

生活習慣病におけるTAGE (toxic AGEs) 病因説 *

竹内正義

TAGE (toxic AGEs) hypothesis in life style-related disease

Masayoshi Takeuchi

Received September 22, 2004

Abstract

The advanced stage of the glycation process (one of the post-translational modifications of proteins) leads to the formation of advanced glycation end-products (AGEs) and plays an important role in the pathogenesis of angiopathy in diabetic patients, in aging, and in neurodegenerative diseases. However, it is still not clear which AGEs subtypes play a pathogenetic role and which of several AGEs receptor mediate AGEs effects on cells. We have provided direct immunochemical evidence for the existence of six distinct AGEs structures (AGEs-1 to -6) within the AGEs-modified proteins and peptides that circulate in the serum of diabetic patients. Recently we demonstrated for the first time that glyceraldehyde-derived AGEs (AGE-2) and glycolaldehyde-derived AGEs (AGE-3) have diverse biological activities on vascular wall cells, mesangial cells, Schwann cells, malignant melanoma cells and cortical neurons. We also demonstrated for the first time that acetaldehyde (AA)-derived AGEs (AA-AGE) have cytotoxic activity on cortical neurons and the AA-AGE epitope was detected in human brain of alcoholics.

These results indicate that of the various types of AGEs structures that can form *in vivo*, the toxic AGEs (TAGE) structures (AGEs-2, -3, and AA-AGE), but not non-toxic AGEs (N-carboxymethyllysine, pentosidine, pyrrolidine *etc.*) are likely to play an important role in the pathophysiological processes associated with AGEs formation.

1. はじめに

AGEs (advanced glycation end-products : 終末糖化産物) は、グルコース等の還元糖と蛋白質との間の非酵素的糖化反応 (発見者の名にちなんでMaillard (メイラード) 反応とも呼ば

* 第15回高岡市民文化賞 (平成16年3月受賞) 記念原稿

The 15th Takaoka citizen cultural prize (Winning of March, 2004) Commemoration manuscript

れている)の後期段階で生成する構造体の総称であり、近年、生体内で存在することが明らかとなってきており、その構造解析も進んでいる。

これまでAGEsは、糖尿病血管合併症の発症、進展に直接関与するものとして、その研究は進められてきた¹⁾。最近では、アルツハイマー病等の神経変性疾患²⁻⁴⁾や悪性腫瘍の増殖、転移、浸潤⁵⁾等にも関与することが明らかとなり、新たな分野の研究が展開されている。

このように、AGEsは糖尿病血管合併症はじめ種々の慢性疾患に関与していることが報告されているが、未だ生体内AGEs構造及びAGEs生成経路の全貌を解明するには至っていない。その理由の一つとして、実際に病気の原因となっているtoxic AGEs (TAGEと命名)と生体防衛的な意味合いで形成されていると考えられるnon-toxic AGEs (カルボキシメチルリジン、ピラリン、ペントシジン等)が同じ土俵レベルで考えられてきた経緯からであると思われる。

本稿では、生体内AGEsの生成過程を概説するとともに、生体内に存在するtoxic AGEs (TAGE)病因説について言及していく。

2. 糖尿病の有病率

平成6年のわが国における糖尿病人口の調査によると、糖尿病患者は約500万人で、40歳以上の10人に1人が糖尿病を有するとされ、平成22年に至る予想増加率は1.1倍となっていた。しかし、平成9年の厚生労働省の実態調査では、既に糖尿病人口は約690万人(約1.4倍)となり、耐糖能異常を含む糖尿病予備軍を合わせると1,370万人に達している。さらに、平成15年8月に厚生労働省から発表された最新の実態調査結果によると、糖尿病人口は約740万人、予備軍を含めると約1,620万人となっている。実にこの5年間で糖尿病患者は50万人、予備軍に至っては200万人も増加しており、その増加率は予想よりもはるかに高くなってきているような状況である。

現在、通院中の糖尿病患者数は予想患者数の約半数とされているが、今後時間の経過とともに糖尿病の管理が必要となる人は激増して、平成22年には1,080万人に達するものと予測されている。こうした糖尿病人口の激増は医療経済学的損失とともに、社会の中心的役割を担う世代の患者層が多いこととも相俟って、日本全体の繁栄、健全性の維持に大きな障害となっている。

3. 糖尿病はなぜ怖い

6.3人に1人が糖尿病という時代。様々なインスリン製剤や経口血糖降下薬の使用が可能となった今日においても、血糖の完全な正常化には困難を要し、合併症をかかえた糖尿病患者の生命予後は必ずしも改善されていない。これを反映して、糖尿病性腎症は透析導入(12,000人/年)の原因疾患の第一原因であり、網膜症では年間約4,000人が失明、神経障害で年間約10,000人が下肢を切断、さらに糖尿病患者の約40-50%が心筋梗塞や脳梗塞で亡くなっているのが現状である。従って、糖尿病合併症の発症、進展のメカニズムを明らかにし、新しい治療法を確立することは緊急に取り組みねばならない最重要課題の一つと言える。

ごく最近、糖尿病合併症の発症、進展のメカニズムを考える上で非常に興味深い報告がなさ

れた⁶⁾。アメリカ・カナダで実施された1型糖尿病患者を対象にした大規模臨床試験では、ヘモグロビンA1c (HbA1c) 6%を目標として6.5年間懸命に治療し続けた強化治療グループ(平均HbA1cが7.2%)の方が、目標を立てずに漫然とインスリン治療を続けた通常治療グループ(平均HbA1cが9.1%)より、網膜症の悪化は断然少なかった(網膜症の発症率は、通常治療群が33%で、強化治療群が10%)。そこで本試験終了後、通常治療群にも強化療法が実施された。4年経った時点で、網膜症の状態を比べたところ大きな差があった。後で強化治療を始めたグループは、HbA1cは改善(通常治療群が8.2%で、強化治療群が7.9%)していたにもかかわらず、網膜症の悪化(網膜症の発症率は、通常治療群が49%で、強化治療群が18%)が進んでいた。すなわち、4年以上前的高血糖状態が身体に残っていて合併症が進行したという解釈である。身体に刻印された高血糖の記憶は簡単に消し去ることができない。

言い換えれば、初めの6.5年間の血糖コントロールがしっかりできていれば、その後血糖が次第に悪くなっても、少なくとも4年間は合併症が進みにくい。ところが反対に、最初のコントロールが不十分だと、途中から厳格にしても合併症の進展を食い止めるのが難しい。つまり、人体の中に血糖の高いことを記憶しているメカニズムがあることが分かった。すなわち、「高血糖に付随して、元に戻らなくなるような物質が体の中に存在し、年月とともに貯まっていくようなメカニズムを考えないと説明がつかない」(図1参照)。その仮説にぴったり合うのがAGEsである。体内の蛋白質は通常、良い働きをしているが、高血糖が持続すると、ブドウ糖と化学反応して糖化蛋白質となる。短期間なら血糖コントロールで元に戻れるが、何年も経つうちゆっくりとAGEsが形成され、今度はいくら血糖を下げても減ることはない。AGEsは血糖コントロールの程度とその持続期間により比例的に生成され、その進み具合は糖尿病合併症のメカニズムとぴったり整合すると言うわけである。

