

三島陽子、三宅千恵、大園恵幸、原田孝司、田口 尚、河野 茂、培養ヒト腹膜中皮細胞における Heat shock protein 47 (HSP47)の発現の検討について。腹膜透析'99 (腎と透析別冊 47) 1999;240-243.

2. 学会発表

1. Nishina M, Miyata T, Horie K, Hirano H, Asahi K, Tanabe R, Saito A, Sakai H, Kurokawa K. Immunohistochemical evidence for an increased carbonyl modification of peritoneal tissues by autoxidation products of carbohydrates and lipids in CAPD patients. 19th Annual Conference on Peritoneal Dialysis. in Charlotte (USA). February 28-March 2, 1999.82.
2. Tanabe R, Miyata T, Fujita Y, Asahi K, Nishina M, Saito A, Sakai H, Kurokawa K. Accumulation of carbonyl compounds modifying peritoneal tissue and cellular proteins (Carbonyl stress) in CAPD patients. 19th Annual Conference on Peritoneal Dialysis in Charlotte (USA)..February 28-March 2, 1999.
3. Suzuki D, Miyata T, Nangaku M, Inagi R, Takano H, Toyoda M, Endoh M, Sakai H, Kurokawa K. In situ hybridization study for a mesangium predominant gene, megsin, in several renal diseases. XVth International Congress of Nephrology. in Buenos Aires (Argentina) May 2-6, 1999.
4. Suzuki D, Miyata T, Takano H, Inagi R, Umezono T, Saotome N, Yagame M, Sakai H, Kurokawa K. Immunohistochemical studies for oxidative stress and carbonyl stress in diabetic nephrology. XVth International Congress of Nephrology. in Buenos Aires (Argentina) May 2-6, 1999.
5. Inagi R, Miyata T, Suzuki D, Sakai H, Kurokawa K. Glucose degradation product, methylglyoxal, modifies the biological functions of Pd peritoneal cells. XVth International Congress of Nephrology. in Buenos Aires (Argentina) May 2-6, 1999.
6. Ueda Y, Miyata T, Inagi R, Saito A, Sakai H, Kurokawa K. Accumulation of carbonyl compounds modifying peritoneal tissue and cellular proteins (carbonyl stress) in CAPD patients. XVth International Congress of Nephrology. in Buenos Aires (Argentina) May 2-6, 1999.
7. Nishina M, Miyata T, Horie K, Inagi R, Hirano H, Suzuki D, Tanabe R, Saito A, Sakai H, Kurokawa K. Immunohistochemical evidence for an increased carbonyl modification of peritoneal tissues by autoxidation products of carbohydrates and lipids in CAPD patients. XVth International Congress of Nephrology. in Buenos Aires (Argentina) May 2-6, 1999.
8. Inagi R, Miyata T, Nangaku M, Suzuki D, Wada T, Sakai H, Kurokawa K. Cell type-specific transcriptional regulation of a mesangium- predominant gene, megsin. XVth International Congress of Nephrology. in Buenos Aires (Argentina) May 2-6, 1999.
9. Stein G, Franke S, Vienken J, Ueda Y, Miyata T, Kurokawa K. Changes in serum protein-linked pentosidine levels of esrd patients during polysulfone hemodialysis. XVth International Congress of Nephrology. in Buenos Aires (Argentina) May 2-6, 1999.
10. Miyata T. Carbonyl stress in atherosclerosis, diabetes, and uremia. 4th World Congress on Inflammation. in paris (France) June 27-30, 1999.
11. Miyata T. Advanced glycation and oxidation end products. The 32th Annual Meeting of the American Society of Nephrology. in Florida (USA). November 1-8, 1999.
12. Inagi R, Miyata T, Ahkand AA, Sakai H, Saito A, Nakashima I, Kurokawa K. Glucose-derived carbonyl compounds in PD fluids cross-links mesothelial cell surface proteins for stimulating vascular endothelial growth factor (VEGF) and mitogen-activated protein kinases (MARK). The 32th Annual Meeting of the American Society of Nephrology. in Florida (USA). November 1-8, 1999.
13. Nangaku M, Yamada K, Hori Y, Hanahusa N, Garipey CE, Yanagisawa M, Okubo T, Miyata T, Kurokawa K, Fujita T. Endothelin receptor type B plays an important role in mesangioproliferative glomerulonephritis model in rats. The 32th Annual Meeting of the American Society of Nephrology. in Florida (USA).

