

審査結果の要旨

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

本論文は、加齢関連疾患の発症に伴って生成が増加する Advanced glycation end-products (AGEs) に着目し、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 の生成抑制成分が生体に及ぼす作用を評価している。その理由として、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が、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測定されているが、糖尿病合併症の予測マーカーとはなっていない。これに対して、アマドリ転位物から後期反応で生成する AGEs は、糖尿病合併症の発症で増加することから、本論文では AGEs を合併症のマーカーとしての利用を有望視している。今回報告された以下2つの発表内容について、経過を報告する。

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

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ているが、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ことが紹介された。そこで本研究では、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ている。方法としては、既知 AGEs である N^ε-(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) で評価している。さらに 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、本構造の化学的性質及び生成機序の検討、さらに生体含量も比較している。その結果、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を免疫化学的に確認している。そこで本研究では、LC-ESI-QTOF 及び理化学研究所が行った NMR の 1H-13C HMBC スペクトルによって Fru-P 抗体のエピトープが glucoselysine (GL) であることを同定している。また、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) との識別が問題であったが、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 の識別が可能であることを確認している。また GL の生成経路の解析として、Bovine serum albumin (BSA) と六炭糖である fructose, glucose, galactose, mannose を 37℃ 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 から生成することを確認している。さらに、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週目の糖尿病ラットで GL は31.3倍、CML は1.7倍、furosine は21.5倍増加したことから、GL は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できることを述べている。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可能性があると結論付けている。

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

次に、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、糖尿病や腎症、骨粗鬆症の進行に伴って生体組織に蓄積されることから、本 AGEs は *in vivo* 試験でその生成を抑制する成分が報告されているが、健常者で有効な pentosidine 生成阻害剤の報告はないことが報告された。本研究では、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ている。具体的には、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 High performance liquid chromatography (HPLC) によって pentosidine の生成抑制効果を評価している。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、同被験者の肌における水分含量及び弾力性を評価している。その結果、松山大学より供与を受けたマンゴスチン果皮から単離された rhodanthone B 及び garcimangosone D は低濃度添加条件下で抑制効果が認められたことから、本単離成分は AGEs 生成抑制効果が高い化合物と言える結論している。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ことも報告している。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を確認し、健常者の生活習慣病の予防及び QOL 向上に有効である可能性が高いと結論している。

申請者は 2020 年 1 月 16 日に行われた学位論文公聴会においても理路整然と発表し、その後の口頭試問で正しい知識を有していることを確認した。加えて本論文に記された研究成果の一部は 2 報の学術論文に筆頭著者として公表されている。

以上の結果、本論文は学位論文として十分な内容を有するものと審査委員全員の一致で判定された。

したがって、申請者 大野 礼一 は東海大学博士 (農学) の学位を授与されるに値すると判断した。

論文審査委員

主査	博士 (工学)	米田 一成	農学部准教授	(生物科学研究科生物科学専攻)
委員	農学博士	荒木 朋洋	農学部教授	(生物科学研究科生物科学専攻)
委員	Ph. D	今川 和彦	総合農学研究所教授	(生物科学研究科生物科学専攻)
委員	博士 (医学)	永井 竜児	農学部教授	(生物科学研究科生物科学専攻)
委員	博士 (理学)	山口 浩	九州教養教育センター准教授	(生物科学研究科生物科学専攻)