

平成 16 年度日本眼科学会学術奨励賞 受賞論文総説

角膜内皮細胞における蛋白糖化最終産物受容体の局在と役割

加治 優一

筑波大学臨床医学系眼科

要 約

角膜内皮細胞は加齢とともに減少するが、そのメカニズムは未知の点が多い。我々は蛋白糖化最終産物(advanced glycation end product, AGE)とその受容体の相互作用が、角膜内皮細胞の減少に関わるという仮説を立てた。ウシの角膜内皮細胞において、AGE 受容体である receptor for AGE(RAGE)と galectin-3 の発現を reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) および免疫組織化学的を用いて検討した。次に、培養角膜内皮細胞に AGE を作用させ、細胞内への取り込み・細胞内活性酸素・アポトーシス誘導について検討した。ウシの角膜内皮細胞には RAGE と galectin-3 の発現を認めた。さらに、galectin-3 は AGE の細胞内への取り込みに、RAGE は AGE と結合することにより細胞内活性酸素とアポトーシスを誘導することに関与することが明らかになった。よって、角膜内皮細胞が加齢とともに減少する機序として、前房水中の AGE と角膜内皮細胞に発現されている AGE 受容体の相互作用が重要な役割を果たしていることが示唆された。(日眼会誌 109 : 691—699, 2005)

tin-3 の発現を認めた。さらに、galectin-3 は AGE の細胞内への取り込みに、RAGE は AGE と結合することにより細胞内活性酸素とアポトーシスを誘導することに関与することが明らかになった。よって、角膜内皮細胞が加齢とともに減少する機序として、前房水中の AGE と角膜内皮細胞に発現されている AGE 受容体の相互作用が重要な役割を果たしていることが示唆された。(日眼会誌 109 : 691—699, 2005)

キーワード：蛋白糖化最終産物、角膜内皮細胞、加齢性変化、活性酸素、アポトーシス

A Review

Expression and Function of Receptors for Advanced Glycation End Products in Bovine Corneal Endothelial Cells

Yuichi Kaji

University of Tsukuba, Institute of Clinical Medicine, Department of Ophthalmology

Abstract

Corneal endothelial cell loss is a change that occurs with age, but its mechanism is still unclear. We postulated that interaction between advanced glycation end product(AGE) and its receptors is implicated in the corneal endothelial cell loss with age. We investigated the expression of AGE receptors : receptors for AGE(RAGE) and galectin-3 in bovine corneal endothelial cells by reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR) and immunohistochemistry. In addition, we investigated the effect of AGE on the cultured corneal endothelial cells. Expression of RAGE and galectin-3 was detected in bovine corneal endothelial cells. Galectin-3 was important in the internalization of

AGE. In contrast, RAGE was important in the generation of reactive oxygen species and induction of apoptosis. Based on these data, the interaction of AGE in aqueous humor and AGE receptors expressed on the corneal endothelial cells was speculated to have a role in the corneal endothelial cell loss with age.

Nippon Ganka Gakkai Zasshi(J Jpn Ophthalmol Soc 109 : 691—699, 2005)

Key words : Advanced glycation end product, Corneal endothelial cells, Ageing process, Reactive oxygen species, Apoptosis

別刷請求先：305-8575 つくば市天王台 1-1-1 筑波大学臨床医学系眼科 加治 優一

(平成 17 年 3 月 18 日受付, 平成 17 年 4 月 23 日改訂受理) E-mail : kajiyuichi@hotmail.com

Reprint requests to : Yuichi Kaji, M. D., Ph. D. University of Tsukuba, Institute of Clinical Medicine, Department of Ophthalmology, 1-1-1 Tennoudai, Tsukuba 305-8575, Japan

(Received March 18, 2005 and accepted in revised form April 23, 2005)

I はじめに

高齢化に伴い、加齢現象やアンチエイジングが一般にも注目を集めるようになってきた。眼科疾患を見ると、白内障や加齢黄斑変性をはじめとして加齢現象が深く関与するものが多い。よって、加齢現象のメカニズムを解明することにより、これらの疾患に対して新しい治療法が開発される可能性がある。しかしながら、加齢現象は遺伝的あるいは外的要因が長期間作用した結果生じるものであるために、培養細胞や実験動物を用いた解析が困難なことが多い。そこで、我々は角膜内皮細胞密度の減少という、眼の加齢性変化の中でも最も単純な系について分子レベルでの解析を試みた。特に本研究では、蛋白の糖化に伴う角膜内皮の変化について検討を行った。蛋白の糖化とは、以下に述べるように、加齢性変化だけではなく糖尿病合併症の発症にも深く関わる現象として知られている。

II 加齢現象の分子メカニズム

加齢現象とは、成熟期以後に各臓器の機能が低下し、個体の恒常性を維持することが不可能になる過程といえることができる。この加齢現象が生じるメカニズムとしては、酸化ストレスの亢進、テロメアの短縮、蛋白質の糖化などが提唱されている。特に蛋白質の糖化は、加齢性変化や糖尿病合併症に関わることが示され注目を集めている¹⁾²⁾。

蛋白質と糖を混在させておくと、酵素を介することなく互いにゆっくりと反応し、蛋白糖化最終産物(advanced glycation end product, AGE)を形成する。この蛋白質の AGE 化反応は、特に食品分野で研究されはじめた。具体的には、缶詰などの保存食品などにおいて、蛋白質が AGE 化されるために、栄養価が低下するという問題に対処するために研究が進んだ。そこで人体を眺めてみると、蛋白質と糖が混在するという点で、AGE が産生される格好の場である。事実、体内では様々な種類の AGE が産生され、硬膜や血管の基底膜などターンオーバーのきわめて遅い組織に沈着することが知られている。

蛋白質が AGE 化する反応は大きく 2 段階に分けられる。まず、グルコースなどの還元糖は直鎖状となり、蛋白質と結合し、数段階の反応を経ることでアマドリ化合物という中間代謝産物を形成する。このアマドリ化合物は酸化・脱水・縮合などの不可逆的な反応を経ることで AGE を形成する。これらの反応は、材料となる糖が多くなるという点で、糖尿病患者において促進される。さらに、AGE 化された蛋白質は蛋白分解酵素により分解されずに蓄積する傾向にあるために、高齢者において蓄積する。さらに、AGE は糖尿病合併症の標的臓器や、加齢現象の生じやすい臓器に蓄積する傾向にあるため

