

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：34310

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26350917

研究課題名(和文)メラトニンは蛋白糖化最終産物とその受容体を制御するか

研究課題名(英文) Does melatonin control advanced glycation end products (AGEs) and their receptor (RAGE) ?

研究代表者

米井 嘉一 (Yonei, Yoshikazu)

同志社大学・生命医科学部・教授

研究者番号：40191655

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：糖化ストレス制御には、蛋白糖化最終生成物(AGEs)生成抑制、AGEs分解促進、AGEs/RAGE(Receptor for AGEs)シグナル抑制の段階がある。実験の結果、メラトニンはAGEs生成抑制作用を有さず、AGEs/RAGE(Receptor for AGEs)シグナルに影響しなかったが、AGEs分解促進作用を有することが示された。

メラトニン分泌量の評価を行う目的で尿中メラトニン代謝産物6-OH-melatonin sulfate (SaMT)を測定した結果、ヒト尿中SaMTは成長ホルモン/IGF-I分泌と相関性を認めた。マウスでは尿中SaMTは検出感度以下であった。

研究成果の概要(英文)：Glycative stress control includes 1. Prevention of advanced glycation end product (AGE) formation, 2. AGE breaking and 3. AGEs/RAGE (Receptor for AGE) signal control. In our experiment, melatonin did not show prevention of AGE formation nor inhibition of AGEs/RAGE signal, but showed the enhancing action of AGE breaking. Furthermore, to evaluate melatonin secretion, we measured urine 6-OH-melatonin sulfate (SaMT), a melatonin metabolite, and found that human urine SaMT correlated to growth hormone/IGF-I secretion but were not detected in mouse urine. Melatonin seems to play a role in the mechanism that the high quality sleep reduces the glycation stress. Urine SaMT may contribute to evaluate the sleep quality.

研究分野：抗加齢医学

キーワード：メラトニン SaMT 糖化ストレス 蛋白糖化最終生成物(AGEs) 睡眠 糖脂質代謝 糖尿病

### 1. 研究開始当初の背景

我々の研究室では糖化ストレスの実験的研究と睡眠・メラトニン分泌に関する臨床研究を行ってきた。糖化反応は還元糖と蛋白の非酵素的かつ不可逆的反応であり、最終的に蛋白糖化查収産物 (advanced glycation end products: AGEs) が生成される。老廃物としての AGEs 蓄積、蛋白 AGEs 化による生体への直接的障害、AGEs をリガンドとする RAGE (receptor for AGEs) を介した炎症の惹起などの機序により、糖尿病合併症や加齢関連疾患に深く関与する。これらを総合したものが糖化ストレスの概念である。

2012 年度診療報酬改定において糖尿病合併症予防、特に腎症進展と透析導入の阻止に重点が置かれている。しかし HbA1c が同程度の糖尿病患者でも個人または生活習慣の違いにより合併症の進行速度が異なり、合併症の進展には AGEs/RAGE 系が深く関与する。ストレプトゾトシン(STZ)誘発糖尿病ラットでは、多くの AGEs の生成が報告されている。一方、AGEs 蓄積に伴う組織障害にはマクロファージが関与することから、その表面に存在する RAGE の関与が想定できる。また STZ 糖尿病ラットに抗酸化効果のあるメラトニンを投与すると、血糖値、HbA1c とフルクトサミンの低下が報告されている。

さらに我々の研究室では pentosidine、CML (carboxymethyllysine) などの AGEs 及び GO (glyoxal)、3DG (3-deoxyglucosone) などの中間体の測定法を確立した。また、これまでメラトニンの存在が報告されているハーブや食用植物(3)に、抗糖化活性を有することを見出した。またパイロット試験でメラトニンが AGEs 生成抑制作用を有することが示された。更に AGE Reader にて非侵襲的に測定した皮膚 AGEs 量が睡眠時間により影響を受けることが示された。

これを皮膚 AGEs 量の年齢推移と比較してみると、本来年代別でバラつきの少ない 20 代において睡眠時間の多寡によって皮膚 AGEs 量の差が大きいことがわかる。本来代謝機能の優れている 20 代において睡眠が AGEs 蓄積に及ぼす影響が大きいことから、メラトニンの AGEs 生成への影響、RAGE に対する作用、さらに AGEs 排出機構に対する効果を検証することにより、生体の AGEs 代謝に関する機序を解明するとともに、AGEs が原因となる様々な疾患の発症予防への新たなアプローチとなる研究を計画した。

