

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 17 日現在

機関番号：32670

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590340

研究課題名（和文）AGEs 特異抗体を用いた糖代謝異常の早期検出とその治療に関する研究

研究課題名（英文）Research on early diagnosis of abnormal carbohydrate metabolism by antibody specific for AGEs

## 研究代表者

永井竜児（NAGAI RYOJI）

日本女子大学・家政学部・講師

研究者番号：20315295

## 研究成果の概要（和文）：

メイラード反応前期生成物（AGEs）であるペントシジン（Pent）は酸加水分解に安定で腎症のマーカーとして期待されている。しかし、既存のPent測定法では血清の加熱処理によってPentが人工的に生成してしまうこと、塩酸の添加によって生成が抑制され、正確な血中Pentの測定が可能となることが明らかとなった。また

N<sup>ω</sup>-carboxymethylarginine（CMA）は不安定で測定が困難であったが、モノクローナル抗CMA抗体を用いてCMAがコラーゲン特異的に生成すること、そのメカニズムが明らかとなった。

## 研究成果の概要（英文）：

Pentosidine, one of advanced glycation end-products (AGEs), is measured by HPLC in the serum, and increased by heating in a temperature- and time-dependent manner. The increase in pentosidine formation is significantly inhibited by acidic conditions. This indicates that the level of serum pentosidine will be measured more accurately by ELISA if hydrochloric acid is added during the heating process. Furthermore, N<sup>ω</sup>-carboxymethylarginine (CMA), acid labile AGE structure, is preferentially generated in glycated collagen. We elucidated the hot-spot of CMA formation in glycated collagen.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：メイラード反応、糖尿病

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：AGEs、メイラード反応、糖化、CML、コラーゲン、老化

## 1. 研究開始当初の背景

メイラード反応後期生成物（AGEs）の生成阻

害剤であるbenfotiamine(Hammes HP et al., Nat. Med. 3, 294-299, 2003)は糖尿病性腎症や網膜症の発症を抑制することから、AGEsは

単なる老廃物ではなく、病態の憎悪因子とも捉えられている。これまでに我々は、生体中存在する(1) AGEs受容体の機能およびAGEs生成経路の解析、(2)既存AGEs測定系の問題点と新規測定法の開発、(3)AGEs生成阻害剤の開発と、一貫してAGEsの病態への役割について研究を行ってきた。メイラード反応前期生成物の一つであるヘモグロビンA1cが血糖コントロールのマーカーとして臨床的に測定されることから、血中や尿中のAGEsを測定して糖尿病合併症等のマーカーとして応用する試みがなされている。しかしこれまでに我々は、アルカリや加熱処理を伴う既存の測定法では、試料の前処理に伴ってAGE構造の一つであるN<sup>ε</sup>-(carboxymethyl) lysine (CML)が人工的に生成した副産物を測定している危険性を見出している。

## 2. 研究の目的

糖代謝異常の早期検出が可能な AGEs 構造体の同定および測定法を確立する。具体的にはペントシジン (Pent) と N<sup>ε</sup>-carboxymethylarginine (CMA)の測定系を確立し、生体における意義を検討する。さらに、糖尿病合併症の進展抑制に有効な AGEs 生成阻害剤の開発を目指す。

## 3. 研究の方法

### (1) 正確な Pent 値の測定系の確立：

①インフォームドコンセントが得られた糖尿病に罹患していない血液透析患者(9名)の血清を用いた。血清に 200mM リン酸緩衝液を加え、加熱処理 (100°C, 15分) をした群 (加熱処理群) と、同一の血清で加熱処理なしの群 (非加熱群) に分けた。その後、定法に従い、6N HCl で 18 時間加水分解した試料を HPLC 法によりペントシジン量を測定した。また、温度を 30~120°C に変化させ 15 分間加熱した試料と 100°C で加熱時間を 0~60 分に変化させた試料を調製し、Pent 含量を HPLC で測定した。

②血清に 200mM リン酸緩衝液または現行の酵素処理による測定法で使用されている 10

mM 塩化カルシウムを含む 100 mM Tris-HCl 緩衝液を添加し、加熱または非加熱処理を行い、酸加水分解後 Pent 値を測定した。また、分子量 10,000 以上の血清 (以下、10,000MW 以上の血清) を得るため、透析膜を用いて 50 mM リン酸緩衝液中で血清を 18 時間透析した。得られた透析液は加熱後、Pent 量の測定を行ない、透析前の血清ペントシジン量と比較した。

