

学位論文題名

Immunochemical Detection of Advanced
Glycation End Products in Renal Cortex
From STZ-induced Diabetic Rat

(ストレプトゾトシン糖尿病ラット腎皮質における
非酵素的糖化反応後期段階生成物の免疫学的測定)

学位論文内容の要旨

糖尿病の治療目標は、糖尿病に起因する慢性血管合併症の発症を阻止することにある。最近、生体蛋白質に生成される非酵素的糖化反応の後期段階生成物Advanced Glycation End Products (以下AGE) が糖尿病性慢性血管合併症の原因として有力視されている。非酵素的糖化反応 (Glycation) はアミノ酸、ペプチド、蛋白質などのアミノ基が求核試薬として還元糖のカルボニル基と反応して Schiff 塩基を形成し、さらにアマドリ転位生成物となる初期段階と、長期間複雑な反応過程を経て褐色、蛍光、分子架橋形成を特徴とする後期段階生成物 (AGE) に至る後期段階から成る。現在、血糖コントロールの指標として臨床的に繁用されているHbA_{1c}は、ヘモグロビンのアマドリ転位生成物である。AGEはコラーゲン、水晶体、ミエリンなど代謝半減期の長い蛋白に存在するといわれているが、形成過程の反応が複雑であり構造的に多様であること、大部分のAGEは酸水解に不安定であることなどから、生体内主要AGEの構造は未だに解明されていない。

しかし、蛋白に結合したAGEはin vitroで容易に作製することができる。そこで申請者らは、AGEをモルモットに免疫して抗AGE抗体を作製し、AGEの免疫学的測定法を開発した。それを用いて糖尿病動物の腎皮質、大動脈より抽出した組織コラーゲンに存在するAGEを測定し、糖尿病性合併症とAGEとの関係を検討した。

【方法】 1) 抗AGE抗体の作製 免疫源としてのAGEは、keyhole limpet hemocyanin (KLH) 100mgとglucose 3gを0.4M磷酸緩衝液(pH 7.5) 5mlに溶解し37℃で12週間反応させPBSで透析することにより作製した。AGE-KLH 100μgを雄モルモットに免疫して抗血清を得た。本抗体の特異性は以下の通りである。①非酵素的糖化反応の前期段階反応物は認識しない。②AGE化した蛋白の酸水解物は認識しない。③FFIやpyrraline等これまでにAGEの構造体として提唱された物質は認識しない。④異なる蛋白で作製した蛋白結合AGEのみならず、リジン誘導体で作製したAGE標品も認識する。⑤AGEの褐色成分より蛍光成分を認識する。⑥蛋白間の架橋に寄与するAGEを主に認識する。

2) AGE-蛋白の作製 0.4M磷酸緩衝液 (pH 7.5) 1ml当たりglucose 300mgと牛アルブミン (BSA) 200mg、glucose 600mgとIV型collagen 4mgを37℃で4週間反応させた後PBSおよび脱イオン水で透析し凍結乾燥した。

3) ストレプトゾトシン(STZ)糖尿病ラット組織コラーゲンの調製 STZ65mg/kg静注後5週ならびに20週のWister系ラットの腎皮質、大動脈を用いた。両組織は、洗浄、細切、脱脂した後37℃で24時間コラゲナーゼ消化処理を行い、その遠沈上清に0.2N NaOHを同量加え4℃で12時間処理しコラーゲン試料とした。同週齢対照ラット組織ならびにin vitroで作製したAGE-コラーゲンも同様にコラゲナーゼ処理した。コラーゲン量は、Stegemann&Stalderの方法に準じてhydroxyprolineを定量し、hydroxyprolineがコラーゲンの

12.5%を構成することをもとに算出した。

4) AGE-コラーゲンの免疫学的測定法 AGE-BSAを固相化した競合ELISA法によった。AGE量は本測定系で固相化AGE-BSAと抗体との結合を50%阻害する蛋白（またはコラーゲン）量を1単位とし、1mg蛋白（またはコラーゲン）量当たりのarbitrary units (AU)で表現した。例えば、standard AGE-BSA（上記2)のごとく作製）が固相化AGE-BSAと抗体との結合を50%阻害する蛋白量が25 ngとすると、AUは40,000と算出される。

5) AGE-コラーゲンの蛍光測定 励起波長370nm、蛍光波長440nmでコラゲナーゼ処理試料を測定した。

【結果】1) 固相化AGE-BSAと抗AGE抗体との結合は、AGE-BSA、AGE-コラーゲン、コラゲナーゼ処理AGEコラーゲン、糖尿病ラットの組織コラーゲンで阻害された。

