

研究組織
研究協力者

稲城 玲子
東海大学総合医学研究所 講師

A. 研究目的

蛋白は糖により非酵素のおよび不可逆的反應を受けて advanced glycation end products (AGE)などの修飾物を形成する。AGEs は当初、血糖の高い糖尿病で展開されてきたが、今では腎不全、動脈硬化、アルツハイマー病、関節リウマチなどの疾患においても研究が行われている。腎不全患者では、糖化ストレス、酸化ストレス、カルボニル消去系の低下に伴い、糖・脂質から生成したカルボニル化合物が蛋白を傷害し AGEs/ ALEs が蓄積している。さらに、血管内皮細胞由来の reactive nitrogen species や単球・マクロファージ由来の reactive oxygen species も蛋白を傷害し、それぞれに特有の蛋白修飾物(3-nitrotyrosine, 3-chlorotyrosine, o-tyrosine, m-tyrosine, dityrosine)を形成することが明らかとなっており、腎不全におけるこのような様々な蛋白修飾物の解析は、病態の生化学的背景を把握し理解を深めるのに有効である。現在、我々はカルボニルストレスの軽減、糖・脂質さらには reactive nitrogen / oxygen species による蛋白傷害を阻害する治療薬の開発を目指している

B. 研究方法

1. カルボニル捕捉ビーズの開発

様々な化合物を市販のアフィニティビーズにカップリングさせ、カルボニルトラップビーズを作製し、腹膜透析液中の RCOs(グリオキサール、メチルグリオキサール、3-デオキシグルコソ、ホルムアルデヒド、アセトアルデヒド、5-ヒドロキシメチルフルフラール、及びフルフラール)吸着効果について検討を行った。RCOs の測定は o-フェニレンジアミン又は DNPH にて誘導体化した後、高速液体クロマトグラフィーを用いて行った。さらに、透析液に対するカルボニルトラップビーズの影響を明らかにするため、グルコース濃度、pH、電解質濃度も測定した。また、A431 細胞を用い、培養液中に条件の異なる腹膜透析液を添加、MTT アッセイによって生物学的適合性の検討を行った。

2. glyoxalase I トランスジェニックマウスの樹立と解析

ヒト glyoxalase I 遺伝子をクローニングし、これをマウス卵に注入し、偽妊娠マウスの卵管に入れ、トランスジェニックマウスを作成した。

外来遺伝子の発現をPCRおよびジェノミックサザンブロットで調べた。外来遺伝子産物の発現は、ウエスタンブロットおよび免疫組織学的手法により、調べた。外来遺伝子産物の生物学的活性については、組織抽出物の glyoxalase 活性およびカルボニル化合物代謝能を調べた。

3. AGE 阻害剤のスクリーニング方法の確立と、その奏功メカニズムの解析

我々は、これまでの AGE 阻害剤の評

価方法を物理的測定法から蛋白修飾物に特異的な化学的定量法に注目し、これら修飾物を蛋白傷害の surrogate marker として既存の化合物の再評価を試みた。AGEs の代表的な構造体であるペントシジンやカルボキシメチルリジンの定量は、最終産物であるAGEを評価するには有用な marker である。しかし、AGE が様々な物質から複数の過程を経て形成される事を考慮し、カルボニル化合物のみならず自動酸化で発生するラジカルに対する捕捉作用の検討も行った。

C. 結果と考察

1. カルボニル捕捉ビーズの開発

カルボニルトラップビーズ作製にあたり、液相反応にて熱滅菌透析液中の RCOs と反応性の高い化合物を検討したところ、ジアミノグアニジン、L-システイン、3,4-ジアミノ安息香酸が特に反応性が高いことが示された。これら化合物をリガンド化合物として、エポキシ法又はアミノ法にてカップリング反応させ、アフィニティビーズに導入した。得られたカップリングビーズを透析液に添加し、固相反応した結果、化合物 X (特許における都合により) をカップリングしたビーズを用いた時に、残存するアセトアルデヒドは 4%、メチルグリオキサールは 1%、その他の RCOs もほぼトラップしていることが示され、最良の結果を得ることができた。液相反応と異なる結果であったのは、固相化した時の化学構造の違いによるものであると思われる。さらに、X ビーズ存在下、非存在

下による、透析液中の組成の変化を比較したところ、グルコース濃度、電解質 (Na^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Cl^-) においては全く変化が見られなかったが、pH のみ中性付近に補正されていた。この結果より、従来の透析液で危惧されていた低 pH による腹膜の影響をも改善できる可能性が示唆された。細胞毒性についても検討した。A431 細胞培養中に従来の熱滅菌透析液、これと同組成のフィルター滅菌透析液、X ビーズ処理後の透析液をそれぞれ添加し、バイアビリティを比較した。結果、熱滅菌透析液を加えたものは細胞育成阻害が顕著に見られたのに対し、X ビーズを使用することによってフィルター滅菌透析液と同等までバイアビリティを回復できることが認められた。以上、X ビーズは、従来の透析液に存在する様々な RCOs を吸着することができ、生物学的適合性の向上も確認された。実用化を視野に入れ、1L の透析液中 RCOs を完全にトラップするために必要な X ビーズ量を検討した場合、メチルグリオキサールにおいては、1g 程度でトラップ可能であり、実用化の可能な範囲であると思われる。しかし、他の RCOs の吸着効率を考慮に入れると、更なるビーズ量が必要になることが予想され、リガンドの結合量やビーズの球状・面積等を検討する必要がある。将来的には便利で、即導入可能なカラムデバイスやメンブレンに応用することを考えている。また、X ビーズは 121°C、20 分のオートクレーブでも分離しないことから透析バック中に直接入れることも可能である。

