

# 論文の内容の要旨

論文題目「メイラード反応後期生成物 (AGEs)と老化関連疾患との  
関連性評価」

学位申請者 大野 礼一

キーワード： Advanced glycation end-products (AGEs)、pentosidine、糖尿病、glucoselysine、マンゴスチン

現在、高齢化及び、偏った食生活と運動不足から糖尿病などの生活習慣病患者が急増している。メイラード反応前期生成物の一種であるヘモグロビン A1c (HbA1c) は、糖尿病患者の血糖コントロールマーカーとして世界的に利用されているが、糖尿病合併症の予測マーカーとはならない。アマドリ転位物が後期反応で生成する Advanced glycation end-products (AGEs) は、糖尿病合併症の発症で増加することから、合併症のマーカーとしての利用が期待されている。そこで生体で病態に伴って蓄積される新規 AGEs 構造の探索および、既に老化関連疾患の進行に伴って生体組織への蓄積が報告されている pentosidine の生成抑制成分を探索した。

## 1) Fructose 由来 glucoselysine の糖尿病ラット水晶体への蓄積

【背景・目的】生体中の fructose は食品由来の他、高血糖状態では細胞内のポリオール経路において sorbitol を経て生成される。1998 年に fructose 修飾蛋白に対するポリクローナル抗体 (Fru-P 抗体) が 1 型糖尿病の誘発期間に伴ってラット水晶体と強く反応することが報告された。しかし、本抗体のエピトープは見出されておらず、その性質や生成経路の詳細な解析はなされていない。今回、理化学研究所より供与頂いた Fru-P 抗体のエピトープを解析し、生体におけるエピトープの定量を機器分析で行った。【方法】既知 AGEs である N<sup>ε</sup>-(carboxymethyl)lysine (CML) に対する抗体 (CML 抗体) と Fru-P 抗体を用いて、糖尿病ラットの水晶体との反応性を Enzyme linked immuno-sorbent assay (ELISA) 及び Western blotting (WB) で評価した。また、本抗体と反応する fructose 修飾構造を High performance liquid chromatography (HPLC) によって精製し、単離物を Nuclear magnetic resonance (NMR) 及び Liquid chromatography-electrospray ionization (ESI)-quadrupole time of flight (LC-ESI-QTOF) によって Fru-P 抗体のエピトープを解析した。さらに、本構造の化学的性質及び生成機序の検討、さらに生体含量を定量した。【結果・考察】ラットに糖尿病を誘発すると、水晶体に CML が蓄積するが、Fru-P 抗体のエピトープ蓄積は CML の蓄積レベルより高いことが ELISA および WB によって確認された。NMR 及び LC-ESI-QTOF によって Fru-P 抗体のエピトープが glucoselysine (GL) と同定された。LC-ESI-mass spectrometry (MS)/MS (LC-ESI-MS/MS) を

用いた GL の測定は、分子量が等しく、フラグメントパターンが類似した fructoselysine (FL) との識別が分析上の課題であった。しかし、塩酸加水分解下で GL は安定であるが、FL は完全に furosine へ変換されたため、GL と FL の識別が可能となった。Bovine serum albumin (BSA) と六炭糖である fructose, glucose, galactose, mannose を 37°C で保温した結果、GL は fructose から 1 日で生成したが、他の六炭糖からは 14 日後も検出されなかったことから、GL は主に fructose から生成することが確認された。LC-ESI-MS/MS によって糖尿病ラット水晶体における GL 及び、CML、furosine を定量した結果、1 週目の健常ラットよりも 8 週目の糖尿病で GL は 31.3 倍、CML は 1.7 倍、furosine は 21.5 倍増加した。特に GL は、誘発期間に依存して有意な増加を示したが、ポリオール経路における fructose 生成の前駆体である sorbitol は糖尿病発症後増加したが、2 週目で平衡に達した。これらの結果は、sorbitol は一時的なポリオール経路の進行を反映するが、GL はより長期的なポリオール経路の進行もしくは水晶体蛋白の変性を反映することを示唆している。本研究によって、GL は糖尿病進行による水晶体蛋白の変性機構を解明するための有用な生物学的マーカーになると考えられる。

## 2) マンゴスチン (*Garcinia mangostana* L.) 果皮抽出物は pentosidine 生成を抑制し、肌の弾力性を改善する

【背景・目的】 AGEs 構造の 1 つである pentosidine は glucose 及び lysine, arginine を基質として酸化反応で生成され、高血糖や腎症で血中濃度が増加する。また、蛍光性を持つことから HPLC によって簡便に定量可能であり、pentosidine は広く研究されてきた AGE である。既に *in vitro* 及び動物を用いた *in vivo* 試験でその生成を抑制する成分が報告されてきたが、健常者で有効な pentosidine 生成阻害剤の報告はない。そこで生体に蓄積する pentosidine を効果的に抑制する天然物成分を探索する目的で、抗酸化・抗炎症作用を持つキサント類やプロシアニジン類、カテキン類等のポリフェノール類を多く含むマンゴスチン (*Garcinia mangostana* L.) 果皮に着目し、その生成抑制効果を評価した。【方法】試験管内で pentosidine が生成する反応系にマンゴスチン果皮の粗抽出物、あるいは単離された成分を添加し、HPLC によって pentosidine の生成抑制効果を測定した。また、マンゴスチン果皮熱水抽出物の錠剤を 100 mg/day で摂取した 32-48 歳の健常な 11 名の女性における血中 pentosidine の変動を、HPLC によって測定した。さらに同被験者の肌における水分含量及び弾力性を評価した。【結果・考察】マンゴスチン果皮から単離された既知構造である rhodanthone B 及び garcimangosone D は、低濃度添加条件下 (0.1-100 nM) で抑制効果が認められた。過去に報告されたフラボノイド化合物の AGEs 生成抑制試験では、添加濃度が 25-250  $\mu$ M であったことと比較すると、本単離成分は AGEs 生成抑制効果が高い化合物と言える。さらに、マンゴスチン果皮の熱水抽出物を摂取した健常者の血中 pentosidine は、2 ヶ月後に有意な減少が認められ、肌の水分含量及び弾力性が向上した。以上の結果から、マンゴスチン果皮由来の化合物は生体中 pentosidine の生成を抑制し、さらに肌の保水能が改善することがはじめて確認され、健常者の生活習慣病の予防及び QOL 向上に有効であることが示された。