

東海大学大学院 令和元年度 博士論文

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

指導 永井 竜児 教授

東海大学大学院生物科学研究科

生物科学専攻

大野 礼一

## 略語一覧表

- AGEs: Advanced glycation end-products (終末糖化産物)
- Fru-P 抗体: fructose 修飾蛋白に対するポリクローナル抗体
- NMR: Nuclear magnetic resonance
- LC-ESI-QTOF: Liquid chromatography electrospray ionization quatropole time-of-flight mass spectrometry
- LC-ESI-MS/MS: Liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry/ mass spectrometry
- GL: glucoselysine
- FL: fructoselysine
- BSA: bovine serum albumin
- LC-ESI-MS/MS: Liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry/mass spectrometry
- STZ: streptozotocin
- CML: N<sup>ε</sup>-(carboxymethyl)lysine
- AR: aldose reductase
- ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay (酵素免疫標識法)
- HPLC: High performance liquid chromatography (高速液体クロマトグラフィー)
- QTOF-MS: Quadrupole time-of-flight mass spectrometry (四重極飛行時間型質量分析装置)
- HbA1c: ヘモグロビン A1c
- CML : N<sup>ε</sup>-(carboxymethyl) lysine
- CMA: N<sup>ω</sup>-(carboxymethyl) arginine
- CEA: N<sup>ω</sup>-(carboxyethyl) arginine
- MG-H1-imidazolone: N<sup>δ</sup>-(5-hydro-5-methyl-4-imidazolone-2-yl) ornithine
- CEL: N<sup>ε</sup>-(carboxyethyl) lysine
- GO: Glyoxal
- GA: Glycolaldehyde
- MG: Methylglyoxal
- Na-PB: Phosphate buffer (リン酸ナトリウム緩衝液)

- PBS: Phosphate buffer saline
- NaCNBH<sub>3</sub>: sodium cyanoborohydride (シアノ水素化ホウ素ナトリウム)
- horseradish peroxidase (HRP)
- KPL: Kirkegaard & perry laboratories
- OPD Tablet: o-Phenylenediamine . 2HCl 10 mg/Tablet (o-フェニレンジアミン二塩酸塩 10 mg/Tablet)
- H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: 硫酸
- N<sup>α</sup>-acetyl-lysine: N<sup>α</sup>-acetyl-L-lysine
- N<sup>α</sup>-acetyl- arginine: N<sup>α</sup>-acetyl-L-arginine
- N<sup>α</sup>-Cbz-lysine: N<sup>α</sup>-carbobenzoxy-lysine
- HCl: Hydrochloric acid (塩酸)
- ACN: Acetonitrile
- TFA: Trifluoroacetic acid
- FA: Formic acid (ギ酸)
- BCA 法: Bicinchoninic Acid Protein Assay
- m. w.: Molecular weight (分子量)
- *m/z*: Mass-to-charge ratio (質量電荷比)
- HFBA: heptafluorobutyric acid (ヘプタフルオロ酪酸)
- RR: Recovery ratio of the skin length (肌長の回復率)
- RE: Ratio of elasticity during constriction (収縮時の弾性率)

## 目次

要旨	7
緒言	10
第1章 Fructose 由来 glucoselysine の糖尿病ラット水晶体への蓄積	
1. 背景	
1-1. 多様な AGEs の生成経路	12
1-2. ポリオール経路による fructose 産生	
1-3. 1 型糖尿病ラット水晶体における Fructose 修飾蛋白の蓄積およびエピトープの同定	14
2. 実験方法	
2-1. 試料調製	
2-2. Fru-P 抗体の調製	15
2-3. 動物実験	
2-4. Fru-P 抗体を用いた western blotting (WB) による fructose 修飾蛋白の検出	
2-5. ELISA	16
2-6. Fru-P 抗体のエピトープ構造の精製	
2-7. NMR 構造解析	17
2-8. LC-ESI-QTOF による構造解析	
2-9. LC-ESI-QTOF による in vitro における CML および GL、furosine、ラット水晶体中 CML の測定	18
2-10. LC-ESI-QTOF によるラット水晶体中 sorbitol の測定	19
2-11. LC-ESI-MS/MS によるラット水晶体中 GL および furosine の測定	20
2-12. GL および FL の化学的性質の解析	21
2-13. 酸化ストレスによる GL もしくは FL の CML への変換	
2-14. ラット水晶体中 AGEs およびアマドリ産物の測定	
2-15. ラット水晶体中 CML 測定	22
2-16. ラット水晶体および腎臓中 GL および furosine の測定	
2-17. ラット水晶体中 sorbitol 測定	
2-18. 統計解析	23

3. 結果	
3-1. ラット水晶体蛋白と Fru-P 抗体との反応性	24
3-2. Fru-P 抗体のエピトープ構造の同定	27
3-3. NMR 構造解析	30
3-4. LC-ESI-QTOF による構造解析	32
3-5. GL 及び FL の化学的性質	34
3-6. LC-ESI-QTOF もしくは LC-ESI-MS/MS によるラット水晶体における sorbitol, furosine, CML, GL の定量	37
4. 考察	40

第2章 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

1. 背景	
1-1. Pentosidine について	45
1-2. マンゴスチン果皮の抗酸化及び AGEs 生成抑制作用	
2. 実験方法	
2-1. 試薬	
2-2. マンゴスチン果皮抽出物の調製	46
2-3. マンゴスチン果皮抽出由来化合物の単離	
2-4. Pentosidine 生成における WEM の抑制効果の測定	
2-5. HPLC による pentosidine 含量の測定	
2-6. 自己蛍光による肌中 AGEs の推定	47
2-7. 被験者への WEM の投与	
2-8. 肌における粘弾性および水分含量の測定	
2-9. 統計分析	48
3. 結果	
3-1. WEM による rebose-gelatin 中 pentosidine 生成抑制の評価	49
3-2. WEM 単離成分による rebose-gelatin 中 pentosidine 生成抑制の評価	50
3-3. WEM を摂取後のヒト血中 pentosidine の定量	51

3-4. WEM を摂取後のヒト皮膚中蛍光性物質の測定	52
3-5. WEM を摂取後のヒト肌の水分含量及び弾力性測定	54
4. 考察	56
総括	58
謝辞	59
参考文献	60

## 要旨

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 rhodanthene 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。

## 緒言

Glucose のような還元糖や methylglyoxal (MG) などのカルボニル化合物は非酵素的にアミノ酸のアミノ基やチオール基と反応し、メイラード反応におけるシッフ塩基およびアマドリ産物を介して AGEs を形成する (1)。本反応は glycation あるいは糖化とも言われているが、糖化産物は生体における糖代謝の指標として用いられてきた。例えば、本反応の前期に生成するアマドリ産物の一種であるヘモグロビン A1c (HbA1c) (2) や glycoalbumin (3, 4), fructoselysine (FL) (5) 等は血中 glucose 濃度を反映する指標であり、HbA1c は過去 1-2 ヶ月の血糖コントロールを評価する糖尿病の臨床的な診断マーカーとして世界中で利用されている。糖化による蛋白の修飾および AGEs の形成は、蛋白構造を変性させ、それによって酵素活性を変化させる (6-9)。最近の研究では、AGEs が加齢に加え (10-12)、細小血管合併症である糖尿病性腎症 (13, 14) や糖尿病性網膜症 (15-17)、糖尿病性神経障害 (18)、さらには動脈硬化 (19, 20) のような病態下で各組織に蓄積することが報告されている。

以前に Nagai らは、広く研究が進められている AGE 構造体の一つである CML が hydroxy radical (21) や次亜塩素酸 (22)、peroxynitrite (23) によるアマドリ転位物の酸化反応によって産生されることから、生体内の酸化マーカーとして利用できることを報告している。CML および CEL は、加齢に伴いヒト水晶体に蓄積することが知られている (10-11)。Thornalley ら (14) は、MG 由来の AGE である N<sup>ε</sup>-(5-hydro-5-methyl-4-imidazolone-2-yl) ornithine (MG-H1) 濃度が、健常者に較べて腎不全患者の血漿で増加することを報告した。また、別の研究結果として、glycolaldehyde (GA) 由来の AGE である GA-pyridine が、ヒト動脈硬化巣に蓄積することが報告されている (20)。このように病態の発症に伴って変動する各種 AGEs を定量することは、生体の代謝の変動を評価するために有用である。

そこで本研究では、各病態の予測マーカーになり得る新たな AGEs 構造に着目し、生体における定量的な評価方法を開発し、病態との関連性を評価した。2017 年度本学大学院修了性の市丸によって、糖尿病ラット水晶体と高い反応性を示す fructose 修飾蛋白に対する抗体 (Fru-P 抗体) のエピトープが glucoselysine (GL) であることが同定されたが、その化学的性質の解析および生体サンプルにおける定量的な確認はなされていなかった。

第 1 章では、GL の生成経路の解析や、生体中の夾雑物と識別するための測定系を確立し、1 型糖尿病ラットの水晶体における GL 含量の評価を行った。さらに水晶体において、ポリオール経路の指標である sorbitol、酸化ストレスで増加する CML、高血糖状態

で生成されるアマドリ転位生成物の fructoselsysine (FL) を定量し、GL と比較した。

第2章では、マンゴスチン果皮成分による pentosidine 生成抑制効果を検証した。AGEs が酸化や炎症反応の過程で生成されることから、抗酸化作用を持つ成分には、AGEs 抑制効果が認められるものが多い。そこで新たな AGEs 生成抑制化合物として、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果皮の効果を評価した。具体的には、蛍光性 AGEs の一種である pentosidine を測定し、マンゴスチン果皮成分による AGEs 生成の抑制効果を検討した。過去に *in vitro* で天然物由来化合物が pentosidine 生成を抑制した報告はあるが (24, 25)、実際に健常者がサプリメントを摂取して、血中 pentosidine の生成を抑制した報告はない。最初に、マンゴスチン果皮及び単離成分による *in vitro* での pentosidine 生成抑制効果を ELISA 法にて検討した。さらにマンゴスチンエキスを摂取した健常者における血清中 pentosidine 濃度の変化を HPLC で評価した。

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

### 1. 背景

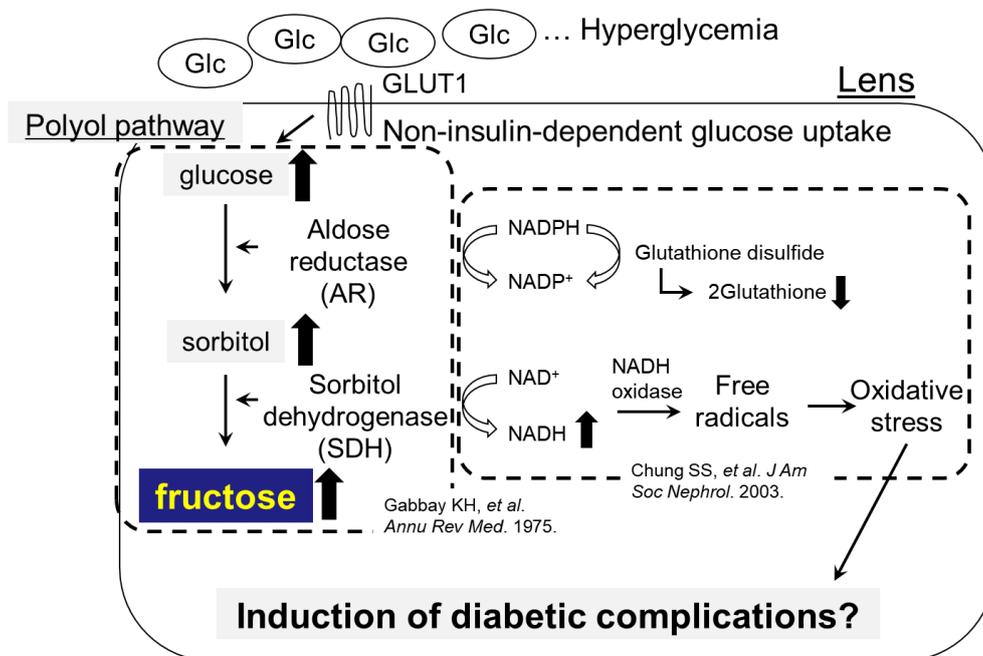
#### 1-1. 多様な AGEs の生成経路

これまで生体で同定された AGEs 構造は、それぞれの異なる生成経路を持つ。高血糖状態が続くと体内では、メイラード反応によって AGEs の前駆体であるアマドリ転位物が生成され、酸化等の後期反応によって CML が生成する。また、Glucose の自己酸化で生成された glyoxal が lysine や arginine と反応し、酸化反応の結果、CML や CMA が生成する。CMA に関しては、コラーゲン蛋白との反応で生成されることから、糖化によるコラーゲン蛋白の変性に関与する可能性が報告されている (26)。インスリンの分泌が減少した 1 型糖尿病ラットでは、細胞へのインスリン依存的な糖の取り込みが減少するため、ケトン体が大量に分泌されて高ケトン血症となる。この症状によって、ケトン体の一種であるアセトンがアセトールへと変換され、lysine との反応で CEL を生成する (27)。また、高ケトン血症で血液が酸性に傾くケトアシドーシスでは、glyoxalase 1 発現の低下によって MG が増加することから、CEL 生成が促進される可能性がある。水晶体における MG は、トリオースリン酸の分解や糖化蛋白の分解、脂質過酸化によって形成され、glyoxalase 1 によって解毒される。しかし、加齢に伴いこの解毒作用は減少し (28, 29)、水晶体中に MG-H1 が増加する (30)。また、水晶体の主要蛋白であるクリスタリンが、MG により修飾され凝集することも報告されている。アテローム型動脈硬化のプラーク形成過程では、好中球やマクロファージが炎症反応で生成する次亜塩素酸と serine が反応して GA を生成し、GA がさらに lysine と反応して GA-pyridine を生成する。この GA-pyridine は、動脈硬化巣に蓄積することが報告されている (20)。このように、これまで解析されてきた生体内 AGEs の生成経路から、生活習慣病と密接な関わりが明らかとなっている。したがって、生体に蓄積する AGEs の生成機構の解析は必須であり、その機序から予想される病態の症状や、その他の病態を反映する因子と比較する研究が行われてきた。生体における AGEs の定量は、病態の予測マーカーとして、臨床的に重要な役割を持つと考えられる。

#### 1-2. ポリオール経路による fructose 産生

糖尿病発症に伴う高血糖は、インスリンの分泌が減少し、インスリン非依存的な

glucose 輸送体によって細胞内へ取り込まれる。細胞内で増加した glucose が aldose reductase (AR) によって sorbitol へ変換される。さらに sorbitol dehydrogenase (SDH) によって sorbitol は fructose へ変換される。この glucose から fructose へ生成されるまでの経路をポリオール経路と呼び (Fig. 1)、本経路の進行は、細胞内におけるグルタチオン濃度の減少および NADH の増加によって酸化ストレスを亢進させる。また、細胞膜を通過できない sorbitol の増加による浸透圧ストレスが生じる。これらのポリオール経路の進行が糖尿病合併症である網膜症や白内障、神経障害に関与する報告があるが (31)、ポリオール経路にかかわる AR や SDH 等の酵素の阻害剤を投与することで、これらの病態が改善するという報告は少ない。そこで私は sorbitol や fructose よりも、fructose 修飾産物の方が生体蛋白の変性に関与するため、病態の進行を反映すると考えた。



**Figure 1. Formation of fructose-derived AGEs through polyol pathway.** Under hyperglycemic conditions, glucose is taken into the cell via GLUT1. In polyol pathway, sorbitol is formed from the reduction of glucose by the AR, and fructose is formed from sorbitol by the SDH. The lens protein is possibly modified by fructose, downstream of polyol pathway, and induced denaturation of the protein. In addition, the progress of polyol pathway reduces intracellular glutathione levels and increases NADH levels, resulting in the enhancement of oxidative stress (32, 33) and formation of AGEs.

### 1-3. 1 型糖尿病ラット水晶体における fructose 修飾蛋白の蓄積およびエピトープの同定

先行研究によって、Kawasaki らが fructose 修飾蛋白に対するポリクローナル抗体 (Fru-P 抗体) を作製し、8 から 20 週目の 1 型糖尿病ラット水晶体と高い反応性を示すことを報告した (34)。さらに sorbitol 濃度と正の相関を示した。しかし、本抗体のエピトープは 20 年間不明であった。本抗体のエピトープは、水晶体に蓄積する主要な AGEs であり、ポリオール経路の進行に伴う病態の評価に重要な役割を担うと考えられる。今回、新たに調製された Fru-P 抗体のエピトープが市丸らによって glucoselysine (GL) と同定されたが、夾雑物の影響で、生体での LC-ESI-MS/MS による定量は困難であった。そこで本研究では、生体中 GL を、夾雑物と識別可能な定量系を確立した。さらに GL の化学的性質および生体における生成経路を解析し、糖尿病ラット水晶体における GL および高血糖の指標である FL、酸化ストレスの指標である CML、ポリオール経路の指標を表す sorbitol との比較を行った。

## 2. 方法

### 2-1. 試料調製

GA および MG 修飾 BSA を 2 mg/mL BSA (1.5 mM lysine 残基; initial fraction by heat shock, minimum 98%; Sigma-JAPAN, 神奈川) と 30 mM GA もしくは MG とともに、それぞれ PBS 溶液中において 7 日間 37°C で保持することで調製した (34)。Fru-BSA は 10 mg/mL BSA と 0.37 M D-fructose (関東化学、東京) の混合水溶液を凍結乾燥し、乾燥状態のまま 30 分間 90°C で保持した (36)。CML-BSA は先行論文にしたがって調製した (34)。10 mg/mL BSA を 0.2 M Na-PB (pH 7.8) 下で、0.15 M glyoxylic acid monohydrate (富士フイルム和光純薬、大阪)、0.45 M NaCNBH<sub>3</sub> とともに 24 時間 37°C で保持し、反応物をセルロース膜に包み、PBS 下で透析することによって未反応の glyoxylic acid および NaCNBH<sub>3</sub> が除去した。Fructose 修飾アミノ酸 (Fru-acetyl-Lys, Fru-acetyl-Arg) の調製では、50 mM N<sup>α</sup>-acetyl-lysine (東京化成工業、東京、日本)、もしくは N<sup>α</sup>-acetyl-arginine (Sigma-JAPAN, 神奈川) と 0.37 mM fructose との混合水溶液を凍結乾燥した。乾燥した試料を 30 分間 90°C 保持した。これらの修飾 BSA もしくはアミノ酸を Fru-P 抗体を用いた非競合 ELISA もしくは競合 ELISA で測定した。