### 2. 研究の目的

糖化ストレスは老化をはじめ様々な疾病の危険因子となっている。肥満、糖尿病、脂質異常症といった糖化ストレスが強い疾病は近年増加していること、また疫学調査からこれらの病態には睡眠の質の低下が関与することが明らかになっている。我々はこれらの疾病と睡眠を関連付ける因子としてメラトニンに注目し、「メラトニンが糖化ストレス

を緩和する」という仮説を立てた。糖化ストレスを抑制する方法には、段階別に AGEs の生成抑制、AGEs の分解促進、AGEs/RAGE シグナルの抑制に分けられる。はじめにメラトニンがどの段階に関与するか検討した。さらに睡眠の質をメラトニンを指標として評価する方法を模索した。

### 3. 研究の方法

#### 【in vitro 実験】

ヒト血清アルブミン (human serum albumin: HSA) とグルコースを反応させた時に生成される AGEs および中間体の測定については、pentosidine、3DG、GO、MG は HPLC 法にて測定した (Moniruzzaman M, 2016)。CML は抗 CML 抗体 (CycLex Co.Ltd)、抗 CMA 抗体 (ニッピ) を用いて ELISA 法にて測定した。蛍光性 AGEs はマイクロプレートリーダーを用いて励起波長 370 nm / 検出波長 440 nm の条件で測定した。この反応系にメラトニン (0.1 ~ 10 mg/mL) を加えた時に抑制効果を検討した。AGEs の分解促進活性は、1-phenyl-1,2-propanegione (PPD) のジケトン構造が切断される際に生じる安息香酸を定量することにより測定した。この反応系に対するメラトニン (0.4 mmol/L) の影響を検証した (Takabe W, 2016)。

#### 【培養細胞を用いた実験】

培養細胞としてマクロファージ系 RAW246.7 を用いた。糖化ストレス負荷として培養細胞に CML-HSA (0.5 ~ 2 µg/mL) を添加した。TNF 量は ELISA にて測定した (Sato K, 2015)。腫瘍壊死因子 (TNF)、IL-6、IK-1、RAGE の mRNA は PCR 法で測定、GAPDH mRNA を用いて標準化した (Mamun-Or-Rashid ANM, 2016)。メラトニン (0.1 ~ 10 µg/mL) の同時添加による抑制効果を測定した。

#### 【動物実験】

糖尿病実験動物の血液・尿・臓器組織中 AGEs (advanced glycation end products) 及び中間体、メラトニン代謝産物の測定を行った。糖尿病モデル動物として db/db マウスを用い通常食餌により飼育、6、8、10、12、14、16 週齢で 3 匹ずつ屠殺、以下の検体：血液、膀胱内尿、大腿骨、下肢関節、下肢骨格筋、肝、脾、腎、心、小腸を得た。これらの組織・体液中の AGEs 及び中間体 (蛍光性 AGEs、pentosidine、CML [carboxymethyllysine]、3DG [3-deoxyglucosone]、GO [glyoxal]、MG [methylglyoxal])、メラトニン代謝産物 6-hydroxymelatonin sulfate (SaMT) を測定した。

#### 【ヒト由来検体を用いた研究】

京都市有隣地域在住の自立生活高齢男女 25 例 (65 ~ 85 歳、73.2 ± 6.5 歳) を対象とし、メラトニン代謝産物として 6-hydroxymelatonin glucuronide を HPLC 法にて、6-hydroxymelatonin sulfate (SaMT) を ELISA 法にて測定した (Kawamoto T, 2016)。研究の遂行に際しては同志社大学の倫理委

員会の承認を得た。

やせ・肥満のない者、入眠困難、中途覚醒、早朝覚醒、熟眠困難など睡眠について不満のある者 31 名の中から男性 5 名、女性 6 名、計 11 名 (51.0 ± 6.3 歳) を選抜し対象とし、唾液中メラトニンを測定した (Takabe W, 2016)。研究の遂行に際してはそれぞれ一般社団法人オリエントラ労働衛生協会東京支部の倫理委員会の承認を得た。

#### 4. 研究成果

糖化ストレスを抑制する方法には、段階別に AGEs の生成抑制、AGEs の分解促進、AGEs/RAGE シグナルの抑制に分けられる。はじめにメラトニンがどの段階に関与するか検討した。HSA とグルコースを反応させ AGEs を生成させる *in vitro* 実験系を用いてメラトニンによる AGEs 生成抑制作用を検証した結果、メラトニンには AGEs 生成抑制作用は認められなかった (Moniruzzaman M, 2016)。培養マクロファージ (RAW264.7) を用いた糖化ストレス負荷した時の TNF 産生実験モデルを作成した (Sato K, 2015)。培養マクロファージに AGEs として CML-HSA を添加すると TNF mRNA 発現量、TNF 蛋白量、IL-6 mRNA 発現量、IL-1 mRNA 発現量、RAGE mRNA 発現量の上昇がみられたが、メラトニンはこれらの上昇を抑制しなかった (Mamun-Or-Rashid ANM, 2016)。従って AGEs/RAGE シグナルの抑制作用は認められなかった。次に AGEs の分解促進について、メラトニンによる ジケトン構造の分解促進作用の有無について検討した (Takabe W, 2016)。その結果、メラトニンが AGEs 分解促進を有することが示され、その効果は陽性対照 *N*-phenacylthiazolium bromide (PTB) に匹敵するものであった。

