

第 112 回 日本眼科学会総会 宿題報告Ⅲ

生活習慣病と眼

蛋白質の翻訳後修飾がもたらす眼疾患

加治 優一

筑波大学大学院人間総合科学研究科疾患制御医学専攻眼科学分野

共同研究者

大鹿 哲郎, 岡本 史樹, 平岡 孝浩(筑波大学大学院人間総合科学研究科疾患制御医学専攻眼科学分野)

天野 史郎, 臼井 智彦(東京大学大学院医学系研究科眼科学)

深山 正久, 高澤 豊(東京大学大学院医学系研究科人体病理学)

石田 晋(慶應義塾大学医学部眼科学教室)

山城 健児(京都大学医学部眼科学教室)

永井 竜児(熊本大学医学部生化学教室)

山本 博, 山本 靖彦(金沢大学医学部生化学教室)

藤井 紀子, 高田 巧, 森 雄平(京都大学原子炉実験所)

Anthony P. Adamis(Jerini Ophthalmic Inc.)

Jonathan Moore, Tara Moore(Department of Immunology and Ophthalmology, University of Ulster, UK)

要 約

糖尿病などの生活習慣病が長期間持続すると、網膜症や白内障などの眼疾患が引き起こされることが知られている。そのため、これらの眼合併症は長い時間の蓄積、すなわち加齢性変化と深く関連しているということが出来る。本研究は、生活習慣病に伴う眼疾患および眼の加齢性変化の発症メカニズムを分子レベルで解明することを目的とした。その結果、糖尿病眼合併症としての網膜症や角膜症、眼の加齢性変化としての白内障、瞼裂斑、spheroid degeneration、ドルーゼンにおいて、蛋白質糖化最終産物(AGE)およびD型アミノ酸を豊富に含んだ蛋白質が凝集していることを見出した。さらに、AGEやD型アミノ酸を豊富に含んだ蛋白質は、立体構造が変化することによって、蛋白質本来の機能を果たすこと

ができなくなっていることを明らかにすることができた。以上のように、糖尿病などの生活習慣病に伴う眼合併症と眼の加齢性変化の原因は、眼を構成するアミノ酸や原子レベルでの変化にまで及んでいることが明らかになった。その結果、生活習慣病に伴う眼合併症や眼の加齢性変化は、AGEあるいはD型アミノ酸生成といった翻訳後修飾を受けた蛋白質の沈着病として捉えることが可能となった。(日眼会誌 113: 424—443, 2009)

キーワード：蛋白質の翻訳後修飾，蛋白質糖化最終産物，D型アミノ酸，糖尿病眼合併症，眼の加齢性変化

別刷請求先：305-8575 つくば市天王台1-1-1 筑波大学大学院人間総合科学研究科疾患制御医学専攻眼科学分野

加治 優一 E-mail: kajiyuichi@hotmail.com

(平成20年10月17日受付, 平成20年11月20日改訂受理)

Reprint requests to: Yuichi Kaji, M. D., Ph. D. Department of Pathophysiology and Vision and Ophthalmology Tsukuba University Graduate School of Comprehensive Human Sciences, 1-1-1 Tennoudai Tsukuba-shi, Ibaraki-ken 305-8575, Japan

(Received October 17, 2008 and accepted in revised form November 20, 2008)

A Review

Ocular Diseases Caused by Accumulation of Proteins with Post-translational Modifications

Yuichi Kaji

*Department of Pathophysiology and Vision and Ophthalmology Tsukuba University Graduate School
of Comprehensive Human Sciences*

Abstract

Long-term duration of lifestyle-related diseases including diabetes induces various ocular diseases. For this reason, the development of lifestyle-related ocular diseases is closely related to the aging process. In the present study, we tried to reveal the molecular mechanism of lifestyle-related ocular diseases, especially diabetic complications of the eyes, in relation to aging. To unify the molecular mechanisms of diabetic complications and aging changes of the eyes, we focused on two kinds of nonenzymatic post-translational modification products: advanced glycation end products (AGEs) and D-amino acids. We found that the accumulation of proteins rich in AGEs and D-amino acids plays a central role in the development of both diabetic complications and such changes of the eyes as diabetic retinopathy, diabetic keratopathy, pinguecula, spheroidal degeneration of the cornea, and drusen. In addition, decreased function

in AGE-modified and D-amino acid-containing proteins is a factor in the development of diabetic complications and aging changes in eyes. In this way, post-translational changes in molecules and amino acids are important contributing factors in the development of diabetic complications and aging changes in eyes. In conclusion, accumulation of AGE-modified and D-amino acid-containing proteins is the molecular mechanism of both diabetic complications and the aging changes in eyes.

Nippon Ganka Gakkai Zasshi (J Jpn Ophthalmol Soc 113 : 424—443, 2009)

Key words : Post-translational modifications, Advanced glycation end products, D-amino acids, Diabetic complications, Aging changes of eyes

I はじめに

糖尿病, 高血圧, 高脂血症などの生活習慣病は, 眼をはじめとするさまざまな臓器に合併症を引き起こす. それらの合併症に共通する特徴として, 糖尿病などの生活習慣病が長期間にわたって持続した際に生じてくるという点が挙げられる. すなわち, 生活習慣病に伴う合併症の発症には, 長い時間の経過が必要という点で, 加齢性変化と密接に関連する. 事実, 糖尿病網膜症, 糖尿病腎症, 動脈硬化に基づく冠動脈狭窄をはじめとする生活習慣病に伴う合併症の罹患率は加齢とともに増大することが知られている¹⁾²⁾. このように, 生活習慣病に伴う合併症と加齢性変化は密接に関連を有している.

生活習慣病が長期間持続することにより合併症が生じてくるという事実は, 生活習慣病の影響が, 合併症の標的となる臓器に何らかの形で蓄積していくことを意味している. 例えば網膜症を発症していなくても, 高血糖になって1日目の網膜よりも1か月目や1年目の網膜には, 高血糖の影響が蓄積していると考えられる. では, 生活習慣病の標的臓器には, どのような形でその影響が蓄積しているのだろうか. 我々は, 生活習慣

病の影響は, 標的臓器を構成する蛋白質の翻訳後修飾という形で蓄積するという考え^{1)~3)}のもとに生活習慣病に伴う眼疾患の分子メカニズムの解明を試みた.

同様に, 加齢に伴う眼の変化についても, 長年にわたって標的臓器に何らかの形で加齢の影響が蓄積しているはずである. 我々は加齢に伴う眼の変化についても, 加齢に伴う影響は蛋白質の翻訳後修飾という形で標的臓器に蓄積していくと考えた.

