

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：33303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K16239

研究課題名(和文)生活習慣病を予見する新しい糖化蛋白質の同定、および疾患予防食品成分の探索

研究課題名(英文) Identification of new advanced glycation end-products and food ingredients to diagnose and prevent lifestyle diseases

研究代表者

逆井 亜紀子(坂井亜紀子)(SAKASAI-SAKAI, Akiko)

金沢医科大学・総合医学研究所・助教

研究者番号：60570059

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：メタボリックシンドロームに伴う高血糖や、食事由来の終末糖化産物(AGEs)過剰摂取などにより、非アルコール性脂肪肝炎(NASH)を含む生活習慣病が増加している。本研究では生活習慣病との関連を見いだしつつあるToxic AGEs (TAGE)蛋白質群の中から、特にNASHの診断に有効である可能性を持つ新規疾患マーカー蛋白質としてcaspase-3の同定に成功した。さらに、同定したcaspase-3のTAGE化を抑える作用を持つ食品成分をスクリーニングにより選別し、生活習慣病予防に応用可能ないくつかの物質を発見した。

研究成果の概要(英文)：Life-style disease including NASH has been associated with hyperglycemic state and excessive intake of food derived advanced glycation end-products (AGEs). To diagnose NASH, we had already found that Toxic AGEs (TAGE) to be useful for disease marker, but the TAGE-modified target protein has not been identified yet. In this study, we identified TAGE modified caspase-3 which has a possibility for the diagnosis of NASH. Furthermore, we screened food ingredients that have an effect of suppressing the TAGE modification of caspase-3, and found several substances that can be applied to lifestyle disease prevention factors.

研究分野：細胞生物学

キーワード：終末糖化産物 AGEs NASH TAGE

1. 研究開始当初の背景

生活習慣病と疾患マーカーの現状

食生活の欧米化、ブドウ糖／果糖の過剰摂取など、現代における様々なストレスにより生活習慣病が増加し続けている。放置するとガンや動脈硬化など深刻な疾患を引き起こすリスクが高いことから大きな社会問題となっており、生活習慣病の早期診断方法の確立は重要な課題である。生活習慣病は各個人の食生活の特性により引き起こされるが、体内での糖濃度の上昇が発病の根本的な原因の一つとなっている。生活習慣病の中でも高血糖状態が続く糖尿病患者が増加しており、また非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) 発症の危険因子の一つに糖尿病が挙げられる。つまり、生活習慣病と生体内の糖化ストレスの関連性が高いことから、疾患の発症や増悪に伴って特異的に増加する糖化マーカーを利用する事により、早期診断が可能になると予想される。実際に生体内の糖濃度が上昇するに伴い、ヘモグロビンが糖化された HbA1c の他、様々な蛋白質が糖化されて生成される終末糖化産物 (AGEs) が増加する。さらに AGEs の中でも毒性の強い Toxic AGEs (TAGE) 化蛋白質量も増加する事が知られている。このうち血液検査で用いられる HbA1c は数ヶ月の血糖コントロール状態のみを反映するもので疾患の進展は予測できず、現在利用されている糖化マーカーでは生活習慣病発症の有無や増悪を感知することが出来ないのが現状である。

TAGE 化蛋白質による疾患マーカー利用の可能性

一方、これまで血液検査による診断が難しかった NASH や動脈硬化の診断に、果糖の過剰摂取などにより増加する TAGE 化蛋白質を利用できる可能性がある (TAGE に特異的に結合する抗体を独自に作製できる当研究室による解析結果: *J. Gastroenterol. Hepatol.* 22: 1112, 2007 他)。そこで、研究代表者は生活習慣病の発症や進展と関連する TAGE 化蛋白質を同定する事により、疾患の診断のためのマーカーとして利用できるのではないかと考えた。

