

学 位 論 文 題 名

糖尿病患者赤血球の蛋白質における  
advanced glycation end products の免疫学的測定

学位論文内容の要旨

近年, 糖尿病患者赤血球における合併症の成因の一つに種々の蛋白と糖との非酵素的糖化(glycation) が関与しているといわれている。Glycation にはその反応過程に初期段階と, 後期段階の二つがあり, 後期段階になると蛋白は褐色化し, 分子間で架橋を形成し, 重合化する。糖尿病の合併症に関しては, この後期段階が重要であり, この時生じる物質は advanced glycation end products (AGE) と呼ばれている。また, 糖尿病患者では赤血球の変形能の低下や赤血球の流動性の低下などの異常が報告されている。赤血球膜にある構造蛋白に AGE が生じれば, 赤血球機能などになんらかの影響を与えることが予想される。

著者は, モルモットで作製した, AGE を特異的に認識する抗 AGE 抗体を用いて, 比較的半減期の短い赤血球周辺膜蛋白質 (以下 EPMP) における AGE を ELISA で測定し, 糖尿病, 患者と正常者での AGE 量を比較検討した。

方 法

1. EPMP の分離と調製

EPMP の分離は, Home らの方法で行った。まず, EDTA 採血の全血を等張のリン酸緩衝溶液 (pH7.5) で十分に洗浄・遠心を繰り返し血漿を除いた。次いで, 低調な 5 mM リン酸緩衝溶液 (pH8.0) を加え溶血させた後, 4℃で20,000 g, 30分間遠心し赤血球膜を分離した。混在するヘモグロビンを除くため赤血球膜成分が白色になるまで洗浄操作を繰り返し赤血球膜標品を得た。

EPMP は赤血球膜標品に0.1N NaOH を加え混和後, 4℃で20,000 g, 30分間遠心し分離した。遠心後, 上清に含まれる EPMP を最終濃度 6 %のトリクロル酢酸 (TCA) を加え濃縮し, 再度0.1N NaOH を加え可溶化し, 0.2M borate buffer で pH を調整後, AGE 測定のための検体とした。血清蛋白の検体の調製は TCA 処理後の手順に準じて行った。

## 2. EPMP の AGE の測定

AGE の測定は中山らの方法に従って ELISA を用いた競合阻害により行った。すなわち、あらかじめ作製しておいた AGE 化した BSA (AGE-BSA) 25ng を、マイクロブレード上に一晚 4℃ で固相化した。各 well を Phosphate buffered saline (PBS) で洗浄後、室温で 1 時間、2 % の家兎血清加 PBS でブロッキングを行った。洗浄後、測定検体、次いでモルモットで作製した抗 AGE 抗体を加え 37℃ で 2 時間反応させた。再度洗浄後、二次抗体としてペルオキシダーゼ結合抗モルモット IgG を加え、37℃ で 1 時間反応させた。その後、発色試薬の OPD を加え 20 分間反応させた。1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> を加え反応を停止し、492nm で吸光度を測定した。

AGE の測定単位は、本測定系で 50 % 結合障害がみられた検体の蛋白量を 1 単位 (arbitrary unit : AU) とし、1 mg 蛋白量当たりで表した。

## 3. Spectrin の精製

Spectrin は Home らの方法に従い分離した。すなわち、赤血球膜標品を 0.1mM EDTA (pH9.5) の溶液で透析後、25,000 g で 1 時間遠心し、上清を回収した。その上清を Sepharose CL-4 B カラム (1.0×90cm) に添加し、流速 4 ml/hr で分画し Spectrin を分離した。