## 2-2. Fru-P 抗体の調製

Fructose 修飾蛋白 (Fru-P) に対するポリクローナル抗体調製のため、50% Freund's complete adjuvant で溶解した Fru-BSA 0.1 mg をウサギの皮下へ注入し、50% Freund's incomplete adjuvant で溶解した Fru-BSA 0.1 mg を同様に 9 回追加免疫した。最終免疫から 10 日後に得た血清を、硫酸アンモニウムとともに沈殿させた。BSA もしくは Fru-BSA を HiTrap NHS-activated HP column (HiTrap-NHS) に結合したアフィニティーカラムにより沈殿物した抗血清蛋白を精製した。BSA-coupled HiTrap-NHS によって、抗 BSA 抗血清を抗血清から除去した。Fru-BSA-coupled HiTrap NHS によって抗 Fru-BSA 抗血清を精製し、Fru-BSA と反応する Fru-P 抗体を得た (37, 38)。ELISA によって Fru-BSA に対する Fru-P 抗体の反応性を測定した。

## 2-3. 動物実験

全ての動物実験は、東海大学によって承認され (承認番号: 181089)、東海大学における科学的目的のための動物の管理と使用に関するガイドラインに準拠した (2007 年 4 月 1 日制定)。Wistar ラットを九動 (熊本) から購入した。ラットを病原体のないバリア施設 (12 時間の明暗周期) で飼育し、通常のげっ歯類用飼料 (Clea, 東京) を与えた。ラットを無作為に 6 つのグループに分けた (n=6/ケージ)。6 週齢の wistar ラット (体重およそ 150 g) に 0.2 mL の 0.05 M 生理食塩水クエン酸緩衝液 (pH 4.5) に溶解した STZ を尾静脈内へ注射することによって、糖尿病が誘発した (50 mg/kg body weight)。血清試料を採取し、グルコース CII-テストワコー (富士フィルム和光純薬、大阪) によって血糖値を、DCA vantage (SIEMENS Healthineers, エルランゲン、ドイツ) によって HbA1c 濃度を測定した。摘出した組織標本は直ちに凍結し、分析までの間は -80°C で保存した。

## 2-4. Fru-P 抗体を用いた western blotting (WB) による fructose 修飾蛋白の検出

WB による Fru-BSA 検出のため、全ての水晶体蛋白 (10 µg) を 12% SDS-PAGE で泳動し、トランスブロット (Bio-Rad, カリフォルニア) を用いた半乾燥条件下で、ポリフッ化ビニリデン (PVDF) 膜へ転写した。その膜は 5% BSA in Tris-buffered saline (TBS; 1 mM Tris-HCl, pH 7.4, and 0.15 M NaCl) とともに室温で穏やかに攪拌することによってブロッキングし、0.05% Tween 20 を含む TBS 溶液で 5 分間洗浄を 3 回行った。その膜は 0.5 µg/mL Fru-P 抗体とともに穏やかに攪拌して 4°C で保持した。洗浄後、その膜を 5000 倍

希釈した horseradish peroxidase (HRP)-conjugated streptavidin とともに 1 時間室温下で穏やかに攪拌し、0.05% Tween 20 を含む TBS 溶液で 5 分間洗浄を 3 回行った。Amersham ECL Prime system (GE Healthcare, イリノイ) を用いたシグナルを増幅する化学発光法で抗体との反応性を測定した。

## 2-5. ELISA

以前の報告を参考に ELISA 測定を行った (20, 39)。非競合 ELISA は、96-well immunoplate (Thermo Fisher Scientific, マサチューセッツ) の各 well に PBS に溶解した各濃度の試料を 0.1 mL ずつコーティングし (Fig. 2A)、1 時間室温で静置した後、0.5% gelatin hydrolysate/PBS 溶液によってブロッキングした。各 well に 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Fru-P 抗体もしくは抗 CML 抗体 (6D12) を添加し、1 時間室温で静置した。各 well に吸着された抗体は、HRP-conjugated anti-mouse IgG 抗体 (Thermo Fisher Scientific, マサチューセッツ) によって検出した。競合 ELISA では、0.01  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Fru-BSA/PBS 溶液を各 well にコーティングした後、0.5% gelatin hydrolysate/PBS 溶液によってブロッキングした。各濃度の試料を 50  $\mu\text{L}$  添加した後 (Fig. 2B, D, F)、等量の 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Fru-P 抗体を添加した。本抗体との反応性を HRP-conjugated anti-mouse IgG 抗体で検出した。

## 2-6. Fru-P 抗体のエピトープ構造の精製

Fructose 修飾 N<sup>α</sup>-Cbz-lysine (Fru-Cbz-lysine) 調製のため、N<sup>α</sup>-Cbz-lysine (Sigma-JAPAN, 神奈川) および 0.37 M fructose を混合し、その溶液を凍結乾燥した。その乾燥試料を 90°C で 30 分間保持した。HPLC (島津製作所、京都、system controller, CBM-20A; pump, LC-20AD; UV detector, SPD-20A; autosampler, SIL-20A; column oven, CTO-20AC) において、Fru-Cbz-lysine 30  $\mu\text{L}$  を Cosmosil Packed column 5C18-AR-II (20 × 250 mm; ナカライテスク、京都) に注入した。移動相は 0.1% TFA (富士フイルム和光純薬、大阪) であり、3 mL/min の流速とともに Acetonitrile (ACN) の 2 段階勾配 (0-2.5 分, 10-25% ACN; 2.5-20 分, 25-47.5% ACN; 20-22.25 分, 47.5-60% ACN; 22.25-40 分, 60% ACN) で測定した。Cbz 基の特性である 270 nm における UV 検出器でその溶出物をモニタリングした。270 nm における UV 吸収で溶出物を観測した。これらの fraction を、20 回分取し、それぞれを濃縮した。濃縮した fraction を水で再溶解し、希釈した各 fraction を上述の Fru-P 抗体を用いた競合 ELISA で測定した。Fraction 2 をさらに精度よく分離するため、Fru-Cbz-lysine

を下記の条件での HPLC システムで測定した。その移動相は ACN の 2 段階勾配 (0–3 分, 10% ACN; 3–5 分, 10–25% ACN; 5–25 分, 25–27.5% ACN; 25–35 分, 27.5–40% ACN; 35–40 分, 40–60% ACN) の 0.1% TFA であった。270 nm における UV 吸収によって溶出物を観測した。これらの fraction を 20 回分取し、Fru-P 抗体を用いた競合 ELISA によって測定した。ここで Fru-P 抗体と反応した精製 fraction を NMR および LC-ESI-QTOF で測定した。さらに、精製 fraction の Cbz 基を水素環境下で 5% palladium carbon を含む MeOH 1 mL を用いた接触還元によって脱保護した (40)。

## 2-7. NMR 構造解析

Cryogenic TXI probe (Bruker BioSpin, マサチューセッツ) を搭載した DRX-500 spectrometer を用いた NMR によって精製 fraction を測定した。Probe 温度を 298K に設定した。試料 (5 mg) を 600  $\mu$ L の D<sub>2</sub>O (99.99 atom% D) で再溶解し、4,4-dimethyl-4-silapentane-1-sulfonic acid に対する <sup>1</sup>H 化学シフトを導き出した。0.251449530 (<sup>13</sup>C/<sup>1</sup>H) および 0.101329118 (<sup>15</sup>N/<sup>1</sup>H) の X/<sup>1</sup>H 共鳴比に基づく間接引用を用いて <sup>13</sup>C と <sup>15</sup>N 化学シフトを校正した。NMR シグナルは 1D <sup>1</sup>H と 1D-selective TOCSY、1D-selective NOESY、1D <sup>13</sup>C、2D <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H DQF-COSY、<sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC、<sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC-TOCSY、<sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC-NOESY、<sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC-ROESY、<sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HMBC、<sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HMBC によって帰属された。XWIN-NMR (version 3.5, Bruker BioSpin) を用いてデータ処理および分析を行った。XWIN-PLOT (version 3.5, Bruker BioSpin) で NMR スペクトルを表示した。

## 2-8. LC-ESI-QTOF による構造解析

HPLC で精製した fraction を乾燥させ、20% ACN 0.1% formic acid (FA) で再溶解した。精製した fraction の正確な質量は Compact mass spectrometer (Bruker Daltonics, ブレーメン) を用いた LC-ESI-QTOF によって同定した。移動相は 80% ACN 0.1% FA の isocratic flow であった。流速は 0.2 mL/min に設定し、注入量を 5  $\mu$ L とした。各測定において 5 mM ギ酸ナトリウムを含む 50% 2-propanol を用いて機器の校正を行った。ESI-positive MS 多重反応モニタリング (MRM) による flow injection で試料を分析した。イオン源温度を 200°C、キャピラリーボルテージを 4.5 kV、衝突エネルギーを 35 eV、圧力を 1.6 bar に設定した窒素を用いて衝突誘起解離させた。は  $m/z$  50–1000 の質量範囲でデータを記録した。SmartFormula manually (Bruker Daltonics, ブレーメン) によって検出されたイオンの

組成式を解析した (14)。

## 2-9. LC-ESI-QTOF による *in vitro* における CML および GL、furosine、ラット水晶体中 CML の測定

LC を 40°C に維持し、ZIC®-HILIC column (2.1 × 150 mm, 5 μm; Merck Millipore, Billerica, MA, USA) によって測定した。移動相は 0.1% FA pH 3.8 を含む ACN の 2 段階勾配 (0–2 分, 90% ACN; 2–16 分, 90–10% ACN; 16–19 分, 10% ACN) であった。流速は 0.2 mL/min、注入量を 5 μL とした。GL と CML、furosine、lysine、これらの内部標準を ESI-positive MS によって検出した。<sup>2</sup>H<sub>2</sub> CML 標準品を PolyPeptide Laboratories (Strasbourg, France) から、<sup>13</sup>C<sub>6</sub> lysine 標準品を Cambridge Isotope Laboratories Inc. (マサチューセッツ) から購入した。溶出時間および定量イオンを Table 1 に示した。

**Table 1. Retention time and *m/z* values of AGEs, Amadori product, and amino acids determined by LC-ESI-QTOF.**

Analyte	Retention time (min)	Parent ion <i>m/z</i>
CML	14.1	205.1183
[ <sup>2</sup> H <sub>2</sub> ] CML	14.1	207.1308
GL	15.7	309.1656
[ <sup>13</sup> C <sub>6</sub> ] GL	15.7	315.1858
furosine	13.5	255.1339
[ <sup>13</sup> C <sub>6</sub> ] furosine	13.5	261.1541
lysine	15.8	147.1128
[ <sup>13</sup> C <sub>6</sub> ] lysine	15.8	153.1329

## 2-10. LC-ESI-QTOF によるラット水晶体中 sorbitol の測定

今回、蛋白と急速に反応して蛋白付加体を形成する fructose ではなく、その代謝前駆体であり、反応性の低い sorbitol をポリオール経路の指標として、LC-ESI-QTOF によって測定した。LC を 40°C に維持し、ZIC®-HILIC column (2.1 × 150 mm, 5 μm; Merck Millipore, マサチューセッツ) によって測定した。移動相は 10 mM 酢酸アンモニウムを含む 80% ACN の isocratic flow であった。流速を 0.2 mL/min、注入量を 5 μL とした。Sorbitol とその内部標準を ESI-negative MS で検出した。[<sup>13</sup>C<sub>6</sub>] D-sorbitol 標準品を Cambridge Isotope Laboratories Inc. (マサチューセッツ) から購入した。Sorbitol と [<sup>13</sup>C<sub>6</sub>] sorbitol の定量イオンをそれぞれ、*m/z* 181.0707 と *m/z* 189.0908 として測定した。

## 2-11. LC-ESI-MS/MS によるラット水晶体中 GL および furosine の測定

LC を上述した LC-ESI-QTOF による AGEs もしくはアマドリ産物の測定と同じ条件で測定した。GL および furosine の正確な質量を TSQ Quantiva system (Thermo Fisher Scientific, マサチューセッツ) を用いた LC-ESI-MS/MS の ESI-positive MRM で同定した。流速を 0.2 mL/min、注入量を 10  $\mu$ L とした。ラット水晶体中 GL および furosine を定量するため、ESI プローブにおいて窒素シェールガスを 35 Arb、補助的なガスを 15 Arb、噴霧電圧を 3.5 kV、イオントラsfアーチューブ温度を 270°C、噴霧器温度を 250°C に設定し、最適化した。アルゴンガスを衝突ガスとして使用し、2.0 mTorr に設定した。溶出時間および定量イオンを Table 2 に示した (41)。

**Table 2. Retention time and  $m/z$  values of AGEs, Amadori products, and amino acids by LC-ESI-MS/MS.**

Analyte	Retention time (min)	Collision energy (eV)	Parent ion ( $m/z$ )	Fragment ion ( $m/z$ )
GL	15.7	18.8	309.2	210.1
[ $^{13}\text{C}_6$ ] GL	15.7	19.0	315.2	216.1
furosine	13.5	15.1	255.1	192.1
[ $^{13}\text{C}_6$ ] furosine	13.5	15.7	261.2	198.1
lysine	15.8	15.0	147.1	84.0
[ $^{13}\text{C}_6$ ] lysine	15.8	15.0	153.1	89.0

## 2-12. GL および FL の化学的性質の解析

酸加水分解下における GL および FL の安定性の評価として、10 pmol GL もしくは FL 標準品を 1 mL の 6 M HCl とともに 100°C で 0-48 時間加水分解した。その試料を乾燥させ、100  $\mu$ L の 20% ACN 0.1% FA で再溶解した。LC-ESI-QTOF によって同試料を測定した。

生理学的な条件における GL および FL の生成のため、BSA を 0.1 M NaBH<sub>4</sub> および 0.2 M ホウ酸ナトリウム緩衝液 (pH 9.1) とともに室温で 4 時間静置することで還元した。還元 BSA (Reduced BSA; RdBSA) を 0.2 M NaPB (pH 7.4) の下、4°C で 18 時間透析し、その蛋白濃度を BCA 法 (Pierce, イリノイ) で測定した。RdBSA (1.5 mg/mL) を 30 mM fructose (Fru-RdBSA)、glucose (関東化学、東京; Glu-RdBSA)、galactose (富士フイルム和光純薬、大阪; Gal-RdBSA)、mannose (関東化学、東京; Man-RdBSA) とともに 0.2 M NaPB (pH 7.4) の下 37°C で 0-14 日間保持した。それらの試料を超純水の下、4°C で 18 時間透析し、蛋白濃度を BCA 法によって測定した。10  $\mu$ g の修飾 BSA 試料を 1 mL の 6 M HCl とともに 100°C で 18 時間加水分解した。その試料を乾燥させ、50  $\mu$ L の 20% ACN 0.1% FA に再溶解した。それらの試料を LC-ESI-QTOF によって測定した。

## 2-13. 酸化ストレスによる GL もしくは FL の CML への変換

50 mM Na-PB (pH 7.2) における 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の非存在もしくは存在下で 0.4 mM FeCl<sub>2</sub> とともに GL もしくは FL (20 pmol) を 37°C で 1 時間保持した。その試料溶液に、1 mL の 0.1% TFA を加えた。その後、Strata-X-C column (Phenomenex, カルフォルニア) によって精製された。精製条件として、カラムを 1 mL の MeOH で予備洗浄、1 mL の 0.1% TFA を滴下することで平衡化し、試料をカラムに滴下し、そのカラムを 3 mL の 2% FA で洗浄した。1.5 mL の 7% アンモニアを含む 20% MeOH 溶液で溶出させた画分を乾燥させ、0.2 mL の 20% ACN 0.1% FA で再溶解した (21)。試料を LC-ESI-QTOF によって測定した。

## 2-14. ラット水晶体中 AGEs およびアマドリ産物の測定

ラット水晶体を 0.2 mL の 1 mM diethylenetriamine-N,N,N',N'',N''-pentaacetic acid (同仁化学研究所、熊本) とともに shake master auto Ver. 2 (Biomedical Science, 東京) によって破碎した。その破碎溶液における蛋白濃度を BCA 法で測定した。

#### 2-15. ラット水晶体中 CML 測定

ラット水晶体試料 (各 0.3 mg) を CML の測定に用いた。試料を 20  $\mu$ L の 200 mM ホウ酸ナトリウム緩衝液 (pH 9.1) 下の NaBH<sub>4</sub> (2  $\mu$ L の 1 M NaBH<sub>4</sub> in 0.1 N NaOH) とともに室温で 4 時間静置した。CML および lysine 内部標準をこれらの沈殿物に添加し、1 mL の 6 M HCl とともに 100°C で 18 時間加水分解した。その乾燥試料を 1 mL の 0.1% TFA で再溶解し、Strata-X-C column で精製した。精製条件として、カラムを 1 mL の MeOH で予備洗浄し、1 mL の 0.1% TFA を滴下することで平衡化した。そのカラムを 2% FA で洗浄し、7% アンモニアを含む 20% MeOH 溶液で溶出した画分を乾燥した。溶出画分を 0.2 mL の 20% ACN 0.1% FA で再溶解した。それらの試料を LC-ESI-QTOF によって測定した。

#### 2-16. ラット水晶体および腎臓中 GL および furosine の測定

ラット水晶体 (0.3 mg) もしくは腎臓 (0.2 mg) を GL および furosine の測定に用いた。GL および furosine、lysine、これらの内部標準を破碎試料に加え、1 mL の 6 M HCl とともに 18 時間加水分解した。その乾燥試料を 1 mL の 0.1% TFA に再溶解し、Sep-pak C18 column で精製した。精製条件として、カラムを 1 mL の MeOH で予備洗浄し、1 mL の溶解溶媒と同じ溶液滴下することで平衡化した。試料溶液を滴下した素通り画分および 1 mL の同じ溶液で溶出した画分をまとめて乾燥させ、1 mL の 20% ACN 0.1% FA で再溶解した。その試料を LC-ESI-MS/MS によって測定した (41, 42)。

#### 2-17. ラット水晶体中 sorbitol 測定

1 mg のラット水晶体試料を sorbitol の測定に用いた。その溶液体積を 1% TFA で 0.2 mL にメスアップし、sorbitol 内部標準をその溶液に添加した。その試料溶液を 10,000 molecular weight cut-off filter によってろ過した。0.1 mL のろ過溶液に 0.9 mL の 1% TFA を加え、Sep-pak C18 column で精製された。精製条件として、カラムを 1 mL の MeOH で予備洗浄し、1 mL の 1% TFA を滴下することで平衡化した。試料溶液を滴下した素通り画分および追加された同じ溶液画分をまとめて乾燥させ、0.1 mL の 20% ACN で再溶解した。それらの試料を LC-ESI-QTOF によって測定した。

## 2-18. 統計解析

データを平均値 ± 標準偏差 (standard deviation, SD) で表した (Table 3, Fig. 1, 5, 6, 7)。グループ間の GL および CML、sorbitol、furosine 濃度の違いを一元配置分散分析 (one-way analysis of variance, ANOVA; normal 1 week vs. normal 8 weeks, DM 1, 2, 4, 8 weeks) を用いて統計的な有意差を算出した。2 群間の差は Student's t-test で分析され、多重比較法は、Bonferroni correction method を用いた。