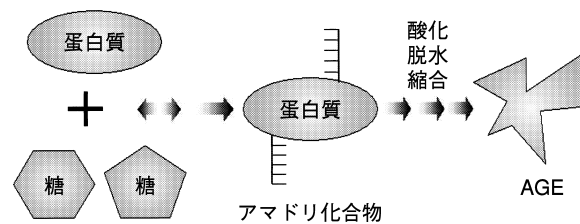


図1 蛋白糖化最終産物(AGE)の生成機序。

蛋白質と糖が混在するとアマドリ化合物を経て AGE が生成される。

に、AGE は糖尿病合併症や加齢現象の原因の一つと考えられるようになってきた(図1)。

III AGE が障害を惹き起こす 2 つのメカニズム

AGE はその生成に関わる糖と蛋白質の種類によって無限の組み合わせから成る。さらに、ある特定の糖と蛋白質の組み合わせであったとしても、生じる AGE 構造は多岐にわたる。AGE とは、このようにして生じた糖と蛋白質が反応した無数の最終産物の総称であり、様々な構造物を含んでいる。しかしながら、材料となる糖や蛋白質の種類によらずに、特有の構造が生じることが明らかになってきた。それらの構造物には、N^ε-(carboxymethyl-Lysine(CML)、ペントシジン、イミダゾロン、ピラリンなどが含まれる。このように AGE 化された蛋白質が体内に沈着すると、主に 2 つのメカニズムで障害を惹き起こすと考えられている。

まず、AGE 化された蛋白質は、その立体構造が大きく変化する。例えば、ペントシジンやクロスリンなどは 2 つのアミノ酸を架橋する構造をとる。そのために蛋白質の分子間あるいは 1 つの分子の中で架橋構造を生じることとなる。この立体構造の変化のために、蛋白質はその機能を果たすことができなくなる場合がある。例えば、基底膜の構成成分であるラミニンが AGE 化されると、その十字架構造が崩れてしまう³⁾。さらに、CML のような非架橋型の修飾であったとしても、酵素の活性中心に生じた場合には、その活性が低下することがあり得る。このように、蛋白質の AGE 化によって、その蛋白質の機能が障害されることとなる。

AGE は細胞表面の受容体と結合することにより細胞障害を惹き起こすことが知られている^{4)~7)}。生体には、AGE を認識する受容体が数多く存在する。その存在意義は未だ明確になってはいない。AGE はそれを認識する受容体と結合することにより、酸化ストレスの亢進を惹き起こすことで細胞機能を障害することが知られている。さらに、AGE は AGE 受容体を介して細胞内に取り込まれ、細胞内に蓄積することにより細胞機能を障害すると考えられている^{4)~7)}。

以上のように、AGE 化された蛋白質はそれ自体の機能が低下しているだけではなく、受容体と結合すること

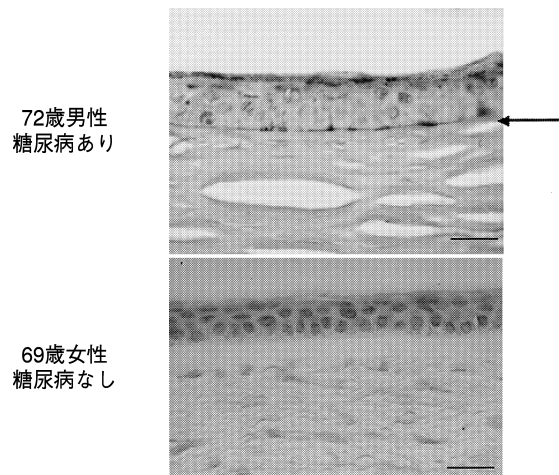


図 2 角膜上皮基底膜における AGE の沈着。
糖尿病歴の長い患者の角膜上皮の基底膜には AGE の沈着を認める(矢印)。しかし、糖尿病歴のない、あるいは若年者の角膜上皮の基底膜には AGE の沈着を認めない。バーは 50 μm

により細胞障害を惹き起こすことにより、加齢や糖尿病に伴う合併症の引き金となることが考えられている。

IV AGE と眼疾患

AGE は眼においても沈着し、様々な病態に関与することが示唆されている。体内で最も早く AGE の蓄積が観察された組織は水晶体である⁸⁾。AGE は水晶体に沈着することにより、AGE に特徴的な褐色調を呈し、混濁の原因となる。高齢者の眼底に観察されるドルーゼンにも AGE が沈着しており、加齢黄斑変性に認められる血管新生を誘導すると考えられている⁹⁾。Descemet 膜や篩板といった、ターンオーバーのゆっくりした蛋白質においても AGE の沈着を認め、加齢に伴う角膜内皮細胞や視神経の減少に関わっている可能性がある¹⁰⁾¹¹⁾。

我々は糖尿病角膜上皮障害の原因を検討するために、糖尿病患者の角膜における AGE の局在を免疫組織化学的に検討した¹²⁾。その結果、糖尿病の罹患歴の長い患者の角膜上皮の基底膜において、AGE が沈着していることを明らかにすることができた¹²⁾(図 2)。さらに、基底膜の成分の中でも、ラミニンの AGE 化によってラミニンの立体構造が変化し、その機能が障害されることによって、角膜上皮細胞と基底膜の接着が障害されることが明らかになった。

上記の変化は、蛋白質が AGE 化されることにより、立体構造が変化し、機能が障害される代表である。それ以外にも、糖尿病に伴い血液中の AGE が増大し、網膜血管内皮細胞に発現されている受容体と結合することにより、糖尿病網膜症が惹き起こされる可能性が示唆されている^{10)~14)}。このように、AGE は眼において加齢性変化や糖尿病合併症に深く関係していることがわかる。

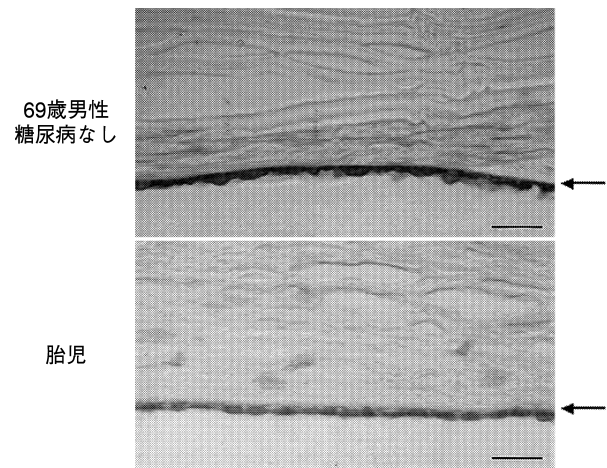


図 3 ヒト角膜内皮における AGE の蓄積。
高齢者をはじめ、生後には角膜内皮に AGE が蓄積している(矢印)。しかし、胎児の角膜内皮には AGE の蓄積を認めない(矢印)。バーは 50 μm