2. glyoxalase I トランスジェニックマウスの樹立と解析

15匹のトランスジェニックマウスが得られ、そのうち2ラインについて解析を行った。これらのマウスは、正常の発育をとげ、行動異常、血液検査の異常、尿検査の異常などを認めなかった。

いずれのラインにおいても、glyoxalase I が様々な臓器に高発現していた。これらの臓器抽出物は高いglyoxalase 活性を示し、*in vitro* のアッセイ系においてグリオキサール、メチルグリオキサールを効率よく代謝した。

3. AGE 阻害剤のスクリーニング方法の確立と、その奏功メカニズムの解析

AGEs/ALEs は RCO と蛋白の carbonyl amino chemistry により生成される。それゆえ、化学的にこれらを補足する化合物を用いることによりカルボニルストレスを軽減できる可能性が考えられる。このような化合物にはヒドラジン基を有するアミノグアニジンや 2-isopropylidenehydrazono-4-oxo-thiazolidin-5-ylacetanilide (OPB-9195) が挙げられる。*In vitro* での検討で、これら化合物は RCO であるメチルグリオキサールやグリオキサールを効率よく捕捉する。さらに、動物モデルにおいてもその有効性が確認されている。このようにアミノグアニジンや OPB-9195 に代表される第一世代の AGE 阻害剤は効率よく AGEs/ALEs の形成を阻害するが、カルボニル化合物に対する特異性が高くなく、総てのカ

ルボニル化合物に反応する。生体にとって有害な糖・脂質由来 RCO のみならず生体にとって必要なピリドキサールなどのカルボニル基も捕捉してしまうなどの重大な副作用を有している。このため臨床試験は実現していない。我々は、これまでの AGE 阻害剤の評価方法を物理的測定法から蛋白修飾物に特異的な化学的定量法に注目し、これら修飾物を蛋白傷害の surrogate marker として既存の化合物の再評価を *in vitro* において試みた結果、副作用の極めて少ない有用な AGE 阻害剤のスクリーニングを可能とした。興味あることに、これら同定された化合物(第二世代 AGE 阻害剤)は第一世代の AGE 阻害剤とは全く作用機序が異なり、AGEs/ALEs の前駆体であるカルボニル補足作用が主ではなかった。様々な自動酸化により発生するラジカルの消去あるいは遷移金属イオンをキレートする作用を有し、糖・脂質からのカルボニル化合物の形成を効率よく阻害した。

D. 結論

カルボニルトラップピーズを用いて処理された透析液は、従来の透析液より生物学的適合性の向上が認められ、腹膜機能低下の改善に有効であることが示唆された。本研究によって、グルコースベース透析液のデメリットをカバーすることによる一つの戦略として、CAPD 療法の新しい試みによる提案と更なる可能性を大いに見出したものになった。今後、この研究成果を安全に

臨床へフィードバックできるようさらなる検討を続ける。

Glyoxalase 過剰発現マウスの樹立と解析により、生体が本来備えているカルボニル消去システムの高発現が、カルボニルストレスに対して有効な対策となりうることを示された。これの、応用研究は今後の課題である。

高感度であり特異的な化学的定量法は、AGE 阻害に有益な薬剤の評価を可能とした。このような薬剤の開発は、糖尿病合併症、動脈硬化、腎不全合併症など種々な病態の進展を阻害する新しい抗酸化治療への展開が期待される。

以上の研究成果は長期透析合併症としての血管病変、腹膜病変、骨関節病変などの病態形成機序を理解し、これに対する新規治療法を開発する上で重要である。また、これらの新しいカルボニルストレスをターゲットとした治療法の開発により、腎不全合併症のみならず、糖尿病合併症、動脈硬化などの種々の病態の進展を阻害する新しい抗酸化治療への展開が期待される。