## 4. SDS-PAGE

EPMP の検体もしくは Spectrin のゲル濾過の最大ピーク分画の検体を用いて、8 % polyacrylamide gel で電気泳動を行った。

## 5. Western blotting

SDS-PAGE 終了後、32V の定電圧で 2 時間 polyacrylamide gel よりニトロセルロース膜へ転写を行った。転写終了後、膜を 3 % BSA-PBS で一晚 4℃ でブロッキングを行った。その後、膜に一次抗体としてモノクロナールマウス抗ヒト Spectrin 抗体を加え室温で 30 分間反応させた。次いで、0.05 % Tween20-PBS で洗浄後、二次抗体としてペルオキシダーゼ結合ウサギ抗マウス IgG を加え室温で 30 分間反応させた。最後にジアミノベンチジン 4 塩酸の発色試薬を用いて約 5 分間発色させ流水で洗浄し反応を止めた。

検定は nonparametric test の Mann-Whitney U test と Spearman rank correlation を用いた。

## 結 果

臨床データ： 今回対象とした症例の臨床データでは、空腹時血糖値 (FBS)、血清フルクトサミン値 (FRA)、HbA<sub>1c</sub> の値はいずれも以下の値のように、糖尿病患者群で有意 ( $p < 0.001$ )

に高値を示した。

|              | Control (n=19) | DM (n=48)  |
|--------------|----------------|------------|
| FBS (mg/dl)  | 86.3±9.4       | 150.7±61.9 |
| FRA (μmol/l) | 273.1±15.9     | 284.8±87.6 |
| HbA1c (%)    | 5.0±0.3        | 8.4±2.2    |

EPMP の AGE の測定：固相化 AGE-BSA と抗 AGE 抗体の結合は AGE-BSA，正常者及び糖尿病患者の EPMP で阻害され，各々の結合阻害曲線はほぼ平行関係を示した。従って，本抗体はこれらの蛋白に含まれる共通した AGE 構造体を認識していることが示唆された。EPMP の AGE 量は正常者で22.5±7.7AU (Mean±S. D.)，糖尿病患者の AGE 量は70.7±51.8AU で，両群間で有意差 (p<0.001) がみられた。

EPMP の AGE 量と HbA<sub>1c</sub> 値との相関：EPMP の AGE 量と HbA<sub>1c</sub> 値間には Spearman の順位相関係数で0.799と有意 (p<0.001) の相関関係が認められた。

SDS-PAGE とゲル濾過：この EPMP 検体での SDS-PAGE では，主要な蛋白のバンドは二本，分子量として221kDa と242kDa に泳動された。

Western blotting：EPMP の検体と SepharoseCL-4 B カラムのピーク分画の検体で Western blotting を行ったところ，いずれの検体でもモノクロナールマウス抗ヒト Spectrin 抗体と反応する Spectrin の β鎖のバンドが確認された。

SDS-PAGE，ゲル濾過，Western blotting の結果から，今回 AGE を測定した EPMP の主要な蛋白は Spectrin であると考えられた。

糖尿病患者と正常者での Spectrin 分画の AGE 量の比較：精製 Spectrin を得るために，Sepharose CL-4 B カラムを用いてゲル濾過を行った。この分画毎に ELISA を行ったところ，糖尿病患者では最大ピークに一致して AGE 量の増加がみられた。糖尿病患者と正常者の最大ピークにおける同一蛋白量での AGE 量を比較すると，この実験に用いた糖尿病患者での検体は正常者の検体より1.8倍 AGE が増量していた。このことから，糖尿病患者の Spectrin にはより多くの AGE が存在することが示された。

以上の結果から，今回多数症例の AGE 測定に用いた EPMP の検体の主要な蛋白質は Spectrin であり，糖尿病患者での EPMP の AGE の増量には，Spectrin における AGE の生成が関与していることが示された。

## 考 察

赤血球の膜蛋白質には、Spectrin に代表される膜の裏打ち蛋白質（すなわち EPMP）が複雑にネットワークを組んでいる。これにより赤血球特有の変形能に富む性質が生み出されている。このネットワークを形成する蛋白質の中心は Spectrin であり、それに構造的な変化をもたらす要因が加わると変形能は著しく阻害される。これまで糖尿病患者の赤血球異常に関して、膜骨格蛋白の AGE 量を測定した報告はなく、今回、糖尿病患者と正常者の Spectrin を中心とした EPMP における AGE の測定し、検討を行った。

