

内 容 要 旨 目 次

主 論 文

The specific localization of advanced glycation end-products (AGEs) in rat pancreatic islets
(ラット膵臓における終末糖化産物(Advanced glycation end-products:AGEs)の局在解析)

森岡祐太, 勅使川原匡, 友野靖子, 王 登莉, 出石恭久, 和氣秀徳, 劉 克約, 高橋英夫,
森 秀治, 西堀正洋

Journal of Pharmacological Sciences 134: 218-224, 2017.

主論文

The specific localization of advanced glycation end-products (AGEs) in rat pancreatic islets (ラット膵臓における終末糖化産物(Advanced glycation end-products: AGEs)の局在解析)

【緒言】

糖尿病は網膜症、腎症および神経障害などの多くの合併症をもたらす。これらの疾患には Advanced glycation end-products (AGEs ; 終末糖化産物)の関与が示唆されている。

AGEs は、高血糖の状態における非酵素的な糖化反応であり、複数の分子種が存在する。非酵素的な糖化反応はまず、還元糖のカルボニル基とタンパク質のアミノ基との反応による Schiff 塩基の形成から、アマトリ化合物生成までの初期段階を経る。次に後期段階である脱水、縮合、加水分解などの反応を経てカルボキシメチルリジン (CML)、カルボキシエチルリジン (CEL)、ペントシジン (自家蛍光を有する AGE) といった AGEs が生成される。

近年の研究では、代謝経路の自己酸化に由来するカルボニル化合物からも AGEs が生成されることが報告されている。血液透析中の 2 型糖尿病患者の血清中には異なる 5 種類の AGEs (グルコース由来 AGEs : Glc-AGEs、グリセルアルデヒド由来 AGEs : Glycol-AGEs、メチルグリオキサール由来 AGEs : MGO-AGEs、グリオキサール由来 AGEs : GO-AGEs) が存在しており、糖尿病患者の血管合併症の発症に関与すると考えられている。これらの AGEs 分子種において、Glycer-AGEs は特に細胞毒性が強いため、Toxic AGEs (TAGE) とも呼ばれている。AGEs の翻訳後修飾は、加齢によっても蓄積しアルツハイマー病やガンなどの様々な疾患の病態プロセスにも関与する。しかしながら、AGEs の蓄積が引き起こす病態メカニズムや生理的機能については、十分に解明されていない。

本研究では、ストレプトゾトシン (STZ) 誘導性 1 型糖尿病ラットおよび健常ラットにおける各 AGEs の組織局在分布を調べるために、4 種類の抗 AGEs 特異的ウサギポリクローナル抗体を作製した。特定の細胞における AGE の局在性を詳細に解明することは、AGEs の機能的役割を理解するための第一歩である。

【材料と方法】

動物実験

12 週齢の Wistar ラットおよびニホン白ウサギの雄性体を使用した。STZ 誘導性 1 型糖尿病ラットは、0.05M クエン酸ナトリウム (pH 4.5) に溶解した 75mg/kg ストレプトゾトシン (Wako) の腹腔内投与によって作製した。ストレプトゾトシン投与の 48 時間後、血糖値が 300mg/dL 以上の個体を糖尿病モデルとした。ラットをストレプトゾトシン投与の 7 日後に麻酔下で屠殺し、膵臓を含む各種の末梢組織を採取した。ウサギは抗 AGE 抗体の作製に使用した (下記参照)。

抗 AGE 特異的ポリクローナル抗体の作製

ニホン白ウサギを完全フロイントアジュバント (Wako) で乳化した AGEs-BSA 抗原で免疫した。不完全フロイントアジュバント (Wako) によるブースター投与を 3 週間後におこなった。麻酔下で免疫したウサギから全血を採取した後、イムノプロット分析により抗血清力価を測定した。免疫グロブリン画分は、硫酸アンモニウムにより血清から沈殿させた。透析後、免疫グロブリンを MEP HyperCel (Pall) を用いて精製した。抗 AGE 特異的抗体を、セファロースビーズ (GE Healthcare) に固定化した各 AGEs-BSA を使用することによって精製した。