[原著・総説] -国外-

1. Takeda A, Wakui M, Hisayoshi N, Dei R, Yamamoto M, Li M, Goto Y, Yasuda T, Nakagomi Y, Watanabe M, Inagaki T, Yasuda Y, Miyata T, Sobue G. Neuronal and glial advanced glycation end product [N ϵ -(carboxymethyl)lysine] in Alzheimer's disease brains. **Acta Neuropathol** 2001; 101: 27-35.
2. Hou FF, Miyata T, Boyce J, Chertow GM, Kay J, Schmidt M, Owen WF. β 2-Microglobulin modified with advanced glycation end products delays monocyte apoptosis and induces differentiation into macrophage-like cells. **Kidney Int** 2001; 59: 990-1002.
3. Miyata T, Kurokawa. Alterations in nonenzymatic biochemistry of carbohydrates and lipids in uremia. **Massry and Glassock's Text Book of Nephrology** 2001; 68: 1275-1278.
4. Miyata T, Saito A, Kurokawa K. Reactive carbonyl compound-related uremic toxicity (carbonyl stress). **Kidney Int** 2001; 59 [Suppl 78]: 25-31.
5. Ueda Y, Miyata T, Goffin E, Yoshino A, Inagi R, Izuhara Y, Saito A, Kurokawa K, van Ypersele de Strihou C. Does removal of glucose lower the carbonyl stress of glucose containing peritoneal dialysis?: effect of dwell time on icodextrin and amino acid PD fluids. **Kidney Int** 2001; 58: 2518-2524.
6. Yamada K, Hori Y, Hanafusa N, Okuda T, Nagano N, Miura NHC, Couser WG, Miyata T, Kurokawa K, Fujita T, Nangaku M. Clusterin is up-regulated in glomerular

- mesangial cells in complement-mediated injury. **Kidney Int** 2001; 59: 137-146.
7. Miyata T, Akhand AA, Kurokawa K, Nakashima I. Reactive carbonyl compounds as uremic toxins. **Contrib Nephrol** 2001; 133: 71-80.
 8. Miyata T, Saito A, Kurokawa K, van Ypersele de Strihou C. Advanced glycation and lipoxidation end products: reactive carbonyl compounds-related uraemic toxicity. **Nephrol Dial Transplant** 2001; 16 [Suppl 4]: 8-11.
 9. Shao J, Miyata T, Yamada K, Hanafusa N, Wada T, Gordon Katherine L, Inage R, Kurokawa K, Fujita T, Johnson R J, Nangaku M. Protective role of nitric oxide in a model of thrombotic microangiopathy in rats. **J Am Soc Nephrol** 2001; 12: 2088-2097.
 10. Suzuki D, Miyata T, Kurokawa K. Carbonyl Stress, Type-2 diabetic nephropathy in Japan from bench to bedside. **Contributions to Nephrology** 2001; 13: 36-45.
 11. Combet S, Ferrier ML, Landschoot M, Stoeniu M, Moulin P, Miyata T, Lameire N, Devuyst O. Chronic uremia induces permeability changes, increased nitric oxide synthase expression, and structural modifications in the peritoneum. **J Am Soc Nephrol** 2001; 12: 2146-2157.
 12. Akhand AA, Hossain K, Kato M, Miyata T, Du J, Suzuki H, Kurokawa K, Nakashima I. Glyoxal and methylglyoxal induce aggregation and inactivation of ERK in human endothelial cells. **Free Radic Biol Med** 2001; 15: 1228-1235.
 13. Miyata T, van Ypersele de Strihou C, Imasawa T, Yoshino A, Ueda Y, Ogura H, Kominami K, Inagi R, Nangaku M, Kurokawa K. Glyoxalase I deficiency is associated with an unusual level of advanced glycation end products in a hemodialysis patient. **Kidney Int** 2001; 60: 2351-2359.
 14. Chen J, Li H, Hampel DJ, Brodsky S, Miyata T, Weinstein T, Gafter U, Norman J, Fine L, Goligorsky MS. Delayed branching of endothelial capillary cords in glycated collagens is mediated by the early induction of PAI-1. **Am J Physiol** 2001; 281: 71-81.
 15. Morimoto K, Ohta K, Yachie A, Yang Y, Shimizu M, Goto C, Toma T, Kasahara Y, Yokohama H, Miyata T, Seki H, Koizumi S. Cytoprotective role of heme oxygenase

- (HO)-1 in human kidney with various renal diseases. **Kidney Int** 2001; 60: 1858-1866.
16. Miyata T, Devuyst O, Kurokawa K, van Ypersele de Strihou C. Towards better dialysis compatibility: Advances in the biochemistry and pathophysiology of the peritoneal membranes. **Kidney Int** 2002; 61: 375-386
 17. Kurokawa K, Nangaku M, Saito A, Inagi R, Miyata T. Current issues and future perspectives of chronic renal failure. **J Am Soc Nephrol** "in press"
 18. Miyata T, Kurokawa K, van Ypersele de Strihou C. "Carbonyl Stress" and long-term uremic complications. **Advanced in Nephrology** "in press"
 19. Kurokawa K, Nangaku M, Saito A, Inagi R, Miyata T. Future perspectives of chronic renal failure. **Am J Kidney Dis** "in press"
 20. Nangaku M, Miyata T, Kurokawa K. Relevance of oxidative and carbonyl stress in uremia. **Forum Issue of ARS** "in press"
 21. Ishibashi Y, Sugimoto T, Akatsuka A, Miyata T, Nangaku M, Tagawa H, Kurokawa K. Glucose dialysate induces mitochondrial DNA damage in peritoneal mesothelial cells. **Prit Dial Int** "in press"
 22. Asano M, Fujita Y, Ueda Y, Suzuki D, Miyata T, Sakai H, Saito A. Renal tubular metabolism of protein-linked pentoisidine, an advanced glycation end product. **Nephron** "in press"
 23. Miyata T, Kurokawa K. Carbonyl stress in uremia. **Nutritional Management of Renal Disease, 2nd Edition**, edited by Kopple JD and Massry SG. "in press"
 24. Inagi R, Miyata T, Ueda Y, Yoshino A, Ishibashi Y, van Ypersele de Strihou C, Kurokawa K. Efficient detoxification of carbonyl stress by the gloxalase system in peritoneal dialysis. **Kidney Int** "in press"
 25. Miyata T, van Ypersele de Strihou C, Ueda, Ichimori K, Inagi R, Izuhara Y, Onogi H, Nangaku M, Kurokawa K. Angiotensine II receptor antagonist and angiotensine converting enzyme (ACE) inhibitor scavenge oxidative radicals and lower the formation of advanced glycation end products. **J Am Soc Nephrol** "in press"
 26. Panuccio V, Mallamaci F, Tripepi G, Asahi K, Miyata T, Zoccali C. Low bone turnover and pentoisidine in hemodialysis patients.

