

- Transplant 1999; 14 [Suppl 1]: 79-81.
24. Miyata T, Ishikawa S, Asahi K, Inagi R, Suzuki D, Horie K, Tatsumi K, Kurokawa K. 2-Isopropylidenehydrazono-4-oxo-thiazolidin-5-ylacetanilide(OPB-9195) inhibits the neointima proliferation of rat carotid artery following balloon injury: Role of glycooxidation and lipoxidation reactions in vascular tissue damage. FEBS letter .1999;445: 202-206.
 25. Miyata T, Kurokawa K. Carbonyl stress: increased carbonyl modification of proteins by autoxidation products of carbohydrates and lipids. Int J Art Org "in press"
 26. Nangaku M, Miyata T, Kurokawa K. Possible involvement of "carbonyl stress" in the pathogenesis of dialysis-related amyloidosis. Am J Med Sci "in press"
 27. Miyata T, Nangaku M, Uchida K, Inagi R, Kurokawa K. Oxidative stress-induced carbonyl stress" in uremia. Redox Regulation Clinical Application "in press"
 28. Miyata T, Kurokawa K, van Ypersele de Strihou C. "Carbonyl Stress" and long-term uremic complications. Advanced in Nephrology "in press"
 29. Miyata T, Kurokawa K. "Carbonyl stress" and dialysis-related amyloidosis. Nephrol Dial Transplant "in press"
 30. Suzuki D, Miyata T, Saotome N, Horie K, Inagi R, Yasuda Y, Uchida K, Izuhara Y, Yagame M, Sakai H, Kurokawa K. Immunohistochemical evidence for an increased oxidative stress and carbonyl modification of proteins by autoxidation products of carbohydrates, lipids, and amino acids in diabetic glomerular lesions. J Am Soc Nephrol "in press"
 31. Miyata T, Sakai T, Kurokawa K. Carbonyl stress: Increased carbonyl modification of tissue and cellular proteins in uremia. Peritoneal Dialysis International "in press"
 32. Wada T, Miyata T, Hideto Sakai, Kurokawa K. b2-microglobulin and renal bone disease Peritoneal Dialysis International "in press"
 33. Mitarai T, Wolf G, Bover J, Miyata T. The first Japan-European Nephrology Forum..Nephrol Dial Transplant "in press"
 34. Miyata T, Sugiyama S, Suzuki D, Inagi R, Kurokawa K. Increased carbonyl modification of proteins by lipids and carbohydrates in diabetic nephropathy. Kidney International "in press"
 35. Handa JT, Verzijl NV, Matsunaga H, Keen AA, Luty GA, Koppele JM, Miyata T, Hjelmeland LM. Increase of the advanced glycation end product pentosidine in Bruch's membrane with age. Investigative Ophthalmology Visual Science "in press"
 36. Suzuki D, Miyata T, Nangaku M, Takano H, Inagi R, Endoh M, Kurokawa K, Sakai H. Expression of megsin mRNA, a novel mesangium-predominant gene, in the renal tissues of various glomerular diseases. J Am Soc Nephrol "in press"
 37. Kawada N, Moriyama T, Ando A, Fukunaga M, Miyata T, Kurokawa K, Imai E, Hori M. Increased oxidative stress in the mouse kidneys with unilateral ureteral obstruction. Kidney International "in press"
 38. Izuhara Y, Miyata T, Ueda Y, Suzuki D, Asahi K, Inagi R, Sakai H, Kurokawa K. A sensitive and specific ELISA for plasma pentosidine. Nephrol Dial Transplant "in press"
 39. Kikuchi S, Shinpo K, Moriwaka F, Makita Z, Miyata T, Tashiro K. Neurotoxicity of methylglyoxal and 3-Deoxyglycose on cultured

- cortical neurons: Synergism between glycation and oxidative stress, possibly involved in neurodegenerative diseases *Neurosci letter* "in press"
40. Faboud B, Keen AA, Miyata M, Hjelmeland LM, Handa JT. Development of a polyclonal antibody with broad epitope specificity for advanced glycation end products and its use for the detection of AGEs in aging human Bruch's membrane and choroid. *Experimental Eye Research* "in press"
 41. Jadoul M, Ueda Y, Yasuda Y, Saito A, Robert A, Ishida N, Kurokawa K, van Ypersele de Strihou C, Miyata T. Influence of hemodialysis membrane type on pentosidine plasma level, a marker of "carbonyl stress". *Kidney International* "in press"
 42. Suzuki D, Miyata T. Carbonyl stress and diabetic nephropathy. *Jpn J Nephrol* "in press"
 43. Inagi R, Miyata T, Kurokawa K. Implication of carbonyl stress in long-term uremic complications. *Blood Purification* "in press"
 44. Miyata T, Asahi K, Inagi R, Uchida K, Ueda Y, Tatsumi K, Kurokawa K. 2-Isopropylidenehydrazono-4-oxo-thiazolidin-5-ylacetanilide (OPB-9195) is a potent inhibitor for glycooxidation and lipoxidation reactions. *Biochem Biophys Res Commun* "in press"
 45. Miyata T, Sugiyama S, Nangaku M, Suzuki D, Uragami K, Inagi R, Kurokawa K. Apo E2/E5 mutation in lipoprotein glomerulopathy recurred in transplanted kidney. *J Am Soc Nephrol*. "in press"
 46. Miyata T, Kurokawa K, van Ypersele de Strihou C. Relevance of oxidative stress in long-term complications in hemodialysis. *Kidney International* "in press"
 47. Stein G, Franke S, Sperschneider H, Vienken J, Ueda Y, Miyata T, Kurokawa K. Decrease in serum pentosidine levels of ESRD patients during polysulfone dialysis. *Nephrol Dial Transplant* "in press"
 48. Shiohita K, Abe K, Miyazaki K, Sasaki O, Ozono Y, Harada T, Taguchi T, Nagata K, Kohno S. Expression of heat shock protein 47 (HSP47) in Sclerosing peritonitis in CAPD patients. *J Am Soc Nephrol* 8:545A, 1997
 49. Ozono Y, Abe K, Miyazaki M, Furusu A, Tsukasaki S, Harada T, Taguchi T, Hosokawa N, Nagata K, Kohno S. Immunohistochemical localization of heat shock protein 47 (HSP47) and α -smooth muscle actin in renal allograft tissue. *J Am Soc Nephrol* 8:718A, 1997
 50. 上田裕彦, 宮田敏男, 黒川 清. 透析アミロイドーシスと AGEs. *腎臓*.1998;20-2:74-79
 51. 伊豆原優子, 宮田敏男. 腎不全長期合併症と糖・脂質カルボニルストレス. *医学のあゆみ*. 1998;186-8:454-455
 52. 宮田敏男, 旭浩一. 内科系疾患と Carbonyl Stress. *日本内科学会誌*.1998;88-2:153-160.
 53. 稲城玲子, 宮田敏男, 黒川 清. 透析アミロイドーシス.印刷中.
 54. 橋本勉, 宮田敏男, 黒川 清. 長期透析合併症とカルボニルストレス. *BIO Clinica*. 印刷中.
 55. 宮田敏男, 旭浩一, 黒川 清. 血管障害進展における AGEs 形成の意義及びその抑制法の検討. 代謝異常治療研究基金研究業績集.印刷中.
 56. 和田 健彦, 宮田 敏男. カルボニルストレスとリウマチ性疾患. 科学評論社.印刷中.
 57. 高野 秀雄, 宮田 敏男. AGE と糖尿病性腎症. *医学のあゆみ*.印刷中.
 58. 旭 浩一, 宮田 敏男. 透析と酸化ストレス. *日本透析医学会*.印刷中.