V 角膜内皮細胞における AGE の沈着

我々は糖尿病に伴う角膜上皮基底膜の変化を検討する過程で、偶然に糖尿病の有無によらず角膜内皮細胞に AGE が蓄積することを見出した¹²⁾。そこで、様々な年齢の角膜内皮細胞における AGE の局在を検討した結果、胎児の角膜内皮細胞には AGE の蓄積を認めなかったが、生後早い年齢から AGE の蓄積が生じることが明らかになった(図 3)。細胞内への AGE の蓄積は、アルツハイマー病患者の海馬の神経細胞などで観察されており、神経細胞死に関わることが示されている。そこで、我々は角膜内皮細胞における AGE の蓄積が、角膜内皮細胞の細胞死に関わっているのではないかという仮説を立てた。AGE が細胞内に蓄積する、あるいは細胞に障害を惹き起こす機序には、特異的な受容体に関与することが示されつつある。よって、我々は角膜内皮細胞において AGE に対する受容体が発現されているかどうかを検討した。

VI 角膜内皮細胞における AGE 受容体の発現

AGE に対する受容体(receptor for AGE, RAGE)には、galectin-3、マクロファージスカベンジャー受容体など様々なものが同定されている^{5)14)~18)}。その中でも AGE の認識の中心的な役割を果たしている RAGE および galectin-3 が角膜内皮細胞において発現されているかどうかを検討した。

RAGE は AGE に対する受容体としてウシの肺胞上皮細胞からクローニングされた。RAGE は免疫グロブリンスーパーファミリーに属し、様々な AGE 構造の中でも主に CML を認識すると考えられている。それに対して galectin-3 は IgE やガラクトースと親和性を有するレクチン様の蛋白質として同定された¹⁹⁾²⁰⁾。その構造

は、小さな頭部、プロリン-グリシン-アラニン-チロシンというアミノ酸の繰り返し配列(PGAY 配列)から成る長くしなやかな首、そして AGE 認識部位から成る²¹⁾。後に galectin-3 は AGE だけではなく、フィブロネクチンやラミニンなども認識することが明らかになった。ただし、galectin-3 は OST-48, 80 K-H という 2 つの分子と受容体複合体を形成することで、AGE に対する受容体として作用することが知られている⁹⁾。我々はウシ角膜内皮細胞の mRNA から cDNA ライブラリーを作製し、RAGE および galectin-3 の発現を reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR)で検討した。次に、RAGE および galectin-3 に対するポリクローナル抗体を作製し、これらの受容体の角膜内皮細胞での発現を免疫組織化学的に発現を検討した。なお、galectin-3 に対するポリクローナル抗体は、ヒトの galectin-3 をウサギに注射することにより、RAGE に対するポリクローナル抗体は、ヒトの RAGE のカルボキシル末端(E³⁹²EPEAGESSTGGP⁴⁰⁴)をウサギに注射することにより作製した。また、これらの抗体はヒトだけ

ではなく、ウシの galectin-3 および RAGE を認識することが確かめられている。なお、上記のポリクローナル抗体は、堀内正公教授(熊本大学大学院医学薬学研究部生体機能病態学講座)より供与を受けた。

RAGE は免疫組織化学および RT-PCR で角膜内皮細胞

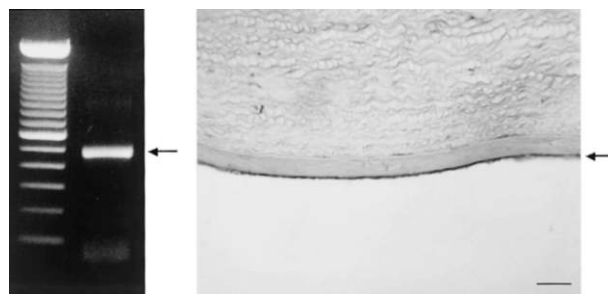


図 4 ウシ角膜内皮における AGE 受容体(RAGE)の発現。

Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)および免疫組織化学的に、ウシの角膜内皮細胞に RAGE の発現を認めた(矢印)。バーは 20 μ m