- November 1-8, 1999.
14. Ueda Y, Miyata T, Asahi K, Izuhara Y, Inagi R, Nangaku M, Ishibashi Y, Sakai H, Saito A, Kurokawa K. 2-Isopropylidenehydrazono-4-oxo-thiazolidin-5-ylacetanilide (OPB-9195) inhibits the glycooxidation reaction in glucose based peritoneal dialysis fluid. The 32th Annual Meeting of the American Society of Nephrology. in Florida (USA). November 1-8, 1999.
 15. Ueda Y, Miyata T, Izuhara Y, Inagi R, Nangaku M, Ishibashi Y, Sakai H, Saito A, Kurokawa K. Lower carbonyl stress in polyglucose or amino acid PD solutions than in conventional glucose based PD fluids. The 32th Annual Meeting of the American Society of Nephrology. in Florida (USA). November 1-8, 1999.
 16. Izuhara Y, Miyata T, Ueda Y, Suzuki D, Asahi K, Inagi R, Sakai H, Saito A, Kurokawa K. A sensitive and specific ELISA for plasma pentosidine in uremia. The 32th Annual Meeting of the American Society of Nephrology. in Florida (USA). November 1-8, 1999.
 17. Asahi K, Miyata T, Ichimori K, Inagi R, Nakazawa H, Watanabe T, Kurokawa K. Nitric oxide inhibits glycooxidation reaction in uremic serum. The 32th Annual Meeting of the American Society of Nephrology. in Florida (USA). November 1-8, 1999.
 18. Akhand AA, Miyata T, Inagi R, Hossain K, Kato M, Suzuki D, Sakai H, Suzuki H, Nakashima I, Kurokawa K. Carbonyl stress regulates the mitogen-activated protein kinase (MARK) family in human mesangial cells. The 32th Annual Meeting of the American Society of Nephrology. in Florida (USA). November 1-8, 1999.
 19. Akhand AA, Miyata T, Asahi K, Nakashima I, Kurokawa K. Carbonyl stress regulates mitogen-activated protein kinase (MAPK) family in human endothelial cells. The 32th Annual Meeting of the American Society of Nephrology. in Florida (USA). November 1-8, 1999.
 20. Horie K, Miyata T, Devuyt O, Inagi R, Nangaku M, Sakai H, Saito A, Maeda K, Kurokawa K. Immunohistochemical detection of carbonyl stress, vascular endothelial growth factor (VEGF), and endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in peritoneal tissues of peritoneal dialysis patients. The 32th Annual Meeting of the American Society of Nephrology. in Florida (USA). November 1-8, 1999.
 21. Toyoda M, Suzuki D, Umezono T, Mori Y, Takano H, Saotome N, Miyata T, Yagame M, Endoh M, Kurokawa K, Sakai H. Study on increasing of serum creatinine in diabetic ketoacidosis (DKA). The 32th Annual Meeting of the American Society of Nephrology. in Florida (USA). November 1-8, 1999.
 22. Umezono T, Suzuki D, Takano H, Toyoda M, Mori Y, Saotome N, Miyata T, Yagame M, Endoh M, Kurokawa K, Sakai H. Is renal biopsy useful for diabetic patients? The 32th Annual Meeting of the American Society of Nephrology. in Florida (USA). November 1-8, 1999.
 23. Yamada K, Hori Y, Hanafusa N, Nagano N, Okubo T, Miyata T, Couser WG, Kurokawa K, Fujita T, Nangaku M. Clusterin is up-regulated in glomerular mesangial cells in complement-mediated injury. The 32th Annual Meeting of the American Society of Nephrology. in Florida (USA). November 1-8, 1999.
 24. Hori Y, Yamada K, Hanafusa N, Okubo T, Miyata T, Couser WG, Kurokawa K, Fujita T, Nangaku M. In vivo antisense approach revealed a role of crry, a complement regulatory protein, in modulation of renal interstitial disease induced by proteinuria. The 32th Annual Meeting of the American Society of Nephrology. in Florida (USA). November 1-8, 1999.
 25. Miyata T. Reactive carbonyl compounds related uremic toxicity (carbonyl stress). 4th International Congress on Uraemic Toxicity. in Wien (Austria). November 20-23.
 26. 宮田敏男. 進行性糸球体障害への分子学的アプローチ. 第14回新潟腎カンファランス. 1999.2,18. 新潟.
 27. 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・メンブレン/次世代人工腎研究会. 1999.3,13-14. 東京.