我々は数多くの蛋白質の翻訳後修飾の中で, 蛋白質糖化最終産物 (advanced glycation end product, 以下 AGE) および D 型アミノ酸生成に着目した. 生活習慣病や加齢に伴い, 眼球のどの部位にこれらの翻訳後修飾を受けた蛋白質が蓄積し, 病態とどのように関与するかを紹介する (図 1).

II 加齢や生活習慣病に伴う原子レベルでの変化が疾患を誘発する

我々の体は, 加齢や生活習慣病に伴い大きく変化することを痛感する. では, 加齢や生活習慣病の変化をミクロのレベルまで突き詰めると, どこに行き着くだろうか. 例えば, 水晶体は細胞および細胞外マトリックス→

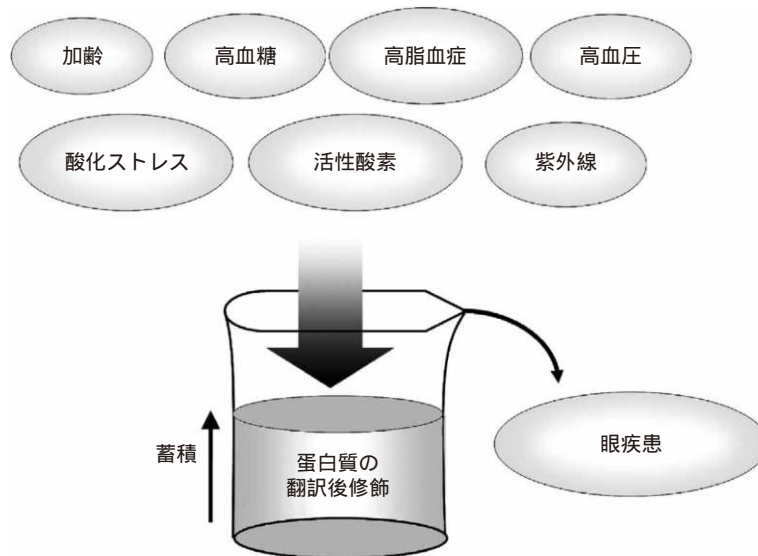


図 1 加齢変化と生活習慣病をつなげる蛋白質の翻訳後修飾。

眼の加齢性変化や、生活習慣病に伴う眼合併症は、酸化ストレス、活性酸素、紫外線などの影響と相まって、体内で蛋白質の翻訳後修飾の形で蓄積される。その蓄積があるレベルを超えると眼疾患が引き起こされると考えることができる。

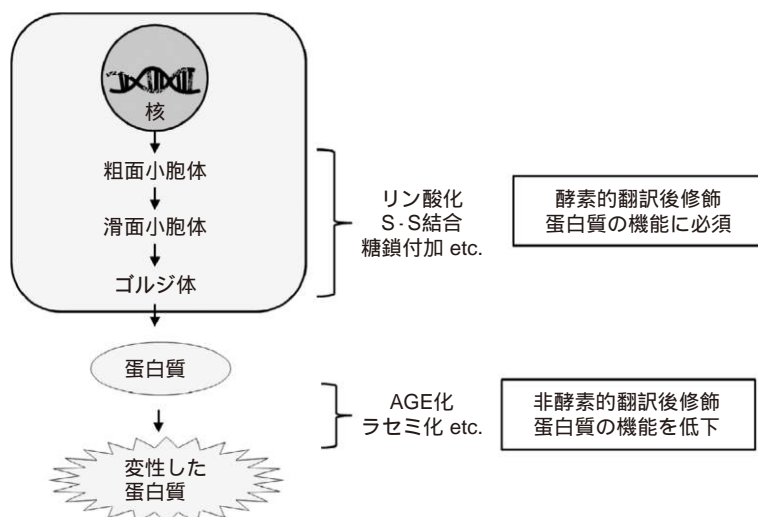


図 2 2通りの蛋白質の翻訳後修飾。

蛋白質は、その機能に必須な酵素的翻訳後修飾と、その機能を低下させる非酵素的翻訳後修飾を受ける。後者に含まれる蛋白糖化最終産物(AGE)化やラセミ化は、加齢や糖尿病に伴う合併症の発症に関与することが知られている。

蛋白質→アミノ酸→原子レベルまで分解できる。逆に、原子やアミノ酸が加齢に伴い変化するならば、それらが構成する蛋白質の構造に大きな変化が生じるといえる。我々の体を構成する蛋白質は、翻訳された後に2通りの翻訳後修飾を受ける(図2)。一つはリン酸化、S-S結合や糖鎖付加のように、その反応に酵素がかかわり、蛋白質の機能に必須な翻訳後修飾がある。もう一つは、AGEやラセミ化をはじめとする、反応に酵素がかかわらない翻訳後修飾がある。非酵素的な翻訳後修飾を受けた蛋白質は、修飾を受けるたびに蛋白質の立体構造がゆがめられるために蛋白質の機能が低下する。さらに、非

酵素的翻訳後修飾を受けた蛋白質は加齢や糖尿病によって体内に蓄積していくことが明らかになり、加齢や糖尿病合併症の原因物質ではないかと考えられるようになった。以下に、AGEやラセミ化によって生じたD型アミノ酸が加齢に伴う眼の変化や糖尿病眼合併症にどのようにかかわるかを示す。

III AGEの沈着病としての加齢性変化

蛋白質と糖が混在すると、非特異的に反応してアマドリ化合物などの中間体をつくった後に、酸化・脱水・縮合・架橋などの複雑な反応を経た結果、AGEが生成さ

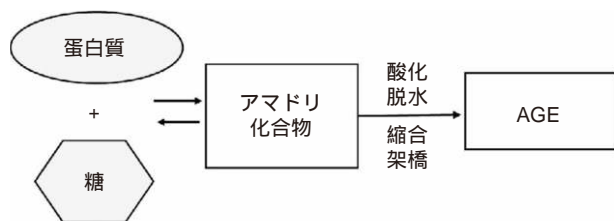


図 3 AGE 化のメカニズム。

蛋白質と糖が混在すると、アマドリ化合物などの中間体を経て複雑な反応を経て AGE が産生される。

れる(図 3)。人体は蛋白質と糖の長期培養装置と例えることができ、体内では常に AGE が生成され続けている。AGE の生成反応は、材料となる糖が多いほど促進される。また、AGE の生成反応はゆっくりとした反応で、かつ非可逆的であるために、長い時間とともに AGE は増大していく。以上の点から分かるとおり、AGE は加齢や糖尿病に伴って体内のさまざまな部位に沈着していく。さらに、蛋白質が AGE 化されると、蛋白質の立体構造が変化することにより、蛋白質の機能が低下したり、蛋白質が凝集物を生成したりするようになる。このようにして体内に沈着した AGE 化蛋白質はさまざまな臓器の合併症を引き起こすと考えられている^{1)4)~6)}。