(2) CMA 生成メカニズムと線維芽細胞への影響：

①滅菌した 30 mM ribose を 2 mg/mL HSA または 2 mg/mL gelatin とエッペンドルフチューブに入れ、0, 2, 4, 7 日間 37°C 恒温器でインキュベートした。CMA の生成はモノクローナル抗 CMA 抗体を用いた ELISA で評価した。  
②AGEs 化コラーゲンをトリプシン消化した後、モノクローナル抗 CMA 抗体結合アフィニティカラムにかけ、その吸着画分を質量分析器で確認した。

## 4. 研究成果

(1) Pent の正確な測定法の確立：今回検討した Pent 値の温度(図1)および時間(図2)依存的な変化や、試料間の異なる増加率から(図3)、現行の測定法では血清 Pent 値を正確に反映していない可能性が示された。

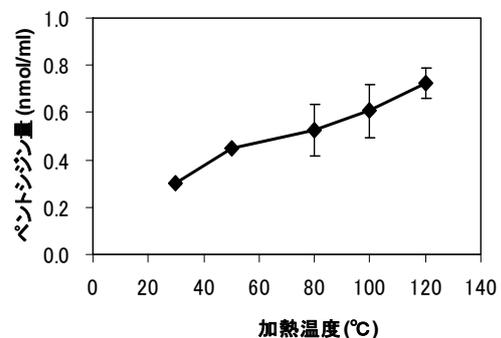


図1：加熱温度による Pent 値の変化

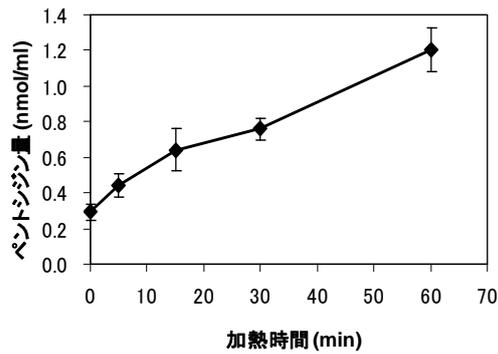


図 2：加熱時間による Pent 値の変化

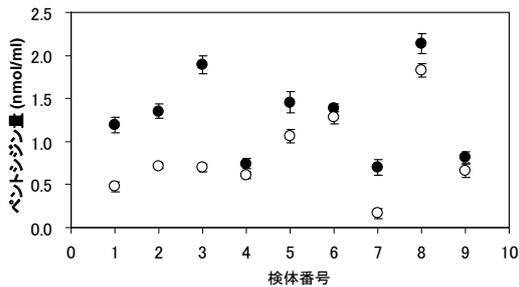


図 3：検体による Pent 値増加の違い

ペントシジンの生成経路は、アマドリタンパクの他、グルコースやアラビノースからの生成、さらに 3-デオキシグルコゾンなどのアルデヒド類からの生成が報告されている。そこで、加熱によるペントシジンの生成経路を確認するため、血清を透析膜で分子量 10,000 以上（アマドリタンパクを含む）と 10,000 以下（遊離のアミノ酸、糖、有機物質等）に分け、加熱に伴うペントシジンの生成量を比較した。その結果、加熱処理で増加したペントシジン量の約 30%は 10,000MW 以上の画分から生成したことが確認された（表 1）。

	非加熱処理	加熱処理	
		リン酸緩衝液	Tris-HCl 緩衝液
血清	0.66 ± 0.12	1.93 ± 0.27	1.04 ± 0.03
10,000MW以上の血清	0.38 ± 0.05	0.73 ± 0.15	—

表 1：分子量および緩衝液による Pent 生成の変化

残りの 60%は、血清中に含有する

10,000MW 以下の低分子化合物画分からの生成が推察され、血漿中の 5,000MW 以下のカルボニル化合物が Pent の生成を増大させるという過去の報告と一致すると考えられた。また、アマドリタンパクにおいても加熱で Pent 値が増加したことから（図 4）、加熱処理に伴う Pent の生成経路は、血清中のグルコース、ペプチドやカルボニル化合物などの低分子化合物だけでなく、アマドリタンパクからも生成されることが示された。

