeutic targets for cardiovascular diseases. *Mol Med.* 2007;13(11-12):625-35.
27. Zuwala-Jagiello J, Pazgan-Simon M, Murawska-Cialowicz E, Simon K. Influence of Diabetes on Circulating Apoptotic Microparticles in Patients with Chronic Hepatitis C. *In Vivo.* 2017;31(5):1027-34.
28. Luevano-Contreras C, Chapman-Novakofski K. Dietary advanced glycation end products and aging. *Nutrients.* 2010;2(12):1247-65.
29. Schmidt AM, Yan SD, Yan SF, Stern DM. The multiligand receptor RAGE as a progression factor amplifying immune and inflammatory responses. *J Clin Invest.* 2001;108(7):949-55.
30. Hudson BI, Harja E, Moser B, Schmidt AM. Soluble levels of receptor for advanced glycation endproducts (sRAGE) and coronary artery disease: the next C-reactive protein? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25(5):879-82.
31. Emanuele E, D'Angelo A, Tomaino C, Binetti G, Ghidoni R, Politi P, et al. Circulating levels of soluble receptor for advanced glycation end products in Alzheimer disease and vascular dementia. *Arch Neurol.* 2005;62(11):1734-6.
32. Ohyagi Y, Asahara H, Chui DH, Tsuruta Y, Sakae N, Miyoshi K, et al. Intracellular A β 42 activates p53 promoter: a pathway to neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Faseb j.* 2005;19(2):255-7.
33. Kumagawa T, Moro N, Maeda T, Kobayashi M, Furukawa Y, Shijo K, et al. Anti-inflammatory effect of P2Y1 receptor blocker MRS2179 in a rat model of traumatic brain injury. *Brain Res Bull.* 2022;181:46-54.
34. Takamine Y. Effect of Pyrazol-3 and MRS2179 Against Gliosis in a Rat Model of Cerebral Contusion Injury. *日大医学雑誌.* 2021;80:319-29.
35. Kobayashi M, Moro N, Yoshino A, Kumagawa T, Shijo K, Maeda T, et al. Inhibition of P2X4 and P2X7 receptors improves histological and behavioral outcomes after experimental traumatic brain injury in rats. *Exp Ther Med.* 2023;26(2):378.
36. Verzijl N, DeGroot J, Oldehinkel E, Bank RA, Thorpe SR, Baynes JW, et al. Age-related accumulation of Maillard reaction products in human articular cartilage collagen. *Biochem J.* 2000;350 Pt 2(Pt 2):381-7.