### 3. 結果

#### 3-1. ラット水晶体蛋白と Fru-P 抗体との反応性

Wistar ラットにおいて STZ による 1 型糖尿病が誘発され、水晶体蛋白における GL の変化が他の生化学的パラメーターと比較された。Table 3 に示されるように、健常ラットの体重は時間依存的に増加したが、糖尿病ラットの体重増加は緩やかであり、8 週目では健常よりも体重がおおよそ 29.9%低かった。糖尿病ラットの空腹時血糖値は糖尿病誘発後、劇的に増加し、飼育期間中に緩やかに増加した。対照的に健常ラットの血糖値は飼育期間中に 8 週目を除いて変化しなかった。さらに HbA1c 値は糖尿病ラットにおいて飼育期間中に増加したが、健常ラットにおいては 8 週目でさえ変化しなかった。

**Table 3. Biochemical parameters of rats after the induction of diabetes**

Weeks after STZ injection	0	1	2	3	4	6	8
Body weight							
Normal (n = 6)	157.2 ± 5.2	201.7 ± 7.4	231.7 ± 9.3	277.5 ± 12.3	307.7 ± 15.0	362.2 ± 20.9	401.0 ± 24.9
DM (n = 6)	157.1 ± 5.8	183.3 ± 13.3	201.9 ± 19.2	235.7 ± 19.0	254.0 ± 21.2	257.0 ± 44.5	281.0 ± 46.9
Blood glucose							
Normal (n = 6)	87.3 ± 17.0	63.1 ± 27.4	98.3 ± 7.6	89.7 ± 20.3	105.7 ± 9.1	105.8 ± 8.8	211.0 ± 38.4
DM (n = 6)	99.1 ± 35.3	321.3 ± 18.7	384.1 ± 39.7	380.8 ± 84.6	461.5 ± 38.5	496.4 ± 38.2	537.1 ± 68.6
HbA1c							
Normal (n = 6)	n.d.	3.1 ± 0.1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3.7 ± 0.1
DM (n = 6)	n.d.	4.5 ± 0.2	5.8 ± 0.3	n.d.	7.5 ± 0.2	8.6 ± 0.8	9.2 ± 0.7

DM, Diabetic group; n.d., not determined

WB で検出されたラット水晶体における Fru-P 抗体のエピトープは、糖尿病誘発によって劇的に増加したが (Fig. 2A-B)、CML は糖尿病誘発によってほとんど変化しなかった (Fig. 2D-E)。その Coomassie brilliant blue 染色されたポリアクリルアミドゲルにおける残余の蛋白量は差がないことが示された (Fig. 2C, F)。さらに、ELISA によって検出においてもまた、糖尿病の誘発を受けてラット水晶体における Fru-P 抗体のエピトープ構造および CML がそれぞれ、5.9 倍 (Fig. 2G)、1.1 倍 (Fig. 2H) まで増加した。

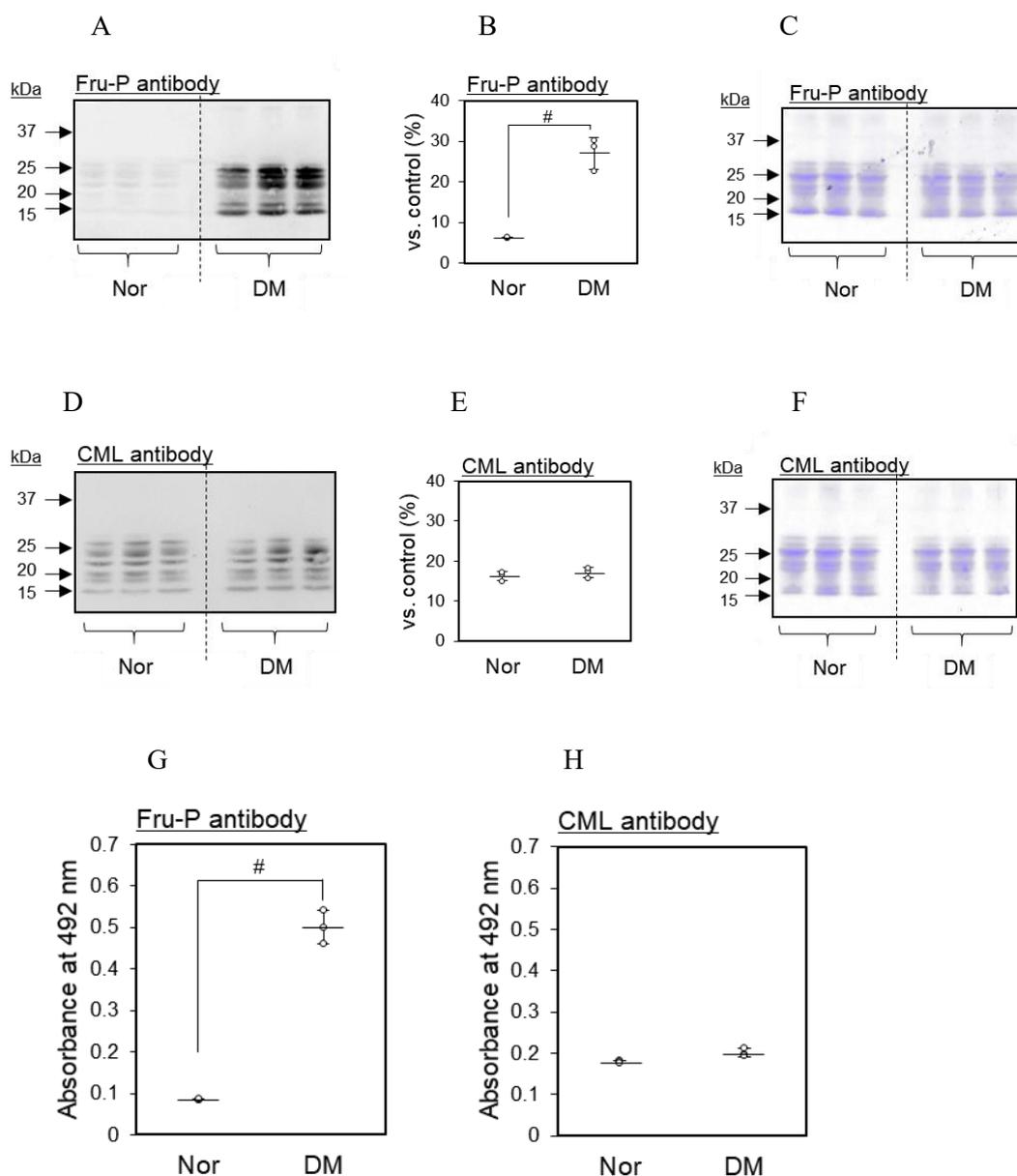
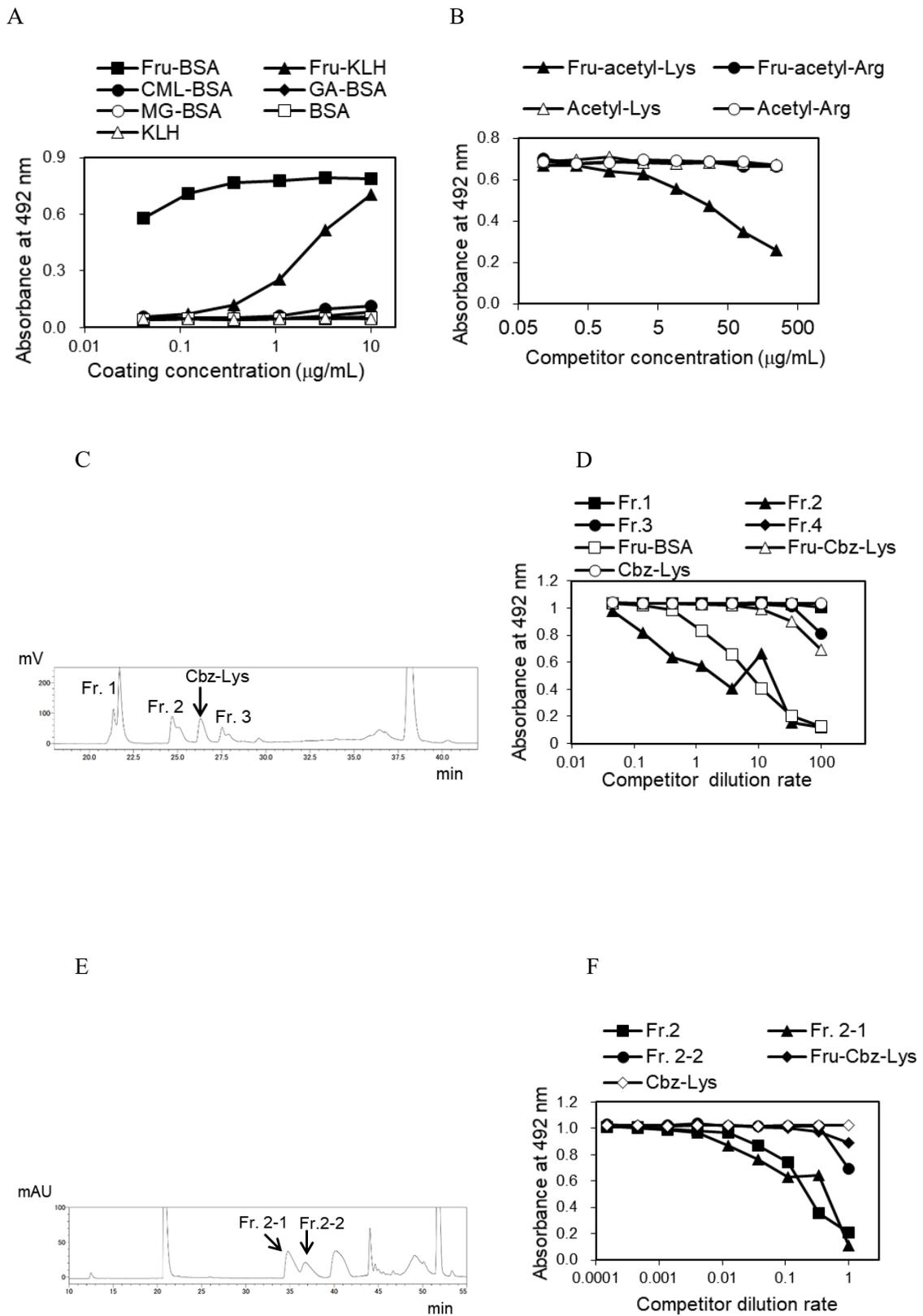


Figure 2. Reactivity of Fru-P antibody or CML antibody to the rat lens proteins after the

**induction of diabetes.** Lens proteins (10 µg/lane) were applied to 12% SDS-PAGE and transferred to a polyvinylidene fluoride membrane. The proteins bound to the membrane were detected by WB using Fru-P antibody (A) or CML antibody (D) and were quantified by densitometric analysis (B, E). Residual proteins on the polyacrylamide gel after blotting were stained by Coomassie brilliant blue as a loading control (C, F). Each well of a 96-well immunoplate was coated with 10 µg/mL lens protein, and the reactivity of 0.5 µg/mL Fru-P antibody (G) or CML antibody (H) were visualized by horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG antibody and 1,2-phenylenediamine dihydrochloride as described in the Experimental Procedures. Nor, normal at 8 weeks (n = 3); DM, diabetes at 8 weeks (n = 3). The data are presented as mean ± SD. #p < 0.001 vs. normal at 8 weeks (Student's t-test).

### 3-2. Fru-P 抗体のエピトープ構造の同定

Fru-P 抗体のエピトープ構造を分析するため、本抗体の反応性が非競合 ELISA で測定された。Fig. 3A に示されるように、Fru-P 抗体は fructose 修飾 BSA (Fru-BSA) および keyhole limpet hemocyanin (Fru-KLH) と時間依存的に反応したが、他のアルデヒド修飾 BSA および native BSA とはほとんど反応しなかった。アルデヒドによって優先的に修飾されると考えられる lysine もしくは arginine のようなアミノ酸と fructose との反応産物において (34)、本抗体は fructose 修飾 N<sup>α</sup>-acetyl-lysine とのみ、時間依存的な反応が認められ (Fig. 3B)、そのエピトープ構造は lysine から生成されることが示唆された。Fig. 3C に示されるように、fructose および N<sup>α</sup>-Cbz-lysine の反応物である Fru-Cbz-lysine の溶出物は、270 nm における UV 吸収で観測し、N<sup>α</sup>-Cbz-lysine は 26-27 分に溶出され、4 つの fraction に分離された (fraction 1, 21-22.5 分; fraction 2, 24.5-25.5 分; fraction 3, 27-28.5 分; fraction 4, 37.5-39 分)。競合物のポジティブコントロールとして Fru-BSA が競合 ELISA で用いられた。Fru-BSA と Fru-P 抗体との反応性は、Fru-BSA および fraction 2 によって有意に競合された (Fig. 3D)。競合 ELISA の結果から、Fru-P 抗体のエピトープは fraction 2 に含まれるが、fraction 2 は二峰性ピークであることから、さらなる分離が必要であった。したがって、反応混合物である Fru-Cbz-lysine の溶出物は、分離効率を改善した HPLC のプログラムによって 270 nm における UV 吸収で観測し、Fig. 2E の結果を得た。Fig. 3E に示されるように、N<sup>α</sup>-Cbz-lysine は 40-42 分に溶出され、fraction 2-1 および 2-2 はそれぞれ、34-36 分、36-38 分に検出された。競合物のポジティブコントロールとして Fraction 2 が競合 ELISA で用いられた。Fru-BSA と Fru-P 抗体との反応性は、fraction 2 および fraction 2-1 によって有意に競合された (Fig. 3F)。

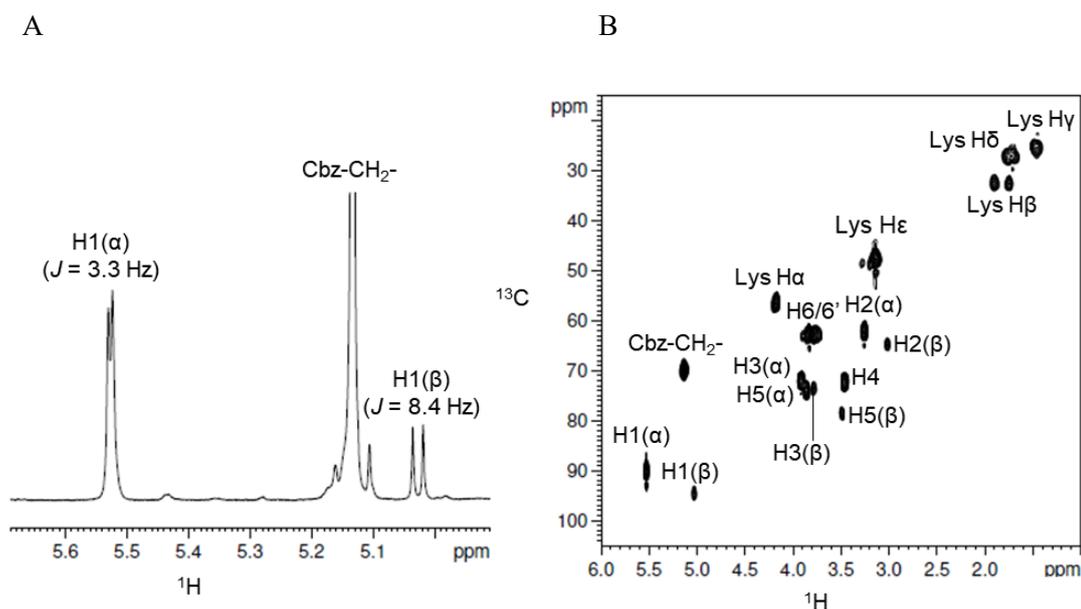


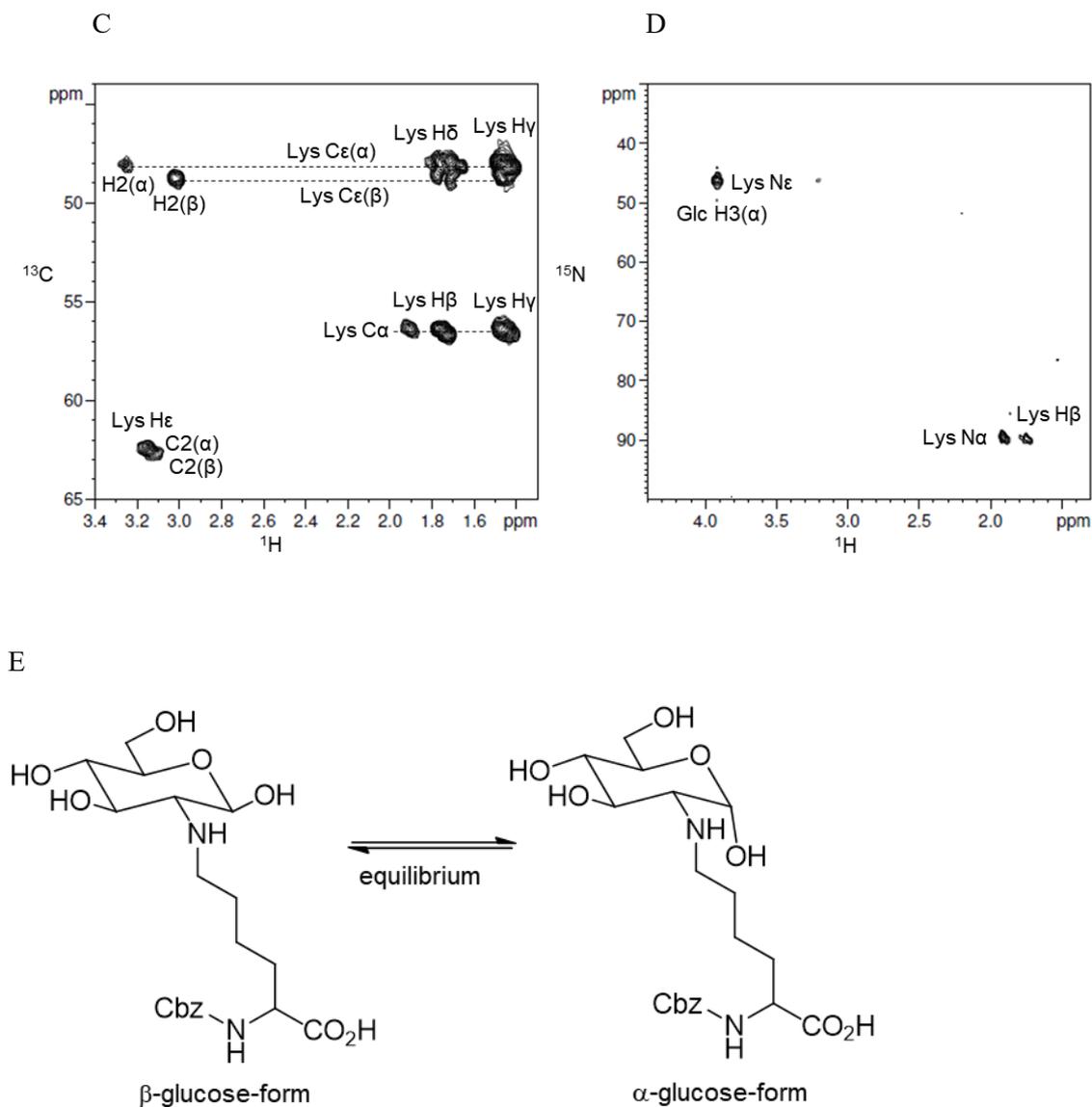
**Figure 3. Isolation of the epitope structure of the Fru-P antibody. Amino acids producing the**

**epitope were analyzed and the epitope structure was isolated by HPLC.** (A) Each well of a 96-well immunoplate was coated with modified proteins, and the reactivity of Fru-P antibody (0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) was visualized by horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG antibody and 1,2-phenylenediamine dihydrochloride as described in the Experimental Procedures. (B) Fru-BSA (0.01  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) was coated on the immunoplate and then blocked with gelatin. Fifty microliters of each competitor was added in the presence of the same volume of Fru-P antibody (0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). The antibody bound to the well was visualized as described above. (C) One hundred microliters of fructose-modified Cbz-lysine (50 mM) was applied to first-step HPLC and separated into four fractions (Fr. 1-4). (D) The reactivity of Fru-P antibody with the four isolated fractions was measured by competitive ELISA. (E) Fr. 2 obtained from first-step HPLC was further applied to second-step HPLC. (F) The reactivity of Fru-P antibody with Fr. 2-1 and 2-2 isolated from second-step HPLC system was measured by competitive ELISA.