27. Dei R, Takeda A, Niwa H, Li M, Nakagomi Y, Watanabe M, Inagaki T, Washimi Y, Yasuda Y, Horie K, Miyata T, Sobue G. Lipid peroxidation and advanced glycation endproducts in the brain in normal aging and in alzheimer's disease.
- [原著・総説] -国内-
1. 伊豆原優子, 宮田敏男, 上田裕彦, 石橋由孝, 稲城玲子, 斉藤明, 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. 腹膜透析 2000 . 2000;49:146-148.
 2. 上田裕彦, 宮田敏男, 伊豆原優子, 石橋由孝, 稲城玲子, 斉藤明, 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. 腹膜透析 2000 . 2000;49:148-152.
 3. 稲城玲子, 宮田敏男. 血管傷害進展における AGEs 形成の意義、及びその制御法の検討. 代謝異常治療基金研究業績集.2000;27:30-35.
 4. 宮田敏男, 黒川清. カルボニルストレス. Diabetes Frontier. 2000;11:661-666.
 5. 宮田敏男. 腎不全・糖尿病・動脈硬化における糖・脂質由来反応性カルボニル化合物による異常蛋白修飾とその病態生理学的意義の解明-腎不全におけるカルボニルストレスの意義- 上原記念生命科学財団研究報告書集. 2001;14:388-392.
 6. 稲城玲子, 宮田敏男, 黒川清. 糖・脂質カルボニルストレスと透析アミロイドーシス. 腎と骨代謝. 2001;14:23-29.
 7. 宮田敏男, 南学 正臣, 黒川清. 糖尿病性血管合併症の予防と治療の進歩. Porgress in Medicine. 2001 ; 21 : 2161-2166.
 8. 宮田敏男. 腹膜における糖化と脂質過酸化の進展:血清および腹膜透析液が反応性カルボニル化合物の生成に果たす役割. Melissa Nephrology & Dialysis. 2002 ; 13 : 8
 9. 宮田敏男, 黒川清. 腎不全進展とカルボニルストレス. 中外医学社. 印刷中.
 10. 宮田敏男, 石橋由孝, 黒川清. AGE化 β 2ミクログロブリン. 東京医学社. 印刷中.
 11. 宮田敏男. 糖尿病合併症とカルボニルストレス. フリーラジカルの臨床. 印刷中.
 12. 宮田敏男. AGEおよび尿毒物質. 透析患者の検査値の読み方. 印刷中.
 13. 宮田敏男, 稲城 玲子, 黒川 清. 腎不全合併症とカルボニルストレス Vitamine E membrane 研究会. 印刷中.
 14. 宮田敏男, 伊豆原 優子. カルボニルストレスと糖尿病性腎障害. 内分泌・糖尿病科. 印刷中
 15. 宮田敏男, 黒川 清, 稲城玲子. 腎臓病研究施設紹介. Nephrology Frontier. 印刷中.