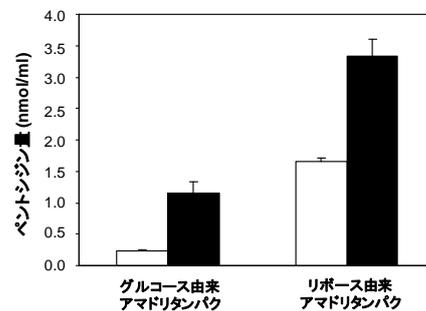


図 4：アマドリタンパクからの Pent の生成

一方、加熱によるペントシジン生成の抑制方法では、塩酸の添加が最も効果的であり、阻害剤として有用であることが明らかとなった（図 5）。ペントシジンはアルカリ条件で生成が促進され、酸性条件下では抑制、かつ安定であることが報告されている。本研究でも酸加水分解処理した試料のペントシジン値の増加が見られないことが確認されている。本結果から、塩酸の添加は、AGのアルデヒド類の補足作用やDTPAによる酸化反応の抑制とは異なり、試料を酸性化することによってペントシジンの生成が抑制されたと考えられる。

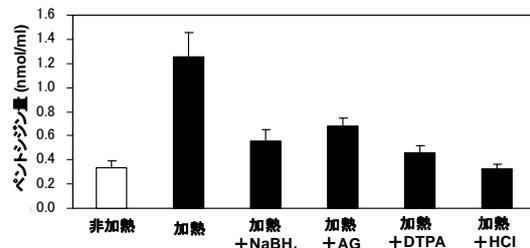


図 5：加熱に伴う Pent 生成の抑制効果

(2) 生体におけるCMAの意義：リボースをHSAあるいはgelatinとインキュベートす

ると、gelatinにCMAが経時的に生成することが確認された。

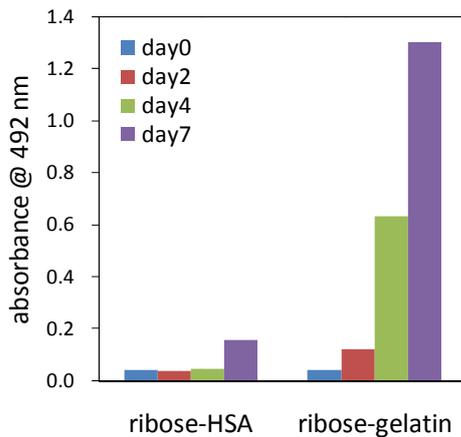


図6：糖化に伴うCMAの生成

CMAがコラーゲン特異的に生成するメカニズムを解析する目的でCMAが生成するアミノ酸配列の同定を行った。ウシのType IIIコラーゲンをglyoxalでAGEs化した後、トリプシン消化してモノクローナル抗CMA抗体アフィニティカラムにかけた。

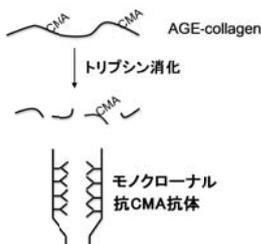


図7:トリプシン消化した糖化コラーゲンに存在するCMAペプチドの単離吸着画分を回収しイオントラップLC-MS解析によってCMA化部位の同定を行った。さらに、CMA化部位の確認実験として、CMAが同定された配列のペプチドを合成した後、riboseで修飾しCMA生成を確認した。その結果、LC-MS解析よりコラーゲン上のCMA化部位のペプチド配列GERGEAGSPGIAGPKなどが検出され、その中には細胞接着に関与するインテグリンが結合する配列もあった。

##### 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 32 件)

1. Toyokuni S, Hirao A, Wada T, Nagai R, Date A, Yoshii T, Akatsuka S, Yamashita Y, Kawada A. Age- and sun exposure-dependent differences in 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and N<sup>ε</sup>-(carboxymethyl)lysine in human epidermis. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 49:121-124, 2011 査読有
2. Fujiwara Y, Kiyota N, Tsurushima K, Yoshitomi M, Mera K, Sakashita N, Takeya M, Ikeda T, Araki T, Nohara T, Nagai R. Natural Compounds Containing a Catechol Group Enhance the Formation of N<sup>ε</sup>-(carboxymethyl)lysine of the Maillard Reaction. *Free Radic. Biol. Med.* 50(7): 883-891, 2011 査読有
3. Kamioka M, Ishibashi T, Ohkawara H, Nagai R, Sugimoto K, Uekita H, Matsui T, Yamagishi S, Ando K, Sakamoto T, Sakamoto N, Takuwa Y, Wada I, Shimoi M, Maruyama Y, Takeishi Y. Involvement of membrane type-1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) in RAGE activation signaling pathways. *J. Cell. Physiol.* 226(6):1554-1563, 2011 査読有
4. Curtis TM, Hamilton R, Yong P-H, McVicar CM, Berner A, Pringle R, Uchida K, Nagai R, Brockbank S, Stitt SW. Müller glial dysfunction during diabetic retinopathy in rats is linked to accumulation of advanced glycation end-products and advanced lipoxidation end-products. *Diabetologia* 54(3):690-698, 2011 査読有
5. Hirose J, Yamabe S, Takada K, Okamoto N, Nagai R, Mizuta H. Immunohistochemical distribution of advanced glycation end products (AGEs) in human osteoarthritic cartilage. *Acta histochemica.* 113(6):613-618, 2011 査読有
6. Lorenzi R, Andrades ME, Bortolin RC, Nagai R, Dal-Pizzol F, Moreira JF. Circulating Glycolaldehyde Induces Oxidative Damage in