### 3-3. NMR 構造解析

NMR 分析は、Fructose 及び N<sup>ε</sup>-Cbz-lysine から生成された fraction 2-1 の構造を同定するために行われた。一次元 <sup>1</sup>H NMR スペクトルは、5.53 および 5.03 ppm における 2 つのアノマーシグナル (ピラノースあるいはフラノースが環状構造を取ることで発生する立体異性体であることを示すシグナル) の存在を示し (Fig. 4A)、糖が α および β ヘミアセタール型間で平衡状態であることを示唆している。各アノマーシグナルにおける結合定数はそれぞれ、3.3 および 8.4 Hz であり、糖は glucose 様で mannose 型の立体配置ではないことが示唆されている。各シグナルは、一次元 NMR および二次元 NMR によって帰属され、その結果は Fig. 4B に示された。糖および lysine 間の連鎖を同定するため、<sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HMBC および <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N HMBC スペクトルが測定された (Fig. 4C-D)。いくつかの HMBC ピークは糖および lysine 側鎖間で観察された。まとめると、lysine 側鎖の ε 位アミノ基が Fru-P 抗体エピトープにおける炭素 2 位に結合されていると結論付けられた。したがって、Fru-P のエピトープは、glucoselysine (GL) であった。

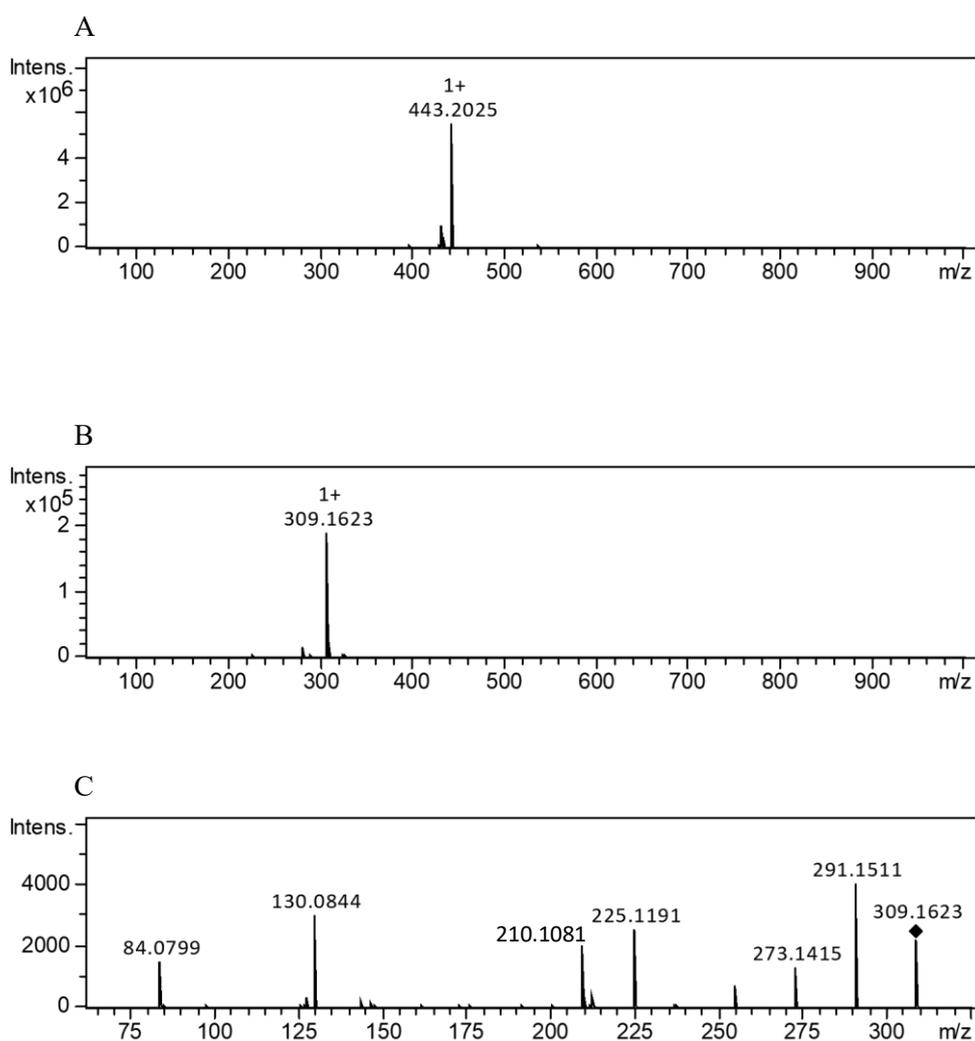




**Figure 4. NMR analysis of the epitope structure recognized by the Fru-P antibody.** NMR spectra of fraction 2-1 shown for (A) 1D  $^1\text{H}$ , (B) 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC, (C) 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC, and (D) 2D  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HMBC. The assignments are labeled for each peak. (E) Chemical structure of glucoselysine.

### 3-4. LC-ESI-QTOF による構造解析

NMR による構造解析を確認するため、エピトープ構造は ESI-QTOF-MS/MS でも分析された。精製 fraction の  $m/z$  443.2025  $[M+H]^+$  におけるイオンピーク  $C_{20}H_{30}N_2O_9$  ( $m/z$  443.2024) と推定された (Fig. 5A)。パラジウム炭素を用いた接触還元によって Cbz 基が脱保護された後、 $m/z$  309.1656 ( $C_{12}H_{25}N_2O_7$ ) (Fig. 5B) におけるピークが GL および FL と同様の質量電荷比と一致した。 $m/z$  309.1656 における fragment ion は MS/MS によって検出され、Fig. 5C および Table 4 に示された。



**Figure 5. Structural analysis by LC-ESI-QTOF.** (A) ESI-QTOF analysis of fraction 2-1 showing an ion peak at  $m/z$  443.2024  $[M+H]^+$  calculated as  $C_{20}H_{30}N_2O_9$ . (B) ESI-QTOF analysis

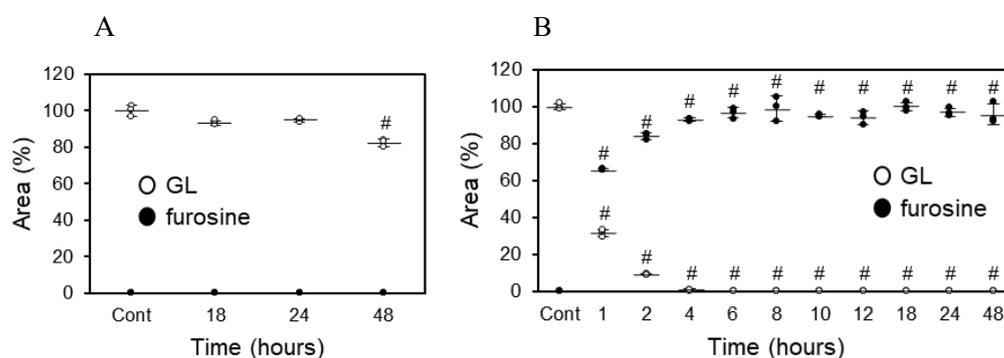
of de-protected fraction 2-1 showing an ion peak at  $m/z$  309.1656  $[M+H]^+$  calculated as  $C_{12}H_{25}N_2O_7$ .  
(C) MS/MS analysis of the de-protected fraction 2-1 of  $m/z$  309.1656  $[M+H]^+$  detected fragment ions shown in Table 4.

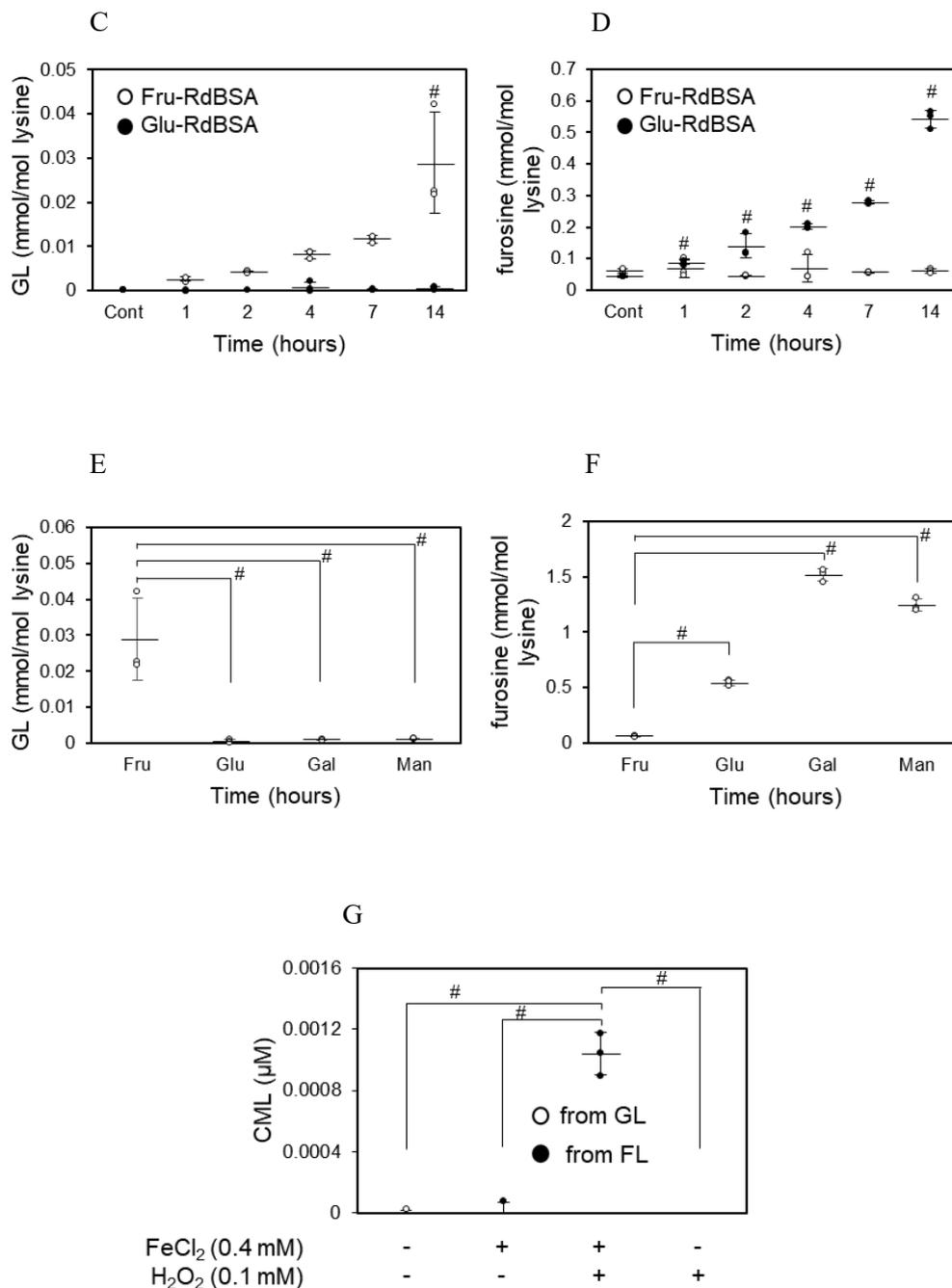
**Table 4. Identification of glucoselysine fragment ion formulas by LC-ESI-QTOF**

<b>Expected <math>m/z</math> and Formula</b>	<b>Detected <math>m/z</math></b>	<b>Difference of <math>m/z</math></b>
84.0808 ( $C_5H_{10}N$ )	84.0799	-0.0009
130.0863 ( $C_6H_{12}NO_2$ )	130.0844	-0.0019
210.1125 ( $C_{11}H_{16}NO_3$ )	210.1081	-0.0044
225.1234 ( $C_{11}H_{17}N_2O_3$ )	225.1191	-0.0043
255.1339 ( $C_{12}H_{19}N_2O_4$ )	255.1271	-0.0068
273.1445 ( $C_{12}H_{21}N_2O_5$ )	273.1415	-0.0030

### 3-5. GL 及び FL の化学的性質

Fructose から生成された GL および glucose から生成された FL はそれぞれ、等しい  $m/z$  ( $C_{12}H_{25}N_2O_7$ ) および元素組成を持ち、その化合物における化学的性質は比較された。Fig. 6A に示されたように、GL は 6 M HCl 下で 48 時間 100°C の条件で安定であったのに対し、FL の全ては同一条件で 18 時間以内に分解された。さらに、furosine は 1 時間で生成され始め、4 時間で FL から完全に furosine へ分解された (Fig. 6B)。FL および GL の収量と比べるため、fructose もしくは glucose, galactose, mannose の存在下で、あらかじめ還元処理によって天然 BSA に含まれる GL が除外された還元型 BSA (Reduced BSA: RdBSA) が反応された。Fructose と反応された条件では GL 濃度は時間依存的に生成されたが、glucose もしくは galactose, mannose からは生成されず、GL は fructose から優先的に生成されたことが証明された (Fig. 6C, D)。対照的に、FL の加水分解物である furosine 濃度は、glucose とともに反応された RdBSA において時間依存的に増加したが fructose からは少量しか生成されず (Fig. 6E)、この結果 FL は、glucose および galactose, mannose から優先的に生成されることが示唆された (Fig. 6F)。GL が hydroxy radical に曝されることによって、酸化ストレスに対する GL の安定性が評価された。FL は酸化によって CML を生成するため、こちらをポジティブコントロールとして用いた。Fig. 6G に示されるように、FL が塩化鉄 (II) および過酸化水素由来の hydroxy radical に曝露されたことで CML が生成された。対照的に GL が同様の条件で hydroxy radical に曝された時、その CML 濃度は検出限界以下であった。これらの結果より、GL は酸化条件下では CML を生成しないことが分かった。





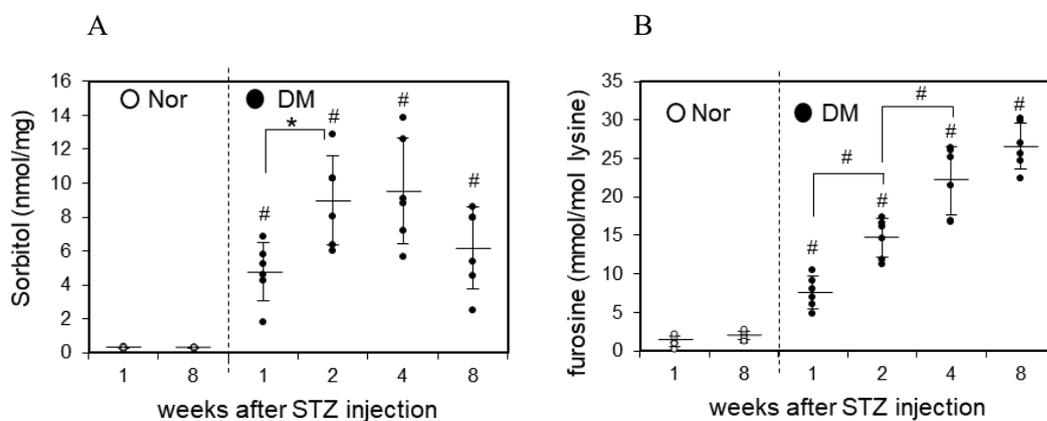
**Figure 6. Chemical properties of glucoselysine (GL) and fructoselysine (FL).** The stability of GL (A) and FL (B) and formation of furosine under acid hydrolysis under 6 M HCl at 100°C for 48 h were measured by LC-ESI-QTOF. The formation of GL (C) and furosine (D) during incubation of reduced-BSA (RdBSA) with fructose (Fru) or glucose (Glu) at 37°C for up to 14 days. Comparison of GL (E) and furosine (F) formation during incubation of RdBSA with Fru, Glu, galactose (Gal), and mannose (Man) at 37°C for 14 days. (G) GL and FL were incubated in 50 mM