A	Human	CCTCCAGGCGCCTA-CC-CTGG-AGCACCTGGAGCTTATCCCGG- - -A- -GCACCT- -
	Mouse	CCTCCAGGGGCGCTATCCAGGACAGGCTCCTCCTAGTGCTACCCCGGCCAACTGCCCTTG
	Bovine	TATCCTGGGGCCTACCCTGGACAGGGACCTCCTGGGGCCTACCCTGGCCCAACAGCACCT- -
	Human	-GC- -A- CCTGG- -AGTCTA-CCCAGG-GC-CA-CC- - -CAG-CGG-CCCTGGGGCCTACC
	Mouse	AGCTTATCCTGGCCCAACTGCCCTGGAGCTTATCCTGGTCAACCTGCCCTGGAGCCT TCC
	Bovine	-GCTTATCCTGGGCCAACTGCACC- -GAG-T-G-CCT- -AC-CCCGG-ACCTGGGGCCT ACC
	Human	CA- -TCTT-CT-GGACAGCCAAGTGCC-A- - -CCGGAGC-CT- -A- - -CCTGCCACTGG
	Mouse	CAGGGCAACCTGGGGCA- CCTGGGGCCTACCCCAAGTGCTCTGGAGGCTATCCTGCTGCTGG
	Bovine	CA- -CCTCC-GGCACAGCCAAGTG-CT- - -CCTGGAGC-CT- -A- - -CCTG CTGCCGG
	Human	CCCCTATGGCGCCCTGCTGGGCCACTGATTGTGCCTTATAACCTGCCTTTGCC TGGGGGAG
B	Human	TGGTGCCTCGCATGCTGATAACAATTCTGGGCACGGTGAAGCCCAATGCAAA CAGAATTGCT
	Mouse	TCATGCCCGCATGCTGATCACAATCATGGGCACAGTGAAACCCCAACGCAAA CAGGATTGTT
	Bovine	TCAGGCCTCGCATGCTGATAACAATCTGGGTACAGTAAAGCCCAATGCGAA CAGACTTGCT
	Human	TTAGATTTCCAAAGAGGGAATGATGTTGCCTTCCACTTTAACCACGCTT CAATGAGAACAA
	Mouse	CTAGATTTCAGGAGAGGGAATGATGTTGCCTTCCACTTTAACCCTCGCTT CAATGAGAACAA
	Bovine	TTAGATTTCAGGAGAGGGAATGATGTCGCTTCCACTTTAACCACGCTT C AATGAGGA CAA
	Human	CAGGAGAGTCATTGTTTGCAATACAAAGCTGGATAATAACTGGGGAAGGGAAGAAAGACAGT
	Mouse	CAGAAGAGTCATTGTG TGTAAACGAAGCAGGACAATAACTGGGGAAGGGAAGAAAGACAGT
	Bovine	CAGGAGAGTCATTGTTTGCAATTCAAAGCTGAATAATAACTGGGGAAGGGAAGAAAGACAAA
	Human	CGGTTTTCCCATTTGAAAGTGGGAAACCATTCAAAATACAAGTACTGGTTGAACCTGACCAC
	Human	TTCAAGGTTGCAGTG
	Mouse	TTCAAGGTTGCGTC
	Bovine	TTCAAGGTTGCAGTC
	Human	PGAYPG-A-PGAYPGAPAPGVYPGP- -P- - -SG- -PGAYPS-SGQPSA- - -TGAYPAT
	Mouse	PGAYPGQAPP SAYPGPTAPGAYPGPTAPGAYPGQAPGAFPGQPGAPGAYPQCSGGYPAA
	Bovine	PGAYPGQGPPGAYPGPTAPA-YPGPTAPSAY- - -PGPGAYP-PPAQPSA-P- - -GAYPAA
	Human	GPYGPAGPL IVPYNLPLPGGVVPRML I TILGTVKPNANRIALDFQRGNDVAFHFNPFRN
	Mouse	GPYGVAGPL TVPYDLPLPGGVMPRL I TIMGTVKPNANRI VLDFRRGNDVAFHFNPFRN
	Bovine	GPYGI P SGPLNVPYDL P FPGGI RPRML I TILGTVKPNANRLALDFKRGNDVAFHFNPFRN
	Human	ENNRRI VCN TKLDNNWGREER QSVFPFESGKPFK IQVLVEPDHFKVAVN
	Human	ENNRRI VCN TKQDNNWGKEER QSAFPFESGKPFK IQVLVEADHFKVAVN
	Bovine	EDNRRI VCN SKLNNNWGREER QMVFPFESGKPFK IQVLVEPDHFKVAVN

図 5 Galectin-3 の cDNA およびアミノ酸配列の一部。

mRNA レベルでは(図 5 A)マウスと 80%, ヒトと 89%, アミノ酸レベルでは(図 5 B)マウスと 82%, ヒトと 83% の相同性のあるウシの galectin-3 の配列を決定することができた。

胞での発現が認められた(図 4)．Galectin-3 についてはヒトやマウスの遺伝子配列は既知であったものの、ウシの遺伝子配列は未知であった．そこで、上流についてはプロリン-グリシン-アラニン-チロシン(PGAY)モチーフと呼ばれる繰り返し配列の部分、下流についてはヒトとマウスで相同性の高い AGE 構造認識部位を選び、degenerative primer を作製して RT-PCR を適用した．その結果、mRNA レベルでは(図 5 A)マウスと 80%、ヒトと 89%、アミノ酸レベルでは(図 5 B)マウスと 82%、ヒトと 83% の相同性のあるウシの galectin-3 の配列を決定することができた．次に、このアミノ酸配列を基に作製した galectin-3 に対するポリクローナル抗体を用いて、galectin-3 の角膜内皮細胞での発現を確認した．すなわち、角膜内皮細胞において galectin-3 は mRNA および蛋白質レベルで発現されていた(図 6)．

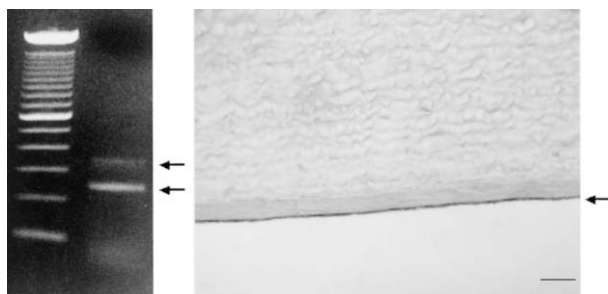


図 6 ウシ角膜内皮における galectin-3 の発現.
Degenerative primer を用いてウシの角膜内皮細胞から複数の galectin-3 のバンドが検出された(矢印)．免疫組織化学的にウシの角膜内皮細胞における galectin-3 の発現を認める(矢印)．バーは 20 μ m

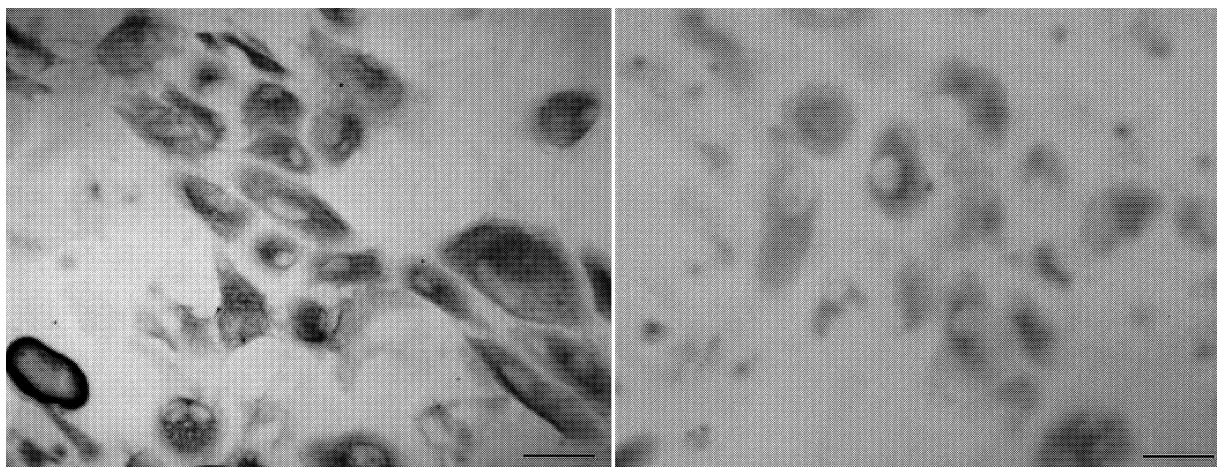
VII AGE 受容体を介した角膜内皮細胞への AGE の取り込み

我々が角膜内皮細胞と AGE を研究するきっかけは、ヒトの角膜内皮に AGE が蓄積していることを偶然に発見したことに始まる．そこで、我々は角膜内皮細胞への AGE の蓄積メカニズムについて検討した．