59. 宮田 敏男, 上田 太朗, 齊藤 明, 黒川 清. カルボニルストレスとハイパフォーマンス膜. 東京医学社. 印刷中.
60. 潮下 敬, 宮崎正信, 芦澤麻美子, 三島陽子, 三宅千恵, 大園恵幸, 原田孝司, 田口 尚, 河野 茂. 培養ヒト腹膜中被細胞における Heat Shock Protein 47 (HSP47)の発現の検討について. 腹膜透析 '99 印刷中.
61. 潮下 敬, 阿部克成, 塚崎祥子, 古巢 朗, 宮崎正信, 大園恵幸, 堀田 覚, 原田孝司, 永田和宏, 河野 茂. CAPD 患者の硬化性腹膜炎における HSP47 の関与 (第 40 回日本腎臓学会学術総会) 日本腎臓学会誌 39(No3);324,1997
62. 潮下 敬, 宮崎正信, 阿部克成, 佐々木修, 長島純子, 大園恵幸, 原田孝司, 田口 尚, 河野 茂. 培養ヒト腹膜中被細胞における Heat Shock Protein 47 (HSP47)の発現の検討 (第 43 回日本透析医学会) 日本透析医学会雑誌 31 (Suppl):453, 1998
- ## 2. 学会発表
1. Miyata T. Altercations of non-enzymatic biochemistry in uremia: Implication of "carbonyl stress" long-term uremic complications. Japan Europe Nephrology Forum in Hakone (Japan). March 13-15, 1998.
2. Miyata T. Advanced glycosylation end-products in uremia and b2m-amyloidosis. Necker's Seminars in Nephrology in Paris (France). May 11-13, 1998.
3. Miyata T. Carbonyl stress and uremic complications. Alterations in non-enzymatic biochemistry of carbohydrate and lipid in uremia. Baxter Extramural Grant Program in Chicago (USA). May 28, 1998.
4. Miyata T. Advanced glycation end-products: Novel uraemic toxins in renal failure. The 12th Asian colloquium in Nephrology in Kuala Lumpur (Malaysia). August 3-8, 1998.
5. Miyata T. b2-Microglobulin and renal bone disease. The 8th Congress of The International Society for Peritoneal Dialysis in Seoul (Korea). August 23-26, 1998.
6. Miyata T. AGE-mediated activation of peritoneal cells. The 8th Congress of The International Society for Peritoneal Dialysis in Seoul (Korea). August 23-26, 1998.
7. Miyata T. AGE, b2m and amyloidosis of renal failure. Nephrology Summer School Seminar in Izmir (Turkey). October 6-7, 1998.
8. Moriyama T, Kawada N, Fukunaga A, Ando, Miyata T, Kurokawa K, Imai E, Hori M. Increased oxidative products, n-(carboxymethyl) lysine and 8-isoprostaglandin f2a in the kidneys of mice with unilateral ureteral obstruction. The 31st Annual Meeting of the American Society of Nephrology in Philadelphia (USA). October 24-28, 1998.
9. Suzuki D, Miyata T, Saotome N, Horie K, Inagi R, Yagame M, Sakai H, Kurokawa K. Immunohistochemical evidence for an increased oxidative stress and carbonyl modification of proteins in diabetic nephropathy. The 31st Annual Meeting of the American Society of Nephrology in Philadelphia (USA). October 24-28, 1998.
10. Yasuda Y, Miyata T, Ahkand A, Inagi R, Suzuki D, Maeda K, Nakashima I, Kurokawa K. Carbonyl stress in diabetic glomerular lesions modifies mesangial cell surface proteins for activating the intracellular protein tyrosine phosphorylation. The 31st Annual Meeting of the American Society of Nephrology in Philadelphia (USA). October 24-28, 1998.
11. Jadoul M, Ueda Y, Yasuda Y,