28. 旭 浩一, 宮田敏男, 上田裕彦, 和田健彦, 齋藤 明, 黒川 清. 腎不全血中におけるカルボニルストレスの証明. 第 14 回ハイパフォーマンス・メンブレン/次世代人工腎会. 1999.3,13-14. 東京.
29. 和田健彦, 宮田敏男, 齋藤 明, 黒川 清, Charles vanYpersele de Strihou. 透析膜生体適合性がカルボニルストレスに及ぼす影響についての検討. 第 14 回ハイパフォーマンス・メンブレン/次世代人工腎研究会. 1999.3,13-14. 東京.
30. 宮田敏男. 糖、脂質カルボニルストレスによる酸化的蛋白修飾と疾患. 第 5 回東京酸素フォーラム学術集会. 1999.3,12. 東京.
31. 宮田敏男. 透析合併症のメカニズムと新しい治療法への展望. 東京都腎臓病患者連絡協議会第 27 回総会. 1999.4.25.東京.
32. 薦田みのり, 下川 功, 樋上賀一, 堀内正公, 宮田敏男. Advanced glycation end-products のラット組織内沈着-加齢、食餌制限の影響. 基礎老化学会. 1999.6.16-18.京都.
33. 宮田敏男. 腎不全におけるカルボニルストレスについて. 1999.6.21.京都.
34. 上田裕彦, 宮田敏男, 和田健彦, 稲城玲子, 鈴木大輔, 堺 秀人, 齋藤 明, 黒川 清, Jadoul Michel, van Ypersele de Strihou Charles. 透析患者におけるカルボニルストレスと透析膜生体適合性. 第 44 回(社)日本透析学会医学界学術集会・総会. 1999.6.25.横浜.
35. 堀江勝智, 新里高弘, 前田憲志, 宮田敏男, 齋藤明, 黒川清. CAPD 腹膜硬化症の進展における血中カルボニルストレスの関与. 44 回(社)日本透析学会医学界学術集会・総会. 1999.6.26.横浜.
36. 藤田裕司, 宮田敏男, 上田裕彦, 伊豆原優子, 田辺享史, 仁科良, 鈴木大輔, 齋藤 明, 堺 秀人, 黒川 清.

- 腹膜透析におけるカルボニルストレスの生化学的解析(1).第44回(社)日本透析学会医学界学術集会・総会. 1999.6.26.横浜.
37. 田辺享史, 宮田敏男, 上田裕彦, 藤田裕二, 伊豆原優子, 仁科良, 齋藤 明, 堺 秀人, 黒川 清. 腹膜透析におけるカルボニルストレスの生化学的解析(2). 第44回(社)日本透析学会医学界学術集会・総会. 1999.6.26. 横浜.
38. 山本敬, 梅山一大, 正札研一, 平原一郎, 浦上研一, 宮田敏男, 稲城玲子, 黒川 清. 透析膜(CAPD)液由来糖分解産物のラット腹膜組織への影響. 第44回(社)日本透析学会医学界学術集会・総会. 1999.6.26.横浜.
39. 稲城玲子, 宮田敏男, 浦上研一, 山本敬, 鈴木大輔, 堺 秀人, 黒川 清. 腹膜透析(CAPD)液由来糖分解産物による腹膜細胞のVEGF産生能亢進. 第44回(社)日本透析学会医学界学術集会・総会. 1999.6.26.横浜.
40. 旭 浩一, 宮田敏男, 稲城玲子, 渡辺 毅, 黒川 清. Nitric oxide (NO)のadvanced glycation end products (AGEs)生成抑制効果. 第42回日本腎臓学会学術総会. 1999.6.27.横浜.
41. 宮田敏男, 稲城玲子, 黒川 清. 進行性糸球体障害に関与する機能遺伝子群の解析. 第42回日本腎臓学会学術総会. 1999.6.28.横浜.
42. 堀 雄一, 山田耕永, 花房規男, 奥田俊洋, 宮田敏男, 黒川 清, 藤田敏郎, 南学正臣. 蛋白尿によって引き起こされる腎間質障害における補体調節蛋白 Crry の役割. 第42回日本腎臓学会学術総会. 1999.6.28.横浜.
43. 南学正臣, 宮田敏男, 橋本 勉, 和田健彦, 八木幹生, 永野伸郎, 堀 雄一, 稲城玲子, 黒川 清. ラットおよびマウスメグシンのクローニングと動物モデルにおける解析. 第42回日本腎臓学会学術総会. 1999.6.28.横浜.
44. 高野秀雄, 鈴木大輔, 梅園朋也, 豊