生体内で最初に AGE が見出された組織は水晶体であった⁴⁾⁷⁾。加齢に伴い水晶体を構成するクリスタリン分子が AGE 化され、立体構造が変化することが、加齢に伴い水晶体が混濁していく一因となると考えられている⁴⁾⁷⁾。その後、脳の硬膜、骨、歯など蛋白質の入れ替わりの少ない臓器において加齢とともに AGE が増大することが明らかになった⁵⁾⁸⁾。さらに、Alzheimer 病⁹⁾¹⁰⁾や加齢黄斑変性¹¹⁾¹²⁾のような病的な加齢性変化においても、病巣に AGE が沈着していることが明らかになってきた。よって、AGE は正常の加齢性変化だけではなく、病的な加齢性変化の原因と考えられるようになった。

我々は、眼の加齢性変化には AGE 化された蛋白質の沈着が関与しているのではないかと考えた。まず、加齢に伴い Descemet 膜や視神経乳頭篩板(図 4)において AGE が沈着していることを免疫組織化学的に証明した¹³⁾。ただし、視神経乳頭篩板や Descemet 膜に AGE が沈着したとしても、それが直接的に疾患につながっているとはいえない。よって、AGE が視神経乳頭篩板や Descemet 膜¹⁴⁾¹⁵⁾に沈着することは、正常な加齢の過程で生じる変化と考えることもできる。

次に我々は、加齢に伴い最も目立つ眼表面の変化である瞼裂斑に着目した。瞼裂斑は 40 歳以上の成人の多くに観察される、加齢性変化の代表である。これほど目立つ病変でありながら、その沈着物の性状は謎であった。組織学的に瞼裂斑の沈着物は、コラーゲンやエラスチンが変性した物質であるといわれているが、変性が何を意

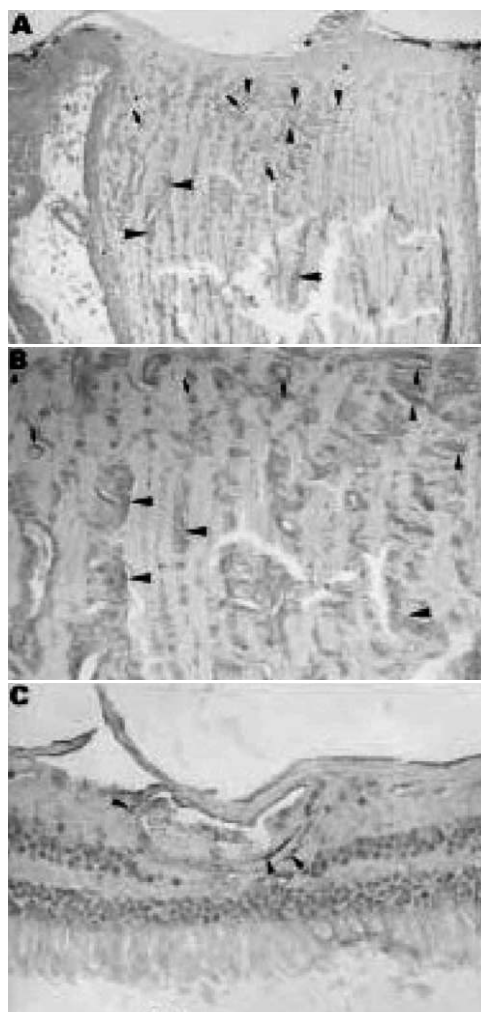


図 4 高齢者の視神経乳頭における AGE の沈着。

AGE は視神経乳頭篩板(矢頭)、視神経内の血管壁(矢印)、および網膜血管壁に沈着を認める。

(文献 13 より許可を得て転載)

味しているか分からなかったのである。我々は、さまざまな AGE 構造に対する抗体を用いて瞼裂斑の切除検体を検討した結果、瞼裂斑は AGE 化された蛋白質の凝集物であることが明らかにした¹⁶⁾(図 5)。

最後に我々は、眼に関する加齢関連疾患の代表として spheroid degeneration に着目した。spheroid degeneration は日本では患者が少ないが、赤道部付近や極地方など紫外線の曝露が多い地方においては、40 歳以上の成人における罹患率が 40% を超え、地域によっては失明の最大の原因となるほど重要な疾患である¹⁷⁾。瞼裂斑と同様に spheroid degeneration の沈着物の正体は不明で、アミロイド、コロイド、赤血球、脂質などさまざまな説が提唱された¹⁷⁾。我々は spheroid degeneration の沈着物の正体は AGE 化された蛋白質の凝集物であるという仮説を立て、角膜における AGE の局在を検討した。その結果、spheroid degeneration は CML [N^ε-(carboxymethyl) lysine]、ピラリン、ペントシジン、イミダゾロンなどさまざまな AGE 構造を含んだ蛋白質の凝集物で