- Saito A, Robelt A, Kurokawa K, Van Ypersele de Strihou C, Miyata T. Influence of hemodialysis membranes on the plasma "carbonyl stress". The 31st Annual Meeting of the American Society of Nephrology in Philadelphia (USA). October 24-28, 1998.
12. Miyata T, Asahi K, Inagi R, Suzuki D, Nangaku M, Saito A, Sakai H, Kurokawa K. Implication of an increased carbonyl modification of vascular tissue proteins by glycooxidation and lipoxidation reaction ("carbonyl stress") in atherosclerosis in end stage renal failure. The 31st Annual Meeting of the American Society of Nephrology in Philadelphia (USA). October 24-28, 1998.
 13. Ueda Y, Miyata T, Yamada H, Inagi R, Yasuda Y, Saito A, Sakai H, Kurokawa K. Implication of altered redox regulation by antioxidant enzymes in the increased plasma pentosidine, an advanced glycation end product, in uremia. The 31st Annual Meeting of the American Society of Nephrology in Philadelphia (USA). October 24-28, 1998.
 14. Wada T, Miyata T, Min-Xin Fu, Ueda Y, Van Ypersele de Strihou C, Suzann R. Thorpe, John W. Baynes, Kurokawa K. Increased carbonyl modification of plasma proteins by autoxidation products of both carbohydrates and lipids in uremic patients: "carbonyl stress" in uremia. The 31st Annual Meeting of the American Society of Nephrology in Philadelphia (USA). October 24-28, 1998.
 15. Fujita Y, Miyata T, Wada T, Ueda Y, Tanabe R, Saito A, Kurokawa K. Accumulation of carbonyl compounds modifying peritoneal tissue and cellular proteins (carbonyl stress) in CAPD patients. The 31st Annual Meeting of the American Society of Nephrology in Philadelphia (USA). October 24-28, 1998.
 16. Horie K, Miyata T, Hirano H, Yasuda Y, Devuyst Oliver, Saito A, Kurokawa K. Immunohistochemical evidence for an increased carbonyl modifications of peritoneal tissues by autoxidation products of carbohydrates and lipids in continuous ambulatory peritoneal dialysis (CAPD) patients. The 31st Annual Meeting of the American Society of Nephrology in Philadelphia (USA). October 24-28, 1998.
 17. Miyata T, Wada T, Anwarul a. Ahkand, Inagi R, Saito A, Oliver Devuyst, Nakashima I, Kurokawa K. Carbonyl stress in CAPD peritoneum modifies endothelial and mesothelial cell surface proteins for activating vascular endothelial growth factor (VEGF) expression and intracellular protein-tyrosine phosphorylation. The 31st Annual Meeting of the American Society of Nephrology in Philadelphia (USA). October 24-28, 1998.
 18. Asahi K, Miyata T, Inagi R, Ueda Y, Nangaku M, Watanabe T, Kurokawa K. Nitric oxide inhibits the formation of advanced glycation end products in uremic serum. The 31st Annual Meeting of the American Society of Nephrology in Philadelphia (USA). October 24-28, 1998.
 19. Guenter Stein, Sybille Franke, Joerg Vienken, Ueda Y, Miyata T, Kurokawa K. Changes in serum protein-linked pentosidine levels of esrd patients during polysulfone hemodialysis. The 31st Annual Meeting of the American Society of Nephrology in Philadelphia (USA). October 24-28, 1998.
 20. Miyata T. Carbonyl stress and metabolic and neurological diseases. The 10th Naito conference (Molecular biological approaches for intractable diseases) in Kanagawa
 21. 宮田敏男. 第13回ハイパフォーメンズ・メンブレン. 1998. 3, 14-15. 東京.

