

論文の内容の要旨

論文題目「生体における非酵素的翻訳後修飾の加齢関連疾患に対する役割の検討」

学位申請者 勝田 奈那

キーワード： *S*-(2-succinyl)cysteine、Advanced glycation end-products、加齢、慢性腎臓病、LC-MS/MS

近年、心血管疾患や糖尿病など加齢関連疾患の患者が急増しているが、それら病態の要因は遺伝子変異やタンパク質発現の変動だけでは説明できない部分があり、翻訳後修飾 (Post-translational modification: PTM) の観点からも研究が行われている。PTMのうち、タンパク質の N 末端やε-アミノ基にグルコース等の還元糖やジカルボニル化合物がメイラード反応により結合して Advanced glycation end-products (AGEs) が生成され、生体タンパク質の変性に関与することが知られている。また最近、ミトコンドリアの機能異常に伴い Tricarboxylic acid (TCA) 回路中間体であるフマル酸が酵素の活性部位等に存在するシステインのチオール基と Succination によって結合し *S*-(2-succinyl)cysteine (2SC) が生成されることが見いだされている。多くの先行研究において 2SC は、抗体を用いた免疫化学的手法やガスクロマトグラフィー質量分析装置を用いて測定が行われているが、定性分析であることや測定対象物を誘導体化するための多段階処理が必要等の問題点がある。本研究では、液体クロマトグラフィー・タンデム型質量分析装置 (LC-MS/MS) を用いて、(1) 加齢に伴うマウス組織中 2SC および AGEs の変動、(2) 腎機能低下に伴うヒト血清中 2SC および AGEs の変動について検討した。

(1) 加齢に伴うマウス組織中 2SC および AGEs の変動：

「加齢」は様々な疾患のリスクファクターであり、脳においては神経変性や認知機能低下との関連が示唆されている。また、肝臓や腎臓の機能も加齢に伴い低下する。ヒト関節軟骨および皮膚コラーゲン、水晶体における AGEs は加齢に伴い増加することが報告されているが、2SC と加齢に関しては知見が乏しい。本研究では LC-MS/MS を用いた生体組織中 2SC の測定系を確立し、若齢および老齢マウス組織中 PTM の測定を試みた。

4, 12, 96 週齢の雄性 C57BL/6J マウスを解剖し、脳、肝臓および腎臓を採取した。組織の破碎、脱脂や加水分解等の前処理を行った後、LC-MS/MS を用いて 2SC および酸化依存性 AGEs の *N*^ε-(carboxymethyl)lysine (CML)、糖代謝異常において生成される

*N*⁶-(5-hydro-5-methyl-4-imidazolone-2-yl)-ornithine (MG-H1) を測定し、2SC 前駆体であるフマル酸値とも比較した。

その結果、脳中 2SC は他の臓器と比較して顕著に高く、その蓄積量は年齢依存的に有意に増加した。肝臓中 2SC は 12 週齢と比較して 96 週齢で有意に高値を示したが、腎臓においては加齢による変化は認められなかった。一方、脳中フマル酸はいずれの年齢でも同程度であったのに対し、肝臓および腎臓においては加齢に伴い有意に増加した。また、CML は脳と腎臓で加齢に伴い有意に増加したが、MG-H1 は腎臓においてのみ変動が認められた。

本研究では、加齢に伴う PTM の蓄積は構造や組織によって異なることが示された。その違いは前駆体や酸化ストレスの変動、臓器の代謝を反映している可能性があり、特に脳と腎臓の代謝は加齢により影響を受けやすいことが示唆された。

(2) 腎機能低下に伴うヒト血清中 2SC および AGEs の変動:

慢性腎臓病 (CKD) が進行し末期腎不全になると、透析や腎移植が必要となり、生活の質は著しく低下する。腎機能に必要なエネルギー産生の大半はミトコンドリアによる代謝に依存しているため、その異常は腎機能に多大な影響を及ぼす可能性が指摘されている。血中代謝物は組織における異常や機能不全を反映する。よって、その測定は病態の進行度を評価するバイオマーカーとなるのみならず、病態の発症・進行メカニズム解明のために重要であると考えられる。本研究では LC-MS/MS による液体試料中 2SC の測定方法を確立し、ヒト血清中代謝物の変動を評価した。

腎ドナー患者 (22 検体) および腎移植患者 (110 検体) 血清から脂質や低極性物質を除去し、濾過等の前処理を行った。その後、LC-MS/MS を用いて遊離型 2SC および CML、MG-H1 を測定し、フマル酸値や腎機能との関連を評価した。

その結果、腎機能低下に伴い 2SC および AGEs は有意に増加し、腎移植によって顕著に低下した。一方、フマル酸値は末期腎不全状態でのみ変動が認められた。2SC および CML、MG-H1 は既存の腎機能マーカーである血清クレアチニン値および推算糸球体濾過量 (eGFR) との相関が認められた。Receiver operating characteristic curve (ROC 曲線) から曲線下面積を算出した結果、2SC が最も高値を示した。さらに、2SC 値は血清クレアチニン値および年齢、性別の影響を受けることが重回帰分析によって示唆された。

腎機能低下に伴い腎臓において産生が増大したフマル酸が腎組織を修飾し、2SC が産生、血中へと放出されたと推測される。フマル酸産生は増加しても直ちに代謝される、あるいは Succination によって消費されるため、腎機能が顕著に悪化しなければ血中での変動が検出されにくいと考えられた。CKD における血中 AGEs の変動に関しては多くの先行研究と同様、生成の増加や腎クレアチニン低下、AGEs 前駆体であるジカルボニル化合物を代謝する酵素のダウンレギュレーション等が要因であると考えられる。本研究は CKD におけるミトコンドリア代謝異常の関与を裏付けるものであり、2SC と腎機能の関係を明らかにした最初の報告である。