

学 位 論 文 題 名

糖尿病性腎症と尿中低分子 AGE (終末糖化産物,
Advanced Glycation Endproduct) との関連について

学位論文内容の要旨

現在、糖尿病慢性合併症の発症や進展の原因として最も有力な説のうちの一つに、蛋白糖化反応を基とした advanced glycation endproduct (AGE) 説がある。AGE は還元糖とアミノ酸の非酵素的蛋白糖化反応(グリケーション)における最終産物で、生体内の比較的半減期の長いコラーゲンなどの蛋白の分子間、または分子内で架橋を形成することによって、また様々なサイトカインや成長因子の産生を介して、組織の障害を起こすといわれている。しかし、AGE 形成の詳細については未だ明らかではなく、生体内の主要 AGE 構造についても明らかにはされていない。これまで様々な AGE 候補物質が報告されているが、それら候補物質は in vitro で作製されたものがほとんどで、生体に存在する全 AGE の数%にすぎないといわれている。

生体内の AGE 量は、その産生と除去能力に依っており、産生のスピードは高血糖状態に規定され、除去能力はマクロファージの働きと腎機能に規定されていると考えられる。流血中には、組織に蓄積した AGE がマクロファージや蛋白分解酵素により貪食、分解されてできた比較的小分子量の AGE (AGE-peptide) と、血清蛋白に蓄積している比較的大分子量の AGE (AGE-protein) の 2 種類の AGE が存在すると考えられており、特に血中 AGE-peptide の量は、健常者に比較し糖尿病患者群で有意な増加、また糖尿病性腎不全のため透析を行っている群では正常者に比べ約 5 倍の増加を認めたとされ、現在の透析療法では、最も除去効率の良い透析膜でも、AGE-peptide の除去は不十分であると報告されている。更に AGE-peptide は AGE-protein と比較し、それらの持つ AGE 活性、毒性が強いとされている。本研究は AGE の持つ特性の一つとしての特異的蛍光波長 (Excitation 370nm/Emission 440nm) を利用して、尿中から AGE-peptide を分離し、更に糖尿病性腎症の進行と尿中 AGE-peptide についての関係を明解にすることを目的とした。

2 型糖尿病患者 100 人、非糖尿病性の腎障害患者 39 人、また正常コントロール 20 人、計 159 人についての来院時随時尿を対象とした。糖尿病患者 100 人は、糖尿病性腎症病期分類に従い 5 群に分類した (N: 腎症前期群, Mi: 早期腎症期群, Ma: 顕性腎症期群, C: 腎不全期群, HD: 透析療法期群)。非糖尿病性の腎障害患者 39 人は、透析療法導入の有無により 2 群に分類した (n-C: 非透析療法群, n-HD: 透析療法群)。尿検体は全て採取当日に Centriprep 10 (Amicon, Denvers, MA, USA) を用い、遠心操作 (3,000 rpm, 45 min) にて分子量 1 万以上の分画と、分子量 1 万以下の分画に分離を行い、分子量 1 万以下の分画のうち 50 μ l を分子篩 HPLC に流し、AGE 特異的蛍光波長でモニターをして、尿中 AGE の検出を行った。全ての群で、時間 19 分、22 分に 2 つの大きなピークといくつかの小さなピークを認め、大きなピークについて、それぞれピーク 1、ピーク 2 と

した。ピーク 1 は分子量 約 6,000 Da, ピーク 2 は分子量 約 2,500 Da であった。また、糖尿病の腎不全期群患者(C)、透析療法期群患者(HD)、非糖尿病の透析療法期群患者(n-HD)の 3 群にはさらに、他には認められない大きなピークを時間 38 分に認め (ピーク 3)、分子量は約 300 Da であった。更に、それら 3 群の尿中 AGE-peptide の総量は、他の群と比較し約 2~3 倍の増加を認めており、これまでの血中における AGE-peptide の同群での増加を報告した結果と一致した成績であった。しかし、AGE-peptide 値は透析患者では糖尿病と非糖尿病とで有意な差を認めなかった。この事実からは、AGE-peptide の増加には、AGE の産生上昇よりも、体内からの排泄低下の方が大きな要因になると考えられた。つまり腎機能が低下すると、血中の AGE 量が多いにも関わらず腎臓から排泄しきれず、尿中の AGE 量が多いにも関わらず尿細管での十分な再吸収が出来なくなることが、血中、尿中の AGE の増加の原因になると推測される。