[学会発表] -国外-

1. Miyata T, Saito A, Kurokawa K. Involvement of carbonyl stress in the development of dialysis-related amyloidosis. **The 19th Annual Meeting of the International Society of Blood Purification.** in Tokyo (Japan) September 7-9, 2001. (invited)
2. Miyata T, Kurokawa K. Therapeutic insights to progressive, irreversible protein modifications in diabetic nephropathy. **The Annual Meeting of the Chinese Society of Nephrology.** in Wuhan (China) September 7-10, 2001. (invited)
3. Miyata T. Genomic drug discovery for glomerular disease. **The Annual Meeting of the Chinese Society of Nephrology.** in Wuhan (China) September 7-10, 2001. (invited)
4. Miyata T. Molecular approaches to glomerular disease. **First Military Medical University** in Guangzhou (China) September 11, 2001. (invited)
5. Inagi R, Miyata T, Ueda T, Nangaku M, van Ypersele de Strihou C, Kurokawa K. Efficient lowering of carbonyl stress by the glyoxalase system in peritoneal dialysis. **ASN/ISN World Congress of Nephrology.** in San Francisco (USA) October 12-19, 2001.
6. Imasawa T, Miyata T, van Ypersele de Strihou C, Ueda Y, Inagi R, Nangaku M, Kurokawa K. Glyoxalase I deficiency is associated with an unusual level of advanced glycation end products. **ASN/ISN World Congress of Nephrology.** in San Francisco (USA). October 12-19, 2001.
7. Ishibashi Y, Sugimoto T, Ichikawa Y, Akatsuka A, Nangaku M, Miyata T, Tagawa H, Kurokawa K. Glucose dialysate induces oxidative mitochondrial DNA damage in peritoneal mesothelial. **ASN/ISN World Congress of Nephrology.** in San Francisco (USA). October 12-19, 2001.
8. Miyata T, Inagi R, Izuhara Y, Nangaku M, Kurokawa K, Uchida K. Immunohistochemical evidence for an increased oxidative stress and carbonyl modification of proteins in diabetic glomerular lesions. **The 7th International Symposium on the Maillard Reaction.** in Kumamoto (Japan). October 29-November 1, 2001.
9. Inagi R, Akhand A, Miyata T, Kurokawa K, Nakashima I.

- AGE precursor-mediated signaling for MAP family kinases and caspase activation in human endothelial cells . **The 7th International Symposium on the Maillard Reaction.** in Kumamoto (Japan). October 29-November 1, 2001.
10. Inagi R, Miyata T, Ueda Y, Nangaku M, van Ypersele de Strihou C, Kurokawa K. Efficient lowering of carbonyl stress by the glyoxalase system in peritoneal dialysis. **The 7th International Symposium on the Maillard Reaction.** in Kumamoto (Japan). October 29-November 1, 2001.
 11. Nangaku M, Miyata T, Imasawa T, Ueda Y, Inagi R, Kurokawa K. Glyoxalase I deficiency is associated with an unusual level of advanced glycation end products in a hemodialysis patient. **The 7th International Symposium on the Maillard Reaction.** in Kumamoto (Japan). October 29-November 1, 2001.
 12. Ichimori K, Miyata T, Izuhara Y, Kurokawa K, Nakazawa H. Nitric oxide inhibits the formation of advanced glycation end products. **The 7th International Symposium on the Maillard Reaction.** in Kumamoto (Japan). October 29-November 1, 2001.
 13. Ueda Y, Miyata T, Izuhara Y, Inagi R, Tatsumi K, van Ypersele de Strihou C, Nangaku M, Kurokawa K. Mechanism of the inhibitory effect of 2-isopropylidenehydrazono-4-oxo-thiazolidin-5-ylacetanilide (OPB-9195) on advanced glycation end product and advanced lipoxidation end product formation. **The 7th International Symposium on the Maillard Reaction.** in Kumamoto (Japan). October 29-November 1, 2001.
 14. Ueda Y, Miyata T, Ishikawa S, Inagi R, Nangaku M, Tatsumi K, Kurokawa K. 2-Isopropylidenehydrazono-4-oxo-thiazolidin-5-ylacetanilide (OPB-9195) inhibits the neointima proliferation of rat carotid artery following balloon injury. **The 7th International Symposium on the Maillard Reaction.** in Kumamoto (Japan). October 29-November 1, 2001.
 15. Izuhara Y, Miyata T, Ueda Y, Kurokawa K. Accumulation of carbonyls accelerated the formation of two advanced glycation end products: carbonyl stress in uremia. **The 7th International Symposium on the Maillard Reaction.** in Kumamoto (Japan). October

29-November 1, 2001.

16. Miyata T, Ueda Y, Kurokawa K. Alterations of non-enzymatic biochemistry in diabetic nephropathy ("Carbonyl stress"). **The 7th International Symposium on the Maillard Reaction.** in Shiga (Japan). October 29-November 1, 2001.

[学会発表] -国内-

11. 潮下 敬, 宮崎正信, 宮田敏男, 大園恵幸, 原田孝司, 田口 尚, 小路武彦, 黒川 清, 河野 茂. 腹膜炎の既往のない CAPD 患者腹膜における HSP47 の発現. 第 45 回(社)日本透析学会医学会学術集会・総会. 2000.6.16-18. 福岡.
12. 宮田敏男, 黒川 清. 糖尿病性血管障害とカルボニルストレス. 第 5 回 Vascular Medicine 学会. 2000.7.7-8. 東京.
13. 宮田敏男, 稲城玲子. カルボニルストレスと血管障害. 第 2 回 **Cardio Vascular Research Forum CVRF**). 講演.
14. 宮田敏男. 腎不全と糖・脂質カルボニルストレス. 第 18 回鹿児島県人工透析研究会. 特別講演 2001.2.18. 鹿児島.
15. 宮田敏男, 稲城玲子. 動脈硬化における糖・脂質由来反応性カルボニル化合物による異常蛋白修飾とその病態生理学的意義:カルボニルストレス概念に基づく新規治療薬の開発.