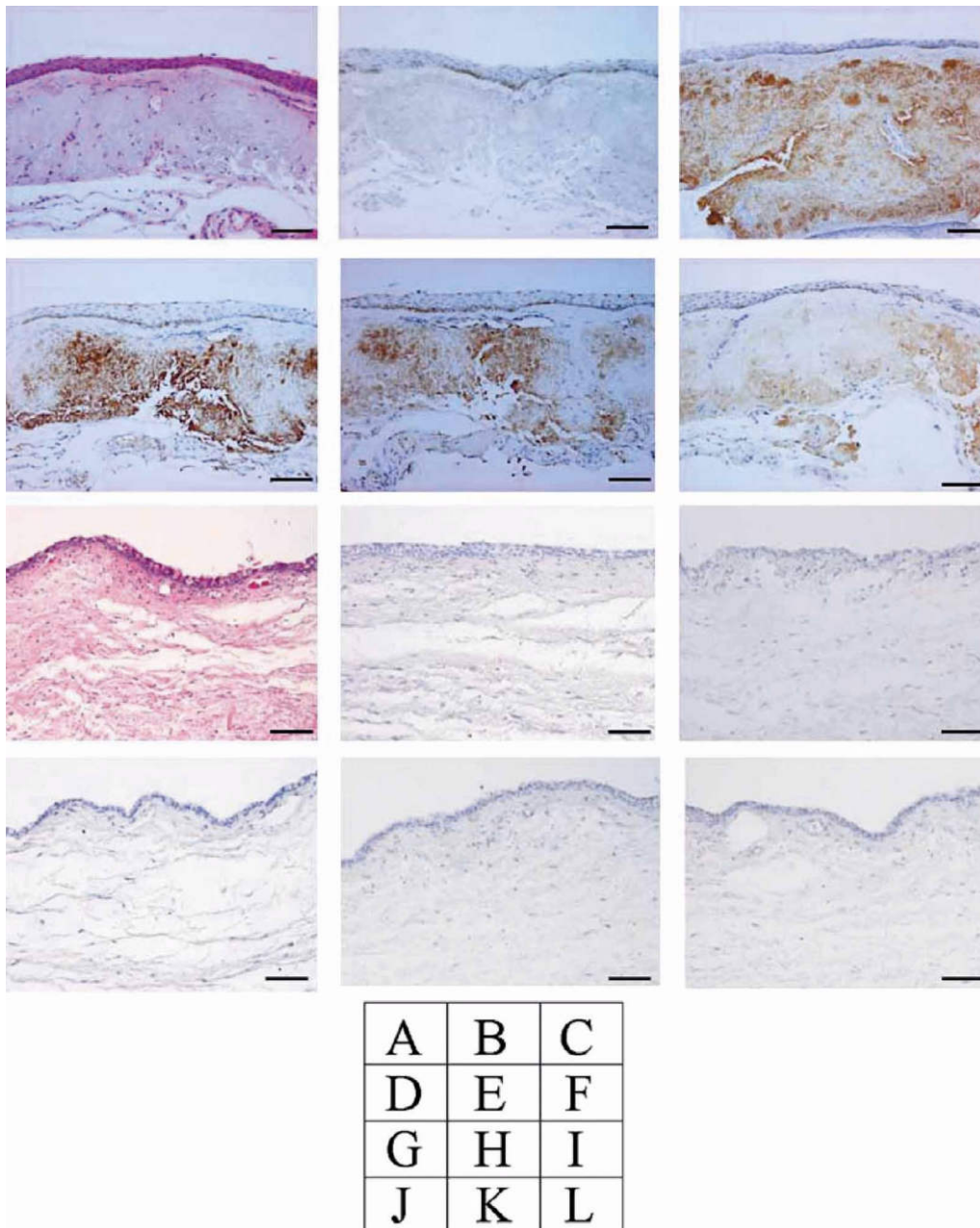


図 5 瞼裂斑における AGE の局在.

瞼裂斑の切除検体(A~F)と、対照の結膜(G~L). 陰性対照(B, H), CML [N^ε-(carboxymethyl)lysine] (C, I), ペントシジン(D, J), イミダゾロン(E, K), ピラリン(F, L)の免疫染色により、瞼裂斑はさまざまな AGE 構造を豊富に含んだ蛋白質の凝集物であることが分かる. バーは 100 μm に相当する.

(文献 16 より許可を得て転載)

あることを明らかにした¹⁸⁾(図 6).

以上のように、瞼裂斑や spheroid degeneration は「AGE 化された蛋白質の凝集病」という共通の分子メカニズムを有する疾患であることが明らかになった.

IV 角膜内皮細胞における AGE の沈着のメカニズムとその影響

我々は数多くの眼球における AGE の局在を検討するうちに、胎児の角膜内皮細胞には AGE の沈着を認めないのに対して、高齢者の角膜内皮細胞には AGE が大量

に蓄積していることを偶然に見出した¹⁹⁾. そこで我々は、AGE が角膜内皮細胞に蓄積することは、加齢に伴う角膜内皮細胞の減少と関連するとの仮説を立てた. ある細胞内に AGE が蓄積する場合、AGE の由来は細胞内の蛋白質が AGE 化されたもののもあれば、細胞外の AGE が受容体を介して細胞内に取り込まれたものことがある. すなわち、角膜内皮細胞に認められる AGE は、前房水中の AGE が受容体を介して取り込まれた可能性がある. 事実、前房内には AGE が存在することが知られている²⁰⁾²¹⁾. まず我々は、角膜内皮細胞に

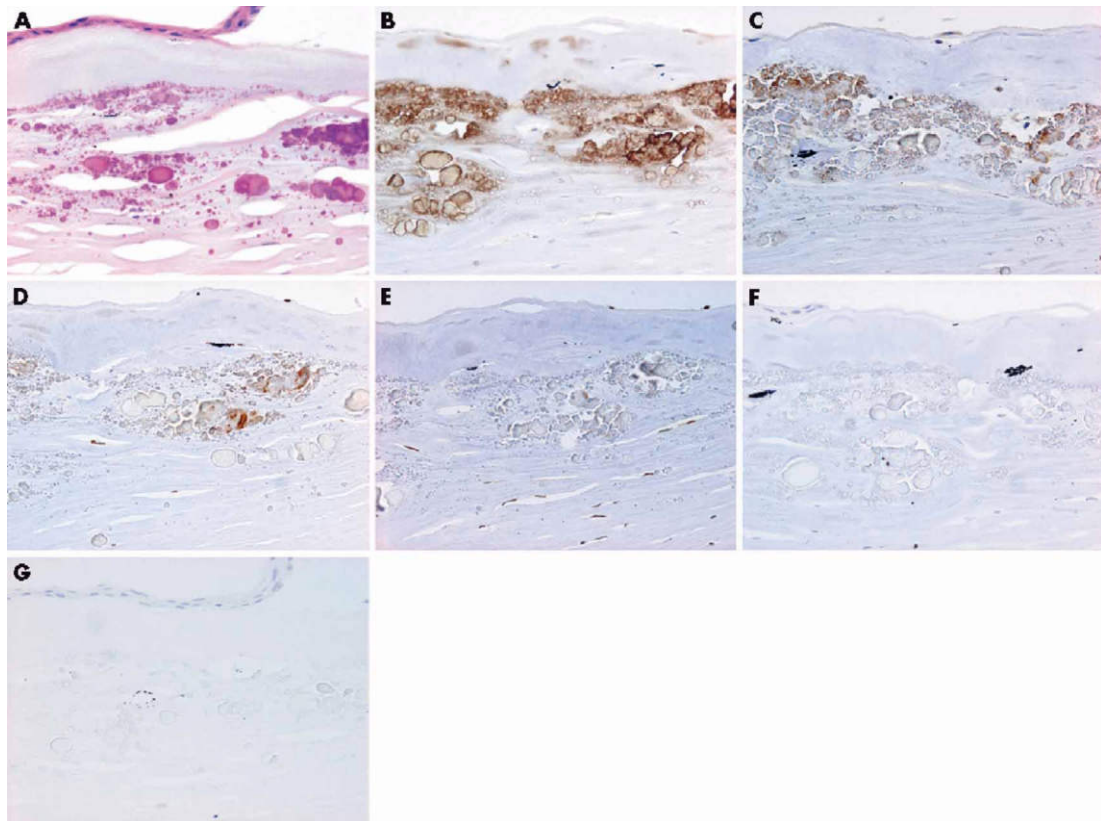


図 6 Spheroid degeneration における AGE の局在.

ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色(A), CML(B), ピラリン(C), ペントシジン(D), イミダゾロン(E)の免疫染色および陰性対照(G). Spheroid degeneration は CML, ピラリン, ペントシジン, イミダゾロンを含んだ蛋白質の凝集物であることが分かる.

(文献 18 より許可を得て転載)

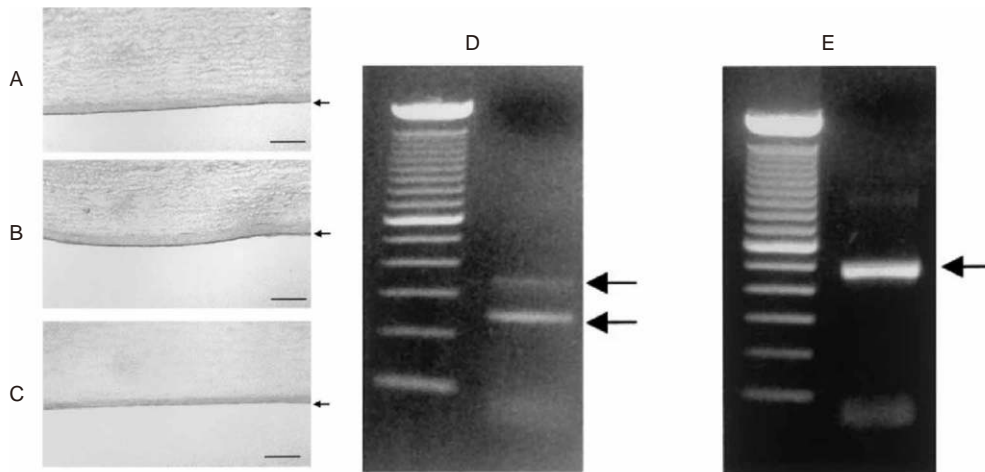


図 7 角膜内皮細胞における AGE 受容体の発現.

ウシの角膜内皮細胞において, galectin-3(A)および RAGE(B)が蛋白質レベルで発現されていた. 陰性対照(C). ウシの角膜内皮細胞において, galectin-3(D)および RAGE(E)が mRNA レベルで発現されていることも分かる.

(文献 22 より許可を得て転載)

において AGE を認識する受容体が発現されているかどうかを検討した. その結果, 角膜内皮細胞には AGE を認識する受容体である RAGE や galectin-3 が発現していた²²⁾(図 7).

さらに, 培養角膜内皮細胞の培養液中に AGE 化あるいは CML 化されたアルブミンを添加したところ, AGE 化アルブミンは培養角膜内皮細胞中に容易に取り込まれるものの, CML 化アルブミンの細胞内への取り込みは

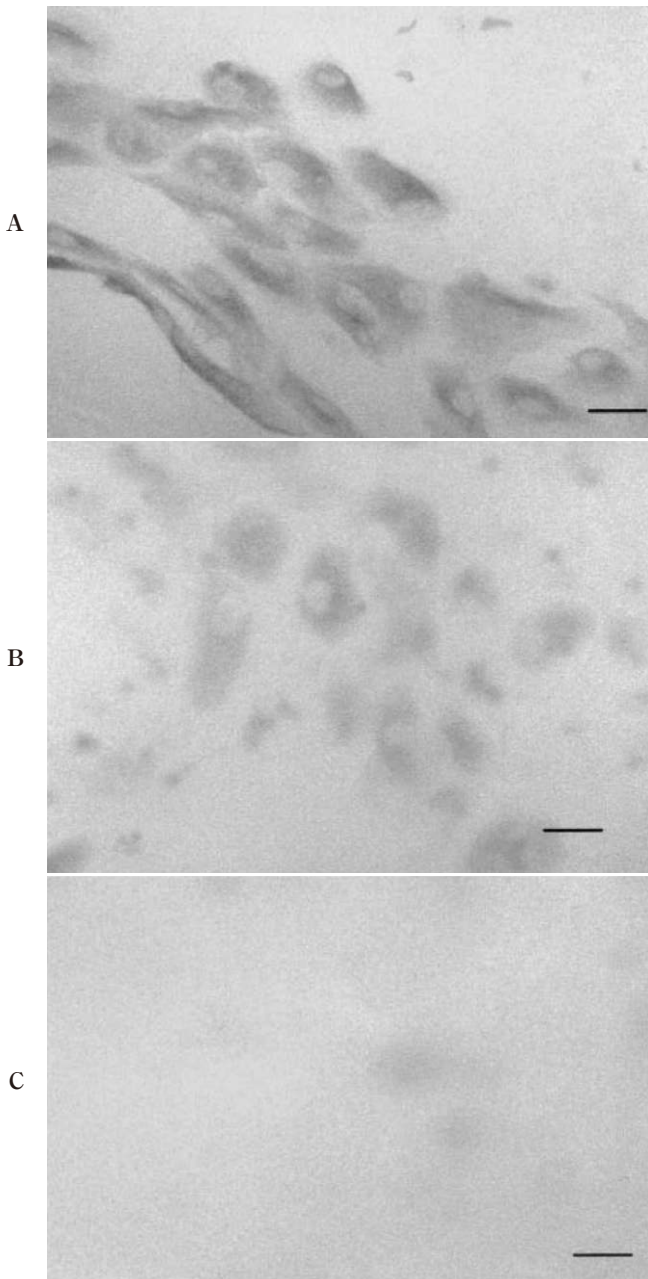


図 8 培養角膜内皮細胞の AGE 取り込み。

培養角膜内皮細胞の培養上清中に AGE 化ウシアルブミンおよび CML 化ウシアルブミンを添加した。AGE 化アルブミンは角膜内皮細胞の細胞質内に取り込まれたが (A), CML 化アルブミンの細胞内への取り込みはわずかであった (B)。陰性対照 (C)。バー：20 μm

(文献 22 より許可を得て転載)

少ないことが明らかになった (図 8)。このように、AGE 化の種類によって、細胞内への取り込みは大きく影響を受けることが明らかになった²²⁾。

引き続き、AGE 化あるいは CML 化アルブミンを培養角膜内皮細胞の培養上清中に添加したところ、両者ともに濃度依存性に細胞内における活性酸素の量が増大し (図 9)、アポトーシスが誘導されることが明らかになった (図 10)。すなわち、AGE 化アルブミンと CML 化ア