ウシの角膜内皮細胞を培養し、第 2 継代までの細胞を研究に利用した．この培養角膜内皮細胞の培養上清中に AGE 化されたウシのアルブミンを添加し、3 日後に免疫組織化学的に AGE 化されたアルブミンの細胞内における局在を検討した．

ウシのアルブミンを AGE 化する方法によって生成される AGE 構造も異なることが知られている．例えば、ウシのアルブミンにグルコースやグルコース-6-リン酸などを添加して 37°C で 1 か月静置することによって、アルブミンには様々な AGE 構造が生じる．具体的には、一分子当たり 40 か所に AGE 構造が認められ、その中でも CML は 9 か所に認められ、最も多い AGE 構造とすることができる²²⁾．すなわち、アルブミンと糖を混合すると、CML を中心としながらも多数の AGE 構造の混合物が生成されることになる．それに対して、アルブミンに glyoxylic acid と NaCNB₃ を混合しておくと、CML 化したアルブミンだけが生成される²³⁾．

上記のような AGE 構造の違いは、AGE 受容体に対する親和性にも影響を及ぼす．具体的には、AGE 受容体の中でも RAGE は主に CML を認識するといわれている．それに対して galectin-3 は CML 以外の様々な AGE 構造も認識するといわれている．よって、CML を含めて様々な AGE 構造を有するアルブミンと、CML のみを有するアルブミンを別々に培養上清中に添加す



AGE化アルブミン

CML化アルブミン

図 7 培養ウシ角膜内皮細胞への AGE の取り込み．

AGE 化アルブミンは角膜内皮細胞の細胞質に取り込まれるが、N^ε-(carboxy)methyl-Lysine CML 化アルブミンの細胞内への取り込みは少ない．バーは 20 μ m

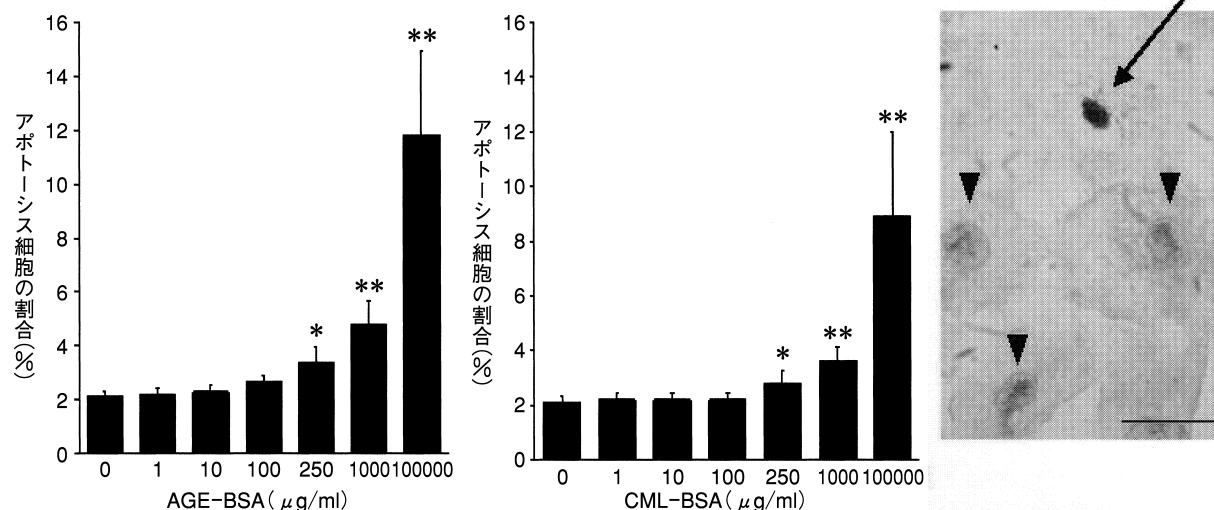


図 8 AGE による角膜内皮細胞のアポトーシス誘導。

AGE 化アルブミンおよび CML 化アルブミンは濃度依存性に角膜内皮細胞にアポトーシスを誘導する。アポトーシス誘導能は AGE 化アルブミンの方が強い(*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$: 多重検定で AGE を添加していない群との比較)。健康な角膜内皮細胞(矢じり)に混じってアポトーシスに陥った細胞のクロマチンは濃縮し、細胞質も縮小している(矢印)。

ることにより、AGE 受容体の作用の違いも識別することが可能となり得る。

培養ウシ角膜内皮細胞の培養上清中に、CML を含めて様々な AGE 構造を有するアルブミンを添加した結果、アルブミンは細胞内に取り込まれ、細胞質内に認められるようになった。それに対して、CML のみを有するアルブミンを培養上清中に添加した場合には、アルブミンはごくわずかししか角膜内皮細胞に取り込まれないことがわかった。このことは、CML 化されたアルブミンは RAGE を介して細胞内に取り込まれることが少ないことを意味する。さらに、角膜内皮細胞への AGE の取り込みは、galectin-3 が様々な AGE 構造の中でも CML ではない成分を認識することによってなされることが考えられた(図 7)。

ヒトにおいて、生後、特に高齢者に認められる角膜内皮細胞への AGE の蓄積は、内皮細胞に発現されている AGE に対する受容体、特に galectin-3 が重要な役割を果たしていることが明らかになった。前房水中には微量ながら AGE 化された蛋白質が存在している²⁴⁾。角膜内皮細胞が前房水中の AGE 化された蛋白質を細胞内に取り込んだ結果、内皮細胞に AGE が蓄積していくものと思われる。さらに、細胞内にはグルコースよりも数倍も AGE 化しやすいフルクトースやグルコース-6-リン酸などの糖の中間代謝産物が豊富に存在する²⁵⁾。よって、AGE を取り込んだ角膜内皮細胞の細胞内における AGE 化も促進されているものと考えられる。