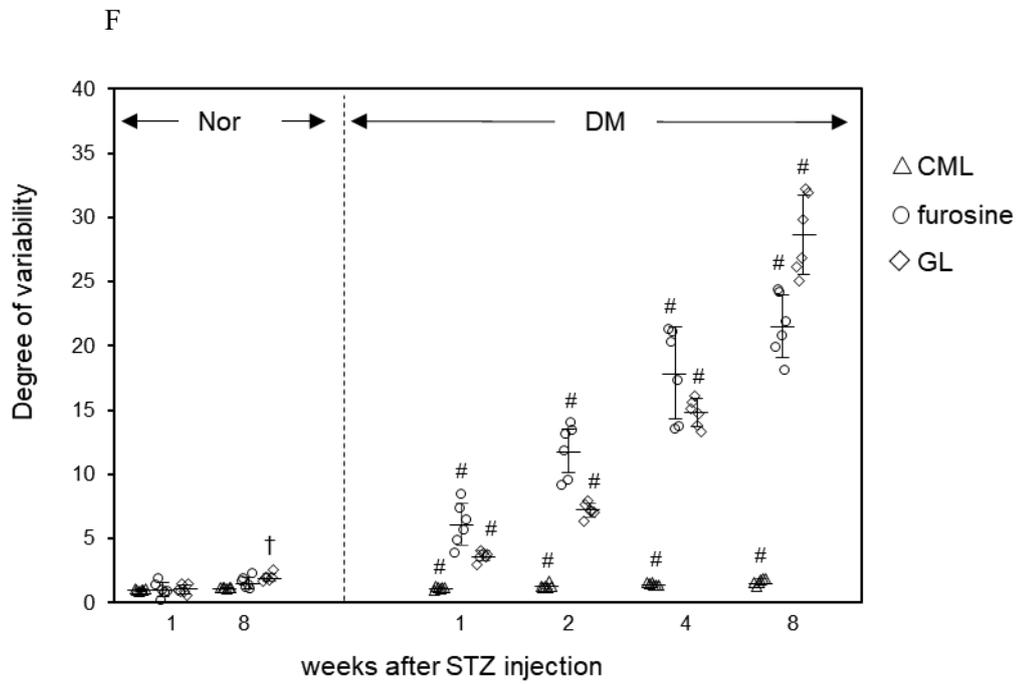
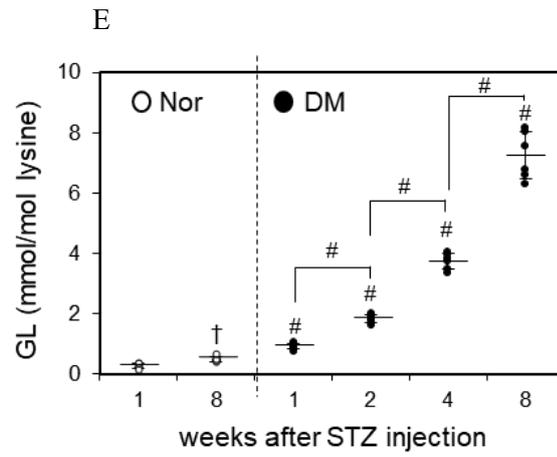
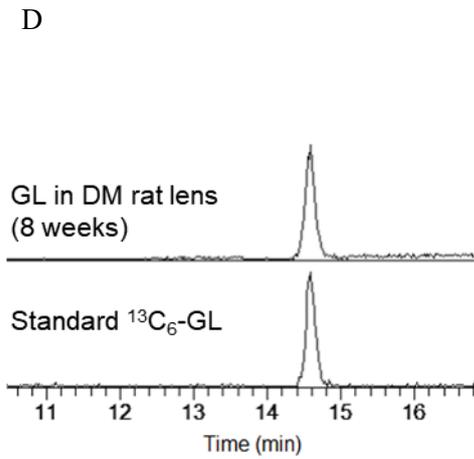
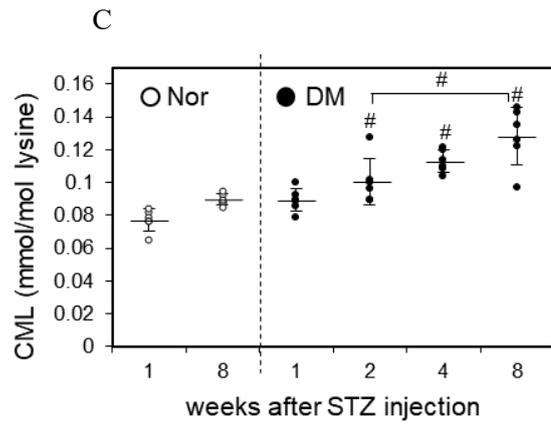
sodium phosphate buffer (pH 7.2) in the presence or absence of FeCl<sub>2</sub> (0.4 mM) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.1 mM) at 37°C for 1 h, and CML formation was determined by LC-ESI-QTOF. The data are presented as mean ± SD (n = 3). #p < 0.001 vs. control or Fru (Bonferroni test).

### 3-6. LC-ESI-QTOF もしくは LC-ESI-MS/MS によるラット水晶体における sorbitol, furosine, CML, GL の定量

糖尿病および健常ラット水晶体における sorbitol および furosine、CML, GL は内部標準を用いた LC-ESI-QTOF もしくは LC-ESI-MS/MS によって分析された。

Sorbitol と [ $^{13}\text{C}_6$ ] sorbitol はそれぞれ 5.9 分に検出された。Sorbitol 濃度は糖尿病誘発後、2 週目で平衡に達した (Fig. 7A)。対照的に FL として測定された furosine および CML は時間依存的に増加した (Fig. 7B-C)。Fig. 7D に示されるように、GL および [ $^{13}\text{C}_6$ ] GL の定量イオンは LC-ESI-MS/MS によって検出された。糖尿病誘発後、ラット水晶体中 GL 濃度は、糖尿病誘発後 1、2、4、8 週目にかけて有意かつ時間依存的に増加した (Fig. 7E)。特に、糖尿病誘発後 8 週目における furosine および CML はそれぞれ、21.5 および 1.7 倍増加したが、8 週目における GL 濃度は 31.3 倍増加した (Fig. 7F)。GL はラット腎臓において検出可能であったが、健常および糖尿病群間で統計的な有意差はなかった (健常群:  $0.341 \pm 0.203$  mmol/mol of lysine, 糖尿病群:  $0.402 \pm 0.182$  mmol/mol lysine, 平均  $\pm$  標準偏差,  $n = 6$ )。





**Figure 7. Quantification of sorbitol, furosine, CML, and GL in the rat lens by LC-ESI-QTOF or LC-ESI-MS/MS.** Changes in sorbitol (A), furosine (B), and CML (C) in rat lens proteins were measured by LC-ESI-MS/MS. (D) Typical chromatogram of GL and  $^{13}\text{C}_6$ -GL in the rat lens obtained by LC-ESI-MS/MS. Changes in GL (E) in rat lens proteins were measured by LC-ESI-MS/MS. The variability in the rate of CML, furosine and GL are indicated (F). Nor: normal group (n = 6), DM: diabetic group (n = 6). The data are presented as mean  $\pm$  SD. #p < 0.001, vs. normal at 1 week (Bonferroni test). In addition, (A) \*p < 0.05, DM at 1 week vs. DM 2 weeks. (B) #p < 0.001, DM at 1 week vs. DM at 2 weeks; DM at 2 weeks vs. 4 weeks. (C) #p < 0.001, DM at 2 weeks vs. DM at 8 weeks (Bonferroni test). (E, F) †p < 0.01, vs. normal 1 week (Student's t-test); #p < 0.001, vs. normal at 1 week (Bonferroni test). In addition, #p < 0.001, DM at 1 week vs. DM at 2 weeks; DM at 2 weeks vs. DM at 4 weeks; DM at 4 weeks vs. DM at 8 weeks (Bonferroni test).

#### 4. 考察

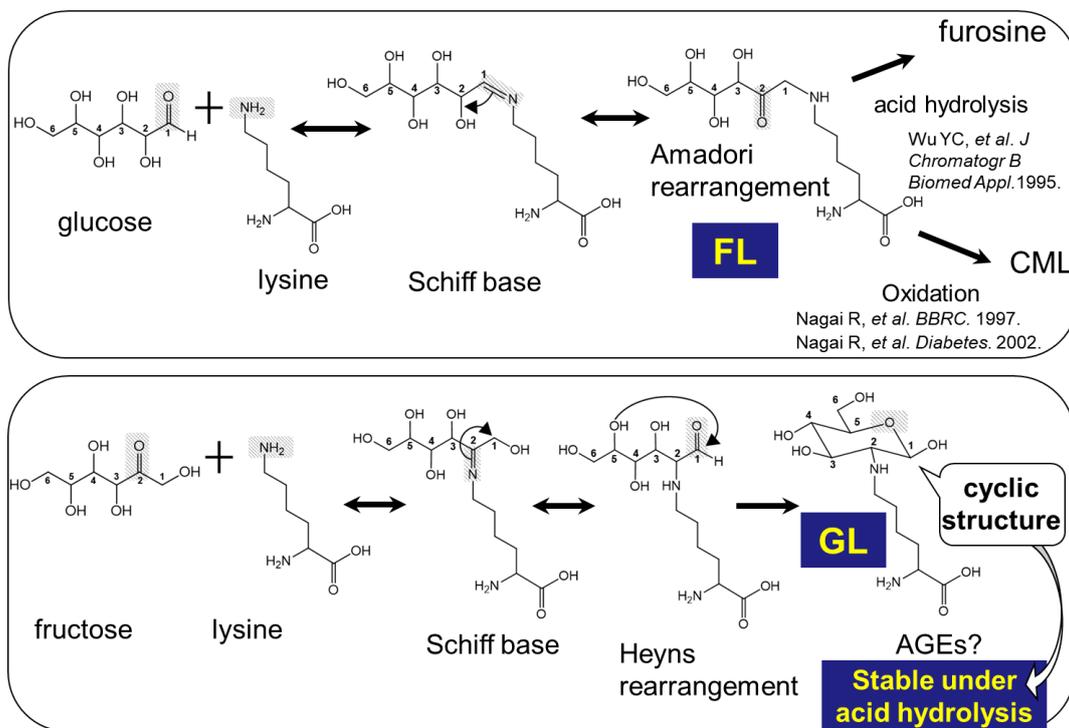
糖尿病合併症の発症に関する詳細な機序は不明であるが、近年、AGEs は本疾患の関与因子として浮上してきている (31)。いくつかの AGEs 構造は生体試料で同定されてきたが、中でも CML は世界中で最も測定されている AGEs である。例えば、CML は糖尿病や (27)、動脈硬化 (19)、腎症 (43) や網膜症 (17) のような糖尿病合併症の進行とともに蓄積することが知られている。WB および ELISA の結果は、Fru-P 抗体が CML 抗体よりも糖尿病ラット水晶体と高い反応性を示した。したがって Fru-P 抗体のエピトープである GL は高血糖条件下における水晶体蛋白の修飾に寄与している可能性がある。Fru-P 抗体のエピトープが糖尿病ラット水晶体へ蓄積する現象は、1998 年に初めて報告されたが (34, 44)、そのエピトープ構造は今まで同定されていなかった。そこで今回新たに作製された Fru-P 抗体のエピトープを同定し、機器分析にてラット水晶体での検出を試みた。さらに、AGEs の濃度は糖尿病や関連する合併症の一般的な臨床のバイオマーカーであるが、AGEs の免疫化学的な検出方法は、加熱や (45) アルカリ処理 (46)、AGEs に対する自己抗体の存在による影響を受ける (47)。したがって、各 AGEs 構造の同定および正確な定量技術は、臨床検査会社において AGEs の生物学的な重要性の評価を行うために必要とされる。

ここで、Fru-P 抗体が fructose 修飾 KLH および BSA を認識するが、それらの未修飾の KLH および BSA を認識しないことを証明した。その上、本抗体は主要な抗原の AGEs である CML もしくは、MG や GA によって修飾された蛋白を認識せず (48)、本抗体のエピトープ構造がこれまで同定された AGEs 構造とは異なることを証明している。GL における側鎖の分子量は 162 Da であり、lysine を含む GL の全体の分子量は 308 Da であることから、Fru-P 抗体による GL の検出はアミノ酸配列および GL 周囲の 3-D 構造によって影響を受けるかも知れない。

Heyns ら (49) は、fructose が lysine 付加体を形成し、それを GL として名付けたことを提唱したが、機器分析による構造の確認はされていなかった。さらに Kawasaki ら (34) は、糖尿病ラット水晶体における Fru-P 量と sorbitol 濃度が正の相関関係にあることを示した。まとめると、これらの報告は、fructose 修飾蛋白がポリオール経路の進行に伴って水晶体に蓄積することを示唆していた。

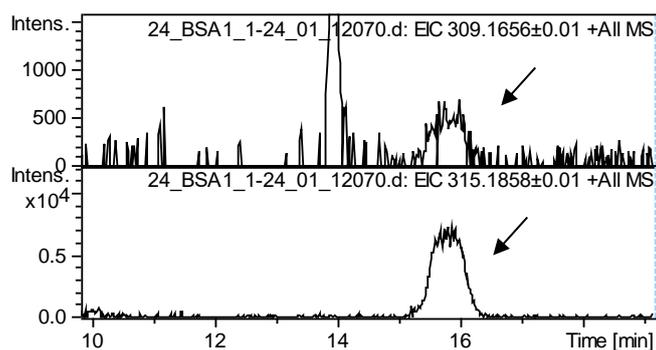
ここで、GL が酸加水分解条件下で安定であるのに対し、FL が同条件によって furosine へ変換されたことを示した。FL は glucose および lysine との反応によって Schiff 塩基を

経て生成される環構造を持たないアマドリ転位物である。これに対し、GLは fructose および lysine との反応でヘインズ転位を介して生成され、環構造を持つため、酸加水分解に安定であったと推測された (Fig. 8)。Furosine 含量は、主として塩酸加水分解前の FL 含量を反映すると考えられているが、以前の実験では試料を 18 時間、塩酸加水分解された後でさえ、生体試料中 FL と同一の parent ion である  $m/z$  309 が検出された (data not shown)。今回、FL 標準品の全ては 4 時間の塩酸加水分解によって furosine へ変換されたため、これまで加水分解後に検出された  $m/z$  309 は GL であった可能性が高い。



**Figure 8. Formation pathway of FL and GL.** FL, which is an amadori product, is formed via schiff base by the reaction of glucose and lysine, has no cyclic structure. however, GL is formed via schiff base and heyns product by the reaction of fructose and lysine, has cyclic structure.

また、塩酸加水分解後の市販 BSA でも GL の parent ion が検出され (Fig. 8)、GL がウシ血清で生成される可能性を示している。生体試料における内在性の GL および FL の存在の可能性を考慮し、これらを除外するために BSA は数種類の糖質と反応する前にテトラヒドロホウ酸ナトリウムを用いて還元された。これらの結果は、FL は mannose および galactose, glucose から生成されたが、GL は fructose から主に生成されることが示された。したがって、GL は fructose による蛋白修飾の有用なマーカーになる可能性を持つ。FL はアマドリ転位生成物の一つであり、hydroxyl radical で酸化されて CML を形成する (21)。対照的に、GL は hydroxyl radical に曝された後も CML を形成せず、その安定性から臨床研究においても適切に検出されることが証明された。血糖値は時々、動物が興奮することで一時的に上昇するため、水晶体中で furosine として測定された FL 濃度 (Fig. 7B) および HbA1c (Table 3) もまた、今日の研究で glucose 濃度の変動を評価するために測定された。

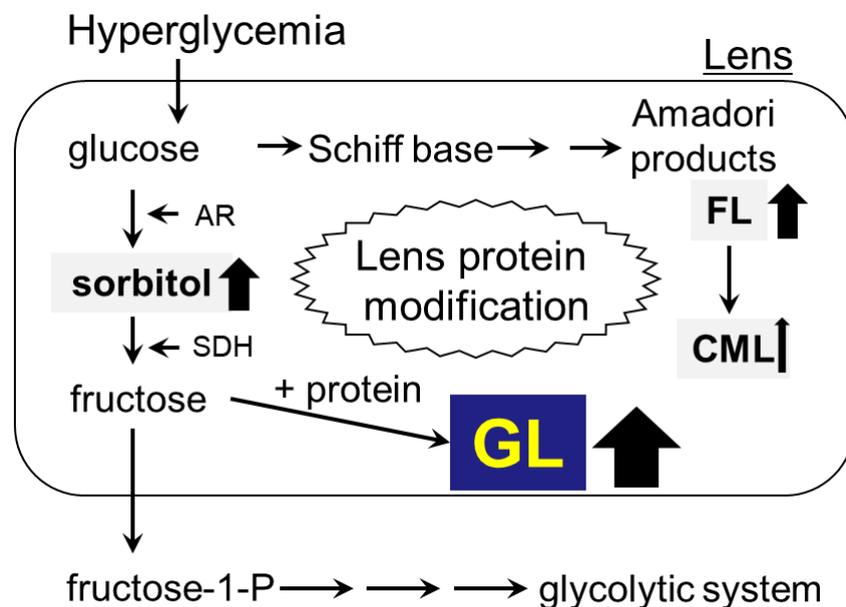


**Figure 9. Detection of GL in native BSA by LC-ESI-QTOF.** The GL was detected as  $m/z$  309.1656 from non-modified BSA after acid hydrolysis by LC-ESI-QTOF. [ $^{13}\text{C}_6$ ] GL internal standard was detected as  $m/z$  315.1858 by LC-ESI-QTOF.

Nakayama ら (50) および Turk ら (51) は、6-14 週齢の間で健常ラットにおける水晶体蛋白の蛍光強度が変化しなかったことを証明した。対照的に、LC-ESI-MS/MS によって測定された GL 濃度は、6 週齢から 8 週間飼育された健常ラットの水晶体において有意な増加が示され、GL は加齢に応じて、増加することを示唆している。今回の研究は、fructose から生成される構造の同定および生体における本構造の存在、そのラット水晶体蛋白における糖尿病の発症による増加に着目したため、健常な加齢によって GL が増加

するかどうかを明確にするにはさらなる研究が必要とされる。

Kawasaki ら (34) の研究では、ラット水晶体蛋白への Fru-P 抗体の反応性が糖尿病を誘発した後の 8 週目で増加した。先行研究と比較して、本研究で LC-ESI-MS/MS によって測定された GL 含量は、糖尿病発症後 1 週目で増加した。さらに、GL および FL, CML 濃度は健常 1 週目に比べ、糖尿病誘発から 8 週目でそれぞれ、31.3, 21.5, 1.7 倍増加した。これまでに糖尿病発症後 8 週間以内に 20 倍増加する AGEs 構造は報告されていない。これらの結果は、FL および CML よりも高い増加率で、ポリオール経路の進行に付随して水晶体における GL が蓄積することを証明した。したがって、GL 蓄積は初期の fructose による水晶体蛋白の変性を反映する (Fig. 10)。しかしながら、ラット腎臓における GL 濃度は、糖尿病の誘発によって増加しなかった。以前に 27 週飼育されたラットで、合計 24 時間蓄尿された試料における尿中蛋白およびアルブミン濃度が非糖尿病ラットと比較して糖尿病ラットでそれぞれ、およそ 5 および 6 倍増加したことが報告されている (27)。ラットは本研究で糖尿病の誘発後 8 週間のみ飼育されたため、腎機能はまだ正常に機能しており、腎臓における GL 濃度は有意に変化しなかったかも知れない。



**Figure 10. Metabolism of fructose and accumulation of GL formation.** In the lens, FL and CML are formed from glucose. Sorbitol and fructose are increased and metabolized to the glycolytic system by the progress of polyol pathway, whereas GL accumulates in the lens.