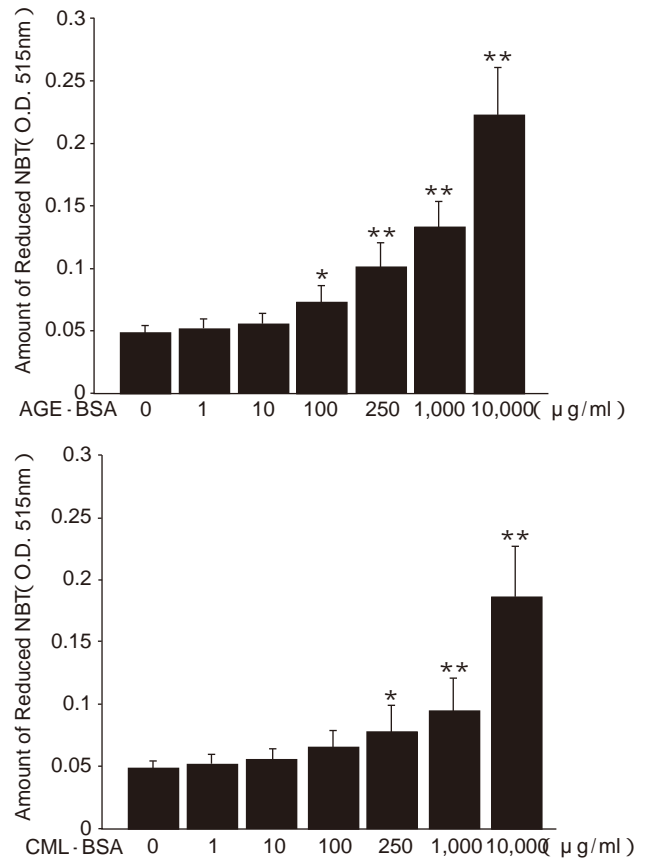


図 9 AGE 化および CML 化アルブミンによる培養角膜内皮細胞における活性酸素の産生誘導。

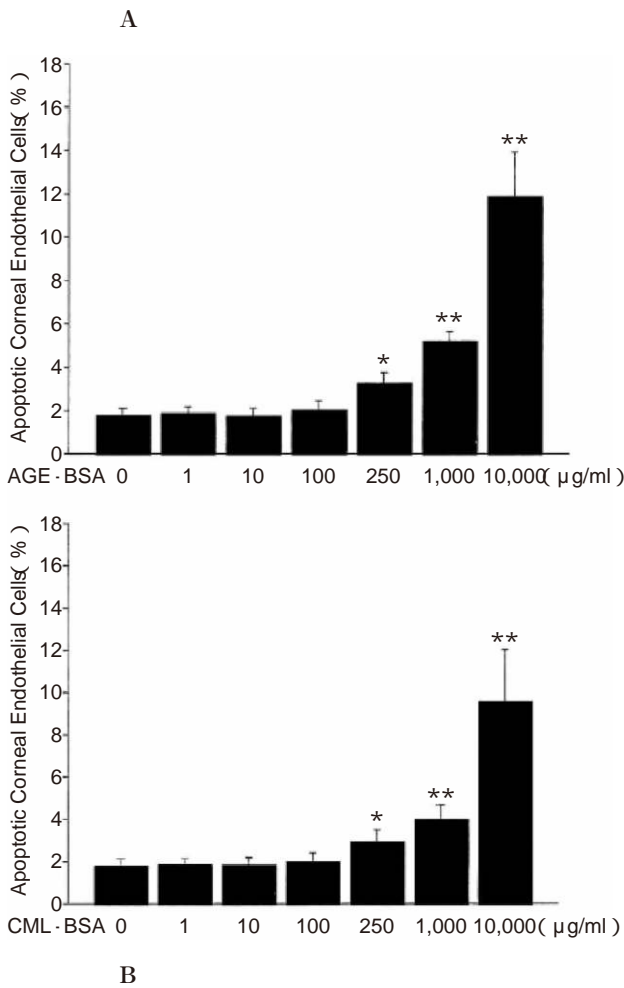
培養角膜内皮細胞の培養上清中に AGE 化アルブミン (AGE-BSA：上) および CML 化アルブミン (CML-BSA：下) を添加すると、ともに細胞内における活性酸素の産生を促進させた。

* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$. いずれも $n = 16$.

(文献 23 より許可を得て転載)

ルブミンは細胞内への取り込みに関しては大きな差があるものの、活性酸素の産生亢進やアポトーシスの誘導に関してはそれほど大きな差がないことを意味している。ただし、AGE 化アルブミンは CML 化アルブミンよりも活性酸素産生促進やアポトーシス誘導が高めであることが分かっている。

以上の結果より、高齢者の角膜内皮細胞に AGE が沈着していることは、角膜内皮細胞の加齢に伴う減少に関与している可能性が考えられた。具体的には、角膜内皮細胞は前房水中の AGE 化蛋白質²⁰⁾²¹⁾ を細胞内に取り込む結果、長年の時間の経過とともに細胞内に AGE が沈着してくると考えられる。さらに、前房水中の AGE と角膜内皮細胞に発現されている AGE 受容体の相互作用によるアポトーシス誘導^{22)~24)} や、角膜内皮細胞中に AGE が蓄積される結果、角膜内皮細胞が減少してくると考えられる。以上の結果を図 11 にまとめる。



B

図 10 AGE 化あるいは CML 化アルブミンによる培養角膜内皮細胞のアポトーシス誘導。
 A：培養角膜内皮細胞の培養上清中に AGE 化(AGE-BSA：上)あるいは CML 化アルブミン(CML-BSA：下)を添加すると、濃度依存性にアポトーシスが誘導された。いずれも n=16。B：アポトーシス陽性細胞を示す。*：p<0.05, **：p<0.01。
 (文献 22 より許可を得て転載)

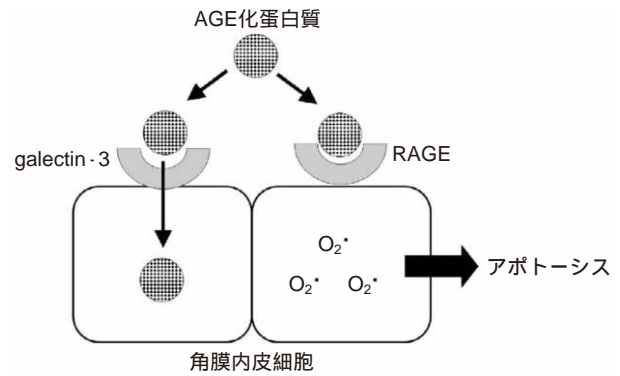


図 11 角膜内皮細胞の加齢に伴う減少における AGE の関与。

AGE 化された蛋白質は galectin-3 に認識され細胞質内に取り込まれる。それに対して RAGE は AGE 化蛋白質の CML の構造を認識して細胞内の活性酸素産生の亢進やアポトーシス誘導に関与すると考えられる。