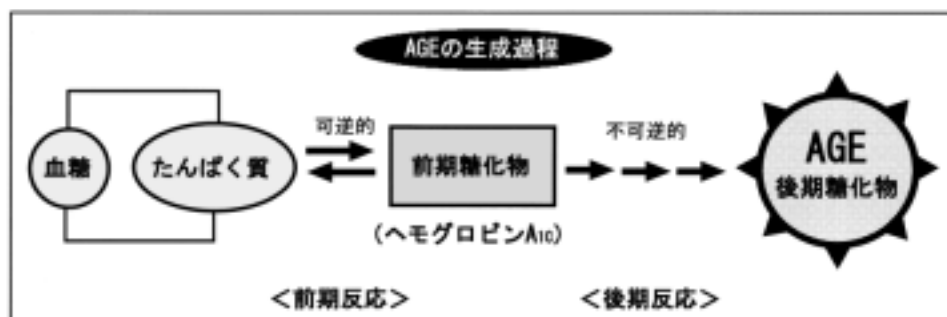


図1 蛋白質の非酵素的糖化反応（メイラード反応）の概略

4. AGEsの概念

古典的な概念によれば、AGEsは特有の蛍光、褐色化、分子内及び分子間での架橋形成といった物理化学的な性状と、マクロファージ等の細胞膜レセプターに認識されるという生物学的な特徴を有するものとされる。但し、これまでのAGEs研究の流れから、このような特徴を有さない構造、例えばカルボキシメチルリジン (N-(carboxymethyl) lysine : CML) やピラリン

(pyrraline) 等も AGEs の概念の中に入れて考えられているのが現状である。現在までに構造が明らかにされた AGEs として、CML やピラリンの他、ペントシジン (pentosidine)、クロスリン (crosslines)、イミダゾロン (imidazolones) 等が知られている。しかし、これらは生体内に存在する全 AGEs の数% にすぎず、どのような AGEs 構造が糖尿病血管合併症等の各種慢性疾患の発症・進展に関わっているのかは未だ明らかではない。

以前より、AGEs の定量は、構造が明らかになっている CML の定量で代替されてきた。しかし、近年、生体内における CML の主な供給源が脂質の過酸化によるものであり、糖化反応によるものではないことが報告された⁷⁾。実際、ヒトの皮膚コラーゲンの解析においても CML 値は加齢とともに上昇するが、糖尿病と非糖尿病患者間とは差異を認めていない。このような現状から、今日では CML は糖化ではなく、むしろ酸化ストレスのマーカーと考えられるようになってきているが、CML 構造を認識する抗体が抗 AGEs 抗体として国内で市販されていることもあり、多くの研究者に誤解を招く原因となっている。

今後は、CML 以外の AGEs 構造に焦点をあてて AGEs 関連疾患との関連を検討すべきであろう。

5. 生体内 AGEs 生成経路の総括

近年、AGEs はグルコースからだけでなく、グルコースの自動酸化及び分解産物 (glucose degradation products : GDPs) より生成したグリオキサール (glyoxal : GO)、メチルグリオキサール (methylglyoxal : MGO)、3-デオキシグルコソン (3-deoxyglucosone : 3-DG) 等のジカルボニル化合物からも生成されることが報告されている⁸⁻¹⁰⁾。糖尿病患者血中 MGO 及び 3-DG レベルは、健常者と比べて有意に高くなっており、また、これらの化合物は分子内にカルボニル基を 2 個有することから、アルデヒド化合物に比べてより反応性が高いとして注目されてきている。しかしながら、我々のこれまでの経験から、これらのジカルボニル化合物よりもむしろ、グリセルアルデヒドやグリコールアルデヒド等の α -ヒドロキシアルデヒドの方が、より蛋白質との反応性が高く、かつ生成された AGEs はより生物作用が強力であることが明らかとなってきている。

このような背景から、我々は生体内における複雑な AGEs 生成メカニズムを解明するため、各種新規抗 AGEs 抗体を作製した¹¹⁻¹³⁾。

グルコース、 α -ヒドロキシアルデヒド (グリセルアルデヒド、グリコールアルデヒド) 及びジカルボニル化合物 (MGO, GO, 3-DG) とウサギ血清アルブミンを無菌的条件下において一定期間反応させ、まず 6 種の AGEs (グルコース由来 AGEs を AGE-1、グリセルアルデヒド由来 AGEs を AGE-2、グリコールアルデヒド由来 AGEs を AGE-3、MGO 由来 AGEs を AGE-4、GO 由来 AGEs を AGE-5、3-DG 由来 AGEs を AGE-6 と命名) を調製した。これらの AGEs をウサギに免疫して各種抗血清を作製した後、得られた抗血清より、6 種の AGEs アフィニティーカラム及び CML アフィニティーカラムを用いて、各種抗 AGEs 抗体を調製した。

得られた 6 種の抗 AGEs 抗体の特異性は、AGE-BSAs (AGEs-1~6) を用いた競合 ELISA 法により検討した。各種抗体とも既存構造の CML、ピラリン、ペントシジン、イミダゾロン等は認識せず、各々の AGEs 構造を特異的に認識した。

上記6種の抗AGEs特異抗体を用いて、糖尿病透析患者血中における各々のAGEsの存在の有無を検討した結果、いずれのAGEs構造も糖尿病透析患者血中に存在することが明らかとなった。さらに、6種の抗AGEs抗体で特異的に認識される分子量の異なるAGEs分子種が、数種類血中に存在していることも推測されている。

すなわち、AGEsは従来グルコースと蛋白質から生成 (AGE-1) すると考えられてきたが、生体においてはグルコースの代謝中間体や分解物、メイラード反応中間体などからも生成 (AGEs-2~6) し、しかもグルコースに比べてはるかに早くAGEs-2~6を生成することが明らかになった (図2参照) ¹¹⁻¹³⁾。