- the Kidney of Rat. Diabetes Research and Clinical Practice. Vol 89,262-267, 2010査読有
7. Lorenzi R, Andrades ME, Bortolin RC, Nagai R, Dal-Pizzol F, Moreira JF. Glycolaldehyde Induces Oxidative Stress in the Heart: A Clue to Diabetic Cardiomyopathy? Cardiovasc Toxicol. 10(4):244-249, 2010査読有
  8. Lai YL, Aoyama S, Nagai R, Miyoshi N, Ohshima H. Inhibition of L-arginine metabolizing enzymes by L-arginine-derived advanced glycation end products. J Clin Biochem Nutr. 46(2):177-185, 2010査読有
  9. Ye X, Ng T. B. Nagai R. Inhibitory effect of fermentation byproducts on formation of advanced glycation end-products. Food Chem. 121, 1039-1045, 2010査読有
  10. Nagai R, Nagai M, Shimasaki S, Baynes JW, Fujiwara Y. Citric acid inhibits development of cataracts, proteinuria and ketosis in streptozotocin (type1) diabetic rats. Biochem. Biophys. Res. Commun. 393, 118-122, 2010査読有
  11. Kamioka M, Ishibashi T, Sugimoto K, Uekita H, Nagai R, Sakamoto N, Ando K, Ohkawara H, Teramoto T, Maruyama Yand Takeishi Y. Blockade of Renin-Angiotensin System Attenuates Advanced Glycation End Products-Mediated Signaling Pathways. J Atheroscler Thromb. 17(6): 590-600, 2010査読有
  12. Ilchmann A, Burgdorf S, Scheurer S, Waibler Z, Nagai R, Wellner A, Yamamoto Y, Yamamoto H, Henle T, Kurts C, Kalinke U, Vieths S, Toda M. Glycation of a food allergen by the Maillard reaction enhances its T-cell immunogenicity: the role of macrophage scavenger receptor class A type I and II, J Allergy Clin Immunol. 125(1): 175-183, 2010査読有
  13. Mera K, Takeo K, Izumi M, Maruyama T, Nagai R, Otagiri M. Effect of Reactive-Aldehydes on the Modification and Dysfunction of Human Serum Albumin. J. Pharm. Sci. 99 (3), 1614-1625, 2009査読有
  14. Adachi H, Fujiwara Y, Kondo T, Nishikawa T, Ogawa R, Matsumura T, Ishii N, Nagai R, Miyata K, Tabata M, Motoshima H, Furukawa N, Tsuruzoe K, Kawashima J, Takeya M, Yamashita S, Koh GY, Suda T, Oike Y, Araki E. Angptl 4 Deficiency Improves Lipid Metabolism, Suppresses Foam Cell Formation and Protects Against Atherosclerosis. Biochem. Biophys. Res. Commun. 20, 379(4):806-811, 2009査読有
  15. Kumagai T, Nangaku M, Kojima I, Nagai R, Ingelfinger JR, Miyata T, Fujita T, Inagi R. Glyoxalase I overexpression ameliorates renal ischemia-reperfusion injury in rats. Am J Physiol Renal Physiol. 296(4): F912-921, 2009査読有
  16. Matsumoto K, Fujiwara Y, Nagai R, Yoshida M. Immunohistochemical detection of advanced glycation end products in human bladder with specific monoclonal antibody. Int J Urol.16: 402-405, 2009査読有
  17. Frizzell N, Rajesh M, Jepson MJ, Nagai R, Carson JA, Thorpe SR, Baynes JW. Succination of thiol groups in adipose tissue proteins in diabetes:Succination inhibits polymerization and secretion of adiponectin. J Biol Chem. 284, 25772-25781, 2009査読有
  18. Fujimoto E, Kobayashi T, Fujimoto N, Akiyama M, Tajima S, Nagai R. AGE-modified collagen I and III induce keratinocyte terminal differentiation through AGE receptor (CD36): Epidermal-dermal interaction in acquired perforating dermatosis. J. Invest. Dermatol. 130(2): 405-414, 2009査読有