以前の報告で、水晶体におけるクリスタリン蛋白は MG もしくは ribose, galactose, fructose によって変性されたことが示され、白内障の原因の一つであるクリスタリン蛋白の凝集を誘発した。これらのアルデヒドもしくは六炭糖は MG-H1 もしくは CEL, CML を形成し (52, 53)、白内障の進行を反映すると考えられている。本研究において、ラット水晶体における GL 蓄積および糖尿病の進行との関連性は認められた。しかし、糖尿病合併症の進行との関連性は評価するにはさらなる研究が必要である。GL は明瞭に CML よりも高い増加率を示すため、加齢疾患である白内障の発症および進行とともに増加するかも知れない。ポリオール関連の糖尿病合併症のマーカーとして GL を使用できる可能性を明らかにするため、糖尿病の様々な期間との関連性や、関連する合併症を精査するためにさらなる研究が必要である。

## 第2章 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

### 1. 背景

#### 1-1. Pentosidine について

AGEs の中でも pentosidine は 1989 年に同定されてから広く測定されている AGEs 構造の 1 つである (54)。蛍光性を持つ pentosidine は酸化条件下で産生され、血漿中や水晶体中のクリスタリンに蓄積する。pentosidine 濃度は糖尿病合併症や動脈硬化、慢性腎不全等の加齢関連疾患による組織の損傷を反映すると言われ、特に腎不全においては発症期間に応じて血漿中 pentosidine 濃度が増加する。現在、簡便な AGEs 定量法として抗 AGEs 抗体を用いた ELISA が広く用いられている。しかし、臨床検査会社等で行われている抗体を用いた pentosidine 測定では、前処理の過程で加熱処理が行われている場合があり、加熱処理で生成する人工産物によって含量が過剰に見積もられてしまう可能性が高い (55)。また、LC-MS/MS による質量分析装置による定量では pentosidine 構造がイオン化されにくいことから定量が困難である。蛍光性を持つ pentosidine は蛍光検出器を用いた HPLC で定量が適している。今回 pentosidine 生成が進行しない酸性下で蛋白を塩酸加水分解し、HPLC を用いて血中濃度の測定を行った。

#### 1-2. マンゴスチン果皮の抗酸化及び AGEs 生成抑制作用

コラーゲンの糖化により生成される AGEs の一種である pentosidine はコラーゲン線維間において架橋構造を形成し、加齢や病態に伴って皮膚での蓄積増加が促進される。抗酸化及び抗炎症作用を持つフラボノイドやカテキン、プロシアニジン等のポリフェノール類 (56, 57) は *in vitro* における AGEs 生成を阻害することが知られている (24, 58, 59)。したがって高い抗酸化活性を持つマンゴスチン熱水抽出物 (Water extract mangosteen: WEM) は AGEs 生成抑制作用を示すことが予見された。

### 2. 実験方法

#### 2-1. 試薬

Gelatin は Sigma-Aldrich Japan (東京、日本) から購入した。Ribose は Wako (大阪、日本) から購入した。HRP-conjugated goat anti-mouse IgG antibody は Kirkegaard Perry Laboratories

(Gaithersburg, MD, USA) から購入した。

## 2-2. マンゴスチン果皮抽出物の調製

新鮮なマンゴスチン果皮を水で2分間煮沸した後、70°Cで8時間乾燥させた。乾燥マンゴスチン果皮 (600 kg) に熱水 (5,600 L) を加え、混合物をろ過した。濾液を減圧下で濃縮し、抽出物の固形分を溶解するために33%デキストリンを添加し、次に混合物を噴霧乾燥した後のWEMの収量は92.1kgであった。

## 2-3. マンゴスチン果皮抽出由来化合物の単離

100 g の WEM を水 500 mL に溶解し、n-ヘキサンを 1.5 L、酢酸エチル (EtOAc) を 12 L、n-ブタノール (BuOH) を 12 L 用いて連続して抽出した。抽出物として、65.5 mg n-ヘキサンおよび 2.59 g の EtOAc、12.45 g の n-BuOH を得た。7.09 g の n-BuOH 抽出物を MCI-gel CHP-20P によって MeOH/H<sub>2</sub>O を用い、段階的勾配モードでクロマトグラフィーを行い、精製した。これらの画分を同様の HPLC パターンで結合させ、さらなる精製を行った。MeOH 水溶液を用い、Sephadex LH-20 および YMC-gel ODS-AQ、Chromatorex ODS のカラムクロマトグラフィーによって、rhodanthenone B を 14.0 mg、epicatechin を 12.4 mg を得た。MeOH 水溶液を用いた Sephadex LH-20 および YMC-gel ODS-AQ、による Chromatorex ODS のカラムクロマトグラフィーで 2.59 g の EtOAc を精製し、epicatechin を 72.5 mg、garcimangosone D を 2.2 mg、eucryphin を 2.6 mg を得た。これらの化合物を標準品との比較もしくは、スペクトルデータを報告された文献データとの比較によって特定した。

## 2-4. Pentosidine 生成における WEM の抑制効果の測定

WEM もしくはその単離化合物である rhodanthenone B および epicatechin、garcimangosone D、eucryphin を DMSO に溶解した。200 mM Na-PB (pH 7.2) で調製した 2 mg/mL gelatin、30 mM ribose 溶液に 0.0016-1 μg/mL WEM もしくは 0.1-100 nM 精製化合物となるように添加し、37°C で 7 日間保温した。低温下において、試料を PBS 溶液中で 18 時間透析し、BCA 法で蛋白定量し、HPLC 分析により pentosidine を測定した。Pentosidine 標準液の調製 (60)、および pentosidine を測定した (55)。

## 2-5. HPLC による pentosidine 含量の測定

ribose-gelatin (各 50 μg) を真空乾燥し、密閉 tube 内で 6 M 塩酸で 24 時間 110°C 保温することで加水分解した。血清 (各 0.1 mL) を等量の 12 M 塩酸 (6 M、最終濃度) と混合し、110°C で 24 時間、密閉した試験管で加水分解した。塩酸を真空中で乾燥させ、0.5 mL

の蒸留水で再び可溶化した。試料を陽イオン交換カラム (Strata-X-C column, Phenomenex, カリフォルニア州) を用い、7% アンモニア (ナカライテスク、京都) で溶出し、真空乾燥した。試料を 0.3 mL の 16% ACN 溶液に再溶解し、HPLC で pentosidine を分析した (55)。

## 2-6. 自己蛍光による肌中 AGEs の推定

被験者から皮膚試料を入手するのは困難であるため、皮膚の AGEs 蓄積を指先の自己蛍光の測定によって推定した。皮膚の自己蛍光を「発光ダイオード (LED) 光源、2048-pixel の CCD 直線イメージセンサーおよび回折格子と二分岐シリカベースの光ファイバーによるスペクトル装置システム」で構成されるプロトタイプで測定した。直径約 0.38 mm の皮膚表面積に、励起ピークで 365 nm の LED 光源を照射した。皮膚の同じ場所で蛍光信号を検出するために、ポリウレタンでコーティングされた Y 字型の柔軟な光ファイバーを使用した。クォーツ Y 形ファイバーを 2 本のコアファイバー (直径 0.6 mm) で構成し、ファイバーの一方の側を分光計に、他方の側を LED 光源に接続した。皮膚の自己蛍光スペクトルとして 450-460 nm の蛍光ピークを検出した。

## 2-7. 被験者への WEM の投与

この研究は特定可能な人間の素材やデータに関する研究を含む人間を対象とする医学研究の倫理原則に関する声明として、ヘルシンキ宣言に従って実施した。実験プロトコルは、介入試験のために北堀江病院の倫理審査委員会によって承認され、AGE 分析は東海大学の倫理審査委員会によって承認された (#14036)。この研究は、32 歳から 48 歳までの健康な女性を募集するオープン試験として実施した (n = 11)。全ての被験者が書面によるインフォームドコンセントを提供した。被験者の空腹時血糖と HbA1c の中央値は、それぞれ  $83.6 \pm 4.6$  mg/dL と  $5.25 \pm 0.21$  であった。2錠 (合計 100 mg WEM) を 1 日 1 回、12 週間かけて各被験者に投与した。4 週間毎に血液および皮膚機能検査は評価した。

## 2-8. 肌における粘弾性および水分含量の測定

生体機能の一つである肌機能を評価した。肌の老化を示す指標として、水分含量および弾力性を示す粘弾性を測定した。肌の水分含量は Robo Skin Analyzer (RSA50; Inforward, Inc., 東京) で肌の水分団量が測定された。弾力性は Cutometer (MPA580; Courage & Khazaka, ケルン、ドイツ) を用いて、肌長の回復率 (Recovery ratio of the skin length: RR) および収縮時の弾性率 (Ratio of elasticity during constriction: RE) の測定を行い、肌の弾力

性を評価した。

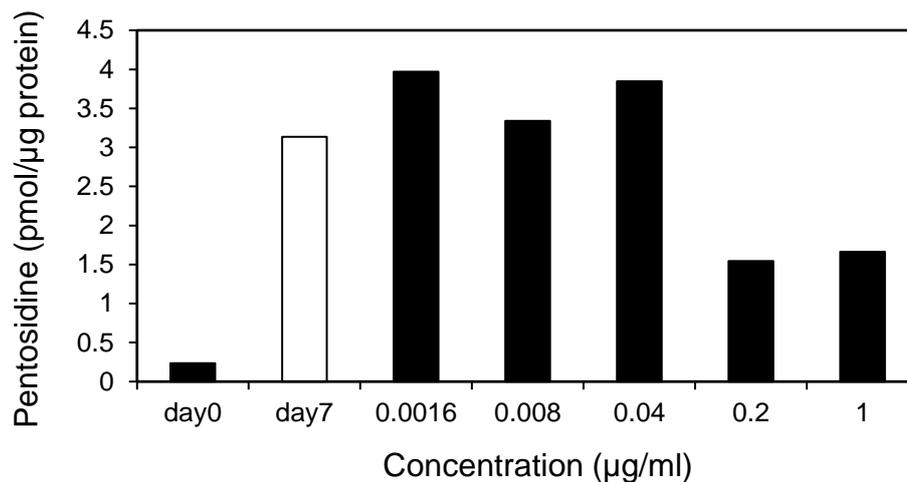
## 2-9. 統計分析

全てのデータは平均  $\pm$ SD として示した。有意差は Mann-Whitney U 検定と非反復測定 ANOVA を用いて評価した。0.05 未満の p 値は、統計的に有意であるとみなした。

### 3. 結果 (2015 年度 大野修士論文より引用)

#### 3-1. WEM による rebose-gelatin 中 pentosidine 生成抑制の評価

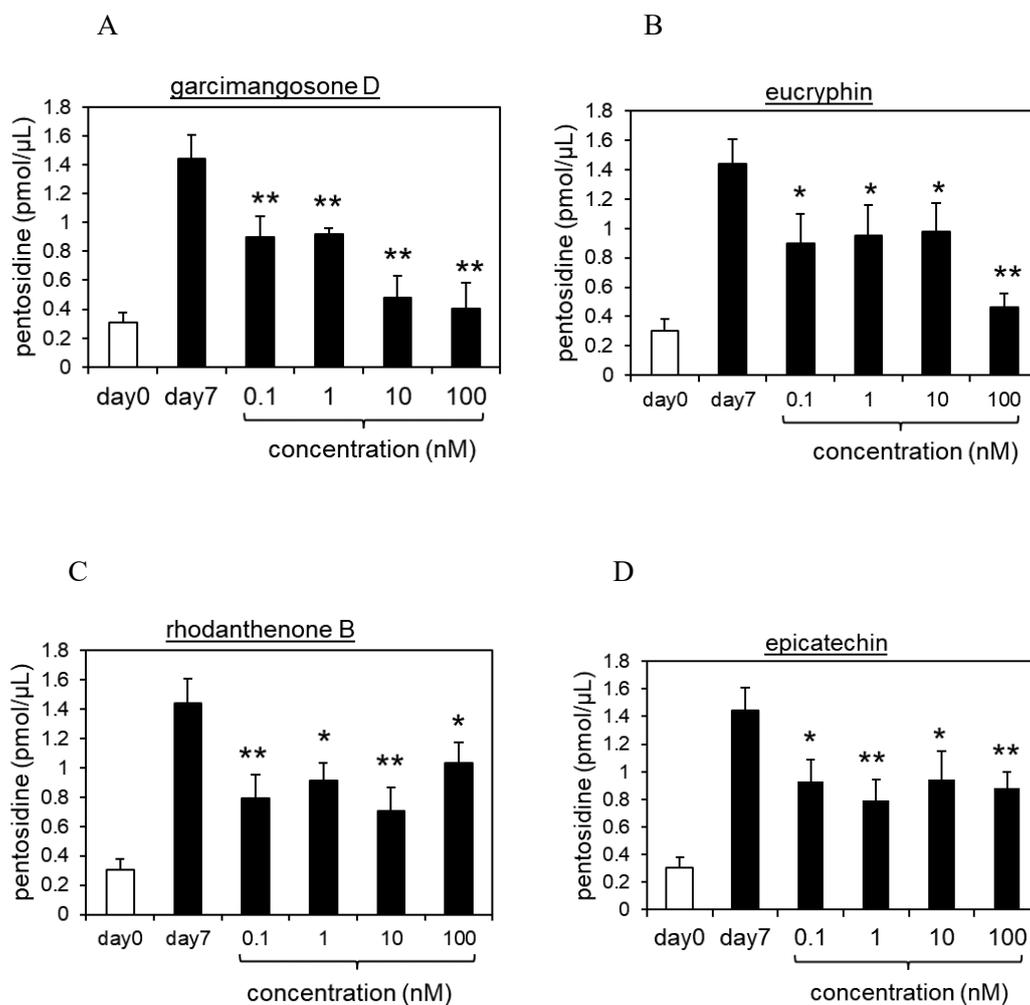
WEM の添加によるリボースゼラチン由来の pentosidine の生成量の変化を検討した結果、WEM 0.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  で生成量が減少し、阻害剤無添加の day 7 の生成量に比べて 51% 抑制された (Fig. 11)。



**Figure 11. Inhibitory effects of WEM on pentosidine formation.** Gelatin was incubated with ribose in the presence of varying concentrations of WEM extract, and pentosidine contents were measured by HPLC. Pentosidine content was normalized to the protein content of the gelatin.

### 3-2. WEM 単離成分による rebose-gelatin 中 pentosidine 生成抑制の評価

WEM の単離成分 (garcimangosone D, eucryphin, rhodanthenone B, epicatechin) は 0.1 nM で阻害剤無添加の day7 に比べ、有意に pentosidine 生成量が減少した。それぞれの生成抑制率は順に 38, 38, 45, 35%であった (Fig. 12)。

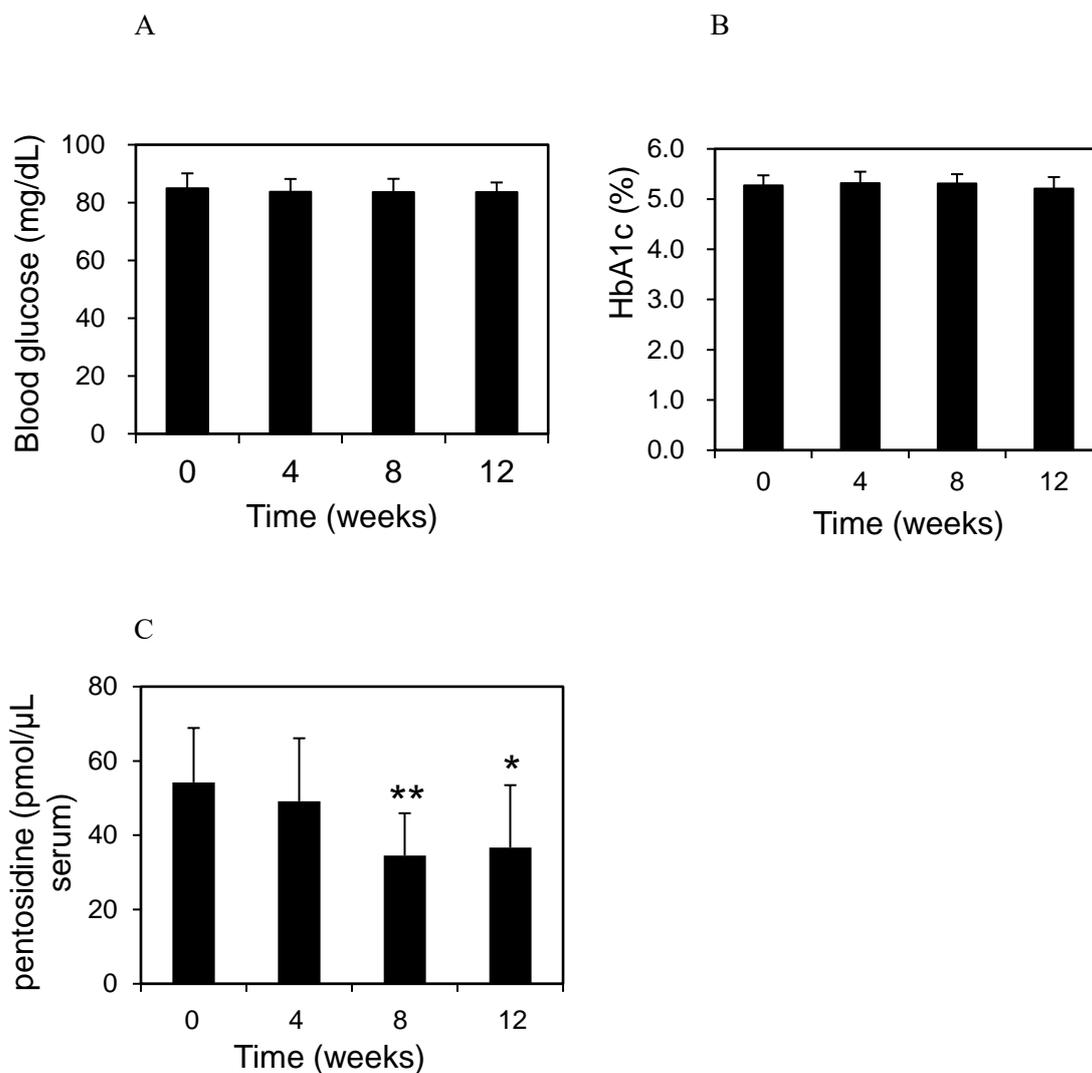


**Figure 12. Inhibitory effects of purified compounds from WEM on pentosidine formation.**

Gelatin was incubated with ribose in the presence of varying concentrations of WEM extract, and pentosidine contents were measured by HPLC. Pentosidine content was normalized to the protein content of the gelatin. Data are expressed as the mean  $\pm$  SD ( $n = 3$ ). \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  (with compounds day 7 vs without compounds day 7).