なる糖が豊富に存在するほど増加する。事実、糖尿病患者においては血液中の AGE 濃度が増大することが知られている²⁵⁾。さらに、AGE 化された蛋白質は立体構造が変化して機能が低下するために、糖尿病に伴う合併症の分子基盤となる可能性が示唆されている。例えば、糖尿病腎症、糖尿病に伴う動脈硬化²⁶⁾、糖尿病神経症²⁷⁾などの糖尿病に伴う合併症が引き起こされた臓器において、AGE が沈着していることが知られている。また、糖尿病神経症においては、ミエリンが AGE 化されることが神経伝達速度の減少の原因であるということが示唆されている⁶⁾²⁷⁾²⁸⁾。

糖尿病網膜症の発症に AGE が深く関与すると数多く報告されている^{29)~33)}。例えば糖尿病患者の硝子体中には有意に高濃度の AGE が存在し、血管内皮増殖因子(vascular endothelial growth factor：VEGF)などのサイトカインの発現量とも相関することが知られている³⁴⁾³⁵⁾。さらに Hammes ら³⁶⁾は、糖尿病に伴い網膜において AGE 特異的な蛍光が増大していると報告し、治療薬の効果の視標として用いた。しかし、網膜において蛍光を発する物質は AGE に限らないことや³⁷⁾、発生に伴い AGE は正常の網膜にも認められることより³⁸⁾、糖尿病において AGE がどの部位に蓄積しているのかについては議論がある。

我々は、糖尿病合併症の中でも糖尿病角膜症に着目した^{39)~41)}。糖尿病患者においては、点状表層角膜炎を併発する割合が高くなる他、遷延性角膜上皮びらんが生じることが知られている。糖尿病角膜症の分子基盤として、ポリオール代謝の亢進に伴う細胞内のポリオールの蓄積^{42)~44)}、神経栄養因子の減少⁴⁵⁾⁴⁶⁾、基底膜を構成する細胞外マトリックスの変化^{47)~49)}などさまざまな説が提唱されている。過去の文献では、糖尿病が持続することにより、角膜上皮の基底膜に異常を来すことが組織学的

V AGE と糖尿病眼合併症

AGE の生成反応からも分かるとおり、AGE は材料と

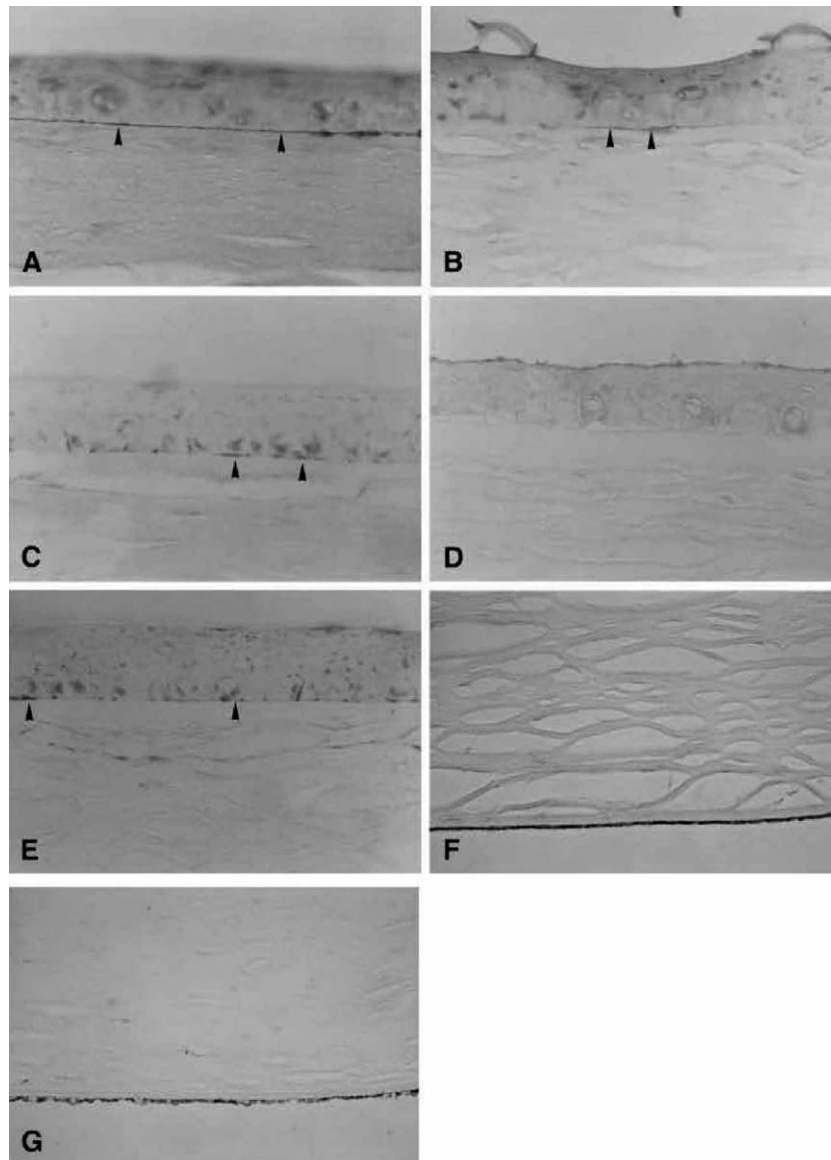


図 12 糖尿病患者の角膜における AGE の沈着.

糖尿病患者(A, B, C, F)および非糖尿病患者(D, E, G)において代表的な AGE 構造である CML の局在を免疫組織化学的に検討した. CML は糖尿病患者の角膜上皮基底膜に観察された(A, B, C: 矢頭)が, 非糖尿病患者では高齢者の 1 例(E: 矢頭)を除いて認められなかった(D). ただし, 角膜内皮細胞には糖尿病の有無を問わずに CML が沈着していた(F, G).

(文献 19 より許可を得て転載)

および化学的に証明されている^{47)~49)}. しかしながら, 角膜上皮の基底膜にどのような変化が生じ, その結果, なぜ角膜上皮と基底膜の接着が障害されるかについては明らかではなかった. そこで我々は, 角膜上皮の基底膜が AGE 化を生じることによって糖尿病角膜症が発症するとの仮説を立てた.

糖尿病患者および非糖尿病患者の角膜検体を検討した結果, 糖尿病歴の長い高齢の患者の角膜上皮基底膜に AGE が蓄積していることを見出した¹⁹⁾(図 12).