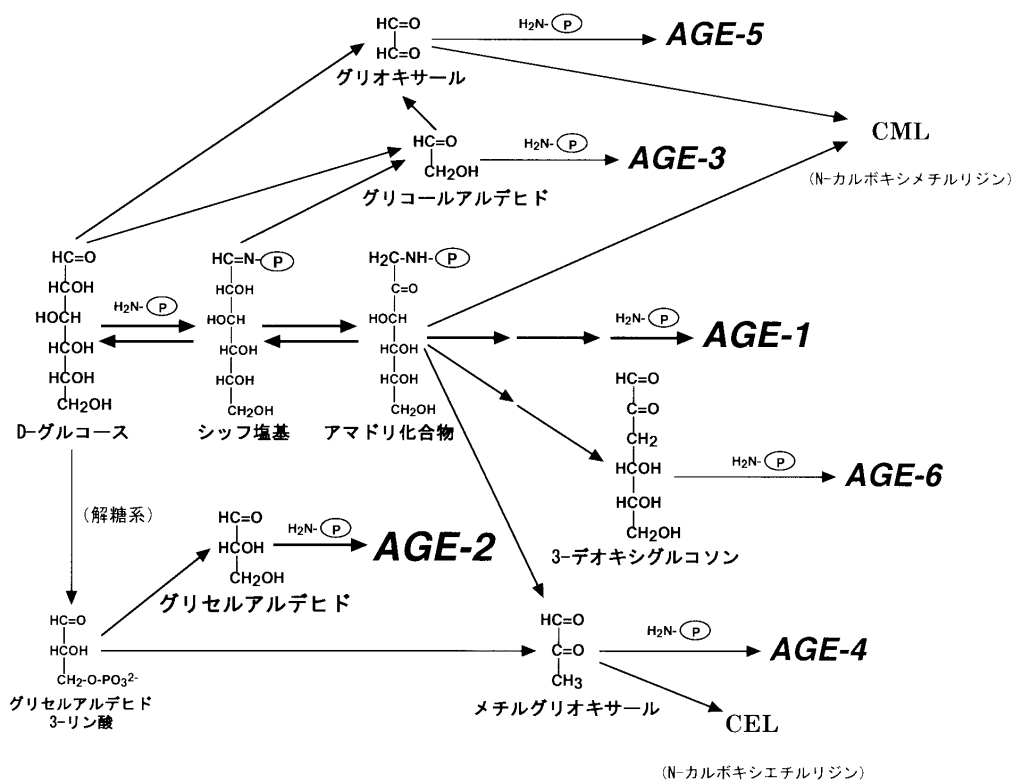


図2 生体内AGEsの生成経路

6. 生体内AGEsの各種生物作用

(1) 糖尿病血管合併症との関連

最近、我々は生体内に存在する各種AGEsの中でも、特にグリセルアルデヒド由来AGEs (AGE-2) 及びグリコールアルデヒド由来AGEs (AGE-3) が、RAGE (receptor for AGEs) を介し糖尿病性網膜症や腎症といった糖尿病血管合併症の発症、進展に強く関わっていることを解明した。実際に生物作用の強力なAGE-2及びAGE-3は、表面プラスモン共鳴法において可

溶型RAGEとの特異的な結合が認められている¹⁴⁾。

以下に、その概要を示す。

<糖尿病性網膜症>

糖尿病性網膜症は持続的な高血糖に暴露される結果、網膜血管構成細胞に機能的、器質的変化が生じ網膜や硝子体に多彩な病変を認める疾患である。糖尿病性網膜症は、病期によって単純、前増殖、増殖網膜症に分類される。

糖尿病性網膜症の場合となる細小血管は、血管の内側を覆う内皮細胞とそれを取り囲む周皮細胞から構成されているが、網膜症の初期においては、網膜周皮細胞の選択的消失 (pericyte loss) と血管透過性の亢進が認められる。また、前増殖、増殖網膜症における主要病態は、血管閉塞、血管新生である。

網膜症においては、1) AGE-2及びAGE-3が網膜周皮細胞の増殖を抑制し、アポトーシスを誘導することにより糖尿病性網膜症の初期に見られる周皮細胞の選択的消失を引き起こすこと、2) また、AGE-2及びAGE-3が周皮細胞における血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor: VEGF) の遺伝子発現を高めることで網膜症初期の血管透過性を亢進すること、3) 一方、AGE-2及びAGE-3は内皮細胞においては増殖を促進し、VEGF遺伝子の発現を誘導する結果、管腔形成促進をきたして増殖性網膜症への進展にも関与することが明らかとなっている¹⁵⁻¹⁸⁾。

我々は最近、アンジオテンシン II (angiotensin II, 以下Ang II) や飽和脂肪酸であるパルミチン酸が周皮細胞RAGEの遺伝子発現を上昇させ、AGE-2及びAGE-3の作用を増強することを見出した¹⁹⁾。コントロール不良の糖尿病状態では、局所のレニン-アンジオテンシン系の活性化に加えて血中遊離脂肪酸ことに飽和脂肪酸が増加しており、これらがAGEsと相まってpericyte lossに拍車をかけるのであろう。Ang IIタイプ1 (AT₁) 受容体阻害剤であるテルミサルタンの投与で周皮細胞における細胞内酸化ストレスの産生亢進が抑えられ、AGEs作用が軽減される事実は、初期網膜症の治療を考える上で注目される²⁰⁾。

さらに我々は最近、網膜色素上皮細胞由来因子 (pigment epithelium-derived factor, 以下PEDF) がAGE-2によるNADPH oxidaseの活性化を抑え細胞内酸化ストレスの産生亢進を抑制することでRAGE以下の情報伝達を阻害することを見出した²¹⁾。PEDFによりVEGFとともにケモカインのひとつである単球走化性因子 (monocyte chemoattractant protein-1: MCP-1) の発現も抑えられることから²²⁾、PEDFはAGEsシグナルをブロックすることでpericyte lossのみならず、血管透過性の亢進や血管閉塞、血管新生をも抑制しうるかもしれない。

<糖尿病性腎症>

腎糸球体を構成する細胞外基質のAGEs化は、糸球体の恒常性を破綻させ、さらにAGEs修飾を受けた基質蛋白質は蛋白質分解酵素による分解を受けにくく、細胞外基質の増加をきたし、腎糸球体硬化症への進展を引き起こすことが推察されている。すなわち、AGEsは糖尿病性腎症にみられる糸球体過剰濾過、微量アルブミン尿、腎メサンギウム領域の拡大、糸球体硬化症といったすべての病態の発症プロセスに関与することが考えられる。

腎症においてもAGE-2及びAGE-3がRAGEを介して認識され、1) メサングウム細胞にアポトーシスを誘導して増殖を抑制すること、2) メサングウム細胞のVEGFやMCP-1遺伝子の発現を誘導すること、3) 一方、糸球体上皮細胞の新規蛋白質合成を阻害すること、4) 形質転換増殖因子 (transforming growth factor- β : TGF- β) 遺伝子の過剰発現が誘導されることが判明した。以上より、糖尿病状態で促進的に形成されるAGE-2及びAGE-3は、腎糸球体メサングウム及び近位尿管上皮細胞に細胞障害的に作用し、蛋白尿の増悪を引き起こし、糸球体硬化症の発症・進展に関与することが考えられる²³⁻²⁶⁾。

<糖尿病性神経障害>

末梢神経系は、糖尿病で最も侵されやすい組織である。糖尿病性神経障害の発症、進展においてもAGEsが関与している可能性が示唆されているが、AGEsが直接神経組織に影響を及ぼすかは明らかではなかった。

神経障害との関連においてもAGE-2及びAGE-3が、末梢神経の機能維持や再生に重要な役割を果たしているシュワン細胞に対して、1) 細胞内酸化ストレスの亢進によるアポトーシスを誘導して増殖を抑制すること、2) 炎症性サイトカイン (TNF- α 及びIL-1 β) の産生増加を引き起こし、糖尿病性神経障害の発症、進展にも関与することを明らかにした²⁷⁾。

既に、我々は糖尿病モデル動物やRAGEトランスジェニックマウスにおいて1) 糖尿病血管合併症の発症、進展にAGE-RAGE系が実際に強く関与すること、2) 新規AGEs阻害薬が蛋白尿の増大と糸球体硬化や尿管萎縮の進展を抑えることを明らかにし、腎症治療への新しい可能性を見出している²⁸⁻³²⁾。

さらに、我々は糖尿病患者血中及び組織中AGEs測定系を開発し、1型、2型いずれの糖尿病患者においても血中AGEsレベルが網膜症及び腎症のステージと相関することも解明した³³⁻³⁶⁾。また、AGE-2は食後過血糖の良い指標となり得ることを見出し、糖尿病の新しい予防法や治療法の確立への大きな期待が持たれている。