- 田雅夫, 五月乙 昇, 宮田敏男, 谷
亀光則, 遠藤正之, 黒川 清, 堺 秀
人. 糖尿病性腎症における腎機能増悪
因子に対する検討. 第 42 回日本腎臓
学会学術総会. 1999.6.28.横浜.
45. 和田健彦, 南学正臣, 宮田敏男, 稲
城玲子, 鈴木大輔, 堺 秀人, 黒川 清.
ヒトメサンギウム細胞優位発現遺伝子
Megsin の高発現系の確立. 第 42 回
日本腎臓学会学術総会. 1999.6.28.
横浜.
46. 稲城玲子, 宮田敏男, 南学正臣, 和
田健彦, 鈴木大輔, 堺 秀人, 黒川 清.
メサンギウム細胞高発現遺伝子
megsin のゲノムクローニング. 第 42
回日本腎臓学会学術総会. 1999.6.28.
横浜.
47. 伊豆原優子, 宮田敏男, 上田裕彦, 稲
城玲子, 鈴木大輔, 堺 秀人, 黒川 清.
ペントシジン特異的 ELISA 法の確立.
第 42 回日本腎臓学会学術総会.
1999.6.28.横浜.
48. 宮田敏男. 第 17 回 お茶の水血液
浄化勉強会. 1999. 9.17.東京.
49. 宮田敏男. 糖・脂質カルボニルスト
レスと代謝・神経疾患. 第 7 回 生
体パーオキシサイド研究会学術講演会.
1999. 9.18.仙台.
50. 宮田敏男, 鈴木大輔, 堺 秀人, 黒
川 清. 糖尿病性糸球体病変とカルボ
ニルストレス. 第 14 回 日本糖尿病
合併症学会. 1999.10.30.滋賀.
51. 宮田敏男, 稲城玲子, 黒川 清. 進
行性糸球体障害に関与する機能遺伝子
群の解析. 第 3 回 腎糸球体カンフ
ァレス. 1999.11.14.岐阜.
52. 宮田敏男. 腎不全とカルボニルスト
レス. 第 15 回神奈川腎研究会合同研
究会. 1999.11.28.横浜.
53. 宮田敏男. 糖尿合併症のメカニズム
と新しい治療法への展望. 全腎協関東
ブロック東京会議. 1999.12. 4.東京.
54. 宮田敏男. 進行性糸球体障害に関与
する機能遺伝子群の解析. 第 4 回病

態分子生物フォーラム. 1999.12.18.
東京.

55. 宮田敏男. 糖尿病合併症とカルボニ
ルストレス. 第16回臨床フリーラ
ジカル会議.2000.2.19. 京都.

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

透析合併症の病因として糖・脂質由来カルボニル化合物による蛋白修飾の亢進（カルボニルストレス）の意義が提唱されている。

本研究ではカルボニルストレス反応経路形成初期段階の Schiff-base 形成や Michael addition が細胞内情報伝達系に及ぼす作用、生体内レドックス制御因子としての nitric oxide (NO)とカルボニルストレスの関連、さらに透析患者臨床指標とカルボニルストレスの関連を検討し、以下の結果を得た。1) 代表的なカルボニル化合物 hydroxynonenal や methylglyoxal が細胞蛋白質との初期反応による特異な経路によって細胞内にシグナルを伝達し、チロシンキナーゼを介して細胞周期を調節したり JNK/c-Jun 経路を介してアポトーシス誘導する。2) NO がカルボニル形成過程で産生されるフリーラジカル形成を抑制することによりカルボニルストレス最終産物の形成を抑制しうる。3)カルボニルストレスの指標血中 pentosidine 値は透析患者の骨ならびに循環器合併症の指標と関連を有する。

以上の結果は腎不全という病態におけるカルボニルストレスの作用機構、制御機構および臨床的意義に関する新知見であり、カルボニルストレスにより惹起される病態の予防・治療法の開発に向けて新しい示唆を与えた。

研究組織

旭 浩一 福島県立医科大学
医学部第三内科

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

A. 研究目的

1) カルボニルストレスの細胞内シグナル伝達機構の解明

糖や脂質に由来する glyoxal、methylglyoxal(MG),hydroxynonenal (HNE)、acrolein 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)がつけられる。

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。

2) 腎不全血管障害合併症におけるカルボニルストレスの病態生理学的意義の解析

カルボニルストレス蛋白修飾最終産物は腎不全でその形成が亢進し、種々の生理活性や組織構築の変化を介して腎不全血管障害の発症・進展に関与することが示唆されている。

腎不全では血管内皮障害、内因性 nitric oxide synthase (NOS) 阻害物質の蓄積などによる nitric oxide (NO) 恒常性の異常が知られており、NO がレドックス制御を介してカルボニルストレス制御に関与している可能性が示唆される。NO のカルボニルストレス制御における役割を検討する。