22. 上田裕彦, 宮田敏男, 南学正臣, 安田宜成, 和田健彦, 旭 浩一, 堺 秀人, 齊藤 明, 黒川 清. 腎不全患者血中におけるカルボニルストレスの証明: advanced glycation end products(AGEs)蓄積のメカニズム. 第41回日本腎臓学会学術総会. 1998. 5, 11-12. 東京.
23. 杉山 敏, 宮田敏男, 梅山一大, 大塚喜彦, 南学正臣, 渡辺有三, 堺 秀人, 黒川 清. Lipoprotein glomerulopathy(LG)の発症機序: アポE遺伝子異常と脂質代謝異常. 第41回日本腎臓学会学術総会. 1998. 5, 11-12. 東京.
24. 宮田敏男, 黒川 清. CAPD 腹膜硬化症における AGEs 及び ALEs の局在: 腹膜硬化進展における酸化ストレスの関与. 第41回日本腎臓学会学術総会. 1998. 5, 11-12. 東京.
25. 藤崎知隆, 宮田敏男, 森田尚克, 旭 浩一, 福内史子, 北村真, 角田隆俊, 南学正臣, 黒川 清, 齊藤 明. 腎不全における脂質過酸化物質 malondialdehyde(MDA)と AGEs の蓄積は何を意味するのか. 第41回日本腎臓学会学術総会. 1998. 5, 11-12. 東京.
26. 齊藤 明, 宮田敏男, 森田尚克, 南学正臣, 上田裕彦, 福内史子, 北村真, 藤崎知隆, 堺 秀人, 黒川 清. 腎不全における advanced glycation end products (AGEs)の controversy. 第41回日本腎臓学会学術総会. 1998. 5, 11-12. 東京.
27. 安田宜成, 宮田敏男, 石川伸太郎, 旭 浩一, 南学正臣, 齊藤明, 堺 秀人, 辰巳邦彦, 黒川 清. OPB-9195 の糖・脂質カルボニルストレス阻害作用及び動物モデルでの有用性. 第41回日本腎臓学会学術総会. 1998. 5, 11-12. 東京.
28. 和田健彦, 宮田敏男, 上田裕彦, 南学正臣, 鈴木大輔, 齊藤 明, 堺 秀人, 黒川 清. 腎近位尿管におけるペントシジンの代謝. 第41回日本腎臓学会学術総会. 1998. 5, 11-12. 東京.
29. 宮田敏男, 南学正臣, 上田裕彦, 安田宜成, 鈴木大輔, 和田健彦, 吉本泰樹, 旭 浩一, 浦上研一, 堺 秀人, 黒川 清. 初めてのメサンギウム特異的遺伝子 megsin のクローニングと解析. 第41回日本腎臓学会学術総会. 1998. 5, 11-12. 東京.
30. 宮田敏男, 黒川 清. AGE 研究の進歩 糖・脂質カルボニルストレスと腎不全合併症. 第43回日本透析医学会学術集会総会. 1998. 5, 29-31. 横浜.
31. 福内史子, 宮田敏男, 上田裕彦, 安田宜成, 山田幸弘, 南学正臣, 齊藤 明, 堺 秀人, 黒川 清. 透析膜の特性(biocompatibility / permeability) と血中 advanced glycation end products (AGEs) レベル. 第43回日本透析医学会学術集会総会. 1998. 5, 29-31. 横浜.
32. 南学正臣, 宮田敏男, 鈴木大輔, 石川伸太郎, 辰巳邦彦, 齊藤明, 堺 秀人, 黒川 清. 糖・脂質カルボニルストレス阻害と腎不全血管病変進展抑制-OPB-9195 の有用性. 第43回日本透析医学会学術集会総会. 1998. 5, 29-31. 横浜.
33. 橋本 勉, 宮田敏男, 南学正臣, 上田裕彦, 山田幸弘, 安田宜成, 堺 秀人, 齊藤 明, 黒川 清. 腎不全の Advanced glycation end products (AGEs)蓄積とレドックス異常. 第43回日本透析医学会学術集会総会. 1998. 5, 29-31. 横浜.
34. 伊豆原優子, 宮田敏男, 上田裕彦, 山田幸弘, 安田宜成, 南学正臣, 齊藤 明, 堺 秀人, 黒川 清. 腎不全における血清 malondialdehyde (MDA) の蓄積: 糖・脂質カルボニルストレス. 第43回日本透析医学会学術集会総会. 1998. 5, 29-31. 横浜.
35. 旭 浩一, 宮田敏男, 鈴木大輔, 南学正臣, 齊藤 明, 堺 秀人, 渡辺 毅, 黒川 清. 腎不全血管病変進展と糖・脂質カルボニルストレス. 第43回日本透析医学会学術集会総会. 1998. 5, 29-31. 横浜.

36. 堀江勝智, 宮田敏男, 安田宜成, 黒川 清, 前田憲志, 熊野和雄. CAPD 腹膜硬化症における AGEs 及び ALEs の局在-腹膜硬化症進展におけるカルボニルストレスの関与-第 43 回日本透析医学会学術集会総会. 1998. 5, 29-31. 横浜.
37. 山田幸弘, 宮田敏男, 上田裕彦, 堺 秀人, 齋藤 明, 黒川 清. 腎不全患者血漿中の AGEs 前駆物質の解析: カルボニルストレスの証明. 第 43 回日本透析医学会学術集会総会. 1998. 5, 29-31. 横浜.
38. 上田裕彦, 宮田敏男, 南学正臣, 齋藤 明, 堺 秀人, 黒川 清. 腎不全患者血中におけるカルボニルストレスの証明: advanced glycation end productus (AGEs) 蓄積のメカニズム. 第 43 回日本透析医学会学術集会 総会, 1998. 5, 29-31. 横浜.
39. 鈴木大輔, 宮田敏男, 齋藤 明, 堺 秀人, 黒川 清. 腎不全における Advanced glycation end products (AGEs) 蓄積機序の解析. 第 43 回日本透析医学会学術集会 総会. 1998. 5, 29-31. 横浜.
40. 宜成, 宮田敏男, 堀江勝智, 南学正臣, 齋藤 明, 前田憲志, 堺 秀人, 黒川 清. 透析アミロイドーシスにおけるカルボニルストレスの免疫組織学的検討. 第 43 回日本透析医学会学術集会 総会. 1998. 5, 29-31. 横浜.
41. 和田健彦, 宮田敏男, 鈴木大輔, 上田裕彦, 南学正臣, 齋藤 明, 堺 秀人, 黒川 清. 腎における ペントシジンの代謝・排出. 第 43 回日本透析医学会学術集会 総会. 1998. 5, 29-31. 横浜.
42. 堀江勝智, 前田憲志, 宮田敏男, 鈴木大輔, 安田宜成, 堺 秀人, 黒川 清, 内田浩二. 糖尿病性腎症におけるカルボニルストレスの関与. 第 8 回メイラード反応研究会. 1998. 9, 17-18. 青森.
43. 上田裕彦, 宮田敏男, 安田宜成, 旭 浩一, 堺 秀人, 黒川 清. 腎不全患者における advanced glycation end products (AGEs) の蓄積とドレックス制御異常. 第 8 回メイラード反応研究会. 1998. 9, 17-18. 青森.
44. 安田宜成, 宮田敏男, 上田裕彦, 黒川 清, 前田憲志, Thorpe SR, Baynes JW. 腎不全における advanced glycation end products (AGEs) 及び advanced lipoxidation end products (ALEs) の蓄積. 第 8 回メイラード反応研究会. 1998. 9, 17-18. 青森.
45. 旭 浩一, 宮田敏男, 安田宜成, 上田裕彦, 堺 秀人, 黒川 清, 石黒直樹. 慢性関節リウマチにおける血漿, 関節液ペントシジンの臨床的意義. 第 8 回メイラード反応研究会. 1998. 9, 17-18. 青森.
46. 宮田敏男. カルボニルストレスと神経・代謝性疾患. 第 10 回内藤コンファレンス-難病の分子生物学-. 1998. 10, 29-11, 1. 湘南.
47. アカンド アジム アンワルル, 加藤昌志, 鈴木治彦, 劉 偉, 杜軍, 濱口道成, 宮田敏男, 黒川 清, 中島 泉. ケリオキサルは T 細胞および線維芽細胞において細胞蛋白を架橋し、日受容体型チロシンキナーゼを活性化する。第 28 回日本免疫学会総会・学術集会.
48. 宮田敏男. ハイパフォーマンス膜とカルボニルストレス. 第 14 回ハイパフォーマンス・メンバー/次世代人工腎研究会. 1999. 3, 13-14