(2) 痴呆との関連

厚生労働省の報告によれば、介護が必要な痴呆性高齢者の数は2002年の149万人から、2040年には385万人に膨らむと予測されている。高齢者の痴呆は、脳血管性痴呆とアルツハイマー型痴呆に大きく分けられる。厳密な区分は困難なことも多いが、比較的若年から始まるのがアルツハイマー型痴呆の特徴である。

一般的に、糖尿病患者では脳血管障害による血管性痴呆の頻度が高いと言われてきた。実際、脳血管疾患の頻度は糖尿病患者の増大で急激に増加しており、高齢者人口の増加が痴呆患者を直接増加させている。糖尿病での脳梗塞の頻度は非糖尿病患者に比し1.5~2倍高いことも報告されている。

また、ロツテルダムで行われた最近の疫学的研究によれば、糖尿病患者ではアルツハイマー型痴呆の有病率も有意に高く、インスリン治療者では経口血糖降下薬服用者よりも、より高い

有病率を示しており、糖尿病患者での痴呆が大きな関心の的となっている。

近年、AGEs及びRAGEが糖尿病血管合併症のみならず、動脈硬化症、アルツハイマー病、腫瘍の増殖、転移、炎症反応にも関与することが示唆されており、AGEsを抑えることが、糖尿病血管合併症をはじめとする様々な疾患の治療戦略上、必要なことがわかってきた。アルツハイマー病との関連では、AGEsが老人斑と神経原線維変化に沈着していること、また、RAGEがアミロイド β 蛋白質 ($A\beta$) による神経細胞毒性を媒介しうること等が報告されている。しかし、AGEsの直接的な神経細胞作用については、ほとんど明らかでなかった。

アルツハイマー病との関連においては、1) ラット胎仔大脳皮質神経細胞に各種AGEsを添加したところ、AGE-2において強力な神経細胞死が見られ、この細胞毒性はAGE-2特異抗体の添加により中和されること、2) 患者血清から得たAGEs画分を神経細胞に添加したところ、神経細胞障害が再現されること、3) これらの作用はAGE-2特異抗体の前処置で完全に抑制されること、4) アルツハイマー病患者病変部にAGE-2が実際に局在することから、生体内においては各種AGEsの中でもAGE-2が特異的に神経細胞障害を引き起こし、アルツハイマー病の発症、進展に関与することが明らかとなっている^{37,38)}。

(3) 悪性黒色腫との関連

日本人一般の平均寿命に比して糖尿病患者では男性で9.4歳、女性では13.5歳短く、早期死を迎えている。最近の報告によれば、糖尿病患者の死因として悪性新生物が上昇中で、2002年の佐野らの集計から、糖尿病性腎症、虚血性心疾患、脳血管障害を合わせた血管障害が39.3%に比して、癌は29.2%を占めている。また、弘前大の八木橋らが行った過去15年間の糖尿病患者の病理解剖例の検討では、各種臓器に発生した癌を全て含めると癌による死亡例が死因としては39.8%を占めており、血管障害の42.3%について2位となっている。

これらの結果は、糖尿病患者管理の上で、血糖管理とともに癌の存在にも注意を払う必要があることを示している。

悪性黒色腫との関連においては、1) AGE-2及びAGE-3がRAGEを介してメラノーマ細胞に作用して増殖を促進すること、2) 転移の際の細胞の形態変化を促進すること、3) 細胞の転移及び浸潤活性も促進すること、4) 実際に悪性黒色腫を植え付けたマウスのAGE-RAGEシグナルをRAGE特異抗体でブロックすることにより、腫瘍の増大や他組織への転移が抑えられ、生存率が著しく高まることも明らかとなっている。加えて、AGE-2はヒト悪性黒色腫腫瘍内に豊富に見られるのに対し、正常皮膚ではわずかにしか認められないことも、悪性黒色腫細胞自身がAGE-2を産生しautocrine的に腫瘍の進展を促進していると考えられる。また、癌細胞のみならず、周辺の間質においてもAGE-2が産生されており、腫瘍周辺間質にAGE-2が沈着することは癌の増殖、転移を誘導する因子のひとつと推察できる^{5,39)}。

癌研究において、これまでの癌細胞自身の増殖を抑え、完治を目指す研究テーマから、より生存率を重視する、転移を抑える研究に急速にシフトしつつある。最近提唱された、癌を一種

の慢性疾患と捉える“tumor dormancy”の概念にも通じる。同一個体由来の癌細胞を明確に判別する術がない以上、今後も転移研究が癌研究の主体となると思われる。

一方、AGEs化した細胞外基質が転移を誘発する因子になり得るという考えは、他に例を見ない。複雑な転移のメカニズムを理解する上で、この新たなコンセプトがいかにインパクトを与えていくか期待される。

(4) アルコール依存症とアセトアルデヒド由来AGEs (AA-AGE) との関連

慢性多量飲酒者とは、1日に日本酒3合以上を10年以上飲み続けた人を言い、わが国では約230万人の多量飲酒者が存在すると言われている。

糖尿病患者の場合には、アルコールによる障害と糖尿病からの障害がオーバーラップし、神経系に複雑な障害が起こる場合がある。一般に、アルコール多飲者では末梢神経系も侵されるが、中枢神経障害も起こり、振戦、痴呆など種々の障害が現れる。

アセトアルデヒドは、これまでアルコール代謝より生成されると考えられてきたが、近年、グルコース分解物 (GDPs) から生成することが明らかとなってきている。特に、酸性腹膜透析液中に多量に存在することが報告されており、3-DGやMGOとともに腹膜透析患者の腹膜肥厚との関連において注目されている。

前述の生体内AGEs生成経路の総括より、GOやMGO等のジカルボニル化合物よりもむしろ炭素数2個 (グリコールアルデヒド) や3個 (グリセルアルデヒド) の α -ヒドロキシアルデヒドからのAGEs生成がより早く、しかもこれらのAGEs (AGE-2及びAGE-3) の生物作用がより強力であることが明らかとなってきた。これらの結果をもとにアセトアルデヒドと蛋白質との非酵素的な反応からもAGE-2やAGE-3と同様な経路によりアセトアルデヒド由来AGEs (AA-AGEと命名) が生成されると推察された (図3参照)。実際に、アセトアルデヒドと蛋白質との反応により生成したAA-AGEは、AGEsに特有の褐色化、特異蛍光、架橋形成といった物理化学的な性状を示した。

アルコール性機能障害との関連では、1) AA-AGEがAGE-2と同様に神経細胞死を引き起こすこと、2) この神経細胞死は、AA-AGE特異抗体の添加により、中和されること、3) ま