VIII AGE 化蛋白質による角膜内皮細胞のアポトーシス誘導

ヒトの角膜内皮に認められる AGE の蓄積には AGE 受容体が関与することが明らかになった。では、角膜内皮細胞における AGE の蓄積は、角膜内皮の加齢性変化、特に内皮細胞密度の減少と関連があるのだろうか。我々は培養角膜内皮細胞に AGE 化されたアルブミンを作用させることによって惹き起こされる角膜内皮細胞の変化を観察した。

培養ウシ角膜内皮細胞に $0 \sim 10^5 \mu\text{g/ml}$ までの様々な濃度で AGE 化あるいは CML 化したアルブミンを加え、2 日後にアポトーシスに陥った角膜内皮細胞を TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL) 法で検出した。その結果、AGE 化したアルブミンも CML 化したアルブミンもともに濃度依存性に角膜内皮細胞にアポトーシスを誘導した。この両者のアポトーシス誘導能を比較すると、AGE 化したアルブミンの方がわずかに強いアポトーシス誘導能を有していた(図 8)。

この結果は、AGE のアポトーシス誘導能は、AGE の中でも CML と RAGE が結合することがきっかけとなっていることを示している。すなわち、前項の結果と併せて考えると、AGE は細胞内に取り込まれなくても、細胞表面の受容体と結合するだけでアポトーシスを誘導していることになる。さらに、AGE 化アルブミンの方が CML 化したアルブミンよりもアポトーシス誘導能が強かったことによって、AGE の細胞内の蓄積もアポトーシス誘導に促進的に作用することが考えられた。

現在のところ、AGE 受容体(特に RAGE)が AGE を

認識した後の細胞内シグナル伝達についてはあまり明らかにされていない。ただし、AGE によって RAGE を刺激することにより reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) オキシゲナーゼが活性化され、活性酸素の産生促進を含んだ細胞内の酸化ストレスが亢進することで NF- κ B の活性化を惹き起こされるという系が提唱されている²⁶⁾。そこで、我々は角膜内皮細胞に AGE を作用させると細胞内の活性酸素が増大す

ることがアポトーシスのきっかけとなるという仮説を立てた。

培養角膜内皮細胞の培養上清中に AGE 化したアルブミンあるいは CML 化したアルブミンを添加し、2 日後に nitro blue tetrazolium (NBT) をさらに添加した。60 分後に角膜内皮細胞より還元型の NBT を抽出し、その濃度を測定することで細胞内活性酸素の指標とした²⁷⁾。その結果、AGE 化したアルブミンも CML 化したアル

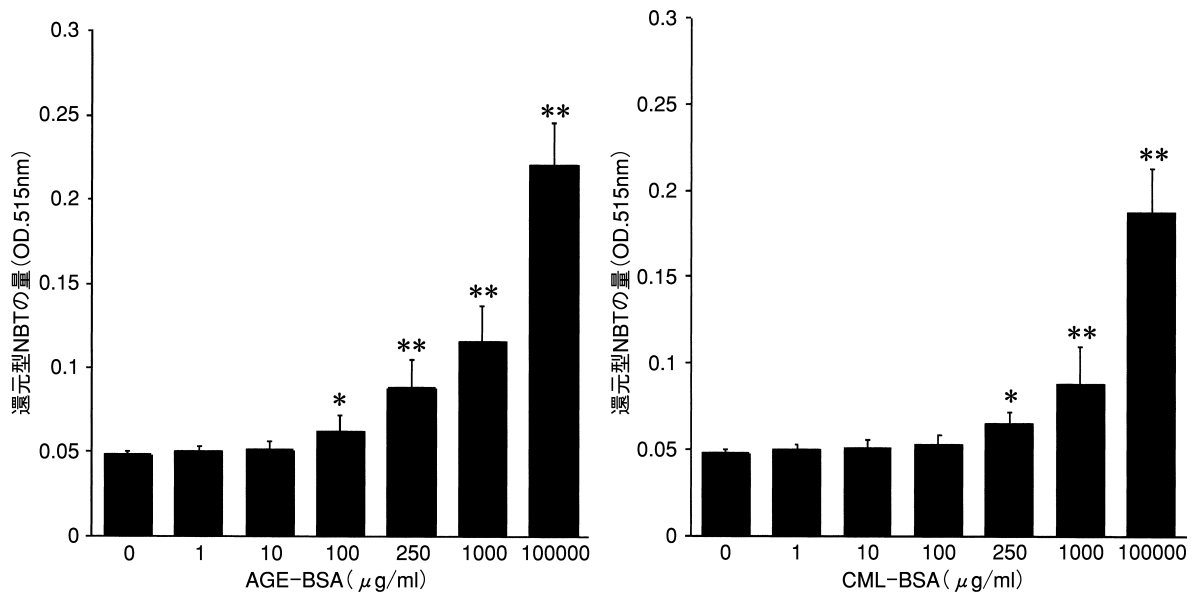


図 9 AGE による角膜内皮細胞内の活性酸素産生促進。

AGE 化アルブミンおよび CML 化アルブミンは濃度依存性に角膜内皮細胞における活性酸素の産生を促進する。活性酸素産生促進能は AGE 化アルブミンの方が強い(*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$: 多重検定で AGE を添加していない群との比較)。

