

糖酸化反応経路の解明、及び糖酸化ストレスのシグナリングとレドックス制御機構の解明

Elucidation of the Pathway of the Glycooxidative Reaction, the Signaling Pathway, and the Mechanism of Redox Regulation to Glycooxidation Stress

(研究プロジェクト番号：JSPS-RFTF 96L00303)

プロジェクトリーダー

宮田 敏男 東海大学総合医学研究所・助教授

コアメンバー

黒川 清 東海大学医学部・教授

中島 泉 名古屋大学医学部・教授

John W. Baynes サウスカロライナ大学生化学・教授

Charles van Ypersele de Strihou ルバイン大学医学部・教授



1. 研究目的

生体内において、比較的豊富に存在する糖や脂質から反応性カルボニル化合物 (RCOs) が生成する。これら、カルボニル化合物は反応性が高く、非酵素的に生体内の蛋白と反応し、糖化最終産物/脂質過酸化最終産物 (advanced glycation/lipoxidation end products: AGEs/ALEs) が生成する (カルボニルストレス) (図1)。カルボニルストレスは種々の疾患の病態に関与すると考えられている。我々は、各種疾患におけるカルボニルストレスの病態生理学的意義の解明、カルボニルストレスにより生じるシグナリングの分子メカニズムの解明、疾患の治療に関する可能性を提供することを目的として検討を行った。



図1. カルボニルストレス

2. 研究成果概要

2.1 AGEsの生成機序に関する検討結果から、酸化的・非酸化的条件下で生成する RCOs により生体内の蛋白が修飾されることが明らかとなった。カルボニルストレスにより、AGEs だけではなく、ALEs によってもマトリックス蛋白や細胞の蛋白が修飾を受けることが明らかとなった。カルボニルストレスは、酸化ストレスに伴って、あるいは RCOs の消去の低下により亢進した。一酸化窒素は、カルボニルストレスに伴う動脈硬化や炎症に関与する

ことが明らかとなった (図2)。

さらに、透析アミロイドーシス、腹膜硬化症、糖尿病性腎症、関節リウマチ、アルツハイマー病、黄斑変成症、肺線維症などにおけるカルボニルストレスの病態生理学的な重要性について明らかにした。

2.2 カルボニルストレスは種々の経路により、直接あるいは間接的に様々なシグナル伝達を介して細胞応答を惹起するという事実を見いだした。間接的経路としては、AGEs が AGE レセプターに結合し、細胞内において酸化ストレスを亢進させることが明らかとなった。それとは対照的に、直接的な経路では、種々の RCOs により細胞表面のレセプターの架橋形成や clustering による EGFR、Ret、c-Src、Lck などのチロシンキナーゼ (PTKs) のリン酸化やフリーラジカルの生成を伴うことを明らかにした。生成したフリーラジカルは一方では、さらにレドックス反応の関与したリン酸化酵素の構造的変化をもたらして PTKs の活性化を促進させ、さらに、ASK1-SEK1-JNK 経路を介して細胞死を誘導するカスパーゼを活性化させた。RCOs の関与した PTKs の活性化は Ras-MAPK 経路を活性化させた。

2.3 腹膜透析 (PD) 液の加熱滅菌によりグルコースから生成する RCOs は、長期腹膜透析患者の腹膜劣化に関与すると考えられている。そこで、グリオキサラーゼ-I (GLO I) を用いた PD 液中の RCOs の消去作用について検討したところ、グルタチオン (GSH) の存在下で GLO I は PD 液中のグルコース由来 RCOs を効果的に減少させた。このことから、GLO I を PD 液や腹膜透析患者腹腔内に添加することによるカルボニルストレスの軽減化が示唆された。

2.4 現在、降圧剤として臨床的に使用されている薬剤について AGE 抑制効果を検討した。いくつかのアンジオテンシン II 受容体拮抗薬、

アンジオテンシン変換酵素阻害薬は、糖尿病患者および腎不全患者血漿あるいはウシ血清アルブミンとアラビノースからの AGE 形成に対して抑制効果を示した。これらの作用はアミノグアニジンやピリドキサミンより AGE 抑制効果は強く、それらの主たる作用機序は RCOs の捕捉ではないことが明らかとなった (図 3)。我々は、アンジオテンシン II 受容体拮抗薬 (ARB)、アンジオテンシン変換酵素 (ACE) 阻害薬などの降圧剤が、強い AGE 抑制効果を有することを初めて明らかにした。