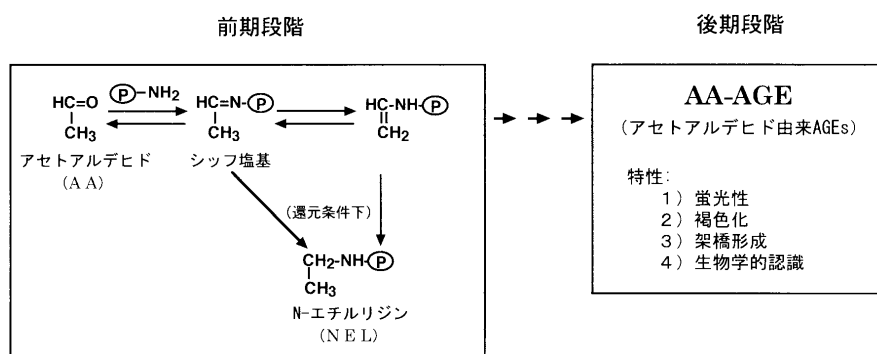


図3 メイラード反応によるアセトアルデヒド由来AGEs (AA-AGE) の推定経路

た、肝細胞にも直接作用して細胞死を誘導すること、3) 免疫染色の結果より、AA-AGEがアルコール依存症者脳内及びアルコール摂取動物肝細胞内に局在していることが明らかとなっている⁴⁰⁻⁴²⁾。

平成15年度の日本癌治療学会において、「アルコールの多量飲酒は癌転移を促進する」との報告がなされたが、恐らくAGE-2同様生体内で形成されたAA-AGEが癌の転移及び浸潤を促進しているものと推察される。

以上のごとく、アルコール代謝に伴って産生されたアセトアルデヒドの一部は、蛋白質の糖化反応によりAA-AGEへ変換されるが、このAA-AGEはこれまで知られていたacetaldehyde-protein adduct (最近この構造がN-ethyllysineであることが報告された) と異なり、肝細胞障害作用が強く、主に中心静脈周囲の肝細胞で産生されることから、アルコール性肝障害の発症、進展に強く関与している可能性が示唆された。

さらに、最近では生活習慣の欧米化に伴い肥満、糖尿病、高脂血症などの生活習慣を背景に非アルコール性脂肪性肝炎 (nonalcoholic steatohepatitis: NASHと略す) 患者の増加が危惧されている。また、NASHは組織学的にアルコール性肝炎 (ASH) に類似しており、病理学的な診断がまだ確立されていないのが現状である。

そこでNASH患者の血中AGE-2量を測定した結果、有意な相関が認められたことから、AA-AGEとAGE-2抗体を用いた組織染色によるASHとNASHの識別を提案している (第24回アルコール医学生物学研究会優秀演題表彰, 平成16年3月)。

7. 生体内AGE-2生成経路の推察

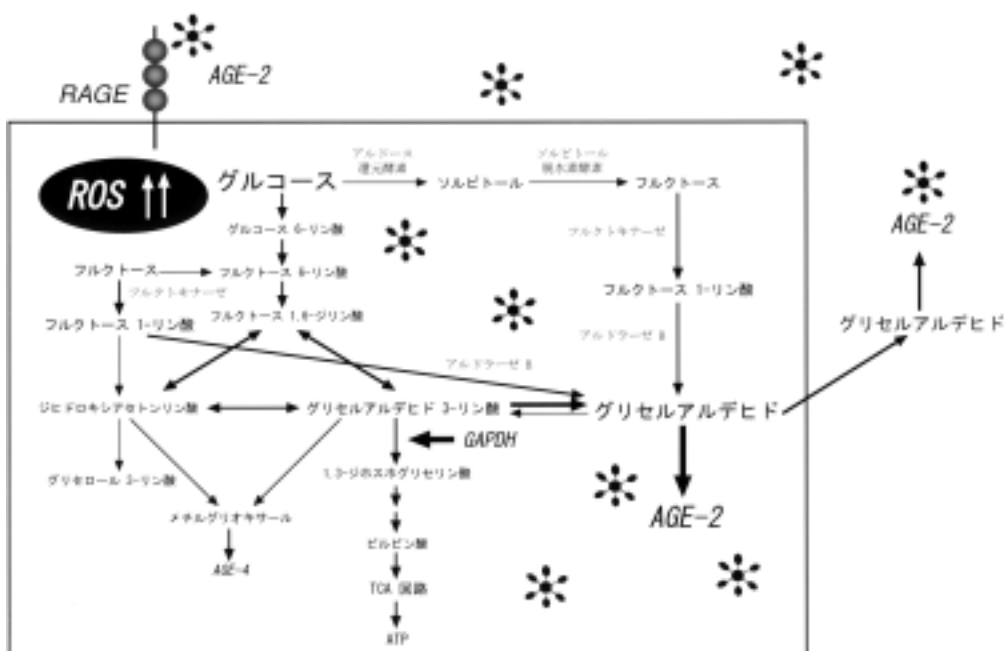
以上の結果より、生体内で生成される様々なAGEsの中でも、特にAGE-2が種々の慢性疾患の発症、進展の直接原因となっていることが示唆された。それでは、AGE-2は生体内においてどのような経路から生成されるかを推察してみた。

- 1) 一つ目の経路としては、グルコースの主要代謝経路である解糖系の中間体として生成するグリセルアルデヒド-3-リン酸が、非酵素的な脱リン酸化を受けてグリセルアルデヒドが直接生成する経路が考えられる。
- 2) 二つ目の経路としては、飲食料品由来のフルクトースがフルクトキナーゼ的作用によりまずフルクトース-1-リン酸に代謝され、その後アルドラーゼB的作用によりグリセルアルデヒドが生成する経路が考えられる。
- 3) 三つ目の経路としては、ソルビトール代謝経路で生成されるフルクトースが上記の2種の酵素の関与により、グリセルアルデヒドを生成する経路が考えられる。

このようにして生成したグリセルアルデヒドは、分子内にリン酸基を有しないため、細胞膜を通過して細胞外に輸送、漏出し、細胞外の蛋白質と反応してAGE-2を生成すると考えられる。従って、生物作用の強力なAGE-2は、細胞内外において生成することが考えられる。実際に、アルツハイマー病患者脳神経細胞内や悪性黒色腫瘍細胞内外でのAGE-2の局在が確認されている。また、細胞外で生成したAGE-2は、RAGEを介して細胞内酸化ストレスを亢進し、例えばグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素 (glyceraldehyde-3-phosphate

dehydrogenase : GAPDH) の活性低下を招き、細胞内グリセルアルデヒドの生成量を増加させ、結果的に細胞内外のAGE-2生成が促進されると考えられる。実際にGAPDH活性の低下は、アルツハイマー病、ハンチントン病等の神経変性疾患でも報告されている。従って、高血糖等によるグリセルアルデヒドの増加は、AGE-2形成の増大、GAPDHの活性低下によるアポトーシス誘導及び、さらなるグリセルアルデヒド形成の増大、といった悪循環を引き起こすということが予想される。細胞内外におけるAGE-2の生成ルートの概略を、図4に示す⁴³⁾。

最近、早瀬及びMonnierのグループにより、グリセルアルデヒド由来AGEsの構造が解明された^{44,45)}。いずれもピリジニウム骨格を有しており、また、堀内のグループが同定したグリコールアルデヒド由来AGEs構造⁴⁶⁾もピリジニウム骨格を有しており、これら3構造が非常に類似している点で、興味を持たれる。ただ、これらの構造が実際に生体内で上述のような直接作用を引き起こすのか、あるいはRAGEへの結合性を有するのか、また、AGE-2及びAGE-3特異抗体で特異的に認識されるのか等、まだ不明な部分も多く、更なる検討が必要である。