加えて、TAGE 化蛋白質は細胞内で強い毒性を持つ事が報告されている (*J Gastroenterol.* 2010 Jun; 45(6) : 646-55.)。つまり、TAGE 化蛋白質が細胞に蓄積し、障害を引き起こした結果、疾患発症／進展につながる事が予想される。そこで同定した TAGE 化蛋白質に対して TAGE 形成そのものを抑制する作用を持つ因子 (食品成分) を探索することにより、疾患に対して予防／改善効果を持つ因子を発見できるといった疾患予防マーカーとしての可能性も秘めている。

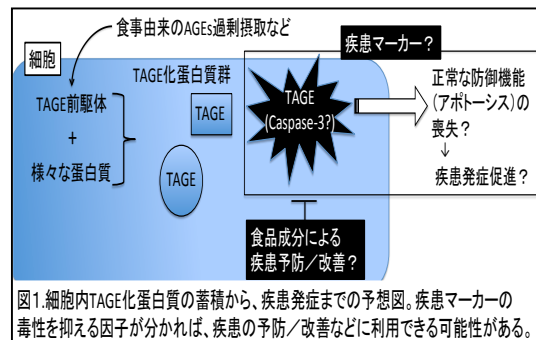
2. 研究の目的

TAGE 化蛋白質の疾患マーカー利用の上での問題点と研究目的

しかし、蛋白質の TAGE 化は酵素反応を介

さず化学反応で生成されることから、TAGE 化蛋白質は数多く存在する。現在、生体内での TAGE 化蛋白質量は抗 TAGE 抗体を用いて測定しているが、実際に TAGE 化されたどのような蛋白質が疾患と相関関係にあるのかについては不明なままである。一方研究代表者は本研究を開始するまでにアポトーシス実行に重要な蛋白質である caspase-3 が、TAGE 前駆体を細胞に処理することによりこれまで報告されていない異常高分子構造を形成するという予備結果を得ていた。現在まで、疾患と caspase-3 の関係については多くの論文が存在し、疾患により活性化する／しないという両方の報告があることから、議論が分かれている。しかし、研究代表者が見いだしていた caspase-3 は、TAGE 化のターゲット蛋白質としてのみならず、異常高分子構造もこれまでに国内外において報告されておらず非常に新規性が高い。そこで、caspase-3 を新規 TAGE 疾患マーカーの候補蛋白質とし疾患との関連性の解析を行う。

加えて、TAGE 前駆体処理に伴い出現する caspase-3 の異常形成を抑える食品成分の探索を行う。これまでに AGEs 形成を阻害する因子として、ビタミン B6 などを含む食品成分が報告されたが、強い副作用により実用化に至っていない。そこで、特に糖化ストレスの上昇に伴い出現すると考えられる caspase-3 の異常形成に対して有効な食品成分のスクリーニング系構築を行う。以上、本研究では生活習慣病と関連する TAGE 疾患マーカーを同定し、食生活から生活習慣病を改善する食品成分を提案する事を目的とした (図 1)。



3. 研究の方法

本研究は食生活のひずみがもたらす生活習慣病を診断するための新規 TAGE 疾患マーカーを同定、さらにそれら疾患の予防／改善が期待される食品成分を探索することを目的とした。特に、疾患マーカー候補蛋白質の caspase-3 を中心に、TAGE 毒性と疾患の関連性を追求する。また、糖化ストレスによる caspase-3 の異常形成を予防できる食品成分を、スクリーニングにより生活習慣病改善に役立つ物質として選定する。さらに、臨床レベルでの応用を目指すために、疾患モデル動物を用いて疾患マーカーの有用性の検討を行う。