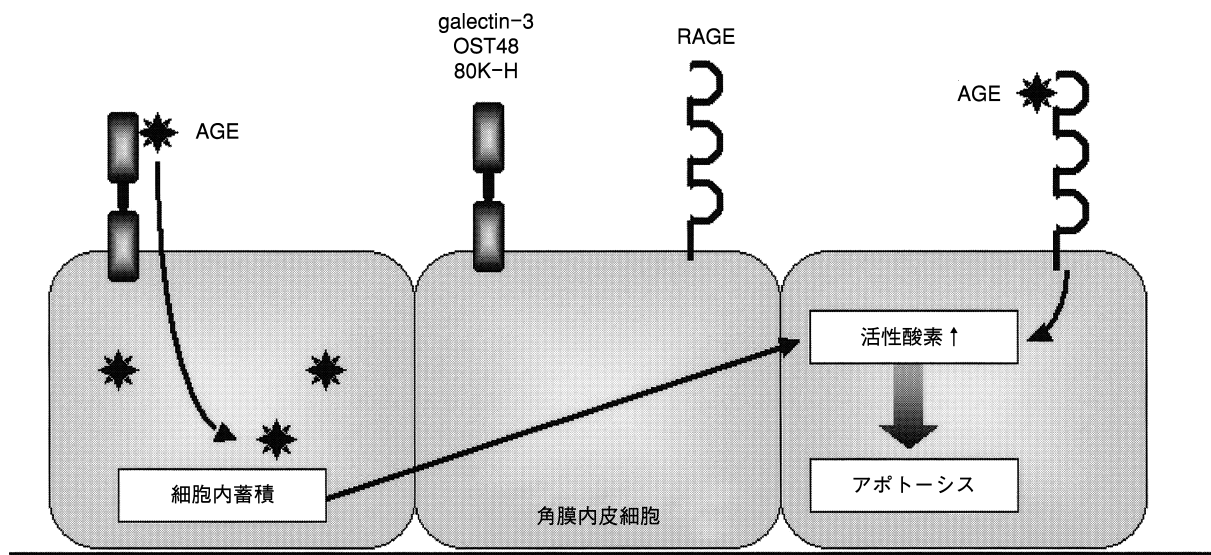


図 10 角膜内皮細胞への AGE の作用のまとめ。

角膜内皮細胞には galectin-3 と OST 48, 80 K-H から成る受容体と RAGE という AGE に対する受容体が発現されている。galectin-3 は AGE の細胞内取り込みに、RAGE は細胞内の活性酸素産生促進を介して角膜内皮細胞をアポトーシスに誘導し得る。

ブミンもともに濃度依存性に角膜内皮細胞における活性酸素の量を増大させた。さらに、アポトーシス誘導能と同様に、AGE 化したアルブミンは CML 化したアルブミンよりもわずかに強い活性酸素誘導能を示した。これは、AGE 化蛋白質自身が活性酸素の産生を促進させる働きがあることに由来していると考えられる(図 9)。

この結果は、CML が細胞表面の RAGE と結合することによって活性酸素の産生が高まることを示している。さらに、細胞内に AGE が取り込まれると、活性酸素の量は増大することも示している。AGE 化された蛋白質は、受容体を介することなく活性酸素の産生を高めることが知られている。よって、AGE による活性酸素産生促進は 2 つのメカニズムから成ると考えられる。1 つは、CML が RAGE と結合することによって生じるものである。もう 1 つは、CML 以外の様々な AGE 構造が galectin-3 と結合し細胞内に取り込まれた結果、AGE 化された蛋白の周囲で生じる活性酸素の産生である²⁶⁾²⁸⁾。この両者が角膜内皮細胞のアポトーシス誘導に関係すると考えられた(図 10)。

IX おわりに

我々は角膜上皮の基底膜と AGE の関係を研究する過程で、偶然に角膜内皮細胞への AGE の蓄積を発見した。さらに、本研究の結果、角膜内皮細胞における AGE の蓄積は、角膜内皮細胞の酸化ストレスの亢進やアポトーシスの誘導に関係していることが明らかになった。よって、AGE は角膜内皮細胞における加齢性変化の代表である内皮細胞密度減少に関わっていることが示唆された。

今後は、AGE と AGE 受容体の相互作用をブロックすることにより、加齢性の変化が抑制できるかどうかを検討する必要がある。AGE と AGE 受容体の相互作用を抑制する方法は 2 つある。1 つは、体内における AGE を減少させるあるいは体内に存在する AGE を分解する方法である。残念なことに *in vitro* では AGE 産生を抑制あるいは AGE を分解する効果が認められている薬剤はアミノグアニジンを含めて数種類あるが²⁹⁾、*in vivo* で有効性を証明されたものはほとんどない³⁰⁾。もう 1 つは、AGE と AGE 受容体の相互作用をブロックする方法がある¹³⁾³¹⁾。例えば RAGE の細胞外ドメインのみを生成し、それを全身投与することによって、血液中の AGE が細胞表面の AGE 受容体と相互作用を惹き起こしにくくなる。この可溶化 RAGE の全身投与は動物実験では糖尿病合併症や動脈硬化などを有意に抑制することが明らかにされている¹³⁾³¹⁾。今後、RAGE をはじめとした AGE 受容体をターゲットとした薬剤の開発が期待される。

本研究により、角膜内皮細胞の加齢による減少について 1 つのメカニズムが明らかにされたと考えられる。こ

の結果は、角膜内皮細胞だけに限らず、様々な臓器の加齢現象に適応ができる可能性がある。複雑で謎の多い加齢現象について、分子レベルでの理解がさらに進むにつれて、新しい見地からの抗加齢療法の開発につながり、quality of vision や quality of life の向上がなされると考える。

稿を終えるに当たり、受賞講演の機会を与えて下さいました学術奨励賞選考委員各位、第 109 回日本眼科学会総会長西田輝夫教授に心より感謝申し上げます。また、研究面での御指導をいただきました大鹿哲郎教授(筑波大学)、天野史郎助教授(東京大学)、堀内正公教授(熊本大学大学院医学薬学研究部生体機能病態学講座)、および貴重な助言をいただきました臼井智彦先生(東京大学)、石田 晋講師(慶應大学)、山城健児先生(神戸市立中央病院)、鈴木 香先生(東京大学分子生物学研究所機能形成研究分野)に感謝いたします。