19. Motomura K, Fujiwara Y, Kiyota N, Tsurushima K, Takeya M, Nohara T, Nagai R, Ikeda T. Astragalosides Isolated from the Root of Astragalus Radix Inhibits the Formation of Advanced Glycation End-products. *J. Agric. Food Chem.* 57(17): 7666-7672, 2009査読有 [学会発表] (計 24 件)
1. 永井竜児、糖による無秩序な蛋白の変性と老化、第10回日本抗加齢医学会総会ランチョンセミナー12京都2010年6月12日
  2. 永井竜児、アンチエイジングを目指したAGE生成阻害剤の開発を目指して、第10回日本抗加齢医学会総会シンポジウム13 京都 2010年6月12日
  3. 永井竜児、抗AGE抗体ライブラリーを用いたAGEsの検出および阻害剤の探索、ifia JAPAN2010、東京、2010年5月19日
  4. 永井竜児、天然物を用いた生活習慣病予防の最先端研究、第5回健康・長寿を支える食・薬・医の研究会、名古屋 2010年3月5日
  5. AGEs/メラノイジンの生体応答とそのメカニズム、第19回日本メイラード学会 金沢 2009年11月20日
  6. 永井竜児、メタボリックシンドローム予防にむけた新たな戦略、北陸大学薬学部大学院セミナー、金沢 2009年11月19日
  7. Nagai R, Katsumata A, Kimura M, Nakano N, Fujiwara Y, Prevention of lifestyle-related diseases by regulating the metabolism of macrophages and adipocytes. The 1<sup>st</sup> International Conference on Lipid Hydroperoxide Biology and Medicine Sendai 2009 (ICLH 2009)、仙台 2009年11月5日
  8. Nagai R, Mera K, Nagai M, Fujiwara Y, Screening of AGE inhibitors by antibody library, 第10回国際メイラード反応シンポジウム、オーストラリア、2009年8月29日
9. 永井竜児、糖化によるコラーゲンの変性機構、ランチョンセミナー、Yokosuka Science Festa 2009、横浜 2009年6月6日
10. 永井竜児、蛋白の修飾・変性とAGEs、第9回日本抗加齢医学会総会カレントコンセプト19 東京 2009年5月29日 [図書] (計10件)
1. 島崎智子、永井竜児 : AGEs (advanced glycation end products)、病理と診断臨時増刊号 Vol. 29, 62-65, 2011
  2. 永井竜児、中野昌子、竹尾和寛 : 骨基質のAGEs 化と骨質、The BONE Vol.24 No.3 39-44,2010
  3. 永井竜児、永井美芽、島崎智子、藤原章雄 : クエン酸による糖尿病性白内障及び腎症の予防効果、腎とフリーラジカル 第10集, 138-142, 2010
  4. 永井竜児、竹尾和寛、久保田碧、中野昌子、米良克美 : 腎疾患とAGEs 現状と今後の展望、腎とフリーラジカル 第10集, 23-27, 2010
  5. 永井竜児、アンチエイジングを目指したAGEs 阻害剤の開発、糖化により疾患と抗糖化食品・素材、シーエムシー出版、24-33, 2010
  6. 永井竜児、高橋杏奈、太田美穂、中野昌子 : 食品による生活習慣病の効果的な予防を目指して、日本家政学会誌 Vol. 60 No. 11, 973-976, 2009
  7. 藤原章雄、池田剛、竹屋元裕、野原稔弘、永井竜児 : トマト由来の新規動脈硬化抑制化合物について、New Food Industry、Vol. 51 No. 3, 21-29, 2009
- [その他]  
ホームページ等  
<http://www2.aso.u-tokai.ac.jp/~rnagai/>
6. 研究組織  
(1) 研究代表者 永井竜児 (NAGAI RYOJI)  
日本女子大学・家政学部・講師  
研究者番号 : 20315295