また本研究で報告したピーク 3 は、糖尿病と非糖尿病の腎不全期群患者(C, n-C)を比較して見た際、糖尿病(C)では認めるが、非糖尿病(n-C)では殆ど認められないことがわかった。さらに分子篩 HPLC で得られた 3 つのピークについて、それぞれイオン交換 HPLC を行い、検討したところピーク 1 とピーク 2 はいくつかの物質の混合であることがわかり、ピーク 3 はイオン交換 HPLC, 逆相 HPLC の結果からも単一の物質で構成されている可能性が示唆された。これは分子量が 300 Da と非常に小さいことから、AGE-peptide の生体内における分解産物、もしくは未だ主要構造の確定していない AGE 物質そのものである可能性も考えられた。

ポリクローナル AGE 抗体を使用した競合 ELISA の結果からも、ピーク 1 とピーク 2 には AGE が含まれていることが示唆されたが、ピーク 3 が AGE 構造体を含んでいるということは明らかにできなかった。しかし、今回の ELISA の結果だけでは、完全にピーク 3 の物質が AGE でないとは確定できないものと思われ、さらなる検討が望まれる。AGE 量を測定することは糖尿病合併症の治療効果のマーカーとしても、合併症出現のリスクのマーカーとしても有用である。しかし、これまでの報告では使用する AGE 抗体によって、AGE 量の結果は異なっており、さらに一部の AGE 抗体は epitope となる AGE の構造自体が不明であり、また、それが heterogeneous なものであることが予測されている。それゆえ多くの種類の AGE 抗体の分類と標準的な免疫学的測定法の確立が望まれている。AGE 特異的蛍光測定法は最も代表的な測定法で、血中の低分子量の AGE について、ELISA 法と蛍光測定法を同時に比較検討した最近の報告では、強い相関が示されている。HPLC と蛍光モニターを組み合わせた本測定法は、簡便で更にピークごとの評価も可能である。生体内 AGE の臨床的意義を解明する有力な測定法として、今後応用できると考えられる。また一般的に糖尿病患者で腎障害を認めた際、その病因が高血糖のみによるものか、合併した高血圧によるものか、または他の腎臓病が合併したものなのかは、臨床データなどからある程度予想は出来るが確定診断が困難な場合も多い。腎生検はその判定に対して有用な検査ではあるが、侵襲的な検査であり、重篤な合併症がおきることや実施自体が難しい施設もあり、必ずしもこの検査は容易ではない。今回の結果より、ピーク 3 は腎機能障害を持つ糖尿病患者の診断の一助として有効な臨床マーカーと成りうると考えられ、また病因を明らかにする目的にも有用である可能性が考えられた。

以上より尿中低分子 AGE が、糖尿病性腎不全患者と、非糖尿病透析患者で著しく増加することを明らかにした。また分子篩 HPLC などを応用し、腎不全患者に特異的なピークの存在を確認した。特に分子量 300 Da のピークは、非糖尿病性の保存期腎不全患者には認められないことから、糖尿病患者の腎機能障害における高血糖との因果関係を検索する上で、有用な検査と成りうる可能性が示唆された。今後、生体内 AGE の最終分解産物である可能性も視野に入れた検討が期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 池 隆 夫