研究課題 カルボニルストレスの病態生理的意義の検討

分担研究者 渡辺 毅 福島県立医科大学医学部第三内科 教授

研究要旨 透析アミロイドーシス・動脈硬化などの合併症の病因として、糖・脂質から生成されるカルボニル化合物による蛋白の修飾の意義が提唱されている。本研究では、腎不全におけるカルボニル・ストレスの蛋白修飾の要因、蛋白修飾の血管構成細胞での産生・作用機構と作用の細胞内情報伝達機構について検討し、以下の結果を得た。(1) 腎不全時におけるカルボニル・ストレスの蛋白修飾に対しては、腎機能障害と時間（修飾時間または蛋白寿命）の二つの大きな因子が関与する。(2) 腎不全での動脈硬化組織における糖・脂質由来カルボニル化合物の最終産物の局在ならびにカルボニルストレス最終産物である AGE 化 BSA の血管平滑筋増殖・血小板凝集の検討から腎不全動脈硬化進展におけるカルボニルストレスの病態生理的意義が細胞レベルで示唆された。(3) カルボニル化合物 glyoxal が、T リンパ球や繊維芽細胞の細胞表面蛋白を Schiff-base 形成を介して架橋し、Src ファミリーの非受容体型チロシンキナーゼを活性化することを示し、カルボニル・ストレスの作用の分子機構を示した。以上の結果は、腎不全という病態でのカルボニル・ストレスの作用機構に関する新しい知見であり、透析合併症の予防・治療の進歩の基礎となると期待される。

研究組織

研究協力者

中島 泉 名古屋大学医学部
免疫学講座 教授
A.A.アカンド 名古屋大学医学部
免疫学講座
杉山 敏 社会保険中京病院
腎臓科主任部長
旭 浩一 福島県立医科大学
医学部第三内科

A. 研究目的

透析アミロイドーシスや動脈硬化による心・血管イベントは長期透析患者に見られる深刻な合併症である。透析

アミロイドーシスの主要病変は骨・関節の破壊であるが、化学修飾を受けた生物活性をもつ β 2-マイクログロブリン (β 2MG) が病因として注目されている。化学修飾に関しては、糖と非酵素的反応であるメイラード反応を受けて糖化 (advanced glycation endproducts : AGEs) した β 2MG について精力的な研究がなされている。一方、種々の生体での蛋白の AGEs は血管構成細胞(内

皮細胞、平滑筋細胞、マクロファージ)への作用を介して動脈硬化進展を促進することが、臨床的観察、動物モデル及び血管由来の培養細胞を用いた実験などから示唆されている。AGE 構造をもつカルボキシメチルリジン (carboxymethyllysine, CML) やペントシジンの生成には糖化とともに酸化が関与していることが明らかにされている。さらに、それら生成過程において蛋白を修飾する共通した前駆体として、高い反応性を持ったカルボニル化合物の関与が示唆され、カルボニル・ストレス仮説として提唱されている [Miyata T, *Kidney Int* 55: 389-399, 1999]。

本研究では、これらの点を踏まえて、腎不全におけるカルボニル・ストレスの蛋白修飾に関与する要因、動脈壁におけるカルボニル・ストレスの存在と作用機構及びカルボニル・ストレスの細胞内シグナル伝達への効果に着目し、以下の具体的検討を行うことで、カルボニル・ストレスの腎不全における病態生理的意義の解明を目指すものである。

I. カルボニル・ストレスにおける腎機能の役割に関する研究

高血糖環境下の糖尿病における非酵素的反応時や酸化的傷害にある病態において、また生体代謝物としてカルボニル化合物はつくられる。しかし、同時にカルボニル化合物は排泄や代謝による不活性化を受けるため、カルボニル化合物による蛋白の修飾の程度はこれらのバランスの上に決定され、さらに生体においては蛋白がカルボニル化合物に曝される時間や修飾を受けた蛋白の寿命の長短により、最終的な病態の形成がなされるものと思われる。尿毒症は酸化的傷害の亢進した病態であるとともに、腎機能障害によるカルボニル化合物の排泄が障害され蓄積した状態であり、腎機能はカルボニル・ストレスに対し重大な役割を担っていることが考えられる。Glycoxidation products であり、カルボニル・ストレスがその生成に関与する ペントシジンを中心に、腎機能のカルボニル・ストレスに対する役割を検討した。

II. 腎不全血管病変進展におけるカルボニルストレスの病態生理学的意義

慢性腎不全では腎不全の病態または透析操作に伴うレドックス異常に伴い、糖のみならず、脂質、アミノ酸、およびアスコルビン酸が反応性の高いカルボニル基を有するカルボニル化合物に変化する。反応性カルボニルは糸球体濾過機能の低下によって蓄積し組織または細胞表面の蛋白のアミノ基と反応して最終蛋白修飾物である advanced glycation end products (AGEs) や advanced lipoxidation end products (ALEs) を形成する (カルボニルストレス)。この一連の蛋白修飾反応は組織構築の変化やカルボニル化合物やその最終蛋白修飾物によりもたらされる細胞応答や生理活性を介して腎不全合併症の病態に関与することが示唆されてきた。本研究では腎不全動脈硬化病変局所におけるカルボニルストレスの病態生理学的意義を検討することを目的とした。