2) 本測定系の日内変動係数は3.2-7.8%、日差変動係数は7.3-8.8%であった。

3) 免疫学的測定法による糖尿病ラットの大動脈コラーゲンのAGE量は、STZ静注後5週では、対照ラットと比較して3.2倍 (52.3 ± 4.9 vs 14.2 ± 1.0 AU, $p < 0.01$)、STZ静注後20週では、対照ラットと比較して7倍 (98.5 ± 6.1 vs 14.0 ± 1.0 AU, $p < 0.01$) であった。一方、従来の蛍光測定法では、STZ静注後5週では対照群と有意差はなく、STZ静注後20週でも対照群と比較して1.5倍弱の上昇であった。免疫学的測定法による糖尿病ラット腎皮質コラーゲンのAGEは、STZ静注後5週では、対照ラットと比較して16倍 (1044.4 ± 151.8 vs 64.3 ± 5.7 AU, $p < 0.01$)、STZ静注後20週では、対照ラットと比較して45倍 (3841.0 ± 1077.3 vs 83.3 ± 12.8 AU, $p < 0.01$) であった。一方、蛍光測定法では、STZ静注後5週で対照群に比較して1.2倍弱の上昇、STZ静注後20週でも1.5倍弱の上昇であった。また、免疫学的に測定した糖尿病ラット腎皮質コラーゲンのAGE量は、大動脈コラーゲンと比較して、STZ静注後5週では20倍、STZ静注後20週では39倍存在した。

【考案】生体内AGEを測定する手段として、これまで多量に蛍光性 (Ex 370nm, Em 440nm) を利用した測定法が主として用いられてきた。この蛍光性を利用した測定法によって皮膚コラーゲンや水晶体クリスタリンのAGEを測定した報告では、AGEは加齢とともに増加し、糖尿病患者では健常者に比べて高く、糖尿病性合併症や白内障の発症と相関性があると言われている。しかし、蛍光性を利用した測定法ではAGE関連の蛍光のみならず、AGEに類似した蛍光波長を有する、脂質や糖質由来の酸化産物の蛍光をも測定している可能性が指摘されており、AGEを特異的に測定する方法としては問題がある。また、蛍光測定法ではAGEと糖尿病性合併症との関係を十分説明しうる程、糖尿病動物と対照動物におけるAGE量の差を表現していない可能性がある。それに対して申請者らが開発した免疫学的測定法を用いた検討では、糖尿病動物と対照動物との間に顕著なAGE量の差を認め、AGEと糖尿病性腎症との因果関係を示唆しうると考えた。

本研究は、糖尿病動物の大動脈や腎皮質コラーゲンに多量のAGEが蓄積し、特に腎皮質で顕著であることを、AGEの免疫学的測定法によって初めて示したものである。その後、本測定系を用いて検討したSTZ静注後16週の糖尿病ラット腎皮質コラーゲンのAGE量は、尿蛋白量と有意な相関関係を認めるという予備的な研究結果も得ており、糖尿病性合併症の病因論を考える上で示唆に富む結果と考えられる。AGEと糖尿病性合併症との因果関係の解明にはさらに詳しい研究を必要とすると思われるが、この抗AGE抗体を用いたAGEの免疫学的測定法は、その研究に極めて有用な手段であると考ええる。

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 寺 沢 浩 一

学 位 論 文 題 名

Immunochemical Detection of Advanced Glycation End Products in Renal Cortex From STZ-induced Diabetic Rat

(ストレプトゾトシン糖尿病ラット腎皮質における
非酵素的糖化反応後期段階生成物の免疫学的測定)

最近、生体蛋白質に生成される非酵素的糖化反応 (Glycation) の後期段階生成物 Advanced Glycation End Products (AGE) が糖尿病性慢性血管合併症の原因として注目されている。Glycationは、アミノ酸、ペプチド、蛋白質などのアミノ基が求核試薬として還元糖のカルボニル基と反応してシッフ塩基を形成し、さらにアマドリ転位生成物となる前期段階と、長時間複雑な反応経路を経て、褐色、蛍光、分子間架橋を特徴とするAGEに至る後期段階から成る。AGEはコラーゲン、水晶体、ミエリンなど代謝半減期の長い蛋白に存在するとされるが、形成過程の反応が複雑であり構造的に多様であること、大部分のAGEは酸水解に不安定であることなどから、生体内主要AGEの構造は未だに解明されていない。腎の基底膜や血管の構造蛋白質であるコラーゲンは、AGEにより分子内、分子間の架橋を形成し、コラーゲンの弾性力の低下や、酸などによる消化性の減弱の原因になると考えられている。さらに、それが糖尿病性血管合併症としての血管透過性の亢進や血管壁の硬化、脆弱性の原因になると推測されている。