今回、AGE と特異的に反応する抗体を用いた測定系で、糖尿病患者と正常者で EPMP の AGE 量を比較したところ、AGE 量は糖尿病患者で有意に高値を示した。このことから、比較的短い寿命の赤血球においてもその膜蛋白質に AGE が生じることが示された。さらに、糖尿病患者で有意に AGE 量が増えていたことから、先に述べた赤血球機能異常に AGE が関与している可能性が示唆された。

EPMP の検体で SDS-PAGE を行ったら、純粋な Spectrin やゲル濾過で分離した Spectrin と同様に  $\alpha$  鎖と  $\beta$  鎖の二本のバンドが確認された。糖尿病患者と正常者でこれらの蛋白質の移動度に差異はみられなかった。Western blotting で Spectrin に対するモノクローナル抗体で検出されたことから、今回の測定検体中に Spectrin が存在することが確認できた。さらに Sepharose CL-4B カラムにより精製した Spectrin における AGE を測定したところ、糖尿病患者では最大ピークに一致して AGE 量の増加がみられた。これらの結果から AGE が Spectrin に生じることにより、赤血球異常の原因の一つになりうることを示唆された。

## 結 論

- 1) EPMP における AGE の免疫学的測定法を開発した。
- 2) EPMP（なかでも Spectrin）には AGE が存在することを始めて明らかにした。
- 3) 糖尿病患者の EPMP の AGE 量は正常者のそれと比較して有意に増量していた。
- 4) EPMP の AGE 量と HbA<sub>1c</sub> 値間には、Spearman の順位相関係数で 0.779 と有意な相関関係が認められた。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 池 隆 夫  
副 査 教 授 石 橋 輝 雄  
副 査 教 授 牧 田 章

近年、糖尿病患者における合併症の成因の一つに種々の蛋白と糖との非酵素的糖化、いわゆる glycation が関与しているといわれている。glycation には、蛋白の遊離アミノ基に糖が結合し Schiff 塩基を形成し、それが Amadori 化合物に変化していく初期段階と、これ以降の後期段階の二つがある。後期段階になると蛋白は褐色化し、蛍光を発し、分子間で架橋を形成し、重合化、不溶化する。糖尿病の合併症に関しては、この後期段階が特に重要で、この後期反応段階で生じてくる物質は advanced glycation end products (AGE) と呼ばれている。AGE の構造は未だ明らかになってはいないが、生体内ではコラーゲンやレンズクリスタリンなど半減期が長い蛋白に存在すると言われている。これまで糖尿病に特有な合併症のうちで AGE が関与していると考えられているものには、レンズクリスタリンの AGE 化で生じる白内障、腎の基底膜における AGE 化で生じる腎症、ミエリンの AGE 化による神経障害などがある。

糖尿病の合併症の指標として AGE 量を測定することは非常に重要なことであるが、人において腎の基底膜や、レンズクリスタリン、あるいはミエリン等を取り出してそれらの AGE 量を測定することは困難である。そこで、糖尿病患者の赤血球膜蛋白に注目してみた。赤血球の膜蛋白質は複雑にネットワークを組み、赤血球特有の変形能に富む性質を生み出している。このネットワークを形成する蛋白質のうち中心的な存在はスペクトリンであり、それに構造的な変化をもたらす要因が加わると変形能は著しく阻害されることが予想される。患者に認められる赤血球機能異常には、赤血球の変形能の低下や赤血球膜の流動性の低下、赤血球の血管内皮への粘着性の増加などが報告されている。しかし、現在まで糖尿病患者と正常者でこれらの蛋白で AGE を測定し比較した報告はない。