AGEs-BSA の合成

BSA を 0.2M グリセルアルデヒド (Sigma-Aldrich)、グリコールアルデヒド (Sigma-Aldrich)、メチルグリオキサール (Sigma-Aldrich) またはグリオキサール (東京化成工業) と 37°C で 7 日間、無菌条件下でインキュベートした。

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

ELISA プレートに 2 μ g/mL AGEs にて固相化し、1% スキムミルクでブロックした。次いで、1 μ g/mL のウサギ抗 AGE ポリクローナル抗体の各々を ELISA プレートのウェルに添加した。4 $^{\circ}$ C で一晩インキュベートした後、peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG (Dako) を各ウェルに添加した。

ウェスタンブロッティング

AGEs-BSA は、Laemmli バッファーで 5 分間煮沸することによって変性させた。1 μ g の AGE-BSA 試料の各々を 10% SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) にかけて、次いで PVDF 膜に転写した。PVDF 膜を 20% スキムミルクおよび 1% 健常ヤギ血清でブロッキングし、2 μ g/mL のウサギポリクローナル抗体 (Glycer-AGEs、Glycol-AGEs、MGO-AGEs または GO-AGEs) を 4 $^{\circ}$ C で一晩反応させた。続いて、peroxidase-conjugated goat anti-rat IgG (MBL) を室温で 1 時間反応させた。Luminata Forte Western HRP 基質 (Millipore) の添加により化学発光反応を開始し、化学発光を ImageQuant LAS 4000 mini (GE Healthcare) によって検出した。

免疫組織化学染色

各パラフィン包埋末梢組織から 5 μ m 厚の組織切片を作製した。各切片は脱パラフィンの後、10mM クエン酸ナトリウム (pH6.0) で 120 $^{\circ}$ C、10 分間の条件で抗原賦活化させた。続いて、切片を 2 μ g/mL 抗 AGE 特異的抗体 (抗 Glycer-AGEs、抗 Glycol-AGEs、抗 MGO-AGEs および抗 GO-AGEs ウサギポリクローナル抗体)、3 μ g/mL 抗インスリンマウスモノクローナル抗体 (HyTest) または 4 μ g/mL 抗グルカゴンマウスモノクローナル抗体 (Abcam) とともにインキュベートした。また、細胞内の分泌小胞を染色するために、10 μ g/mL 抗 VAMP2 (小胞関連膜タンパク質 2) マウスまたはウサギモノクローナル抗体 (Abcam または Cell Signaling) を用いて同様の条件下でインキュベートした。二次抗体は、Alexa Fluor 488 または 555-conjugated goat anti-mouse または anti-rabbit IgG 抗体 (Invitrogen) を使用した。細胞核は 4', 6'-ジエタジノ-2-フェニルインドール (DAPI) で対比染色した。

[結果]

抗 AGE ポリクローナル抗体の特異性

ウェスタンブロット法により AGEs-BSA に対する各ポリクローナル抗体の抗原特異性を確認した。AGEs-BSA は、分子間の架橋構造をランダムに生成するため、検出された AGEs バンドはラダーパターンを示した。抗 Glycer-AGEs 抗体は、Glycer-AGEs だけでなく MGO-AGEs に対しても交差反応性を示したが、他の抗体は各抗原に対して特異的反応を示した。また、ELISA においても、ウェスタンブロットの結果と同様の交差反応性を示した。

ラット末梢組織における AGEs の局在様式

慢性の高血糖で生じる AGEs の中で最も毒性の高い Glycer-AGEs の陽性免疫染色が、健常ラットの脳、膵臓および胃で観察された。また、本研究で調べた各末梢組織では、健常ラットと STZ 誘発糖尿病ラットとの間の AGEs 分布に差異はなかった。