RAGE : receptor for AGEs (AGEsレセプター), ROS : reactive oxygen species (活性酸素種)

GAPDH : glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (グリセルアルデヒド 3-リン酸脱水素酵素)

図4 生体内AGE-2生成経路

8. TAGE (toxic AGEs) 病因説

我々のこれまでの研究結果を考え合わせると、生体内におけるAGEs生成反応は、蛋白質翻訳後修飾反応の一つとして非常に重要な生理的な意義を担っているものと考えられる。

本来、DNA上の遺伝情報に従って翻訳された蛋白質は、糖鎖付加などの修飾反応を経て、

生理作用を担う分子に成熟することが知られている。ところが、生体内においてAGEsの前駆物質であるアルデヒドやジカルボニル化合物の産生が増大した状態では、蛋白質がこれらの化合物と反応し、種々のAGEs構造が形成されるものと推察される。恐らく、CMLやピラリン等の生物作用を示さないnon-toxicなAGEs構造の形成は、反応性の高いアルデヒド等の化合物をトラップして生体防衛的に機能していると考えられ、一方、AGE-2、AGE-3及びAA-AGE等のtoxic AGEs構造（TAGE）は、種々の疾病の発症、進展に非常に密接に関与していることが示唆される（図5参照）。

上記のように、生体内に存在し、種々の慢性疾患の直接的な病因物質となっているAGEsを“TAGE（toxic AGEs）”と命名し、これらの疾患の発症、進展における“TAGE病因説”を提唱するに至っている⁴⁷⁾。

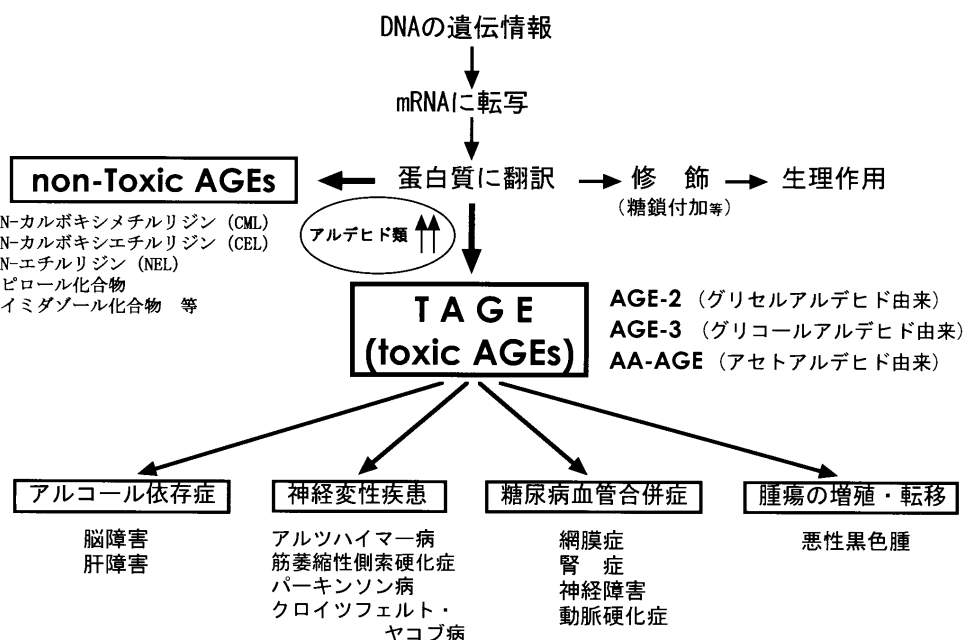


図5 各種慢性疾患の発症・進展におけるTAGE病因説

9. まとめ

動物モデルにおいては、AGEs形成阻害薬の投与やAGEsのレセプターへの結合阻害により上記慢性疾患の発症、進展が抑えられており、今後はTAGE特異的形成阻害薬の開発ならびに臨床現場での“TAGE病因説”の立証が心待ちにされる。

一方では、我々が日常口にしていくコーラ等の清涼飲料水、スポーツドリンク、乳酸菌飲料、ポテトチップス等の加熱食品中には、多量のAGEsが含まれていることが明らかとなってきた。まさしく我々の食生活習慣が自ら慢性疾患を引き起している可能性があり、今後は内因性（TAGE）だけでなく、外因性（飲食料品由来）AGEsの摂取にも十分に配慮した総合的な

研究の展開の必要性をここに提案する。

謝 辞

本研究は、久留米大学医学部第三内科・山岸昌一講師をはじめ、元久留米大学医学部・牧田善二教授、北海道大学医学部第二内科・小池隆夫教授、同眼科・大野重昭教授、同神経内科・菊地誠志助教授、同皮膚科・阿部理一郎助手、札幌医科大学神経精神医学・齋藤利和教授及び佐々木信幸助手、弘前大学医学部第一病理学・八木橋操六教授、東京女子医科大学糖尿病センター・内潟安子教授、金沢医科大学消化器内科・堤幹宏助教授、金沢大学医学部第二生化学・山本博教授、京都府立医科大学病態分子薬理学・矢部千尋教授、徳島大学医学部病態情報医学・土井俊夫教授らとの共同研究により遂行されたものであり、ここに深謝致します。

また、本学において共に研究を遂行してくれた生化学教室AGEグループの大学院生（鈴木貴子（2000年修了）、柳瀬由紀子（2002年修了）、渡井孝幸（2003年修了）、岩城実奈（2005年修了））、4年次実習生（丸山光子、鈴木貴子（1997年）、前嶋克幸、岩瀬光保、枝広茂樹（1998年）、門名明孝、杉江智則、柳瀬由紀子（1999年）、渡辺典子、庭木美帆、渡井孝幸（2000年）、小西泉、井上理恵（2001年）、市川優子、赤羽睦美、横山千代、岩城実奈（2002年）、伊藤真知子、池田しのぶ（2003年）、下垣内徳子、上嶋友洋、村山大育（2004年））及び研究をサポートして頂きました生化学教室の亀田幸彦主任教授、浅野直樹教授、千葉賢三助教授、大畠京子助手、山崎眞津美助手に感謝致します。

最後に、本研究の遂行にあたり、北陸大学特別研究助成（1999-2003年）をはじめ、文科省科研費（1999-2000年：基盤(B)展開、2000-2001年：基盤(B)一般、2001-2005年：私立大学ベンチャー研究開発拠点整備事業）、厚労省科研費（1999年）、長寿科学振興財団助成金（1999年）、米国小児糖尿病財団助成金（2000-2002年）、北陸産業活性化センター助成金（2001-2002年）及び企業からの研究奨学寄付金（三共(株)、山之内製薬(株)、日本ベーリンガーインゲルハイム(株)、中外製薬(株)、味の素(株) 医薬カンパニー、(株)三和化学研究所、大塚製薬(株)、(株)ニチレイ加工食品カンパニー、(株)ジェイ・エム・エス、(株)新薬開発研究所、(医)翠悠会）の補助を受けたことを記し、併せて感謝致します。