赤血球膜構造蛋白の AGE 化は、赤血球機能低下につながることを予想される。そこで本研究では、主要赤血球膜構造蛋白の AGE 量を正常者と糖尿病患者で測定し、比較検討した。

赤血球膜の分離は、EDTA 採血で赤血球を採取し、遠沈操作で血漿成分を除去し、低張溶液で溶血させ、洗浄操作を繰り返し、赤血球膜標品を得た。

赤血球主要膜蛋白のスペクトリンは、上記操作で得た赤血球膜標品を EDTA 溶液で透析後、

遠沈し、上清を回収し Sepharose CL-4 B カラムで分離精製した。

抗 AGE 抗体は、モルモットに AGE 化したヘモシアニンを免疫して作製した。この抗 AGE 抗体は種々の AGE 化蛋白に特異的に反応し、しかも、glycation の初期段階反応物とは反応しない。この抗体を用いて、固相酵素抗体法により、赤血球膜蛋白の AGE 量を測定した。

AGE 量の測定は、競合阻害法を用いた固相酵素抗体法によった。すなわち、まず、PBS で溶解した AGE 化した BSA を最初に固相化する。ブロッキングの後、測定検体と希釈した抗 AGE 抗体を混和し、固相化した AGE 化した BSA に反応させる。次いで、ペルオキシダーゼで標識した二次抗体を加え、反応終了後、基質である OPD を加え、吸光度を測定する。

AGE の測定単位は、本測定系で 50% 結合阻害がみられたサンプルの蛋白量を 1 単位 (arbitrary unit : AU) とし、1 mg 蛋白量当たりで表した。

糖尿病患者と正常者の赤血球膜蛋白の AGE 量は、48 例の糖尿病患者では平均 70.7 AU で、年齢、性を一致させた正常者の平均 22.5 AU に比べて、有意に増加していた。

AGE 化された主要赤血球膜蛋白の解析を行う目的で SDS-PAGE を行った。主要な蛋白のバンドは分子量 221kDa と 242kDa に二本泳動された。しかし、糖尿病患者と正常者で主要な蛋白の移動度に差異はなかった。

SDS-PAGE で認められた主要赤血球膜蛋白を同定するために、Western blotting を行った。その結果、分子量 221kDa のバンドにはスペクトリンの  $\beta$  鎖に特異的な抗体が反応した。スペクトリンの  $\alpha$  鎖に特異的な抗体は入手不可能なために断定はできないが、SDS-PAGE の結果と合わせて、今回 AGE を測定した赤血球膜蛋白の主要な蛋白はスペクトリンであると考えられた。

スペクトリンを精製するために、Sepharose CL-4 B カラムを用いた赤血球膜標品のゲル濾過を行った。その結果、四量体を形成するスペクトリン蛋白が得られた。

次に、この精製スペクトリンを用いて、糖尿病患者と正常者でスペクトリンの AGE 量を比較検討した。スペクトリン 1  $\mu$ g 当たりの AGE 量は、糖尿病患者では正常者より 1.8 倍 AGE が増量していた。このことから、糖尿病患者のスペクトリンには、より多くの AGE が存在することが示された。

以上の実験から、糖尿病患者の赤血球膜蛋白 (スペクトリン) の AGE 量は有意に増加しており、糖尿病患者に認められる赤血球膜機能低下の原因の一つになっていると結論した。

試問に際し牧田教授より抗 AGE 抗体の特異性、抗体と他の組織 (レンズクリスタリンやコラーゲン) との反応性、AGE と年齢、HbA<sub>1c</sub> との関係について、石橋教授より AGE の構造、SDS-PAGE での蛋白の染色法、スペクトリンの精製法について質問があったが、申請者は概

ね適切な答弁をした。また副査の牧田教授, 石橋教授による本研究に関しての審査と面接を受け, 合格と判定された。

以上により, 本論文は学位授与に値するものと判定した。