第 12 回小野医学研究財団フォーラム療研究会. 2001.3.10. 千里ライフサイエンスセンター.

16. 宮田敏男, 斉藤 明, 堺 秀人, 黒川 清. 腹腔内カルボニルストレスとその関与. 第 43 回日本腎臓学会学術総会. ワークショップ. 2001.5.27-5.29. 東京.
17. 稲城 玲子, 宮田敏男, Akhand AA, 斉藤 明, 中島 泉, 黒川 清. 糖・脂質由来カルボニル化合物による血管内皮細胞シグナリング. 第 43 回日本腎臓学会学術総会. 講演. 2001.5.27-5.29. 東京.
18. 上田裕彦, 宮田敏男, 稲城玲子, 吉野 淳, 斉藤 明, 黒川 清. 腹膜透析における腹腔内カルボニルストレスの制御に対するグリオキサラーゼ消去系の検討. 第 43 回日本腎臓学会学術総会. 講演. 2001.5.27-5.29. 東京.
19. 吉野 淳, 宮田敏男, 小倉裕幸, 上田裕彦, 稲城玲子, 伊豆原優子, 南学正臣, 斉藤 明, 黒川 清. 透析患者におけるカルボニル消去系の検討. 第 43 回日本腎臓学会学術総会. 講演. 2001.5.27-5.29. 東京.
20. 北内誉敬, 吉田克法, 富岡厚志, 宮本 賀, 吉川元祥, 米田龍生, 石橋道男, 大園誠一郎, 岡島英五郎, 平尾佳彦, 宮田敏男, 黒川 清. 血液透析患者における血中ペントシジン測定の見直し. 第 43 回日本腎臓学会学術総会. 講演.

- 2001.5.27～5.29. 東京.
21. 邵 菁, 南学正臣, 曾我部肇, 山田耕永, 花房規男, 和田健彦, 稲城玲子, 黒川 清, RichardJohnson, 藤田敏郎. Thrombotic microangiopathy モデルにおける eNOS の保護作用. 第 43 回日本腎臓学会学術総会. 講演. 2001.5.27～5.29. 東京.
 22. 宮田敏男, 斎藤 明, 堺 秀人, 黒川 清. 腎不全とカルボニルストレス. 第 46 回(社)日本透析学会医学会学術集会・総会. シンポジウム. 2001.6.22～24.大阪.
 23. 宮田敏男. 透析患者におけるカルボニルストレス(オーバービュー). 第 46 回(社)日本透析学会医学会学術集会・総会. ワークショップ. 2001.6.22～24.大阪.
 24. 稲城玲子, 宮田敏男, 山本敬, 浦上研一, 吉野 淳, 上田裕彦, 斎藤 明, 黒川 清. methylglyoxal による腹膜中皮細胞の VEGF 産生亢進に対するカルボニル化合物消去剤の効果. 第 46 回日本透析医学会学術集会・総会. 2001.6.22～24. 大阪.
 25. 杉山 敏, 宮田敏男, 稲城玲子, 黒川 清. 腹膜機能不全とカルボニルストレス. 第 46 回(社)日本透析学会医学会学術集会・総会. ワークショップ. 2001.6.22～24. 大阪.
 26. 吉田克法, 北内誉敬, 宮田敏男. 腎移植後のカルボニルストレス-ペントシジンによる検討-. 第 46 回(社)日本透析学会医学会学術集会・総会. ワークショップ. 2001.6.22～24. 大阪.
 27. 北内誉敬, 吉田克法, 富岡厚志, 宮本 賀, 吉川元祥, 米田龍生, 大園誠一郎, 岡島英五郎, 平尾佳彦, 宮田敏男, 黒川 清. 血液透析患者における ACI と血中ペントシジン測定 の検討. 第 46 回(社)日本透析学会医学会学術集会・総会. ワークショップ. 2001.6.22～24. 大阪.
 28. 宮田敏男. カルボニルストレスと糖尿病性腎症. 第 74 回日本内分泌学会学術総会. 特別講演. クリニカルアワー. 2001.06.29～07.01. 横浜.
 29. 宮田敏男. 腎不全合併症とカルボニルストレス. 第 2 回ビタミン E 固定化ダイアライザー臨床評価研究会. 特別講演. 2001.07.14. 東京.
 30. 宮田敏男, 稲城玲子, 黒川 清. 腹腔内カルボニルストレスの軽減に向けて. 第 7 回日本腹膜透析研究会. ワークショップ. 2001.11.10～11. 広島.
 31. 上田 裕彦, 宮田敏男, 稲城玲子, 吉野 淳, 斎藤 明, 黒川 清. 腎不全におけるカルボニル消去系に関する検討. 第 2 回腎不全病態治療研究会. 2001.12.8. 東京.
 32. 宮田敏男. カルボニルストレスインヒビター抗治療への新たな展開. 鎌倉循環器フォーラム. 2002.2.1. 横浜.