III. カルボニル化合物とシグナル伝達

糖や脂質に由来する glyoxal や 4-hydroxynonenal (HNE) などのカルボニル化合物は、蛋白質リジンの ϵ -アミノ

基等と結合して Schiff-base を形成したり、蛋白質のシステイン、リジン、ヒスチジン等と Michael addition と呼ばれる様式で結合したりする。その後、時間の経過とともに分子の再構築が進み、N-carboxymethyllysine (CML) などの advanced glycation end products (AGEs) がつくられる。AGEs は、特に透析合併症と関連して病態組織に沈着することが知られてきており、その病因的意義が注目されてきている。本研究は独自の視点から、AGEs 形成の初期段階の Schiff-base 形成や Michael addition が細胞内シグナル伝達系に及ぼす作用とその病態形成における意義の解明をめざす。

B. 研究方法

I. カルボニル・ストレスにおける腎機能の役割に関する研究

1. 血中ペントシジンに対する腎機能の関与の検討

腎機能障害のある者を含む糖尿病患者 74 例を対象とした。対象患者の平均年齢は 62 ± 9 (42-82) 才、男 44、女 30 名、平均糖尿病歴 11 ± 7 (13-2) 年、平均 HbA1c 8.8 ± 1.9 (4.9-13.9) %、平均血清

クレアチニン 1.2 ± 0.9 (0.4-4.0) mg/dl、平均血清総コレステロール 215 ± 33 (145-307)md/dl であった。Glycoxidation products である ペントシジンの血中レベルについては HPLC にて測定した [Odetti P, Diabetes. 41: 153-159, 1992]。また、これらの対象患者の虚血性心疾患の有無について検討し、明らかな心筋梗塞の既往および冠動脈造影にて異常所見を有する狭心症のある者を虚血性心疾患ありと判定した。

2. 糖尿病性腎症系球体病変におけるペントシジンの免疫組織学的検討。

腎機能が正常から高度障害（血清クレアチニン値：0.7mg/dl-6.1mg/dl）までの糖尿病性腎症 13 例の患者から得られたの腎生検標本を用いた。合成ペントシジンで修飾した keyhole limpet hemocyanin で家兎に免疫して作成した抗ペントシジン抗体を用い、酵素抗体法にて免疫組織染色を行った。

II. 腎不全血管病変進展におけるカルボニルストレスの病態生理学的意義

1. ラット頸動脈バルーン障害モデルならびに透析患者剖検動脈硬化組織を用いて、AGEs であるカルボキシメチ

ルリジン(CML)、ペントシジン、ALEs であるマロンジアルデヒド(MDA)-リジン、ヒドロキシノネナール(HNE)蛋白修飾物に対する特異的抗体を用いてカルボニルストレスの局在を免疫組織化学的に検討した。

2. AGE 化 BSA の ADP またはトロンボキササン A2 analog である U46619 に誘導されるヒト血小板凝集能に対する作用を検討した。

III. カルボニル化合物とシグナル伝達

代表的なカルボニル化合物である glyoxal を T リンパ球や繊維芽細胞株 (NIH3T3)に試験管内作用させて、これらの細胞におけるシグナル伝達を以下の方法で解析した。

1. 経時的に細胞を溶解して、SDS-PAGE で各細胞蛋白を分離し、イムノプロット法により、各情報伝達分子の量とリン酸化の程度を定量する。

2. 非受容体型チロシンキナーゼである c-Src のキナーゼ活性を試験管内キナーゼアッセイにより測定した。

3. チロシンキナーゼの活性化の機序におけるカルボキシル化合物による分子架橋の役割を明らかにする目的で、

キナーゼ活性化における分子架橋の状況をレーザーフローサイトメトリーと SDS-PAGE で解析した。

C. 研究結果

I. カルボニル・ストレスにおける腎機能の役割に関する研究

1. 血中ペントシジン値と腎機能

腎機能障害患者を含む 74 例の糖尿病患者について腎機能と血中ペントシジンとの関連を検討すると血中ペントシジン値は血清クレアチニン及びクレアチニン・クリアランスと強い相関を示した ($r^2=0.429$, $P < 0.0001$)。腎機能の正常な糖尿病性腎症においてはペントシジン値は正常コントロールに比べ増加はみられるがその差は僅かであった。

血清クレアチニン 1.0mg/dl 以下の腎機能正常群においても血清ペントシジン値について検討した。虚血性心疾患の既往のある者はない者に比べ、血中ペントシジン値は高値を示した (1.89 ± 0.43 , $n=11$ vs 1.55 ± 0.32 pmol/mg $n=38$ $P=0.0061$)。両群間に年齢、糖尿病歴、HbA1c、血清クレアチニン値、総コレステロール値、高血圧症や喫煙の頻度

に差を認めなかった。

2. 血中ペントシジン値と糖化

腎機能正常 49 例について、血中ペントシジン値は HbA1c ($r^2=0.171$, $P=0.0044$) 及び血清クレアチニン値 ($r^2=0.098$, $P=0.029$) と相関した。また、血中ペントシジン値は患者年齢、糖尿病歴、血清総コレステロール値とも相関を示した。しかし、血中ペントシジン値に影響を与える独立因子を重回帰分析にて検討すると HbA1c ($P=0.033$) と血清クレアチニン値 ($P=0.046$) のみであった。腎不全を含めた 74 例では、血清クレアチニンのみが独立した因子で、HbA1c は独立して影響を与えなかった。