3) カルボニルストレスと透析患者臨床的指標との関連の検討

カルボニルストレスの腎不全合併症における臨病態生理学的意義を明らかにするため透析患者の臨床的指標との関連を検討する。

B. 研究方法

1) カルボニルストレスの細胞内シグナル伝達機構の解明

HNE や MG を上皮性細胞株 A431 や T 細胞白血病細胞株 Jurkat に試験管内で作用させる。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。また、チロシンキナーゼ活性を試験管内キナーゼアッセイにより測定する。DNAの断裂、細胞膜 annexin-V の結合性、ミトコンドリアの膜電位などを、電気泳動法やレーザーフローサイトメトリーにより測定する。

2) 腎不全血管障害合併症におけるカルボニルストレスの病態生理学的意義の解析

牛血清アルブミン (BSA) と還元糖 (ribose) からなる反応液ならびに非糖尿病血液透析患者血漿を 37℃, 大気下に 3~7 日間, NO 供与体 SNAP ならびにその分解産物 (denatured(d)-SNAP) と孵置した際に形成されるカルボニルストレス蛋白修飾最終産物 pentosidine を HPLC 法で定量した。さらに, 還元糖自動酸化系において形成される炭素中心ラジカル, ヒドロキシルラジカルおよびカルボニル化合物の形成に対する NO 供与体 (SNAP, NOC18) ならびにそれらの分解産物 (d-SNAP, diethylenetriamine ; DT) の作用をそれぞれ ESR スピントラップ法, 安息香酸水酸化反応お

よび Girard T 試薬反応を用いて定量的に評価した。

3) カルボニルストレスと透析患者臨床的指標との関連の検討

透析患者 (血液透析 95 例, CAPD47 例) の循環器系ならびにその他の各種臨床的指標と血中 pentosidine レベルの関連を解析した。

C. 結果と考察

1) カルボニルストレスの細胞内シグナル伝達機構の解明

(1) HNE を A431 細胞に作用させた時に起動する細胞内シグナル伝達のカスケードを解析し以下の成績を得た。①HNE は, A431 細胞の表面に発現する受容体型チロシンキナーゼ EGFR と結合し, EGFR 分子の集合を誘導して EGFR の活性化を誘導した。これに伴って, ②アダプター蛋白である Shc や MAP ファミリーのキナーゼである ERK や JNK が活性化し, ③A431 細胞の増殖が阻害された。④この増殖抑制は EGFR

の特異的阻害剤である AG1478 で阻止され、HNE による細胞の増殖阻害は EGFR の活性化を介するシグナルによっておこることが示された。

(2) HNE や methylglyoxal を Jurkat 細胞に作用させると核 DNA の断片化を伴う細胞死 (アポトーシス) が発生することを示した。このアポトーシス誘導のシグナル伝達経路を解析して以下の結果を得た。

(2-1) HNE を用いた解析の結果 20-50 μ M の HNE を Jurkat 細胞に作用させると DNA 断片化を伴うアポトーシスが導されたが、それに先立って HNE を作用させて3時間後以降にカスパー 8、カスパー 9、カスパー 3 が活性化され、カスパー 3 の基質である PARP の切断が促進された。HNE によるこうしたカスパーの活性化と PARP の切断は、HNE の添加に先立ってリジン、ヒスチジン、シスチンを添加しても阻害されなかったが、システインまたは DTT の添加によって阻止された。このことから、HNE によるアポトーシスシグナルの伝達には細胞内分子の酸化還元 (レドックス)

反応がかかわることが示唆された。

そこで、HNE 添加後の細胞内の還元 (GSH) と酸化型(GSSG)のグルタチオンのレベルを測定したところ、HNE 添加の2時間後にかけて GSH レベルは低下しその後回復傾向を示すこと、さらに、GSSG レベルも増加することなく低下することを見いだした。この成績は HNE が細胞内に入り、GSH と結合してこれを消費することを示唆する。なお、この系におけるアポトーシスの誘導は抗 Fas 抗体などで阻止されないことなどから細胞表面の Fas を介するものではないことも認めた。

(2-2) MG を用いた解析の結果 250-500 μ M の MG を Jurkat 細胞に作用させると DNA 断片化を伴うアポトーシスが作用の6時間後以降に誘導された。アポトーシスを誘導する MG のこの作用に対しては細胞型によって感受性の差異があり、MOLT4, Hela, COS-7 の各細胞株はそうした感受性を持たなかった。MG を Jurkat 細胞に作用させるとカスパー 3 が切断されて活性化し、カスパー 3 の基質である PARP が切

断された。MG によるアポトーシス誘導はカスパーゼ阻害剤である Z-DEVD-fmk により阻害されたことからアポトーシス誘導のシグナル伝達経路にカスパーゼが重要な役割を担うことが示された。