ヒトおよび動物におけるメラトニン分泌量の評価を行う目的で尿中メラトニン代謝産物 6-OH-melatonin sulfate (SaMT) を測定した。糖尿病モデル動物 db/db マウスでは、週齢 6 から 16 の期間、尿中 SaMT 検出感度以下であった (未発表)。自立生活高齢男女 25 例 (65 ~ 85 歳) の夜間膀胱内蓄尿中 SaMT を測定した結果、実年齢および機能年齢の筋年齢、血管年齢、神経年齢、骨年齢とは相関がなかったが、機能年齢のうちホルモン年齢との負相関 ( $r = 0.479$ ,  $p < 0.05$ ) を認めた (Kawamoto T, 2016)。6-hydroxymelatonin glucuronide はメラトニン分泌の指標とするには再現性、ばらつきの点で問題があった (未発表)。メラトニン分泌量が多く睡眠の質が高い者では、成長ホルモン分泌量も多くセカンドメッセンジャーホルモン IGF-I 分泌が増えホルモン年齢が若くなることが予想されており、本結果はこの予想とうまく適合する。またヒトで唾液中メラトニン量の測定を行ったが、測定誤差、ばらつきが多く、メラトニン分泌評価には不相当と判断した (Takabe W, 2016)。

結論として、睡眠の質の低下と糖脂質代謝異常との関連つける因子の一つがメラトニンであること、メラトニンが AGEs 分解促進作用を有することが示され、健康増進のためにはメラトニン代謝産物量を指標に睡眠の質を的確に評価し、睡眠の質改善に向けた介入を積極的に行うことが重要であることが示唆された。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

Mamun-Or-Rashid ANM., Takabe W, Yonei Y. Melatonin has no direct effect on inflammatory gene expression in CML-HSA stimulated RAW264.7 cells. *Glycative Stress Research* 3(3): 141-151, 2016. 査読有

Takabe W, Ogura M, Yagi M, Yonei Y. Effect on sleep quality of bedding with a high user rating in a post-marketing survey: A non-controlled open-label study. *Glycative Stress Research* 3(3): 110-123, 2016. 査読有

Takabe W, Mitsuhashi R, Parengkuan L, Yagi M, Yonei Y. Cleaving effect of melatonin on crosslinks in advanced glycation end products. *Glycative Stress Research* 3(1): 38-43, 2016. 査読有

Kawamoto T, Takabe W, Maruyama Y, Hattori A, Yonei Y. Relationships between urinary melatonin metabolites and glycative stress and body functional age. *Glycative Stress Research* 3(1): 15-22, 2016. 査読有

Moniruzzaman M, Takabe W, Yonei Y. Melatonin is not a carbonyl scavenger. *Glycative Stress Research* 3(1): 1-4, 2016. 査読有

Sato K, Yagi M, Takabe W, Yonei Y. Inhibitory effect of plant extract on tumor necrosis factor- $\alpha$  formation from carboxymethyllysine stimulated macrophages. *Glycative Stress Research* 2(4): 191-196, 2015. 査読有

〔学会発表〕(計 3 件)

米井嘉一。抗加齢健診と通常健診：データから両者の違いを考える。第 45 回日本総合健診医学会、東京ベイ舞浜ホテル (千葉県浦安市) 2017 年 1 月 27 - 28 日。

Mamun-Or-Rashid ANM, Takabe W, Yagi M, Yonei Y. Advanced glycation end products (AGEs) alter RANKL-induced osteoclastogenesis in RAW264.7 cell. 第 26 回日本メイラード学会、つくば国際会議場 (茨城県つくば市) 2016 年 11 月 11 日。

米井嘉一。睡眠の科学と糖化ストレス。第 11 回糖化ストレス研究会、同志社大学東京オ

フィス(東京都中央区) 2016年11月10日。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

米井 嘉一 (YONEI, Yoshikazu)

同志社大学・生命医科学部・教授

研究者番号：40191655

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：

(4) 研究協力者

( )