厚生科学研究費補助金(21世紀型医療開拓推進研究事業)
分担研究報告書

カルボニルストレスに起因する細胞内シグナリング経路の解明

分担研究者 中島 泉 名古屋大学医学部免疫学 教授

研究要旨

カルボニルストレスに起因する細胞内シグナリング経路の解明のため、種々のカルボニル化合物の培養ヒト血管内皮細胞におけるシグナル伝達について解析を行い、特にアポトーシスに注目して研究を行った。

本年度の本研究では、異なるカルボニル化合物である GO と MGO は培養ヒト血管内皮細胞に対して共通にチロシンキナーゼの活性化を誘導する活性を示す一方、アポトーシス誘導に関しては異なるシグナルを伝達すること、同時にフィードバック制御機構も起動することが明らかにされた。

研究組織

研究協力者

Anwarul A. Akhand(アンワルル A. アカンド)

名古屋大学大学院医学研究科

微生物・免疫学講座

分子細胞免疫学分野 助手

武田 湖州恵

同上

厚生省リサーチレジデント

A. 研究目的

カルボニルストレスは、長期透析合併症の発症に重要な役割を果たして

いると考えられる新しい概念である。

種々の carbon skeleton を持つカルボニル化合物は、多様な細胞内シグナルを伝えることにより、様々な病態に関与していると考えられる。

現在までの研究で、methylglyoxal (MGO), 4-hydroxynonenal などのカルボニル化合物をヒト T 細胞白血病細胞等に作用させると受容体型、非受容体型のチロシンキナーゼが活性化すること及びレドックス機序がかかわって細胞死(アポトーシス)が誘導されることを認めている。本年度は、長期透析合併症によりかかわりが深いヒト血管内皮細胞 (HUVEC) の glyoxal や methylglyoxal に対するアポトーシス誘導性のシグナルを中心にシグナル伝達のカスケードを解析した。

B. 研究方法

臍帯から分離したヒト血管内皮細胞に試験管内で glyoxal(GO)や MGO を作用させた後、細胞を界面活性剤で溶解し、細胞内のチロシンキナーゼや MAP ファミリーのキナーゼ (ERK, JNK, p38 MAPK) など各種シグナル伝達分子の発現と活性化/リン酸化のレベルを SDS-PAGE とウエスタンブロットイング、あるいは試験管内キナーゼアッセイにより解析した。また、アポトーシスの誘導と関連するカスパーゼの活性化や DNA の断片化のレベルをウエスタンブロットイング、アガロースゲル内電気泳動、フローサイトメトリーなどにより調べた。

C. 研究結果と考察

GO と MGO はともに2つのカルボニル基を持っており、両者の構造上の違いは MGO がメチル基を余分に持つことだけである。この2つの構造が似たカルボニル化合物に生物学的活性の違いがあるかどうかを調べた。HUVEC に低濃度 (500 μ M) または高濃度 (10 mM) の GO, MGO を作用させると濃度に依存して各種細胞蛋白のチロシンリン酸化がほぼ同程度に誘導された。一方、低濃度の MGO はカスパーゼを活性化させてアポトーシスを誘導したが、GO はいずれの濃度でもアポトーシスを誘導することはない、この2つのカル

ボニル化合物の活性に質的な差を認めた。こうした活性の差の原因を調べる目的で、GO と MGO を作用させた HUVEC の細胞内のグルタチオンのレベルを測定し比較した。その結果、MGO を作用させた細胞ではグルタチオンのレベルが低下するのに対し、GO を作用させた細胞ではこうした低下が軽微であることが判明した。MGO により誘導されるアポトーシスは MGO とともにリジンやヒスチジンを添加しても影響を受けなかったが、システインやアセチルシステインまたはジチオスレイトールを添加すると阻止された。このことから、MGO によるアポトーシスの誘導はレドックス依存性であると考えられた。このレドックス依存経路により JNK が活性化し、この JNK に依存してアポトーシスが誘導されることが示された。

GO や MGO を HUVEC に作用させると、Flk-1 や VE-cadherin などの細胞表面蛋白が Schiff-base 形成により重合することが示された。これに伴って、チロシンキナーゼが活性するにもかかわらず、リン酸化 ERK が脱リン酸化することを認めた。この機序を解析した結果、ERK 特異的な脱リン酸化酵素である MKP-1 が動員されて活性化することを示した。これは

GO や MGO により起動するチロシンキナーゼ/MAP ファミリーキナーゼ活性化のフィードバック制御機構と考えられた。

D. 結論

GO と MGO は HUVEC に対して共通にチロシンキナーゼの活性化を誘導する活性を示す一方、アポトーシス誘導に関しては異なるシグナルを伝達すること、MGO によるアポトーシス誘導シグナルは活性酸素の産生とそれによる JNK シグナル伝達経路の活性化によることが明らかとなった。同時に、チロシンキナーゼ活性化のシグナルと平行して、ERK の脱リン酸化を誘導するフィードバック制御機構も起動することを明らかにした。これらの所見は長期透析合併症としての血管病変の病態形成機序を理解し、これに対する新規治療法を開発する上で重要と考える。

E. 研究発表

1. 論文発表

Akhand AA, Du J, Liu W, Hossain K, Miyata T, Nagase F, Kato M, Suzuki H, Nakashima I: Redox-linked cell surface-oriented signaling for T-cell death. *Antioxid Redox Signal*, in press.