250-500 μM の MG を作用させた Jurkat 細胞では、作用後 30 分から 2 時間後にかけて JNK と p38MAPK のリン酸化と活性化が亢進した。JNK の阻害剤である curcumin (20 μM) で細胞を前処理した後で MG を作用させたところ、JNK の活性化はほぼ完全に抑えられるとともにカスパーゼ 3 の活性化と PARP の断裂が強く抑制された。一方、p38MAPK の阻害剤である SB203580 は MG による PARP の断裂を抑制しなかった。ドミナントネガティブの変異 JNK 分子を発現する Jurkat 細胞を作製して MG を作用させたところ、JNK の下流の c-Jun のリン酸化と活性化が低下し、アポトーシス誘導の指標となる細胞膜の annexin-V 結合性、DNA 断裂、ミトコンドリアの膜電位の低下のレベルがいずれも対照の Jurkat 細胞におけるそれに比べて有

意に低下した。これらの結果から、MG によるアポトーシス誘導のシグナル伝達には JNK がカスパーゼの上流で重要な役割をすると結論された。以上より、HNE や MG は、細胞のチロシンキナーゼを活性化させて細胞周期を調節するシグナルを伝達する一方、JNK/c-Jun 活性化経路を介してミトコンドリアの膜電位低下、カスパーゼの活性化、DNA の断片化を伴う細胞のアポトーシスを誘導するものと考えられる。カルボニル化合物の作用で活性化するチロシンキナーゼと JNK/c-Jun 経路の関係はなお明らかでないが、HNE や MG によるアポトーシス誘導経路には細胞内レドックスレベルの変化がかかわることも示唆された。これらの成績から、カルボニル化合物による細胞傷害と病態形成を予防し治療する方法としてカルボニル基の消去の他に細胞内レドックスレベルやシグナル伝達分子の働きを調整する薬物や遺伝子治療法の開発が有効であることが示唆された。

2) 腎不全血管障害合併症における

カルボニルストレスの病態生理学的 意義の解析

SNAP は BSA ならびに透析患者血漿における pentosidine 形成を濃度依存性に有意に抑制した。この抑制効果は d-SNAP では認められず、NO 捕捉剤である carboxy-PTIO により消去された。また還元糖自動酸化系において NOC18 は DT により亢進する炭素中心ラジカルの形成を有意に抑制した。さらに SNAP ならびに NOC18 はいずれもヒドロキシラジカルおよびカルボニル化合物の形成を有意に抑制し、その抑制率はそれぞれの分解産物に比し有意に大であった。以上より NO 自身が還元糖自動酸化系におけるカルボニル形成過程で産生されるフリーラジカル形成を抑制することにより、結果的にカルボニル化合物による蛋白修飾最終産物の形成を抑制しうることが示された。この作用は糖・脂質由来の種々のカルボニル中間体を含有する腎不全血漿においても認められた。動脈硬化病変局所ならびに腎不全循環における NO 恒常性破綻がカルボニルストレスの亢進を介して血管病

変の進展に関与しうることが示唆された。

3) カルボニルストレスと透析患者 臨床的指標との関連の検討

Pentosidine は血液透析患者において血中 intact PTH ならびに骨型 alkaline phosphatase と有意の負相関を、CAPD 患者において血清 K、収縮期血圧と有意の正相関、血清 Ca と有意の負相関を有していた。また、変数選択重回帰解析（変数減少法：選択変数群；収縮期血圧、脈圧、血清 albumin、性、ヘモグロビン、年齢、透析期間、血清ホモシステイン、コレステロール・中性脂肪積、pentosidine）にて pentosidine は ultrasound cardiography により算出される心筋の mean wall thickness（後壁厚と心室中隔壁厚の平均値；心筋線維化の進行に伴う心筋肥厚を反映；Fagard RH, Hypertension 29 (1997)) の独立変数となることが示された。以上よりカルボニルストレスが透析療法における骨ならびに循環器の合併症の指標と何らかの関連を有することが

おける骨ならびに循環器の合併症の指標と何らかの関連を有することが示唆された。

D. 結論

1) カルボニルストレスの細胞伝達機構の解明

代表的なカルボニル化合物である HNE や MG が細胞蛋白質との初期反応による特異な経路によって細胞内にシグナルを伝達し、チロシンキナーゼを介して細胞周期を調節したり JNK/c-Jun 経路を介してアポトーシス誘導したりすることを明らかにし、カルボニル化合物により惹起される病態の予防・治療法の開発に向けて新しい示唆を与えた。