実験材料として、食生活の影響を一番受けやすいと考えられる肝実質細胞と、NASH 疾患モデルマウスを用いて研究を進める。細胞レベルでの研究においては、ヒト培養肝細胞 (HepG2) および初代培養肝細胞を用い、ブドウ糖/果糖の代謝中間体である TAGE 前駆体のグリセルアルデヒドを添加して細胞内で TAGE を蓄積する評価系を用いる。この評価系を用い、caspase-3 の TAGE 化および機能異常の解析を行う。さらに、NASH 発症疾患モデルマウスの肝臓を用いて、得られた疾患マーカーの有用性を検討する。また、TAGE 毒性を予防する因子を選定するために、TAGE 前駆体処理により異常構造を形成する caspase-3 に対し、TAGE 化に対する保護作用を持つ食品成分のスクリーニング系を作製する。

4. 研究成果

本研究では生活習慣病との関連を見出しつつある Toxic AGEs (TAGE) 化蛋白質群の中から、特に NASH の診断に有効な新規疾患マーカーを同定し、さらに疾患予防因子の発見を目的として実験を行った。

ヒト培養肝細胞 HepG2 を用い、TAGE 前駆体のグリセルアルデヒド (GA) 処理を行った結果、caspase-3 の異常高分子化及び酵素活性異常を呈することが明らかとなった。さらに、正常細胞に近いヒト初代培養肝細胞を用いた場合にも同様の異常高分子構造が観察されることから、HepG2 細胞を用いた実験結果が生体を反映していることを確認した。また、疾患との相関関係が見られるのは生体内で生成される TAGE 化蛋白質であることから、疾患マーカー候補蛋白質である caspase-3 が TAGE 化されているのかについて解析を行った。TAGE 前駆体に加えて AGEs 形成阻害剤 (アミノグアニジン) を併用した結果、caspase-3 の異常高分子化が抑制された。また、精製された caspase-3 を試験管内で GA と反応させた結果、処理時間依存的に抗 TAGE 抗体と抗体抗原反応を示す物質が形成されることから TAGE 化 caspase-3 の形成が確認された。また、試験管内で形成される TAGE 化 caspase-3 の高分子構造は、細胞内で観察される異常高分子化 caspase-3 と同程度のサイズであった。これらの結果から、GA 処理により細胞内で観察される異常高分子化 caspase-3 は TAGE 化されていることを明らかにした。

一方 caspase-3 は、正常状態ではアポトーシス誘導時に酵素機能が活性化することが知られている。そこで、caspase-3 の TAGE 化は、アポトーシス実行時にどのような影響を受けるのかについて解析した結果、GA 処理を行った細胞では caspase-3 の活性化機能の喪失が起こり、周辺細胞へ炎症を及ぼすネクロトーシス型の細胞死が引き起こされていた。

さらに、肝実質細胞を用いて得られた結果が生体を反映するのかを確認する目的で、NASH 発症モデルマウスの肝臓を用いた解析

を行った。肝細胞において TAGE 化 caspase-3 がアポトーシスに必要な酵素機能を喪失している事を明らかにしているが、この結果が疾患モデル動物にも反映されるかを検証した結果、健常マウスの肝臓と比較して、脂肪肝、NASH、肝線維化と病態が進行するに従い肝臓中の caspase-3 の酵素活性が減少する傾向が観察された。これらの結果から、同定した TAGE 化 caspase-3 が NASH における新規疾患マーカーとして有用である可能性が示唆された。

また、以上の解析により同定した TAGE 化 caspase-3 の異常 (異常高分子構造および酵素活性化機能の喪失) を阻害する化合物の探索は生活習慣病の予防につながるのではないかと考え、スクリーニング系を考案した。1st スクリーニングでは caspase-3 の酵素活性を指標にしたマルチウェルプレート上での解析を行い、有効性が確認された化合物については 2nd スクリーニングでウエスタンブロット法を用いて TAGE 化 caspase-3 の異常高分子構造形成抑制作用の確認を行った。その結果、複数の食品化合物に caspase-3 の TAGE 形成阻害作用を見出すことに成功した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 11 件)