Akhand AA, Hossain K, Kato M, Miyata T, Du J, Suzuki H, Kurokawa K, Nakashima I: Glyoxal and methylglyoxal induce aggregation and inactivation of ERK in human endothelial cells. *Free Radical Biol Med* 2001;31:1228-1235.

Miyata T, Akhand AA, Kurokawa K, Nakashima I: Miyata T, Akhand AA, Kurokawa K, Nakashima I. Reactive carbonyl compounds as uremic toxins. *Contrib Nephrol*. 2001; 133: 71-80.

Liu W, Kato M, Itoigawa M, Murakami H, Yajima M, Wu J, Ishikawa N, Nakashima I: Distinct involvement of NF-kappaB and p38 mitogen-activated protein kinase pathways in serum deprivation-mediated stimulation of inducible nitric oxide synthase and its inhibition by 4-hydroxynonenal. *J Cell Biochem* 2001; 83: 271-280.

Du J, Suzuki H, Nagase F, Akhand AA, Ma Z, Yokoyama T, Miyata T, Nakashima I: Superoxide-mediated early oxidation and activation of ASK1 are important for initiating methylglyoxal-induced apoptosis process. *Free Radical Biol Med* 2001; 31: 469-478.

Akhand AA, Hossain K, Mitsui H, Kato M, Miyata T, Inagi R, Du J., Takeda K, Kawamoto Y, Suzuki H, Kurokawa K, Nakashima I: Glyoxal and methylglyoxal trigger distinct signals for MAP family kinases and caspase activation in human endothelial cells. *Free Radical Biol Med* 2001; 31: 20-30.

Takeda K, Kato M, Wu J, Iwashita T, Suzuki H, Takahashi M, Nakashima I:

Osmotic stress-mediated activation of RET kinases involves intracellular disulfide-bonded dimer formation. *Antioxid Redox Signal* 2001; 3:473-482.

Takeuchi K, Kato N, Suzuki H, Akhand AA, Wu J, Hossain K, Miyata T, Matsumoto Y, Nimura Y, Nakashima I: Acrolein induces activation of the epidermal growth factor receptor of human keratinocytes for cell death. *J Cell Biochem* 2001; 81: 679-688.

2. 学会発表

Akhand AA., Hossain K, Miyata T, Suzuki H, and Nakashima I: Glyoxal and methylglyoxal trigger distinct signals for MAP family kinases and caspase activation in human endothelial cells. The 11th International Congress of Immunology. 2001. 7.22~7.27. Stockholm.

Du J, Suzuki H, Nagase F, Nakashima I: Early oxidization is important for initiating methylglyoxal-induced apoptosis process. The 11th International Congress of Immunology. The 11th International Congress of Immunology. 2001. 7.22~7.27. Stockholm.

20010579

以降のページは雑誌/図書等に掲載された論文となりますので
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。

「研究成果の刊行に関する一覧表」

Relevance of oxidative and carbonyl stress to long-term uremic complications

Masaomi Nangaku, Toshio Miyata, Kiyoshi Kurokawa
Antioxidants and Redox Signaling

Angiotensin II receptor antagonists and angiotensin converting enzyme inhibitors lower in vitro the formation of advanced glycation end products: Biochemical mechanisms.

Toshio Miyata, Charles Van Ypersele de Strihou, Yasuhiko Ueda, Kohji Ichimori, Reiko Inagi, Hirohi Onogi, Masaomi Nangaku, and Kiyoshi Kurokawa
J Am Soc Nephrol in press

Efficient lowering of carbonyl stress by the glyoxalase system in vitro in conventional glucose peritoneal dialysis fluid

Inagi R, Miyata T, Ueda T, Nangaku M, van Ypersele de Strihou C, Kurokawa K.
ASN/ISN World Congress of Nephrology. in San Francisco (USA) October 12-19,2001.

Glyoxal and methylglyoxal trigger distinct signals for map family kinases and caspase activation in human endothelial cells.

Akhand AA, Hossain K, Mitsui H, Kato M Miyata T Inagi R, Du J, Takeda K, Kawamoto Y, Suzuki H, Kurokawa K, Nakashima I.
Free Radical Biol Med 31, 20-30 2001

Osmotic stress-mediated activation of RET kinases involves intracellular disulfide-bonded dimer formation.

Takeda K, Kato M, Wu J, Iwashita T, Suzuki H, Takahashi M, Nakashima I.
Antioxid Redox Signal 2001 3 473-482

Glyoxal and methylglyoxal induce aggregation and inactivation of ERK in human endothelial cells.

Akhand AA, Hossain K, Kato M, Miyata T, Du J, Suzuki H, Kurokawa K, Nakashima I.
Free Radical Biol Med 2001 31 1228-1235