2) 腎不全血管障害合併症におけるカルボニルストレスの病態生理学的意義の解析

NO によるレドックス制御がカルボニルストレス抑制の手段として有用である可能性が示唆された。

3) カルボニルストレスと透析患者

臨床的指標との関連の検討

本検討をさらに深めカルボニルストレスの臨床的意義を明らかにしてゆく必要がある。

E. 業績

1. 論文発表

1. Nakashima I, Akhand AA, Kato M, Du J, Liu W, Hossain K, Suzuki H, Wu J, Takeda K, Takeuchi K, Yoshihara M. Oxidative stress and signal transduction in the immune system. *Recent Research Development in Immunology* 1999;1: 283-296.
2. Liu W, Akhand AA, Kato M, Yokoyama I, Uchida K, Miyata T, Kurokawa K, Nakashima I. 4-Hydroxynonenal triggers epidermal growth factor receptor-linked signal pathway for growth inhibition. *J. Cell Science* 1999;112: 2409-2417.
3. Nakashima I, Akhand AA, Pu M, Kato M, Hamaguchi M, Senga T, Miyata T, Suzuki H, Parashah A, Du J, Liu W, Umeda Y. 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., New York. 1999; 177-204.
4. Akhand AA, Kato M, Suzuki H, Liu W, Du J, Hamaguchi M, Miyata T, Kurokawa K, Nakashima I. Carbonyl compounds cross-link cellular proteins and activate protein-tyrosine kinase p60c-src. *J. Cell. Biochem.* 1999; 72:1-7.
5. 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.* 1999; 14: 576-580.

6. Miyata T, Ueda Y, Asahi K, Izuhara Y, Inagi R, Saito A, van Ypersele de Strihou C, Kurokawa K. Mechanism of the inhibitor effect of 2-isopropylidenehydrazono-4-oxo-thiazolidin-5-ylacetanilide (OPB-9195) on AGE and ALE formation. *J. Am. Soc. Nephrol.* (in press)
7. Asahi K, Ichimori K, Nakazawa H, Miyata T, Izuhara Y, Watanabe T, Kurokawa K. Nitric oxide inhibits the formation of advanced glycation end products. *Kidney Int.* (in press)
8. Du J, Suzuki H, Nagase F, Akhand AA, Yokoyama T, Miyata T, Kurokawa K, Nakashima I. Methylglyoxal induces apoptosis in Jurkat leukemia T-cells by activating c-Jun N-terminal kinase. *J. Cell. Biochem.*(in press)
9. Liu W, Kato M, Akhand AA, Hayakawa A, Suzuki H, Miyata T, Kurokawa K, Hotta Y, Ishikawa N, Nakashima I. 4-Hydroxynonenal induces Fas-independent redox-related activation of caspase-3. *J. Cell.Sci.*(in press.)
10. 中島 泉. 新たなアポトーシス誘導因子(AIF)の発見. 特集II「アポトーシスの新たな動向」臨床免疫 32 (4):417-425, 1999.
11. 中島 泉. 酸化ストレスとシグナル伝達. 「生体応答学の新展開」. 医学部のあゆみ別冊、77-82, 1999.
12. 中島 泉. 環境応答と非レセプター型チロシンキナーゼ 蛋白質、核酸、酵素. 増刊「環境応答・適応の分子機構」 44 (15): 2420-2426, 1999.
13. 宮田敏男, 旭 浩一. 内科系疾患とカルボニルストレス. 日本内科学会雑誌 1999;88: 153-160.
14. 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. 1999;26: 21-27.
15. 旭 浩一, 宮田敏男. 透析と酸化ストレス 丸茂文昭, 秋葉 隆編 透析療法 new wave. 東京, 中外医学社 1999;52-59.
16. 旭 浩一, 宮田敏男, 上田裕彦, 黒川 清. 腎不全血中におけるカルボニルストレスの証明. 腎と透析. 1999;47 (suppl): 196-199.
2. 学会発表
1. Akhand AA, Miyata T, Inagi R, Hossain K, Kato M, Suzuki D, Sakai H, Suzuki H, Nakashima I, Kurokawa K. Carbonyl stress