3. 糖尿病性腎症における組織レベルの検討

免疫組織学的検討では、腎機能正常糖尿病性腎症においては拡大増加したメサンジウム基質に、また、腎不全患者においては結節病変に抗ペントシジン抗体の強い染色がみられた。

II. 腎不全血管病変進展におけるカルボニルストレスの病態生理学的意義

ラット頸動脈バルーン障害の新生内

膜肥厚部、透析患者動脈硬化組織の脂肪線条(fatty streaks)の CD68 陽性マクロファージ集簇部位および内膜肥厚部に一致して CML, ペントシジン, MDA-リジン, および HNE 蛋白修飾物のいずれもが共存した。

ヒト血小板と AGE 化 BSA との前処理により, 対照 (BSA) に比し ADP またはトロンボキサン A2analogue である U46619 に誘導される血小板凝集ならびに platelet-rich plasma におけるスーパーオキシド産生を有意に亢進させた。この血小板凝集能の亢進はスーパーオキシドディスムターゼならびにインドメタシンにより阻害された。

III. カルボニル化合物とシグナル伝達

T リンパ球や繊維芽細胞株 (NIH3T3) に対する glyoxal 作用のシグナル伝達を解析の結果、以下の成績を得た。

- ・ 2-50 mM の glyoxal をマウス胸腺 T リンパ球に試験管内で 10 分間作用させたところ、濃度依然性に多種類の細胞内蛋白質がチロシンでリン酸化された。

- ・ このリン酸化は Schiff-base 形成の阻害剤である OPB9195 により阻止され

た。

- ・ 50mM の glyoxal を T リンパ球に作用させて経時的に調べたところ、リン酸化は 2 分後から始まり、10 分で極大となった後減少した。

- ・ チロシンリン酸化の亢進に伴って、一部蛋白質の架橋による凝集が観察された。

- ・ 上記の凝集に GPI 結合膜蛋白質 Thy-1 が含まれていた。

- ・ glyoxal を NIH3T3 に作用させた時にも、T リンパ球の場合と基本的に同様に、細胞蛋白質の架橋による凝集とチロシンリン酸化の亢進が誘導された。

- ・ 上記細胞において、c-Src キナーゼの酵素活性の亢進が観察され、この効果は OPB9195 により阻止された。なお、この時 c-Src 分子そのものの架橋による凝集は観察されなかった。

D. 考察

I. カルボニル・ストレスにおける腎機能の役割に関する研究

1. 酸化的傷害

Glycoxidation products であり、カルボニル・ストレスがその生成に関与するペントシジンを中心に、腎機能のカ

ルボニル・ストレスに対する役割を検討した。

血中ペントシジン値は血清クレアチニン値と強い相関を示した。ペントシジンは蛋白のアミノ酸残基を修飾する形でアルブミンと強く結合して血中に存在し、糸球体濾過を受けないことより、この腎機能低下時における血中ペントシジンの増加は糸球体濾過機能の低下では説明できない。腎機能障害時には蛋白を化学的に修飾する何らかの因子の蓄積や、その排泄障害の存在が推定される。虚血性心疾患の既往を有する患者に有意に高いレベルの血中ペントシジンがみられたことはペントシジンの生成過程に酸化の関与を示唆する所見であった。これまで、腎機能障害時の酸化的傷害についてはいろいろ報告されている。ビタミン C やグルタチオンは生体内活性酸素に対する消去系を構成している。透析患者において total ascorbate に対する酸化型 ascorbate の比をみると正常者に比べ高値を示し、腎不全における酸化的傷害の亢進が報告されている。また、尿毒症における酸化的傷害のマーカーとされる AOPP (advanced oxidation

protein products) の spectrophotometric assay による検討においても腎機能障害時の酸化的傷害の亢進が示唆されている。

2. 糖化的傷害

腎機能が正常である糖尿病患者について血中ペントシジン値は HbA1c と有意の相関を示した。また、血清クレアチニンとも同様に有意の相関を示したが、重回帰分析ではそれぞれ独立して有意に影響を与える因子であり、カルボニル・ストレス生成物にたいする糖化の関与が示唆された。

3. 生体からの除去、排泄、非活性化

腎機能障害のある糖尿病患者で、血中ペントシジンは腎機能と強い相関を示した。また、糸球体過剰濾過のある微量アルブミン尿を示す群では血中ペントシジンは低値を示す傾向にあり、カルボニル・ストレスの生体からの除去、排泄に腎の関与が窺われた。除蛋白した腎不全患者血清に人血清アルブミンを加え incubation すると正常者血清に比べ有意に高いレベルのペントシジンが認められ、腎不全血清中には前駆体と思われるカルボニル化合物の蓄積を示唆する報告がある。

4. 蛋白寿命、修飾時間

血中レベルでは腎機能の正常な糖尿病性腎症においてはペントシジン値は正常コントロールに比べ僅かに増加がみられただけであった。しかし、組織レベルでは腎機能正常糖尿病性腎症においては拡大増加したメサンジウムに強く認められた。免疫染色の程度は腎不全患者に認められた結節病変と大きく変わらなかった。組織レベルの観察ではマトリックス蛋白は腎機能に関係なく強く修飾を受けていた。即ち、寿命の短い血清アルブミンに対しては、大きな修飾を惹起しない程度のカルボニル・ストレスであっても、寿命の長い組織コラーゲンに対しては有意の傷害となるものと考えられる。

II. 腎不全血管病変進展におけるカルボニルストレスの病態生理学的意義

免疫組織化学的検討で、カルボニルストレスにより生成される AGEs ならびに ALEs が、ラット頸動脈バルーン障害ならびに腎不全動脈硬化組織に共通して存在することより、血管病変におけるカルボニルストレスが、それぞれ成因も代謝的背景も異なるいくつか