副 査 教 授 浅 香 正 博

副 査 教 授 吉 木 敬

学 位 論 文 題 名

糖尿病性腎症と尿中低分子 AGE（終末糖化産物， Advanced Glycation Endproduct）との関連について

本研究は、糖尿病慢性合併症の要因と考えられている Advanced Glycation Endproduct (以下 AGE)、中でも生物活性が高いと考えられている低分子 AGE (以下 AGE-peptide) に関して、尿中 AGE-peptide と糖尿病性腎症進展との関連を明らかにし、更に数種類の AGE-peptide に対して検討を加えたものである。

AGE は還元糖とアミノ酸の非酵素的蛋白糖化反応（グリケーション）における最終産物で、生体内の比較的半減期の長いコラーゲンなどの蛋白の分子間、または分子内で架橋を形成することによって、また様々なサイトカインや成長因子の産生を介して、組織の障害を起こすといわれている。しかし、AGE 形成の詳細については未だ明らかではなく、生体内の主要 AGE 構造についても明らかにはされていない。これまで様々な AGE 候補物質が報告されているが、それら候補物質は *in vitro* で作製されたものがほとんどで、生体に存在する全 AGE の数%にすぎないと言われている。

腎症進行度別に分類した糖尿病患者、非糖尿病性の腎障害患者ら計 159 人の随時尿 peptide 分画をそれぞれ分子篩 HPLC により分析し、AGE 特異的蛍光(Ex370nm/Em440nm)を有する 3 種類の特徴的なピークを得た。抗 AGE 抗体を用いた ELISA 法により、分子量 6,000、2,500 Da の 2 つのピークには AGE 物質の存在が確認され、更にイオン交換 HPLC、逆相 HPLC により、数種類の AGE-peptide が混在していることが明らかとなった。AGE 特異的蛍光を有する分子量 300 Da の peptide は、糖尿病と非糖尿病の透析群と糖尿病性保存期腎不全群にほぼ特異的に認められ、同様に腎機能の低下している非糖尿病性の保存期腎不全群には見られなかった。この peptide はかなり小さい物質であり、生体内 AGE 物質の最終分解産物である可能性が示唆された。また、腎障害をもつ糖尿病患者において、腎障害が糖尿病によるものか他の腎疾患の合併なのか、時に行われる腎生検と同様に、糖尿病自体の腎障害への関与を測る指標になる可能性が示唆された。尿中の総 AGE-peptide 量は糖尿病性腎症の進行と共に増加を認め、これまでの報告と併せて、要因として AGE-peptide の近位尿細管での再吸収障害と、AGE-peptide の糸球体通過障害に伴う血中 AGE-peptide 増加の反映が考えられた。糖尿病性腎症群でも排泄機能が保たれている場合は、血中 AGE-peptide 増加は乏しく、正常対

象群でも 2,500Da ピークは尿中に比較的多く認めることより、高血糖による AGE 生成とともに、それ以上に AGE-peptide 排泄が生体内、結果としては尿中の AGE-peptide の量を反映する要素と考えられた。

発表終了後、吉木教授から糖尿病性腎症 AGE 免疫染色に使用される抗 AGE 抗体の多様性、血液中における同様の AGE-peptide の検出の有無について質問があり、最後に 300Da の物質に対してのキャリアタンパクを利用した抗体作製についての提言があった。続いて、浅香教授から、使用した抗 AGE 抗体の作成法と認識するエピトープ、生体内での AGE の存在形態、統計処理の仕方、透析患者の血中 AGE-peptide 量に関するこれまでの報告との差違について質問があった。これらの質問に対し、申請者は概ね適切な解答をした。最後に、本研究の臨床応用に向けての展望を述べ、質疑応答を終了した。

この論文は、糖尿病慢性合併症の要因である AGE-peptide と糖尿病性腎症の関連を明らかにし、腎症進行と深く関与する新たな peptide を示した研究として高く評価され、今後、未だ不明である生体内主要 AGE 物質の構造解明、糖尿病慢性合併症の新しい治療の開発に貢献するものと期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。