- regulates the mitogen-activated protein kinase (MAPK) family in human mesangial cells. 32nd Annual Meeting and 1999 Renal Week. Miami Beach, Florida, November 1-8, 1999.
2. Inagi R, Miyata T, Akhand AA, Sakai H, Saito A, Nakashima I, Kurokawa K. Glucose-derived carbonyl compounds in PD fluids cross-links mesothelial cell surface proteins for stimulating vascular endothelial growth factor (VEGF) and mitogen-activated protein kinases (MAPK). 32nd Annual Meeting and 1999 Renal Week. Miami Beach, Florida, November 1-8, 1999.
 3. Akhand AA, Pu M, Senga T, Kato M, Suzuki H, Miyata T, Hamaguchi M, Nakashima I. Nitric oxide controls Src kinase activity through a redox reaction-mediated Tyr527-independent and Tyr416-linked mechanism. International Symposium for Oxidative stress, Redox Regulation and Signal Transduction; Clinical Implications. Kyodai Kaikan, Kyoto, November 4-6, 1999.
 4. Liu W, Kato M, Akhand AA, Suzuki H, Nakashima I. 4-hydroxynonenal induces Fas-independent redox-related activation of caspase-3. International Symposium for Oxidative stress, Redox Regulation and Signal Transduction; Clinical Implications. Kyodai Kaikan, Kyoto, November 4-6, 1999.
 5. Asahi K, Miyata T, Akhand AA, Uragami K, Saito A, Nakashima I, Kurokawa K. Carbonyl stress in CAPD peritoneum modifies mesothelial cell surface proteins for activating vascular endothelial growth factor (VEGF) expression and intracellular protein-tyrosine phosphorylation. 19th Annual Conference on Peritoneal Dialysis, Feb. 28-Mar. 2, 1999, Charlotte, NC, USA
 6. Nishina M, Miyata T, Horie K, Hirano H, Asahi K, Tanabe R, Saito A, Sakai H, Kurokawa K. Immunohistochemical Evidence for an Increased Carbonyl Modification of Peritoneal Tissues by Autoxidation Products of Carbohydrates and Lipids in CAPD Patients. 19th Annual Conference on Peritoneal Dialysis, Feb. 28-Mar. 2, 1999, Charlotte, NC, USA
 7. Tanabe R, Miyata T, Fujita Y, Asahi K, Nishina M, Saito A, Sakai H, Kurokawa K. Accumulation of Carbonyl Compounds Modifying Peritoneal Tissue and Cellular Proteins (Carbonyl Stress) in CAPD Patients. 19th Annual Conference on Peritoneal Dialysis, Feb. 28-Mar. 2, 1999, Charlotte, NC, USA.
 8. Ueda Y, Miyata T, Asahi K, Izuhara Y, Inagi R, Nangaku M, Ishibashi Y, Sakai H, Saito A, Kurokawa K. 2-Isopropylidenehydrazono-4-oxo-thiazolidin-5-ylacetanilide(OPB-9195) inhibits the glycoxidation reaction in glucose based peritoneal dialysis fluid. 32nd Annual meeting of American Society of Nephrology, November 5-8 1999, Miami Beach, FL, USA.
 9. Asahi K, Miyata T, Ichimori K, Inagi R, Nakazawa H, Watanabe T, Kurokawa K. Nitric oxide inhibits glycoxidation reaction in uremic serum. 32nd Annual meeting of American Society of Nephrology, November 5-8 1999, Miami Beach, FL, USA
 10. Izuhara Y, Miyata T, Ueda Y, Suzuki D, Asahi K, Inagi R, Sakai H, Saito A, Kurokawa K. A sensitive and specific ELISA for plasma pentosidine in uremia. 32nd Annual meeting of American Society of Nephrology, November 5-8 1999, Miami Beach, FL, USA.
 11. Akhand AA, Miyata T, Asahi K, Nakashima I, Kurokawa K. Carbonyl stress regulates mitogen-activated protein kinase (MAPK) family in human endothelial cells. 32nd Annual meeting of American Society of Nephrology, November 5-8 1999, Miami Beach, FL, USA.
 12. Akhand AA, Hossain K, 加藤昌志、杜軍、鈴木治彦、宮田敏男、中島泉. ヒト内皮細胞 MAP キナーゼ活性のカルボニルストレスによる調節. 日本免疫学会総会 1999.12.1-3. 京都.

学術総会. 1999.6.26-28. 横浜.

13. 竹内啓、加藤昌志、Akhand AA, 吉原基、武田湖州江、Hossain K, 中島泉. アクロレインは、ヒトケラチノサイトのアポトーシスを誘導する. 日本免疫学会総会日本免疫学会総会. 1999.12.1-3. 京都.

14. 杜軍、鈴木治彦、長瀬文彦、Akhand AA, 横山稔厚、中島泉. Methylglyoxal により誘導されるアポトーシスのメカニズム. 日本免疫学会総会 1999.12.1-3. 京都.

15. 旭 浩一, 市川幸延. 慢性関節リウマチにおける糖酸化最終産物ペントシジンの臨床的意義第 43 回日本リウマチ学会総会. 1999 6.3. 札幌.

16. 旭 浩一, 宮田敏男, 稲城玲子, 渡辺 毅, 黒川 清. Nitric oxide(NO) の advanced glycation end products(AGEs) 抑制効果. 第 42 回日本腎臓学会