### 3-3. WEM を摂取後のヒト血中 pentosidine の定量

WEM 錠剤を摂取した後、血清中 pentosidine 濃度においては 8 ( $p < 0.005$ ) 及び 12 週間後 ( $p < 0.05$ ) に有意な減少が認められた。しかし、血糖値及び、HbA1c には有意な変化は認められなかった (Fig 13)。

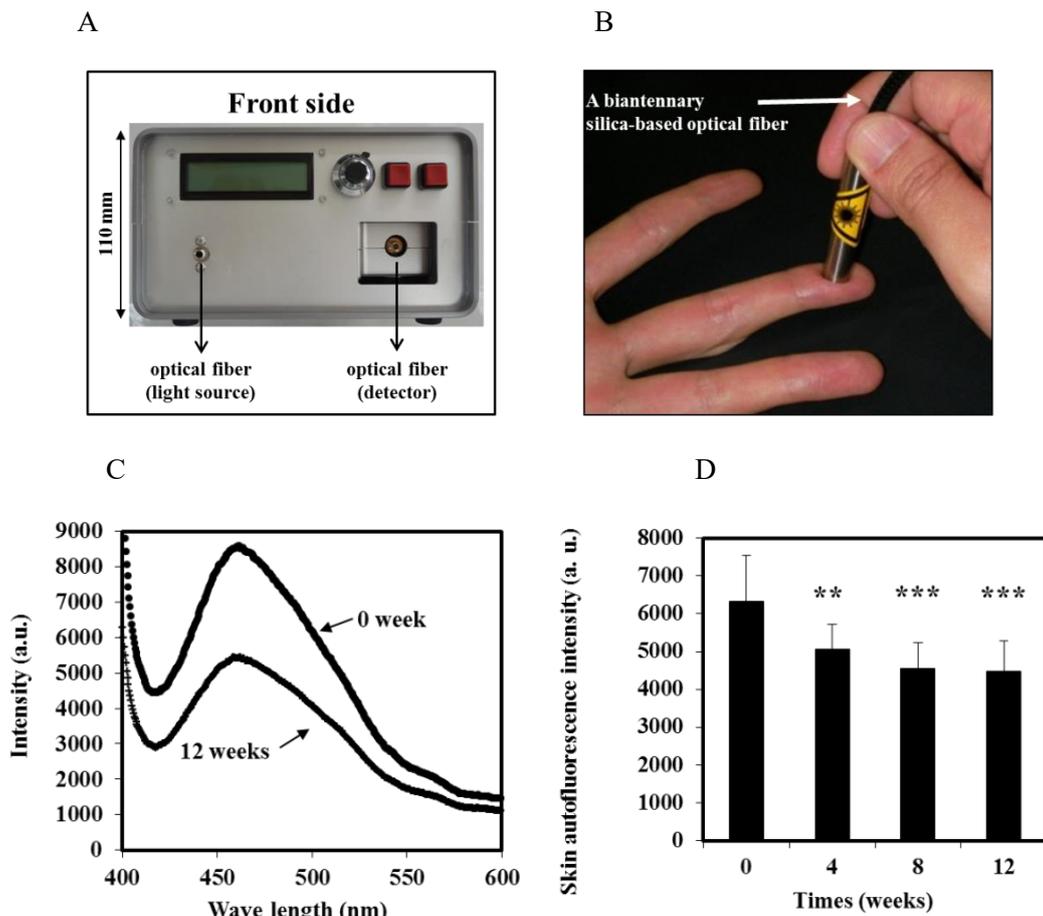


**Figure 13. Effects of WEM on biochemical parameters and pentosidine formation in vivo.**

WEM was administered to healthy subjects, and the serum pentosidine levels were determined by HPLC. Two tablets (100 mg WEM in total) were administered once a day to healthy women ( $n = 11$ ) for 12 weeks. The blood glucose (A), HbA1c (B), and pentosidine (C) levels were evaluated every 4 weeks. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$  (vs. before WEM administration).

### 3-4. WEM を摂取後のヒト皮膚中蛍光性物質の測定

皮膚における AGEs の蓄積は、皮膚の蛍光を測定することで推定された (Fig. 14A, B)。皮膚の自己蛍光のスペクトルは、励起ピークで 365 nm の LED 光源によって照射された皮膚表面領域から取得され、皮膚自己蛍光スペクトルは、450-460 nm で安定した蛍光ピークを示しました (Fig. 14C)。指先の蛍光 (n=11) は、時間依存的に WEM を 100 mg/day で摂取した被験者で有意に減少した (Fig. 14D)。

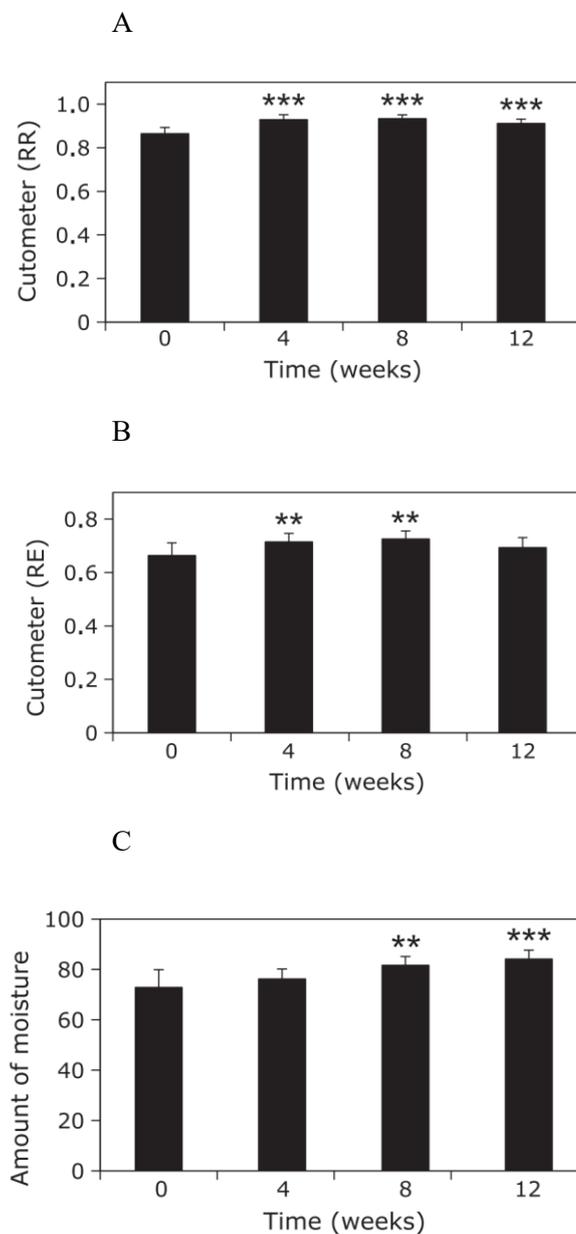


**Figure 14. The inhibitory effect of WEM on AGE accumulation in the skin.** Skin autofluorescence was recorded with a prototype consisting of a LED light source (A), a spectral apparatus system by a 2048-pixel CCD linear image sensor and grating and a biantennary silica-based optical fiber (B). A skin surface area was irradiated by an LED light source of 365 nm at excitation peak, and the skin autofluorescence spectrum showed a stable emission peak at 450–460 nm (C). The inhibitory effect of WEM on AGE accumulation in the skin was estimated by

measuring fingertip autofluorescence (n = 11) (D). \*\*p < 0 .01; \*\*\*p < 0.001 (vs. before WEM administration).

### 3-5. WEM を摂取後のヒト肌の水分含量及び弾力性測定

被験者の肌の弾力性を反映する肌長の回復率 (RR) は WEM 摂取後 4 週目で大幅に改善された (0.865 vs. 0.929: WEM 摂取 vs. 摂取後 4 週目,  $p < 0.005$ )。また、被験者の収縮時の弾力率 (RE) は 4 週目で有意に改善したが (0.663 vs. 0.715: WEM 摂取前 vs. 摂取後 4 週目,  $p < 0.01$ )、12 週目で有意差は認められなかった (Fig. 15A, B)。さらに WEM 投与前の被験者の皮膚の平均水分量 (72.8) は時間依存的に増加し、12 週目で 84.1 となった ( $p < 0.001$ ) (Fig. 15C)。これらの結果は、WEM の経口投与により、4 週目で被験者の弾力性および水分量が改善されたことを示している。



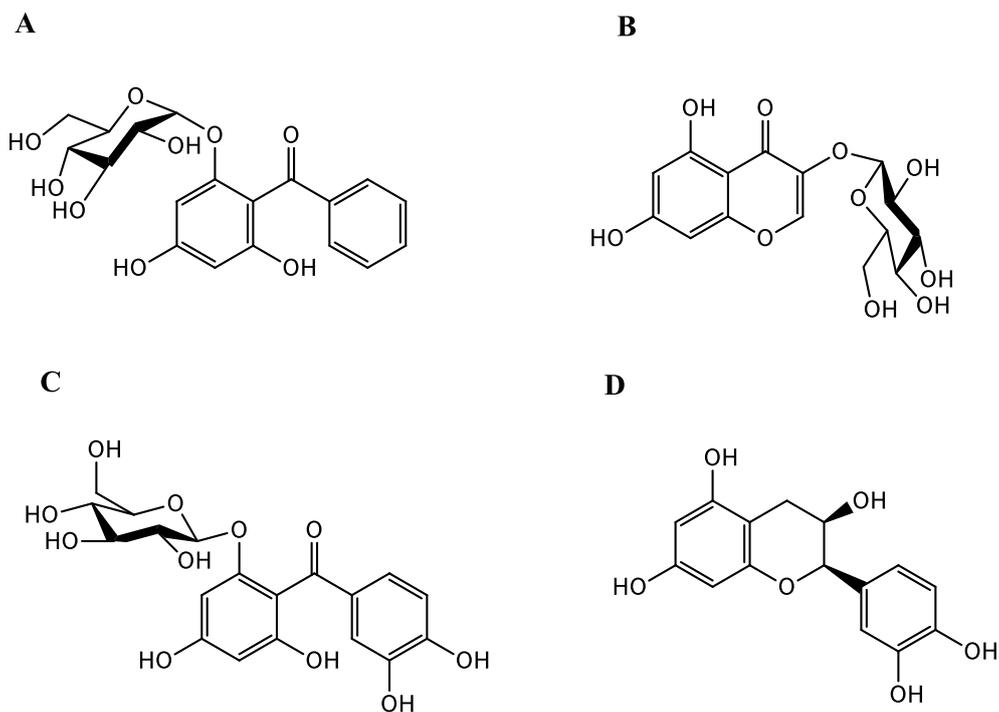
**Figure 15. Effect of WEM on the elasticity and moisture content of the skin.** Skin elasticity was measured by a skin viscoelasticity analyzer. Skin elasticity on the internal lesion of left upper arm was analyzed and 2 skin elasticity indices were measured: (A) the recovery ratio of the skin length (RR), and (B) the ratio of elasticity during constriction (RE). The measurement of moisture contents on the face (C) was conducted by a Robo Skin Analyzer. \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  (vs. before WEM administration).

#### 4. 考察

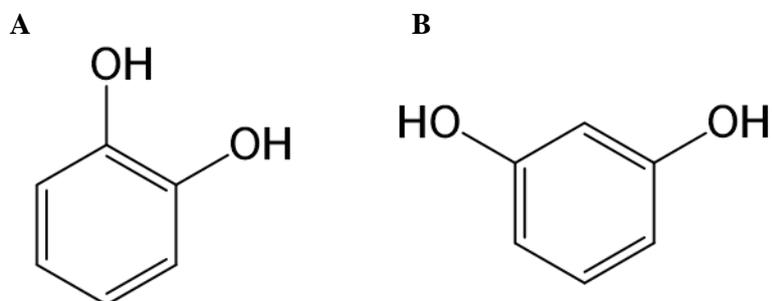
*In vitro* における pentosidine 生成は、0.2 及び 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の WEM もしくは 0.1~100 nM の garcimangosone D 及び eucryphin, rhodanthenone B, epicatechin の各単離成分で生成が抑制された (Fig. 12)。以前の研究では、天然物由来の粗抽出物による AGEs 生成抑制効果を検討するスクリーニングにおける有効濃度は 0.01-0.1  $\text{mg}/\text{mL}$  であったが、マンゴスチンの粗抽出物 (WEM) においては 0.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (50.8% 生成抑制) であった (61)。さらに WEM 由来の 4 種類の単離成分では生成を抑制する有効濃度が 0.1 nM であった (garcimangosone D: 37.9% 生成抑制  $p < 0.01$ , eucryphin: 37.9% 生成抑制  $p < 0.05$ , rhodanthenone B: 45.0% 生成抑制  $p < 0.01$ , epicatechin: 35.5% 生成抑制  $p < 0.05$ )。これらの抑制活性を 10 nM で比較すると garcimangosone D の抑制活性が最も高かった (garcimangosone D: 66.7% 生成抑制  $p < 0.01$ , eucryphin: 32.1% 生成抑制  $p < 0.05$ , rhodanthenone B: 51.1% 生成抑制  $p < 0.01$ , epicatechin: 34.4% 生成抑制  $p < 0.05$ )。これは過去に報告のある抑制化合物の有効濃度である 25-250  $\mu\text{M}$  (24) より低濃度の単離成分添加でリボースとゼラチン由来の pentosidine 生成を抑制したことから、抑制活性が高いことが確認された。使用した 4 種類の化合物には、抗酸化作用を持つ catechol もしくは resorcinol を有している (Fig. 16, 17)。AGEs 生成抑制機構の内、緒論で述べたこのカルボニルトラップ型の AGEs 抑制剤にはカルボニル基のトラップ能のみならず、高いキレート能が知られている (25)。さらに N-phenacylthiazolium bromide (PTB) は生体内で AGEs 構造を分解することで知られる「AGEs ブレーカー」が注目されていたが、PTB が溶液中で加水分解の影響を受けやすいこと (62) やモデル化合物を分解しても AGEs 由来の架橋構造を分解する活性が認められない (63) 等、生体における PTB に作用を疑問視されている。PTB には高い金属キレート能が高いために AGEs 分解ではなく、抗酸化作用により AGEs 生成を抑制した可能性が提唱されている。化合物に抗酸化作用により pentosidine 生成抑制が認められた可能性がある。しかしながら、今回の WEM における各化合物の含有量は rhodanthenone B が 0.08%、epicatechin が約 1% であり、その他の化合物は 0.01% 以下と少量であったことは、これらの化合物一つ一つがペントシジン生成抑制したのではないことを示唆している。

いくつかの化合物等による相乗効果、もしくは他にペントシジン生成抑制作用を持つ化合物が存在している可能性が考えられる。最も WEM における含有量の高かった epicatechin が pentosidine 生成を抑制したことから epicatechin を多く含むお茶が pentosidine

生成を抑制する可能性が考えられる。しかし、今回精製したマンゴスチン特有のベンゾフェノン化合物である garcimangosone D や rhodanthenone B で強い pentosidine 生成抑制作用が見られたことから、WEM 摂取による pentosidine 生成抑制作用は他の植物素材に比べて高いことが期待される。



**Figure 16. The structure of compounds with an inhibitory effect on pentosidine formation.** Garcimangosone D (Fig. 16A), eucryphin (Fig. 16B), rhodanthenone B (Fig. 16C) and epicatechin (Fig. 16D) isolated from WEM. These compounds were identified by direct comparison with authentic specimens or by comparison of their spectral data with those reported in the literature.



**Figure 17. Antioxidant structure.** The four compounds shown in Fig. 16 have catechol (Fig. 17A) and resorcinol (Fig. 17B) with antioxidant activity.

## 総括

本研究では、私は新たな蛋白の変性を評価するマーカーとなる新規 AGEs 構造の同定および天然物由来成分から AGEs 生成抑制化合物のスクリーニングを行った。新規 AGE 構造に関して、fructose 由来の AGE として GL が同定し、その化学的性質を解析することによる定量方法の確立、生体における生成経路の解析、水晶体への蓄積を証明した。着目すべき点は、水晶体中 GL が FL や CML よりも増加率が高いことである。これまでの糖化研究において、生体組織や血清中で最も変動するものはアマドリ産物である FL であった。この理由として、FL は生体中に最も多い糖である glucose から生成されること、AGEs よりも迅速に生成される構造であること、多くの組織に glucose が存在することが挙げられる。既に FL が血清および水晶体、腎臓、網膜等で糖尿病の発症で増加することが報告されている。しかしながら今回、水晶体において GL が FL よりも高い増加率を示したことは水晶体の蛋白変性において重要な役割を持つことを示唆している。

また、天然物よりマンゴスチン果皮成分による pentosidine 生成抑制効果を検討し、ヒト介入試験においても血中濃度の減少が明らかとなった。Pentosidine は糖化や酸化ストレスを伴う病態で増加することや、架橋構造を持つことから骨中コラーゲンで生成されることによって骨が脆くなる原因の一つとして報告されている。また、広く研究されている AGEs の一つであり、測定が簡便であることから血液検査において検査項目の一つとして臨床応用もされている。マンゴスチン果皮成分による pentosidine 生成抑制効果を見出したことは、このような病態の予防につながる。さらに GL のような新しく病態と関与する AGEs を抑制する成分を探索することもまた、QOL 向上に役立つと考えられる。

今回、AGEs を測定する上で生成経路を解析するためにその前駆体であるアマドリ産物や糖の定量系を確立し、その含量や変動を比較した。しかし、前駆体と「AGEs」の定義は曖昧である。「AGEs」は「advanced glycation end products; 終末糖化産物」であり、AGEs 形成後に生体で構造変化するかどうかを評価するのは難しい。本論文では、GL が糖由来であり、酸加水分解および酸化ストレスに安定であることから、「AGEs」とみなしたが、構造的に安定に存在すれば AGEs とみなすのか、特定の経路から生成されるものを AGEs とみなすのかを明確にする必要がある。さらにその生成経路および生体における動態を見出すことが AGEs の持つ病態の予測マーカーとなる可能性を高めることに繋がると考える。

## 謝辞

本研究を遂行する際に終始ご指導していただきました永井竜児教授ならびに白河潤一先生、山中幹宏先生、永井美芽先生に心より感謝、御礼を申し上げます。

また、博士論文の添削を行って頂きました生物科学研究室の米田一成准教授ならびにタンパク質化学研究室の荒木朋洋教授、東海大学総合農学研究所の今川和彦教授、東海大学農学部の山口浩准教授、第一章の研究のきっかけを作ってくださった伊藤恵美先生、Fru-P 抗体を供与いただきました谷口直之先生、glucoselyine の構造を同定していただきました東北医科薬科大学薬学部の山口芳樹先生、食品生体調節学研究室の皆様にも厚く感謝、御礼を申し上げます。

東京慈恵会医科大学 基礎・臨床講座整形外科学講座

荒川翔太郎先生、鈴木隆介先生

大阪国際がん研究センター

谷口直之先生

国立国際医療研究センター研究所

伊藤恵美先生

東北医科薬科大学薬学部

山口芳樹先生

食品生体調節学研究室一同

永井竜児教授

スタッフ: 白河潤一、永井美芽、井陽太、山中幹宏

大学院生 (博士): 須川日加里、山口広子、荒川翔太郎、鈴木隆介

大学院生 (修士): 砂掛詩織、勝田那奈、田中誠太郎、富永悠幹、市丸健太 (2017 年度卒業)、木下奨 (2017 年度卒業)、佐藤ひかり (2018 年度卒業)

学部 4 年: 伴郁穂、朝倉隆成、高橋基秀、谷地亜祐香、飛松佳穂美、川島悠暉、溝上大輝

学部 3 年: 山崎理予、小野綾也伽、岩崎紫音、榊井俊、卷千恵、平岡吉隆、古賀律紀

## 参考文献

1. Wells-Knecht, K.J., Brinkmann, E., Wells-Knecht, M.C., Litchfield, J.E., Ahmed, M.U., Reddy, S., Zyzak, D.V., Thorpe, S.R., and Baynes, J.W. (1996) New biomarkers of Maillard reaction damage to proteins. *Nephrol. Dial. Transplant* **11**, 41-7
2. Davidson, M.B., Schriger, D.L., Peters, A.L., and Lorber, B. (1999) Relationship between fasting plasma glucose and glycosylated hemoglobin: potential for false-positive diagnoses of type 2 diabetes using new diagnostic criteria. *J.A.M.A.* **281**, 1203-1210
3. Schleicher, E.D., Gerbitz, K.D., Dolhofer, R., Reindl, E., Wieland, O.H., Edelmann, E., Haslbeck, M., Kemmler, W., Walter, H., and Mehnert, H. (1984) Clinical utility of nonenzymatically glycosylated blood proteins as an index of glucose control. *Diabetes Care* **7**, 548-556
4. Jones, I.R., Owens, D.R., Williams, S., Ryder, R.E., Birtwell, A.J., Jones, M.K., Gicheru, K., and Hayes, T.M. (1983) Glycosylated serum albumin: an intermediate index of diabetic control. *Diabetes Care* **6**, 501-503
5. Zyzak, D.V., Richardson, J.M., Thorpe, S.R., and Baynes, J.W. (1995) Formation of reactive intermediates from Amadori compounds under physiological conditions. *Arch. Biochem. Biophys.* **316**, 547-554
6. Bucala, R., Makita, Z., Vega, G., Grundy, S., Koschinsky, T., Cerami, A., and Vlassara, H. (1994) Modification of low density lipoprotein by advanced glycation end products contributes to the dyslipidemia of diabetes and renal insufficiency. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 9441-9445
7. Cheng, R.Z., and Kawakishi, S. (1994) Site-specific oxidation of histidine residues in glycosylated insulin mediated by Cu<sup>2+</sup>. *Eur. J. Biochem.* **223**, 759-764
8. Mullokandov, E.A., Franklin, W.A., and Brownlee, M. (1994) DNA damage by the glycation products of glyceraldehyde 3-phosphate and lysine. *Diabetologia* **37**, 145-149
9. Arai, K., Maguchi, S., Fujii, S., Ishibashi, H., Oikawa, K., and Taniguchi, N. (1987) Glycation and inactivation of human Cu-Zn-superoxide dismutase. Identification of the in vitro glycosylated sites. *J. Biol. Chem.* **262**, 16969-16972
10. Dunn, J.A., Patrick, J.S., Thorpe, S.R., and Baynes, J.W. (1989) Oxidation of glycosylated proteins: age-dependent accumulation of N epsilon-(carboxymethyl)lysine in lens proteins.