- 1) 逆井 (坂井) 亜紀子、瀧野純一、福村敦、高田尊信、堤幹宏、竹内正義
NAFLD と ALD の発症・進展における Toxic AGEs (TAGE) 病因説 日本未病システム学会雑誌 24 (1) : 19-25 (2018) 査読あり
- 2) Akiko Sakasai-Sakai, Takanobu Takata, Jun-ichi Takino, and Masayoshi Takeuchi.
Impact of intracellular glyceraldehyde-derived advanced glycation end-products on human hepatocyte cell death.
Sci. Rep. 7: 14282 (2017) DOI: 10.1038/s41598-017-14711-3 査読あり
- 3) Takanobu Takata, Tadashi Ueda, Akiko Sakasai-Sakai, Masayoshi Takeuchi.
Generation of glyceraldehyde-derived advanced glycation end-products in pancreatic cancer cells and the potential of tumor promotion.
World J. Gastroenterol. 23: 4910-4919 (2017) DOI: 10.3748/wjg.v23.i27.4910. 査読あり
- 4) Jun-ichi Takino, Kentaro Nagamine, Mikoto Suzuki, Akiko Sakasai-Sakai, Masayoshi Takeuchi, Takamitsu Hori.
Gene expression changes associated with the loss of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M function.
Am. J. Mol. Biol. 7: 87-98 (2017) DOI:

10. 4236/ajmb. 2017. 72007 査読あり

5) Masayoshi Takeuchi, Jun-ichi Takino, Akiko Sakasai-Sakai, Takanobu Takata, Mikihiro Tsutsumi.
Toxic AGE (TAGE) theory for the pathophysiology of the onset/progression of NAFLD and ALD.
Nutrients 9: E634 (2017) DOI: 10. 3390/nu9060634 査読あり

6) 竹内正義、逆井 亜紀子、高田尊信、上田忠司、瀧野純一
非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) の発症・進展における Toxic AGEs (TAGE) の関与
日本未病システム学会雑誌 23: 20-30 (2017) 査読あり

7) Masayoshi Takeuchi, Akiko Sakasai-Sakai, Jun-ichi Takino, Takanobu Takata, Tadashi Ueda, Mikihiro Tsutsumi.
Toxic AGEs (TAGE) Theory in the Pathogenesis of NAFLD and ALD.
Int J Diabetes Clin Res. 2:4 (2015) 査読あり

8) Masayoshi Takeuchi, Akiko Sakasai-Sakai, Takanobu Takata, Tadashi Ueda, Takino J, Tsutsumi M, Hyogo H, and Yamagishi S.
Serum levels of toxic AGEs (TAGE) may be a promising novel biomarker in development and progression of NASH.
Med. Hypotheses 84: 490-493 (2015) DOI: 10. 1016/j. mehy. 2015. 02. 002 査読あり

9) Jun-ichi Takino, Kentaro Nagamine, Takamitsu Hori, Akiko Sakasai-Sakai, and Masayoshi Takeuchi.
Contribution of toxic advanced glycation end-products-receptor axis in nonalcoholic steatohepatitis-related hepatocellular carcinoma.
World J. Hepatol. 7: 2459-2469 (2015) DOI: 10. 4254/wjh. v7. i23. 2459 査読あり

10) 竹内正義、瀧野純一、逆井 (坂井) 亜紀子、高田尊信、上田忠司
生活習慣病の発症・進展における Toxic AGEs (TAGE) の関与：-新たな予防戦略- ~食事性 AGEs および糖毒性の真実~ 金医大誌 40: 95-103 (2015) 査読あり

11) 逆井 (坂井) 亜紀子、神野正雄、竹内正義
不妊治療バイオマーカーとしての Toxic AGEs (TAGE) の有用性 日本未病システム学会雑誌 21 (1): 93-96 (2015) 査読あり

[学会発表] (計 15 件)

1) 竹内正義、逆井 (坂井) 亜紀子、高田尊信、瀧野純一、堤 幹宏
NAFLD/ALD の発症・進展における Toxic AGEs (TAGE) 病因説 日本薬学会第 138 年会、2018