の血管障害に共通する現象であることが示唆された。

カルボニルストレス最終産物は、これまで報告されている単球遊走能の刺激、リンパ球からの炎症性サイトカイン放出、nitric oxide の血管平滑筋弛緩反応の抑制、血管平滑筋細胞の増殖促進、血管内皮細胞に対する障害作用などの作用のほかに、血小板凝集能亢進を介して atherogenic に働いている可能性がある。この血小板凝集能亢進にはスーパーオキシドアニオンならびにプロスタノイドの作用を介していることが示唆された。

III. カルボニル化合物とシグナル伝達

得られた成績から、glyoxal が GPI 結合膜蛋白質を含む各種細胞蛋白質を Schiff-base 形成を介して架橋し、この結果、GPI 結合膜蛋白質等と会合する Src ファミリーのチロシンキナーゼが活性化する新しいシグナル伝達経路があることが示唆された。

E. 結論

I. カルボニル・ストレスにおける腎機能の役割に関する研究

カルボニル・ストレスの蛋白修飾に関し、腎を中心に考えると、腎機能と時間（修飾時間または蛋白寿命）の二つの大きな因子が存在する。

II. 腎不全血管病変進展におけるカルボニルストレスの病態生理学的意義

腎不全動脈硬化組織には糖・脂質由来カルボニルストレスが存在し、カルボニルストレス最終産物は以前報告した血管内皮細胞障害、血管平滑筋細胞増殖促進の他に血小板凝集亢進作用などの生理活性を介して動脈硬化進展に関与することが示唆された。

III. カルボニル化合物とシグナル伝達

代表的なカルボニル化合物である glyoxal が Schiff-base 形成を介して c-Src キナーゼ等を活性化することを示した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Sugiyama S et al : Plasma level of pentosidine in diabetic patients: An advanced glycation end product. J Am Soc Nephrol 9: 1681-1688 1998
2. Miyata T, Inagi R, Asahi K, Yamada Y, Horie K, Sakai H,

Uchida K, Kurokawa K. Generation of protein carbonyls by glycooxidation and lipoxidation reactions with autoxidation products of ascorbic acid and polyunsaturated fatty acid FEBS Lett 437, 24-28 (1998)

3. Hangaishi M, Taguchi J, Miyata T, Ikari Y, Togo M, Hashimoto Y, Watanabe T, Kimura S, Kurokawa K, Ohno M. Increased aggregation of human platelets produced by advanced glycation end products in vitro Biochem Biophys Res Commun 248, 285-292 (1998)

4. Miyata T, Ishikawa S, Asahi K, Inagi R, Suzuki D, Horie K, Tatsumi K, Kurokawa K 2-Isopropylidenehydrazono-4-oxothiazolidin-5-ylacetanilide (OPB-9195) inhibits the neointima proliferation of rat carotid artery following balloon injury: role of glycooxidation and lipoxidation reactions in vascular tissue damage FEBS Lett 445, 202-206 (1999)

5. 宮田敏男, 旭 浩一, 黒川 清. 血管障害進展における AGEs 形成の意義及びその抑制法の検討 代謝異常治療研究基金研究業績集 26 巻, 印刷中

6. Nakashima, I. et al.: Redox-oriented chemical events in signal transduction in cells. In Redox Regulation of Cell Signaling and its Clinical Applications (Eds, J. Yodoi and L. Packer), Marcel Dekker, Inc., in press.

7. Akhand, A.A. et al.: Carbonyl compounds cross-link cellular proteins and activate protein-

tyrosine kinase p60c-src J. Cell. Biochem. 72:1-7,1999.

8. 中島 泉：酸化ストレスとシグナル伝達。医学のあゆみ別冊、印刷中

2. 学会発表

1. Akhand, A. A. et al.: Glyoxal cross-links cellular proteins and activates non-receptor protein-tyrosine kinases in T lymphocytes and fibroblasts. 第 28 回日本免疫学会総会、神戸、12, 1998.
2. Akhand, A. A. et al.: Signal transduction into murine T lymphocytes and fibroblasts after chemical stimulation. International Congress of Immunology, New Delhi, India, 11, 1998
3. Nakashima, I. et al.: Oxidative stress and signal transduction. International Symposium on Oxidative Stress. Valdivia, Chile, 9, 1998.
4. 旭浩一, 宮田敏男, 鈴木大輔, 堀江勝智, 安田宜成, 南学正臣, 堺秀人, 斎藤明, 渡辺毅, 黒川清. 腎不全血管病変進展と糖・脂質カルボニルストレス 第 41 回日本腎臓学会学術総会 1998 年 5 月 10-12 日, 東京.
5. 安田宜成, 宮田敏男, 石川伸太郎, 旭浩一, 鈴木大輔, 南学正臣, 斎藤明, 堺秀人, 辰巳邦彦, 黒川清. OPB-9195 の糖・脂質カルボニルストレス阻害作用及び動物モデルでの有用性第 41 回

日本腎臓学会学術総会 1998 年 5 月 10-12 日, 東京.

6. 旭浩一, 宮田敏男, 鈴木大輔, 南学正臣, 堺秀人, 斎藤明, 渡辺毅, 黒川清. 腎不全血管病変進展と糖・脂質カルボニルストレス第 43 回日本透析医学会学術総会 1998 年 5 月 29-31 日, 横浜
7. Miyata T, Asahi K, Inagi R, Suzuki D, Nangaku M, Saito A, Sakai H, Kurokawa K. Implication of an increased carbonyl modification of vasculartissue proteins by glycooxidation and lipoxidation reactions ("carbonyl stress") in atherosclerosis in end-stage reanal failure 31st Annual meeting of American Society of Nephrology. October 25-28, 1998, Philadelphia, USA.