次にラット膵臓における AGEs の局在様式を調べるために、各 AGEs の免疫組織染色をおこなった。健常ラットにおいて、Glycer-AGEs および MGO-AGEs の局在が膵島に認められたが、Glycol-AGEs および GO-AGEs の局在は認められなかった。また、抗 Glycer-AGEs 抗体の染色パターンは、抗 MGO-AGEs 抗体の染色パターンとは明らかに異なっていた。膵臓における Glycer-AGEs は、膵島の辺縁に局在しており、この Glycer-AGEs 陽性細胞は、膵 α 細胞であると考えられた。実際に、Glycer-AGEs およびグルカゴンの二重免疫組織染色は、両方の染色が大部分共局在していた。しかし、膵島の辺縁のグルカゴン陰性細胞の一部も、Glycer-AGEs に対して陽性であった。これらの Glycer-AGEs 陽性細胞は、組織形態学的特徴から判断すると δ 細胞または PP 細胞である可能性が最も高い。一方、MGO-AGEs の免疫反応性はインスリンの局在と完全に一致し、これらの MGO-AGEs 陽性細胞は膵 β 細胞であることが示された。さらに、MGO-AGE とインスリンの共局在が β 細胞の細胞質顆粒様構造内に位置することも認められた。これらの結果は、インスリン分泌顆粒に MGO-AGEs 修飾タンパク質が存在するこ

とを示唆している。STZ 誘発糖尿病ラットの膵島では、膵β細胞の顕著な減少に伴い、萎縮性の形態異常が観察された。しかし、STZ 処理した後の膵島において、Glycer-AGE および MGO-AGE の局在は、健常ラットと比べてほぼ同様の染色パターンを示した。

【考察】

現在、特定の AGEs 分子種に対するいくつかの特異的抗体が、AGEs 修飾の役割を調査するために利用されている。しかし、CML は各種 AGEs 修飾タンパク質に共通するエピトープ構造であるため、これらの抗体は、Glc-AGEs 以外の AGEs に対しても交差反応性を有する場合が多い。さらに、生体内における CML の主な供給源は、脂質過酸化であり、グリコシル化ではない。したがって、将来の研究では、様々な病態に直接関連する AGE 構造に対して、より特異的な抗体を提供することが重要な課題となってくる。

本研究では、グリセルアルデヒド由来 AGEs (Glycer-AGEs)、グリコールアルデヒド由来 AGEs (Glycol-AGEs)、メチルグリオキサール由来 AGEs (MGO-AGEs)、グリオキサール由来 AGEs (GO-AGE) のそれぞれに対する 4 種のポリクローナル抗体を作製した。各抗体の抗原特異性を確認した後に、これらの抗体を用いてラット末梢組織における各 AGEs 分子種の局在性を決定した。解析は特に膵島における Glycer-AGE および MGO-AGE の組織学的局在に焦点を当てた。

本研究は、Glycer-AGE および MGO-AGE が健常ラットの膵島に存在し、それらの局在はα細胞およびβ細胞の 2 つのタイプの島細胞ではっきりと区別されていることを明らかにした。STZ 誘発性糖尿病ラットでは、インスリン分泌β細胞の数の顕著な減少および高血糖が認められたが、膵島に生存していたαおよびβ細胞において、Glycer-AGE および MGO-AGE の局在性および細胞当たりの発現量は健常ラットと比べて変化しなかった。

これらの結果は、AGE 修飾タンパク質の細胞特異的局在が、普遍的に生体内に存在しており、AGEs 修飾が何らかの生理的役割を担っている可能性を示唆している。膵β細胞における MGO-AGE は、インスリン分泌顆粒に局在することから、膵島における MGO 特異的糖化は、インスリンの分泌または成熟に重要な役割を果たすための翻訳後修飾なのかもしれない。

一般に AGEs の蓄積は、慢性的炎症病態を惹起すると考えられている。膵島においても、Glycer-AGEs によって膵β細胞のインスリン分泌能が低下するという報告がある。しかし、これらの AGEs 刺激は、細胞膜上に発現する AGEs 受容体 (RAGE) へのリガンド結合による細胞応答の結果であると考えられる。細胞内に蓄積した AGEs によって誘導される、RAGE を介さない細胞応答に関しては、ほとんど報告がなされていない。

本研究では、*in vivo* での免疫化学的検出のために有用な AGEs 特異的抗体を作製し、末梢組織における AGE 特異的な生理的役割の存在の可能性を明らかとした。末梢組織における病原性 AGEs 修飾と生理的 AGEs 修飾の間の機能的相違を解明するために、さらなる研究が依然として必要とされる。

【結論】

AGE は健常ラットの末梢組織に存在する。特に、Glycer-AGE および MGO-AGE は、それぞれ膵島のα細胞およびβ細胞に局在していた。したがって、我々は AGEs が膵島におけるホルモン分泌のプロセスにおいて何らかの役割を有し得ると推測している。