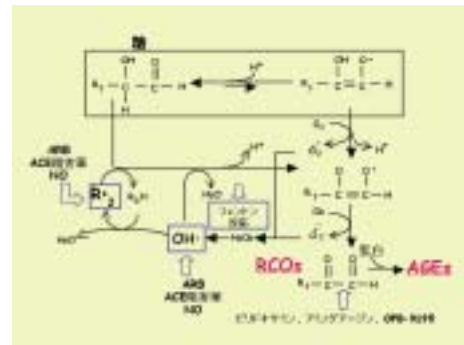


図 3. AGE の生成に対する抑制メカニズム

2.5 PD 液中の RCOs をトラップ可能な化合物をビーズに結合させてアフィニティービーズを作製した。エポキシビーズにヒドラジンを結合させたビーズにより、加熱滅菌した PD 液中の RCOs を濾過滅菌した PD 液と同レベルまで RCO の量を減少させた。また、PD 排液中の血清由来 RCOs についても同様の効果が認められた。これらの結果から、カルボニルトラップアフィニティービーズは加熱滅菌した PD 液の生体適合性を改善し、腹膜機能を維持するためにも有用であることが示唆された。

3. 結論

カルボニルストレスを軽減することは、腎不全や糖尿病合併症に対して新たな治療手段となりうる。カルボニルトラップビーズによる PD 液中の反応性カルボニル化合物の除去、新規カルボニル阻害剤の開発、グリオキサラゼによるカルボニル化合物の除去などがカルボニルストレスを軽減するために有望と考えられる。これらの、治療手段により実際に糖、脂質由来の蛋白修飾が阻害され、カルボニル化合物による細胞内シグナリングや細胞応答が抑制された。また、動物モデルにおいては、*in vivo* における組織障害の進展が効果的に阻害されることが明らかとなった。



図 2. 酸化およびカルボニルによる蛋白修飾

主な発表論文

1. Miyata T, et al. 2-microglobulin modified with advanced glycation end products is a major component of hemodialysis-associated amyloidosis. *J Clin Invest* 1993; 92: 1243- 1252.
2. Miyata T, et al. Involvement of 2-microglobulin modified with advanced glycation end products in the pathogenesis of hemodialysis-associated amyloidosis: Induction of human monocyte chemotaxis and macrophage secretion of tumor necrosis factor- α and interleukin 1. *J Clin Invest* 1994; 93: 521-528.
3. Miyata T, et al. Identification of pentosidine as a native structure for advanced glycation end products in 2-microglobulin containing amyloid fibrils in patients with dialysis-related amyloidosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 2353-2358.
4. Miyata T, et al. The receptor for advanced glycation end-products (RAGE) is a central mediator of the interaction of AGE- 2 microglobulin with human mononuclear phagocytes via an oxidant-sensitive pathway: implications for the pathogenesis of dialysis-related amyloidosis. *J Clin Invest* 1996; 98: 1088-1094.
5. Horie K, et al. Immunohistochemical colocalization of glycoxidation products and lipid peroxidation products in diabetic renal glomerular lesions. *J Clin Invest* 1997; 100: 2995-3004.
6. Uchida K, et al. Protein-bound acrolein: potential markers for oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 4882-4887.
7. Miyata T, et al. Alterations in non-enzymatic biochemistry in uremia. Origin and significance of "carbonyl stress" in long-term uremic complications. *Kidney Int* 1999; 55: 389-399.
8. Miyata T, et al. Advanced glycation and lipoxidation end products: Role of reactive carbonyl compounds generated during carbohydrate and lipid metabolism. *J Am Soc Nephrol* 2000; 11: 1744-1752.
9. Miyata T, et al. Towards better dialysis compatibility: Advances in the biochemistry and pathophysiology of the peritoneal membranes. *Kidney Int* 2002; 61: 375-386.