11. Ahmed, M.U., Brinkmann, Frye E., Degenhardt, T.P., Thorpe, S.R., and Baynes, J.W. (1997) N-epsilon-(carboxyethyl)lysine, a product of the chemical modification of proteins by methylglyoxal, increases with age in human lens proteins. *Biochem. J.* **324**, 565-570
12. Verzijl, N., DeGroot, J., Oldehinkel, E., Bank, R.A., Thorpe, S.R., Baynes, J.W., Bayliss, M.T., Bijlsma, J.W., Lafeber, F.P., and Tekoppele, J.M. (2000) Age-related accumulation of Maillard reaction products in human articular cartilage collagen. *Biochem. J.* **350**, 381-387
13. Miyata, T., Ueda, Y., Shinzato, T., Iida, Y., Tanaka, S., Kurokawa, K., van Ypersele de Strihou, C., and Maeda, K. (1996) Accumulation of albumin-linked and free-form pentosidine in the circulation of uremic patients with end-stage renal failure: renal implications in the pathophysiology of pentosidine. *J. Am. Soc. Nephrol.* **7**, 1198-1206
14. Thornalley, P.J., Battah, S., Ahmed, N., Karachalias, N., Agalou, S., Babaei-Jadidi, R., and Dawnay, A. (2003) Quantitative screening of advanced glycation endproducts in cellular and extracellular proteins by tandem mass spectrometry. *Biochem. J.* **375**, 581-592
15. Swamy-Mruthinti, S., Miriam, K.C., Kumar, S.K., Biswas, J., Ramakrishnan, S., Nagaraj, R.H., and Sulochana KN. (2002) Immunolocalization and quantification of advanced glycation end products in retinal neovascular membranes and serum: a possible role in ocular neovascularization. *Curr. Eye Res.* **25**, 139-145
16. Ni, J., Yuan, X., Gu, J., Yue, X., Gu, X., Nagaraj, R.H., and Crabb, J.W. (2009) Plasma protein pentosidine and carboxymethyllysine, biomarkers for age-related macular degeneration. *Mol. Cell. Proteomics* **8**, 1921-1933
17. Murata, T., Nagai, R., Ishibashi, T., Inomuta, H., Ikeda, K., and Horiuchi, S. (1997) The relationship between accumulation of advanced glycation end products and expression of vascular endothelial growth factor in human diabetic retinas. *Diabetologia* **40**, 764-769
18. Duran-Jimenez, B., Dobler, D., Moffatt, S., Rabbani, N., Streuli, C.H., Thornalley, P.J., Tomlinson, D.R., and Gardiner, N.J. (2009) Advanced glycation end products in extracellular matrix proteins contribute to the failure of sensory nerve regeneration in diabetes. *Diabetes* **58**, 2893-2903
19. Sakata, N., Imanaga, Y., Meng, J., Tachikawa, Y., Takebayashi, S., Nagai, R., Horiuchi, S., Itabe, H., and Takano, T. (1998) Immunohistochemical localization of different epitopes of

- advanced glycation end products in human atherosclerotic lesions. *Atherosclerosis* **141**, 61-75
20. Nagai, R., Hayashi, C.M., Xia, L., Takeya, M., and Horiuchi, S. (2002) Identification in human atherosclerotic lesions of GA-pyridine, a novel structure derived from glycolaldehyde-modified proteins. *J. Biol. Chem.* **277**, 48905-48912
  21. Nagai, R., Ikeda, K., Higashi, T., Sano, H., Jinnouchi, Y., Araki, T., and Horiuchi, S. (1997) Hydroxyl radical mediates N epsilon-(carboxymethyl)lysine formation from Amadori product. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **234**, 167-172
  22. Mera, K., Nagai, R., Haraguchi, N., Fujiwara, Y., Araki, T., Sakata, N., and Otagiri, M. (2007) Hypochlorous acid generates N epsilon-(carboxymethyl)lysine from Amadori products. *Free Radic. Res.* **41**, 713-718
  23. Nagai, R., Unno, Y., Hayashi, M.C., Masuda, S., Hayase, F., Kinae, N., and Horiuchi, S. (2002) Peroxynitrite induces formation of N( epsilon )-(carboxymethyl) lysine by the cleavage of Amadori product and generation of glucosone and glyoxal from glucose: novel pathways for protein modification by peroxynitrite. *Diabetes* **51**, 2833-2839
  24. Urios, P., Grigoroვა-Borsos, A.M., and Sternberg, M. (2007) Flavonoids inhibit the formation of the cross-linking AGE pentosidine in collagen incubated with glucose, according to their structure. *Eur. J. Nutr.* **46**, 139-146
  25. Price, D.L., Rhett, P.M., Thorpe, S.R., and Baynes, J.W. (2001) Chelating activity of advanced glycation end-product inhibitors. *J. Biol. Chem.* **276**, 48967-48972
  26. Iijima, K., Murata, M., Takahara, H., Irie, S., and Fujimoto, D. (2000) Identification of N (omega) -carboxymethylarginine as a novel acid-labile advanced glycation end product in collagen. *Biochem. J.* **347**, 23-27
  27. Nagai, R., Nagai, M., Shimasaki, S., Baynes, J.W., and Fujiwara, Y. (2010) Citric acid inhibits development of cataracts, proteinuria and ketosis in streptozotocin (type 1) diabetic rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **393**, 118-122
  28. Kamei, A. (1993) Glutathione levels of the human crystalline lens in aging and its antioxidant effect against the oxidation of lens proteins. *Biol. Pharm. Bull.* **16**, 870-875
  29. Haik, G.M., Jr., Lo, T.W., and Thornalley, P.J. (1994) Methylglyoxal concentration and glyoxalase activities in the human lens. *Exp. Eye. Res.* **59**, 497-500
  30. Ahmed, N., Thornalley, P.J., and Dawczynski, J. (2003) Methylglyoxal-derived

- hydroimidazolone advanced glycation end-products of human lens proteins. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **44**, 5287-5292
31. Gabbay, K.H. (1975) Hyperglycemia, polyol metabolism, and complications of diabetes mellitus. *Annu. Rev. Med.* **26**, 521-536
  32. Chung, S.S., Ho, E.C., Lam, K.S., and Chung, S.K. (2003) Contribution of polyol pathway to diabetes-induced oxidative stress. *J. Am. Soc. Nephrol.* **14**, S233-236
  33. Kunjara, S., Greenbaum, A.L., Sochor, M., Flyvbjerg, A., Grønbaek, H., and McLean, P. (2014) Effects of long-acting somatostatin analogues on redox systems in rat lens in experimental diabetes. *Int. J. Exp. Pathol.* **95**, 95-100
  34. Kawasaki, Y., Fujii, J., Miyazawa, N., Hoshi, A., Okado, A., Tano, Y., and Taniguchi, N. (1998) Specific detections of the early process of the glycation reaction by fructose and glucose in diabetic rat lens. *FEBS Lett.* **441**, 116-120
  35. Nagai, R., Matsumoto, K., Ling, X., Suzuki, H., Araki, T., and Horiuchi, S. (2000) Glycolaldehyde, a reactive intermediate for advanced glycation end products, plays an important role in the generation of an active ligand for the macrophage scavenger receptor. *Diabetes* **49**, 1714-1723
  36. Kańska, U., and Boratyński, J. (2002) Thermal glycation of proteins by D-glucose and D-fructose. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)* **50**, 61-66
  37. Ikeda, K., Higashi, T., Sano, H., Jinnouchi, Y., Yoshida, M., Araki, T., Ueda, S., and Horiuchi, S. (1996) N (epsilon)-(carboxymethyl)lysine protein adduct is a major immunological epitope in proteins modified with advanced glycation end products of the Maillard reaction. *Biochemistry* **35**, 8075-8083
  38. Koito, W., Araki, T., Horiuchi, S., and Nagai, R. (2004) Conventional antibody against Nepsilon-(carboxymethyl)lysine (CML) shows cross-reaction to Nepsilon-(carboxyethyl)lysine (CEL): immunochemical quantification of CML with a specific antibody. *J. Biochem.* **136**, 831-837
  39. Sugawa, H., Ohno, R., Shirakawa, J., Nakajima, A., Kanagawa, A., Hirata, T., Ikeda, T., Moroishi, N., Nagai, M., and Nagai, R. (2016) *Eucommia ulmoides* extracts prevent the formation of advanced glycation end products. *Food Funct.* **7**, 2566-2573
  40. Sajiki, H., Hattori, K., and Hirota, K. (1998) The Formation of a Novel Pd/C–Ethylenediamine

Complex Catalyst: Chemoselective Hydrogenation without Deprotection of the O-Benzyl and N-Cbz Groups. *J. Org. Chem.* **63**, 7990-7992

41. He, G., Guo, B., Zhang, J., Li, Y., Wu, X., Fan, Y., Chen, Y., Cao, G., and Yu, J. (2018) Determination of the sulfate and glucuronide conjugates of levornidazole in human plasma and urine, and levornidazole and its five metabolites in human feces by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **1081-1082**, 87-100
42. Shirakawa, J., Arakawa, S., Tagawa, T., Gotoh, K., Oikawa, N., Ohno, R., Shinagawa, M., Hatano, K., Sugawa, H., Ichimaru, K., Kinoshita, S., Furusawa, C., Yamanaka, M., Kobayashi, M., Masuda, S., Nagai, M., and Nagai, R. (2016) *Salacia chinensis* L. extract ameliorates abnormal glucose metabolism and improves the bone strength and accumulation of AGEs in type 1 diabetic rats. *Food Funct.* **7**, 2508-2515
43. Miyata, T., Fu, M.X., Kurokawa, K., van Ypersele de Strihou, C., Thorpe, S.R., and Baynes, J.W. (1998) Autoxidation products of both carbohydrates and lipids are increased in uremic plasma: is there oxidative stress in uremia? *Kidney Int.* **54**, 1290-1295
44. Miyazawa, N., Kawasaki, Y., Fujii, J., Theingi, M., Hoshi, A., Hamaoka, R., Matsumoto, A., Uozumi, N., Teshima, T., and Taniguchi, N. (1998) Immunological detection of fructated proteins in vitro and in vivo. *Biochem. J.* **336**, 101-107
45. Miki Hayashi, C., Nagai, R., Miyazaki, K., Hayase, F., Araki, T., Ono, T., and Horiuchi, S. (2002) Conversion of Amadori products of the Maillard reaction to N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine by short-term heating: possible detection of artifacts by immunohistochemistry. *Lab. Invest.* **82**, 795-808
46. Nagai, R., Ikeda, K., Kawasaki, Y., Sano, H., Yoshida, M., Araki, T., Ueda, S., and Horiuchi, S. (1998) Conversion of Amadori product of Maillard reaction to Nepsilon-(carboxymethyl)lysine in alkaline condition. *FEBS Lett.* **425**, 355-360
47. Mera, K., Nagai, R., Takeo, K., Izumi, M., Maruyama, T., and Otagiri, M. (2011) An autoantibody against N(epsilon)-(carboxyethyl)lysine (CEL): possible involvement in the removal of CEL-modified proteins by macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **407**, 420-425
48. Reddy, S., Bichler, J., Wells-Knecht, K.J., Thorpe, S.R., and Baynes, J.W. (1995) N epsilon-(carboxymethyl)lysine is a dominant advanced glycation end product (AGE) antigen in tissue

- proteins. *Biochemistry* **34**, 10872-10878
49. Heyns, K., and Noack, H. (1962) Die Umsetzung von D-Fructose mit L-Lysin und L-Arginin und deren Beziehung zu nichtenzymatischen Bräunungsreaktionen. *Chem. Ber.* **95**, 720-727
  50. Nakayama, H., Mitsunashi, T., Kuwajima, S., Aoki, S., Kuroda, Y., Itoh, T., and Nakagawa, S. (1993) Immunochemical detection of advanced glycation end products in lens crystallins from streptozocin-induced diabetic rat. *Diabetes* **42**, 345-350
  51. Turk, Z., Misur, I., and Turk, N. (1997) Temporal association between lens protein glycation and cataract development in diabetic rats. *Acta. Diabetol.* **34**, 49-54
  52. Li, C.T., How, S.C., Chen, M.E., Lo, C.H., Chun, M.C., Chang, C.K., Chen, W.A., Wu, J.W., and Wang, S.S. (2018) Effects of glycation on human  $\gamma$ d-crystallin proteins by different glycation-inducing agents. *Int. J. Biol. Macromol.* **118**, 442-451
  53. Luthra, M., and Balasubramanian, D. (1993) Nonenzymatic glycation alters protein structure and stability. A study of two eye lens crystallins. *J. Biol. Chem.* **268**, 18119-18127
  54. Sell, D.R., and Monnier, V.M. (1989) Structure elucidation of a senescence cross-link from human extracellular matrix. Implication of pentoses in the aging process. *J. Biol. Chem.* **264**, 21597-21602
  55. Nakano, M., Kubota, M., Owada, S., and Nagai, R. (2013) The pentosidine concentration in human blood specimens is affected by heating. *Amino Acids* **44**, 1451-1456
  56. Kondo, M., Zhang, L., Ji, H., Kou, Y., and Ou, B.J. (2009) Bioavailability and antioxidant effects of a xanthone-rich Mangosteen (*Garcinia mangostana*) product in humans. *Agric. Food Chem.* **57**, 8788-8792
  57. Zhang, C.X., Dai, Z.R., and Cai, Q.X. (2011) Anti-inflammatory and anti-nociceptive activities of *Sipunculus nudus* L. extract. *J. Ethnopharmacol.* **137**, 1177-1182
  58. Yokozawa, T., and Nakagawa, T. (2004) Inhibitory effects of Luobuma tea and its components against glucose-mediated protein damage. *Food Chem. Toxicol.* **42**, 975-981
  59. Cai, Q., Li, B.Y., Gao, H.Q., Zhang, J.H., Wang, J.F., Yu, F., Yin, M., and Zhang, Z. (2011) Grape seed procyanidin b2 inhibits human aortic smooth muscle cell proliferation and migration induced by advanced glycation end products. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **75**, 1692-1697
  60. Imai, N., Nishi, S., Suzuki, Y., Karasawa, R., Ueno, M., Shimada, H., Kawashima, S.,

- Nakamaru, T., Miyakawa, Y., Araki, N., Horiuchi, S., Gejyo, F., Arakawa, M. (1997) Histological localization of advanced glycosylation end products in the progression of diabetic nephropathy. *Nephron* **76**, 153–160
61. Ohno, R., Moroishi, N., Sugawa, H., Maejima, K., Saigusa, M., Yamanaka, M., Nagai, M., Yoshimura, M., Amakura, Y., and Nagai, R. (2015) Mangosteen pericarp extract inhibits the formation of pentosidine and ameliorates skin elasticity. *J. Clin. Biochem. Nutr.* **57**, 27-32
62. Thornalley, P.J. and Minhas, H.S. (1999) Rapid hydrolysis and slow alpha,beta-dicarbonyl cleavage of an agent proposed to cleave glucose-derived protein cross-links. *Biochem. Pharmacol.* **57**, 303-307
63. Yang, S., Litchfield, J.E., and Baynes, J.W. (2003) AGE-breakers cleave model compounds, but do not break Maillard crosslinks in skin and tail collagen from diabetic rats. *Arch. Biochem. Biophys.* **412**, 42-46

## 本論文にかかわる報告

本論文は下記に発表した論文を基礎としてまとめたものである。

- Ohno, R., Ichimaru, K., Tanaka, S., Sugawa, H. Katsuta, N., Sakake, S., Tominaga Y., Ban, I., Shirakawa, J., Yamaguchi, Y., Ito, E., Taniguchi, N., and Nagai, R. (2019) Glucoselysine is derived from fructose and accumulates in the eye lens of diabetic rats. *J Biol Chem.* **294**, 17326-17338
- Ohno, R., Moroishi, N., Sugawa, H., Maejima, K., Saigusa, M., Yamanaka, M., Nagai, M., Yoshimura, M., Amakura, Y., and Nagai, R. (2015) Mangosteen pericarp extract inhibits the formation of pentosidine and ameliorates skin elasticity. *J. Clin. Biochem. Nutr.* **57**, 27-32