文 献

- 1) Wolff SP, Jiang ZY, Hunt JV : Protein glycation and oxidative stress in diabetes mellitus and ageing. *Free Radic Biol Med* 10 : 339—352, 1991.
- 2) Horiuchi S, Araki N : Advanced glycation end products of the maillard reaction and their relation to aging. *Gerontology* 40 : 10—15, 1994.
- 3) Charonis AS, Tsilbary EC : Structural and functional changes of laminin and type IV collagen after nonenzymatic glycation. *Diabetes* 41 : 49—51, 1992.
- 4) Yamamoto Y, Yamagishi S, Yonekura H, Doi T, Tsuji H, Kato I, et al : Roles of the AGE-RAGE system in vascular injury in diabetes. *Ann N Y Acad Sci* 902 : 163—170, 2000.
- 5) Li YM, Mitsuhashi T, Wojciechowicz D, Shimizu N, Li J, Stitt A, et al : Molecular identity and cellular distribution of advanced glycation end-product receptors : relationship of p60 to OST-48 and p90 to 80 K-H membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 : 11047—11052, 1996.
- 6) Bierhaus A, Illmer T, Kasper M, Luther T, Quehenberger P, Tritschler H, et al : Advanced glycation end product(AGE)-mediated induction of tissue factor in cultured endothelial cells is dependent on RAGE. *Circulation* 96 : 2262—2271, 1997.
- 7) Stern DM, Yan SD, Yan SF, Schmidt AM : Receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) and the complications of diabetes. *Ageing Res Rev* 1 : 1—15, 2002.
- 8) Araki N, Ueno N, Chakrabarti B, Morino Y, Horiuchi S : Immunochemical evidence for the presence of advanced glycation end products in human lens proteins and its positive correlation with aging. *J Biol Chem* 267 : 10211—10214, 1992.
- 9) Ishibashi T, Murata T, Hangai M, Nagai R,

- Horiuchi S, Lopez PF, et al** : Advanced glycation end products In age-related macular degeneration. *Arch Ophthalmol* 116 : 1629—1632, 1998.
- 10) **Kaji Y, Amano S, Usui T, Suzuki K, Tanaka S, Oshika T, et al** : Advanced glycation end products in Descemet's membrane and their effect on corneal endothelial cell. *Curr Eye Res* 23 : 469—477, 2001.
- 11) **Amano S, Kaji Y, Oshika T, Oka T, Machinami R, Nagai R, et al** : Advanced glycation end products in human optic nerve head. *Br J Ophthalmol* 85 : 52—55, 2001.
- 12) **Kaji Y, Usui T, Oshika T, Matsubara M, Yamashita H, Araie M, et al** : Advanced glycation end products in diabetic corneas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41 : 362—368, 2000.
- 13) **Moore TC, Moore JE, Kaji Y, Frizzell N, Usui T, Poulaki V, et al** : The role of advanced glycation end products in retinal microvascular leukostasis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44 : 4457—4464, 2003.
- 14) **Kaji Y, Amano S, Usui T, Oshika T, Yamashiro K, Ishida S, et al** : Expression and function of receptors for advanced glycation end products in bovine corneal endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44 : 521—528, 2003.
- 15) **Vlassara H, Li YM, Imani F, Wojciechowski D, Yang Z, Liu FT, et al** : Identification of galectin-3 as a high-affinity binding protein for advanced glycation end products (AGE) : A new member of the AGE-receptor complex. *Mol Med* 1 : 634—646, 1995.
- 16) **Araki N, Higashi T, Mori T, Shibayama R, Kawabe Y, Kodama T, et al** : Macrophage scavenger receptor mediates the endocytic uptake and degradation of advanced glycation end products of the Maillard reaction. *Eur J Biochem* 230 : 408—415, 1995.
- 17) **Ohgami N, Nagai R, Ikemoto M, Arai H, Kuniyasu A, Horiuchi S, et al** : CD36, a member of class B scavenger receptor family, is a receptor for advanced glycation end products. *Ann N Y Acad Sci* 947 : 350—355, 2001.
- 18) **Vlassara H, Brownlee M, Cerami A** : High-affinity-receptor-mediated uptake and degradation of glucose-modified proteins : A potential mechanism for the removal of senescent macromolecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82 : 5588—5592, 1985.
- 19) **Cherayil BJ, Chaitovitz S, Wong C, Pillai S** : Molecular cloning of a human macrophage lectin specific for galactose. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87 : 7324—7328, 1990.
- 20) **Cherayil BJ, Weiner SJ, Pillai S** : The Mac-2 antigen is a galactose-specific lectin that binds IgE. *J Exp Med* 170 : 1959—1972, 1989.
- 21) **Pricci F, Leto G, Amadio L, Iacobini C, Romeo G, Cordone S, et al** : Role of galectin-3 as a receptor for advanced glycosylation end products. *Kidney Int Suppl* 77 : S 31—39, 2000.
- 22) **Urata Y, Yamaguchi M, Higashiyama Y, Ihara Y, Goto S, Kuwano M, et al** : Reactive oxygen species accelerate production of vascular endothelial growth factor by advanced glycation end products in RAW 264.7 mouse macrophages. *Free Radic Biol Med* 32 : 688—701, 2002.
- 23) **Ikeda K, Higashi T, Sano H, Jinnouchi Y, Yoshida M, Araki T, et al** : N^ε-(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, 1996.
- 24) **Endo M, Yanagisawa K, Tsuchida K, Okamoto T, Matsushita T, Higuchi M, et al** : Increased levels of vascular endothelial growth factor and advanced glycation end products in aqueous humor of patients with diabetic retinopathy. *Horm Metab Res* 33 : 317—322, 2001.
- 25) **Oimomi M, Sakai M, Ohara T, Igaki N, Nakamichi T, Hata F, et al** : Acceleration of fructose mediated collagen glycation. *J Int Med Res* 17 : 249—253, 1989.
- 26) **Wautier MP, Chappey O, Corda S, Stern DM, Schmidt AM, Wautier JL** : Activation of NADPH oxidase by AGE links oxidant stress to altered gene expression via RAGE. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280 : E 685—694, 2001.
- 27) **Baehner RL, Nathan DG** : Quantitative nitroblue tetrazolium test in chronic granulomatous disease. *N Engl J Med* 278 : 971—976, 1968.
- 28) **Yan SD, Schmidt AM, Anderson GM, Zhang J, Brett J, Zou YS, et al** : Enhanced cellular oxidant stress by the interaction of advanced glycation end products with their receptors/binding proteins. *J Biol Chem* 269 : 9889—9897, 1994.
- 29) **Brownlee M, Vlassara H, Kooney A, Ulrich P, Cerami A** : Aminoguanidine prevents diabetes-induced arterial wall protein cross-linking. *Science* 232 : 1629—1632, 1986.
- 30) **Thornalley PJ** : Use of aminoguanidine (Pimagedine) to prevent the formation of advanced glycation endproducts. *Arch Biochem Biophys* 419 : 31—40, 2003.
- 31) **Lalla E, Lamster IB, Feit M, Huang L, Spessot A, Qu W, et al** : Blockade of RAGE suppresses periodontitis-associated bone loss in diabetic mice. *J Clin Invest* 105 : 1117—1124, 2000.