参考文献

- 1) Vlassara H, Bucala R, and Striker L. *Lab. Invest.* **70**, 138-151 (1994).
- 2) Sasaki N, Toki S, Choei H, Saito T, Nakano N, Hayashi Y, **Takeuchi M**, and Makita Z. *Brain Res.* **888**, 256-262 (2001).
- 3) Sasaki N, **Takeuchi M**, Choei H, Kikuchi S, Hayashi Y, Nakano N, Ikeda H, Yamagishi S, Kitamoto T, Saito T, and Makita Z. *Neurosci. Lett.* **326**, 117-120 (2002).
- 4) Kikuchi S, Shinpo K, Ogata A, Tsuji S, **Takeuchi M**, Makita Z, and Tashiro K. *Amyotroph. Lateral Scler. Other Motor Neuron Disord.* **3**, 63-68 (2002).
- 5) Abe R, Shimizu T, Sugawara H, Watanabe H, Nakamura H, Choei H, Sasaki N, Yamagishi S, **Takeuchi M**, and Shimizu H. *J. Invest. Dermatol.* **122**, 461-467 (2004).
- 6) The diabetes control and complications trial/epidemiology of diabetes interventions and complications research group. *N. Engl. J. Med.* **342**, 381-389 (2000).
- 7) Fu MX, Requena JR, Jenkins AJ, Lyons TJ, Baynes JW, and Thorpe SR. *J. Biol. Chem.* **271**, 9982-9986 (1996).
- 8) Glomb MA, and Monnier VM. *J. Biol. Chem.* **270**, 10017-10026 (1995).

- 9) Wells-Knecht KJ, Zyzak DV, Litchfield JE, Thorpe SR, and Baynes JW. *Biochemistry* **34**, 3702-3709 (1995).
- 10) Thornalley PJ, Langborg A, and Minhas HS. *Biochem. J.* **344**, 109-116 (1999).
- 11) **Takeuchi M**, Makita Z, Yanagisawa K, Kameda Y, and Koike T. *Mol. Med.* **5**, 393-405 (1999).
- 12) **Takeuchi M**, Makita Z, Bucala R, Suzuki T, Koike T, and Kameda Y. *Mol. Med.* **6**, 114-125 (2000).
- 13) **Takeuchi M**, Yanase Y, Matsuura N, Yamagishi S, Kameda Y, Bucala R, and Makita Z. *Mol. Med.* **7**, 783-791 (2001).
- 14) Yonekura H, Yamamoto Y, Sakurai S, Petrova RG, Abedin MJ, Li H, Yasui K, **Takeuchi M**, Makita Z, Takasawa S, Okamoto H, Watanabe T, and Yamamoto H. *Biochem. J.* **370**, 1097-1109 (2003).
- 15) Yamagishi S, Amano S, Inagaki Y, Okamoto T, Koga K, Sasaki N, Yamamoto H, **Takeuchi M**, and Makita Z. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **290**, 973-978 (2002).
- 16) Yamagishi S, Amano S, Inagaki Y, Okamoto T, **Takeuchi M**, and Makita Z. *Mol. Med.* **8**, 546-550 (2002).
- 17) Okamoto T, Yamagishi S, Inagaki Y, Amano S, **Takeuchi M**, Kikuchi S, Ohno S, and Yoshimura A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **297**, 419-424 (2002).
- 18) Okamoto T, Yamagishi S, Inagaki Y, Amano S, Koga K, Abe R, **Takeuchi M**, Ohno S, Yoshimura A, and Makita Z. *FASEB J.* **16**, 1928-1930 (2002).
- 19) Yamagishi S, Okamoto T, Amano S, Inagaki Y, Koga K, Choei H, Sasaki N, Kikuchi S, **Takeuchi M**, and Makita Z. *Mol. Med.* **8**, 179-184 (2002).
- 20) Yamagishi S, Amano S, Inagaki Y, Okamoto T, Inoue H, **Takeuchi M**, Choei H, Sasaki N, and Kikuchi S. *Drugs Exp. Clin. Res.* **29**, 75-80 (2003).
- 21) Yamagishi S, Inagaki Y, Amano S, Okamoto T, **Takeuchi M**, and Makita Z. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **296**, 877-882 (2002).
- 22) Inagaki Y, Yamagishi S, Okamoto T, **Takeuchi M**, and Amano S. *Diabetologia* **46**, 284-287 (2003).
- 23) Yamagishi S, Inagaki Y, Okamoto T, Amano S, Koga K, **Takeuchi M**, and Makita Z. *J. Biol. Chem.* **277**, 20309-20315 (2002).
- 24) Yamagishi S, Inagaki Y, Okamoto T, Amano S, Koga K, and **Takeuchi M**. *Kidney Int.* **63**, 464-473 (2003).
- 25) Ohashi S, Abe H, Takahashi T, Yamamoto Y, **Takeuchi M**, Arai H, Nagata K, Kita T, Okamoto H, Yamamoto Y, and Doi T. *J. Biol. Chem.* **279**, 19816-19823 (2004).
- 26) Fukami K, Ueda S, Yamagishi S, Kato S, Inagaki Y, **Takeuchi M**, Motomiya Y, Bucala R, Iida S, Tamaki K, Imaizumi T, Cooper ME, and Okuda S. *Kidney Int.* **66**, 2137-2147 (2004).
- 27) Sekido H, Suzuki T, Jomori T, **Takeuchi M**, Yabe-Nishimura C, and Yagihashi S. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **320**, 241-248 (2004).
- 28) Nakamura S, Makita Z, Ishikawa S, Yasumura K, Fujii W, Yanagisawa K, Kawata T, and Koike T. *Diabetes* **46**, 895-899 (1997).
- 29) Yamamoto Y, Kato I, Doi T, Yonekura H, Ohashi S, **Takeuchi M**, Watanabe T, Yamagishi S, Sakurai S, Takasawa S, Okamoto H, and Yamamoto H. *J. Clin. Invest.* **108**, 261-268 (2001).
- 30) Wada R, Nishizawa Y, Yagihashi N, **Takeuchi M**, Ishikawa Y, Yasumura K, Nakano M, and Yagihashi S. *Eur. J. Clin. Invest.* **31**, 513-520 (2001).
- 31) Yamagishi S, Koga K, Inagaki Y, Amano S, Okamoto T, and **Takeuchi M**. *Drugs Exp. Clin. Res.* **28**, 221-227 (2002).
- 32) Miyoshi H, Taguchi T, Sugiura M, **Takeuchi M**, Yanagisawa K, Watanabe Y, Miwa I, Makita Z, and Koike T. *Horm. Metab. Res.* **34**, 371-377 (2002).
- 33) Endo M, Yanagisawa K, Tuchida K, Okamoto T, Matsushita T, Higuchi M, Matsuda A, **Takeuchi M**, Makita Z, and Koike T. *Horm. Metab. Res.* **33**, 317-322 (2001).
- 34) Koga K, Yamagishi S, Okamoto T, Inagaki Y, Amano S, **Takeuchi M**, and Makita Z. *Int. J. Clin. Pharmacol. Res.* **22**, 23-27 (2002).
- 35) Miura J, Yamagishi S, Uchigata Y, **Takeuchi M**, Yamamoto H, Makita Z, and Iwamoto Y. *J. Diabetes Complicat.* **17**, 16-21 (2003).
- 36) Miura J, Uchigata Y, Yamamoto Y, **Takeuchi M**, Sakurai S, Watanabe T, Yonekura H, Yamagishi S, Makita Z, Sato A, Omori Y, Yamamoto H, and Iwamoto Y. *J. Diabetes Complicat.* **18**, 53-59 (2004).
- 37) **Takeuchi M**, Bucala R, Suzuki T, Ohkubo T, Yamazaki M, Koike T, Kameda Y, and Makita Z. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **59**, 1094-1105 (2000).
- 38) Choei H, Sasaki N, **Takeuchi M**, Yoshida T, Ukai W, Yamagishi S, Kikuchi S, and Saito T. *Acta Neuropathol.* **108**, 189-193 (2004).
- 39) Abe R, Shimizu T, Yamagishi S, Shibaki A, Amano S, Inagaki Y, Watanabe H, Nakamura H, **Takeuchi M**, Imaizumi T, and Shimizu H. *Am. J. Pathol.* **164**, 1225-1232 (2004).