そこで本研究では、糖尿病性合併症とAGEとの関係を検討するために、抗AGE抗体を用いたAGEの免疫学的測定法を開発し、糖尿病動物の腎皮質、大動脈より抽出した組織コラーゲンに存在するAGE量を測定した。また、従来の蛍光測定法 (EX.370nm, EM.440nm) によるAGEの測定と比較した。

抗AGE抗体はモルモットにAGE化したKLHを免疫して作製した。本抗体はGlycationの前期段階反応物やAGE化した蛋白の酸水解物は認識しない。また、異なる蛋白質で作製した蛋白結合AGEのみならず、リジン誘導体で作製したAGE標品も認識する。さらに、AGEの褐色成分より蛍光成分を認識し、蛋白質間の架橋に寄与するAGEを主に認識する。

糖尿病ラットは、Wister系ラットにストレプトゾトシン (STZ) 65mg / kgを静注して作製し、5週後ならびに20週後に諸臓器を摘出した。各組織はPBSで洗浄後細切し、脱脂したものをメタノール、脱イオン水、塩化カルシウム-Trisバッファーで洗浄後コラーゲナーゼ消化を行った。その上清をコラーゲン試料とし蛍光測定ならびにELISAに使用した。ELISAに使用する試料は、コラーゲンに形成された分子内や分子間のAGEを露出するために、0.2M NaOHで処理しその上清をフィルターを通してpHを調整したものをを用いた。

免疫学的なAGEの測定は、AGE-BSAを固相化した競合ELISA法で行った。まず、AGE-BSAを固相化し、正常ウサギ血清でブロッキングした後、測定検体と抗AGE抗体を添加し37℃で2時間反応させる。次いでペルオキシダーゼで標識したウサギ抗モルモットIgGを加え37℃で1時間反応させた後、基質であるOPDを加え吸光度を測定する。AGE量は固相化AGE-BSAと抗体との結合を50%阻害する蛋白 (コラーゲン) 量を1単位とし、1mg蛋白 (コラーゲン) 量当たりのarbitrary units(AU)で表現した。

免疫学的に測定したSTZ糖尿病ラットの大動脈コラーゲンのAGE量は、対照ラットと比較して、STZ 静注後5週では3.2倍、STZ静注後20週では7倍の有意な増加が認められたが、従来の蛍光測定法ではSTZ静注

後5週では対照群と有意差はなく、STZ静注後20週でも対照群と比較して1.5倍弱の上昇であった。免疫学的に測定したSTZ糖尿病ラットの腎皮質コラーゲンのAGE量は、対照ラットと比較して、STZ静注後5週では16倍、STZ静注後20週では45倍の有意な増加が認められたが、従来の蛍光測定法では、対照群と比較して、STZ静注後5週では1.2倍弱、STZ静注後20週でも1.5倍弱の上昇であった。免疫学的に測定した糖尿病ラットの腎皮質コラーゲンに含まれるAGE量は、大動脈と比較して、STZ静注後5週では20倍、STZ20週では39倍多量に存在した。また、免疫学的に測定したSTZ静注後5週の糖尿病ラットの眼球被膜、肺、心筋、脾臓、骨格筋のコラーゲンに存在するAGE量は、対照ラットと比較して、眼球被膜では2.7倍、肺では3.4倍、心筋では2.6倍、脾臓では1.9倍の有意な増量が認められたが、骨格筋では有意差がなかった。糖尿病群の腎皮質で認められた対照群との16倍という顕著な差は、今回検討したいずれの臓器においても認められなかった。

以上、抗AGE抗体を用いたAGEの免疫学的測定により、STZ糖尿病ラット腎皮質コラーゲンには多量のAGEが存在することを証明した。実際に、剖検で得られた糖尿病性腎症を有するヒト腎皮質コラーゲンのAGE量を免疫学的に測定した結果、非糖尿病群と比較して3.8倍と有意に増加していた。本測定法はヒト組織コラーゲンに存在するAGEの測定においても非常に有用な手段であると考えられた。

以上の結果より、糖尿病性合併症、特に腎症とAGEは密接に関係していることが示唆されると結論した。

試問に際し、石橋輝雄教授より、免疫学的測定法と蛍光測定法によるAGE量の解離の原因、本抗体の特異性、コラーゲンに形成されたAGEの架橋の構造について、寺沢浩一教授より抗体の免疫源の作製と反応、本測定系の干渉物質について、長嶋和郎教授より本抗体の免疫組織染色への応用、網膜と神経の細小血管のAGEについて質問があり、申請者は概ね適切な答弁をした。また、副査の石橋教授、寺沢教授による本研究につい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。