2) 高田尊信、逆井 (坂井) 亜紀子、竹内正義
ヒト株化膵管上皮癌培養細胞における TAGE

生成／蓄積と膵癌促進の可能性 日本薬学会第 138 年会 2018

3) 逆井 (坂井) 亜紀子、高田尊信、竹内正義
肝実質細胞死におけるグリセルアルデヒド由来終末糖化産物の関与 第 40 回日本分子生物学会年会、2017

4) 逆井 (坂井) 亜紀子、高田尊信、瀧野純一、竹内正義
糖尿病の発症・進展における Toxic AGEs (TAGE) の関与-新たな予防概念- 第 60 回日本糖尿病学会 2017

5) 高田尊信、逆井 (坂井) 亜紀子、瀧野純一、竹内正義
生活習慣病の発症・進展における Toxic AGEs (TAGE) の関与-新たな予防概念- 第 17 回日本抗加齢医学会 2017

6) 逆井 (坂井) 亜紀子、高田尊信、竹内正義
糖尿病の発症・進展における TAGE の関与-新たな予防概念- 日本糖尿病学会第 91 回中部地方会 2017

7) 高田尊信、逆井 (坂井) 亜紀子、竹内正義
ヒト株化膵管上皮癌培養細胞における TAGE 生成／蓄積と膵癌促進の可能性 日本糖尿病学会第 91 回中部地方会 2017

8) 高田尊信、逆井 (坂井) 亜紀子、竹内正義
生活習慣病の発症・進展における新規バイオマーカーとしての Toxic AGEs (TAGE) 第 24 回日本未病システム学会学術総会 2017

9) 竹内正義、瀧野純一、逆井 (坂井) 亜紀子、高田尊信、堤 幹宏
NAFLD と ALD の発症・進展における Toxic AGEs (TAGE) の関与 第 24 回日本未病システム学会学術総会 2017

10) 竹内正義、逆井 (坂井) 亜紀子、瀧野純一
NASH の発症・進展予防における Toxic AGEs (TAGE) の関与 第 3 回肝臓と糖尿病・代謝研究会 2016

11) 高田尊信、逆井 (坂井) 亜紀子、上田忠司、竹内正義
PANC-1 における細胞内 TAGE 生成と TAGE 化蛋白質の探索 第 31 回日本糖尿病合併症学会 2016

12) 竹内正義、逆井 (坂井) 亜紀子、高田尊信、上田忠司、瀧野純一
非アルコール性脂肪性肝障害 (NAFLD) の発症・進展における Toxic AGEs (TAGE) の関与 第 23 回日本未病システム学会総会学術総会 2016

13) 瀧野純一、長嶺憲太郎、永井真也、山根惇、平石勇、逆井 (坂井) 亜紀子、竹内正義、堀隆光
Glycer-AGEs に関連した NASH の非侵襲的バイオマーカー探索 第 55 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会 2016

14) 竹内正義、瀧野純一、逆井 (坂井) 亜紀

子、高田尊信、上田忠司
生活習慣病の発症・進展における新規バイオ
マーカーとしての Toxic AGEs (TAGE) 日本
薬学会第 137 年会 2017
15) 高田尊信、逆井 (坂井) 亜紀子、上田忠
司、竹内正義
ヒト膵管癌培養細胞における細胞内 TAGE 蓄
積と細胞障害関連蛋白質の探索 日本薬学
会第 136 年会 2016

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称：カスパーゼー 3 の異常高分子化を抑制
または抑止する物質のスクリーニング法
発明者：逆井亜紀子、竹内正義
権利者：金沢医科大学
種類：技術
番号：公開番号 2017-063614
出願年月日：2015 年 9 月 28 日
国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

逆井 (坂井) 亜紀子
(SAKASAI-SAKAI, Akiko)
金沢医科大学・総合医学研究所・助教
研究者番号：60570059