- 40) **Takeuchi M.** Watai T, Sasaki N, Choei H, Iwaki M, Ashizawa T, Inagaki Y, Yamagishi S, Kikuchi S, Riederer P, Saito T, Bucala R, and Kameda Y. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **62**, 486-496 (2003).
- 41) Nagai K, Tsutsumi M, Fukumura A, Tsuchishima M, Takase S, Yamagishi S, and **Takeuchi M.** *Alcohol Biomed. Res.* **23**, 87-91 (2003).
- 42) **Takeuchi M.** and Saito T. *Alcohol Biomed. Res.* **24**, 31-36 (2004).
- 43) **Takeuchi M.** and Yamagishi S. *Med. Hypotheses* **63**, 453-455 (2004).
- 44) Usui T, and Hayase F. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **67**, 930-932 (2003).
- 45) Tessier FJ, Monnier VM, Sayre LM, and Kornfield JA. *Biochem. J.* **369**, 705-719 (2003).
- 46) Nagai R, Hayashi CM, Xia L, Takeya M, and Horiuchi S. *J. Biol. Chem.* **277**, 48905-48912 (2002).
- 47) **Takeuchi M.** and Yamagishi S. *Med. Hypotheses* **63**, 449-452 (2004).

AGEs関連の総説及び著書

- 1) Yamagishi S, Nakamura K, **Takeuchi M.** and Imaizumi T. Molecular mechanism for accelerated atherosclerosis in diabetes and its potential therapeutic intervention. *Int. J. Clin. Pharmacol. Res.* *in press* (2004).
- 2) **Takeuchi M.** Yamagishi S, Iwaki M, Inagaki Y, Nakamura K, and Imaizumi T. Advanced glycation end product (AGE) inhibitors and their therapeutic implications in disease. *Int. J. Clin. Pharmacol. Res.* *in press* (2004).
- 3) Yamagishi S, Inagaki Y, Nakamura K, **Takeuchi M.** and Imaizumi T. Pericytes and angiogenesis. *Progress in angiogenesis research, Nova Science Publishers, NY.* *in press* (2004).
- 4) **Takeuchi M.** Kikuchi S, Sasaki N, Suzuki T, Watai T, Iwaki M, Bucala R, and Yamagishi S. Involvement of advanced glycation end-products (AGEs) in Alzheimer's disease. *Curr. Alzheimer Res.* **1**, 39-46 (2004).
- 5) Yamagishi S, **Takeuchi M.** Inagaki Y, Nakamura K, and Imaizumi T. Role of advanced glycation end products (AGEs) and their receptor (RAGE) in the pathogenesis of diabetic microangiopathy. *Int. J. Clin. Pharmacol. Res.* **23**, 129-134 (2003).
- 6) Kikuchi S, Shinpo K, **Takeuchi M.** Yamagishi S, Makita Z, Sasaki N, and Tashiro K. Glycation – a sweet tempter for neuronal death. *Brain Res. Brain Res. Rev.* **41**, 306-323 (2003).
- 7) **Takeuchi M.** and Makita Z. Alternative routes for the formation of immunochemically distinct advanced glycation end-products *in vivo.* *Curr. Mol. Med.* **1**, 305-315 (2001).
- 8) Yamagishi S, **Takeuchi M.** and Makita Z. Advanced glycation end products and the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Contrib. Nephrol.* **134**, 30-35 (2001).
- 9) **竹内正義**, 岩城実奈, 山岸昌一. 基礎編：第I章 化学・生化学・薬理学, 10. AGEs. *酸化ストレスナビゲーター* (メディカルレビュー社) **印刷中** (2004).
- 10) **竹内正義**, 山岸昌一. 臨床編：第II章 検査法, 6. カルボキシメチルリジン. *酸化ストレスナビゲーター* (メディカルレビュー社) **印刷中** (2004).
- 11) 山岸昌一, **竹内正義**, 今泉勉. 臨床編：第IV章 薬剤・治療, 17. AGEs阻害薬. *酸化ストレスナビゲーター* (メディカルレビュー社) **印刷中** (2004).
- 12) **竹内正義**, 岩城実奈. AGEsの基礎：2. 生体内AGEsの生成過程. AGEs研究の最前線～糖化蛋白関連疾患研究の現状～ (メディカルレビュー社) 27-36 (2004).
- 13) **竹内正義**, 岩城実奈, 亀田幸彦, 山岸昌一, 平井麻美, 山本敬史, 狩野智一, 名本真二. CAPD液中GDPs等に由来するAGEsの生成経路の総括と生物作用. 腎と透析 別冊「腹膜透析2004」 **57**, 546-549 (2004).
- 14) **竹内正義**, 山岸昌一, 山本博. 高血糖とAGE：新しい治療戦略. *BIO Clinica* **18**, 47-51 (2003).
- 15) **竹内正義**, 山岸昌一, 牧田善二. 新時代の糖尿病学 (3) AGE阻害薬 OPB-9195. *日本臨床増刊号* **60**, 606-610 (2002).
- 16) 渡辺琢夫, 山本靖彦, 櫻井繁, **竹内正義**, 米倉秀人, 山本博. 糖尿病と酸化ストレス-高血糖による細胞内酸化ストレス増強機序：終末糖化産物-. *Diabetes Frontier* **13**, 164-168 (2002).
- 17) 柳瀬由紀子, **竹内正義**. 生体内AGE産生過程と神経細胞毒性. *Medical Technology* **29**, 1166-1167 (2001).
- 18) 山岸昌一, **竹内正義**, 牧田善二. 糖尿病腎症の発症機構とその治療. *内科* **87**, 1597-1600 (2001).

AGEs関連の特許

- 1) **竹内正義**, 清水晋治, 黒田俊彦, 井田伸夫. 低分子アルデヒド由来前進性反応産物.
特願2002-266441 (特許出願人: 東レ株式会社)
- 2) **竹内正義**. フルクトース由来AGEに対する抗体及びその用途.
特願2004-112713 (特許出願人: 株式会社三和化学研究所)
- 3) 北原吉朗, 三浦恭子, **竹内正義**. 血糖制御状態の検査方法.
特願2004-047020 (特許出願人: 味の素株式会社)
- 4) 北原吉朗, **竹内正義**. オリゴペプチドを用いた糖尿病合併症の予防・治療剤.
特願2004-091764 (特許出願人: 味の素株式会社)