次にラミニンや IV 型コラーゲンなどの基底膜の構成成分にグルコース 6 リン酸を加えて AGE 化させることで, 人工的に糖尿病患者の角膜上皮の基底膜を作製し

た. この人工的な基底膜の上にヒト培養角膜上皮細胞をまいたところ, ラミニンが AGE 化された場合に角膜上皮細胞との接着能が有意に低下することが明らかになった¹⁹⁾(図 13). すなわち, 糖尿病患者では, 角膜上皮の基底膜が AGE 化された結果, 基底膜本来の働きである細胞接着能が低下してしまうことによって, 遷延性角膜上皮びらんが生じるものと考えられた.

VI AGE およびその受容体との相互作用がもたらす糖尿病網膜症

糖尿病患者, ことに糖尿病腎症を発症した患者においては, 血液中の AGE 濃度が上昇することが知られてい

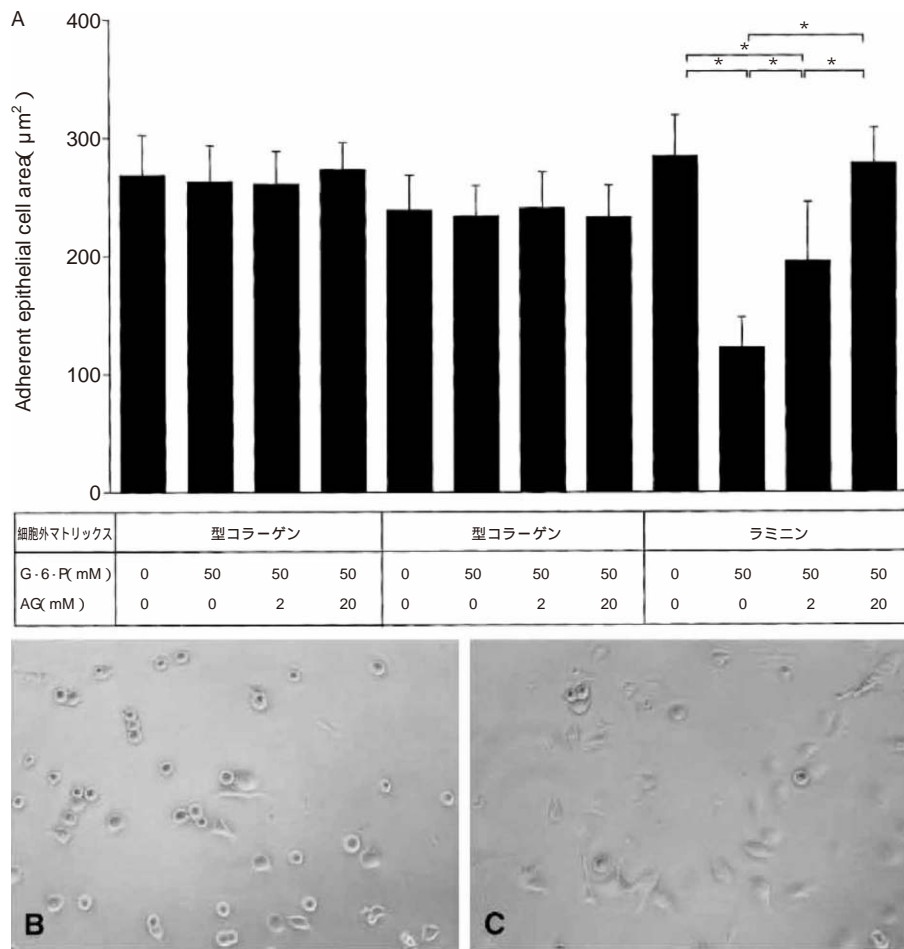


図 13 細胞外マトリックスの AGE 化の角膜上皮接着への影響。

- A : I 型・IV 型コラーゲンおよびラミニンにグルコース 6 リン酸 (G-6-P) を加え AGE 化させた後に、培養角膜上皮細胞との接着能を検討した。その結果、ラミニンを AGE 化させた場合に細胞接着能が低下していた。グルコース 6 リン酸の溶液中にアミノグアニジン (AG) を加えると AGE 化が抑制され、細胞接着能が回復する。* : $p < 0.05$ 。
- B : AGE 化されたラミニン上の培養角膜上皮細胞は接着することができず球形である。
- C : AGE 化されないラミニン上の培養角膜上皮細胞は、培養皿に接着することができるために扁平化している。(文献 19 より許可を得て転載)

る²⁵⁾。さらに、網膜を含めた血管内皮や周細胞には AGE を認識する受容体が発現されており、糖尿病患者では AGE と AGE 受容体の相互作用が亢進していることが明らかになっている³³⁾⁵⁰⁾⁵¹⁾。AGE と AGE 受容体の相互作用は、nuclear factor- κ B (NF- κ B) の活性化²³⁾²⁴⁾²⁸⁾、VEGF や interleukin (IL)-6 などさまざまなサイトカイン発現誘導²⁴⁾²⁹⁾、および酸化ストレスの亢進を含めた多様な変化を引き起こす誘因となる²²⁾²⁸⁾⁵⁰⁾。そのため、糖尿病合併症の発症には AGE と AGE 受容体の相互作用が重要であると考えられている³³⁾⁵⁰⁾⁵¹⁾。

例えば、AGE 化された蛋白質を全身投与すると、血糖値が正常であるにもかかわらず糖尿病網膜症と類似した眼合併症が生じることが証明されている³⁰⁾⁵²⁾。さらに、血糖値や血中 AGE 濃度は正常であるにもかかわらず、AGE 受容体の発現を増加させた遺伝子改変マウスにおいては糖尿病腎症と類似した組織所見が得られるこ

とが証明されている⁵³⁾⁵⁴⁾。このように、血糖値が正常であったとしても、AGE を増加させる、あるいは AGE 受容体の発現量を増加させることによって糖尿病合併症が誘導されると考えられる⁵³⁾⁵⁴⁾。しかし、AGE と AGE 受容体の相互作用が糖尿病網膜症の発症にどのように関与するかで証明した論文は皆無である。その理由として、AGE 産生や AGE と AGE 受容体の相互作用を特異的に阻害する薬剤が存在しないことが挙げられる。我々は、AGE と AGE 受容体の相互作用を促進するために、AGE 化蛋白質の全身投与あるいは AGE 受容体の発現を増加させた遺伝子改変マウスを用いた²⁹⁾⁵³⁾⁵⁴⁾。さらに AGE と AGE 受容体の相互作用を特異的に阻害するために、可溶化した AGE 受容体を全身投与した。

AGE 化されたアルブミンを全身投与した結果、NF- κ B の活性化とともに網膜血管への白血球粘着 (図 14) や

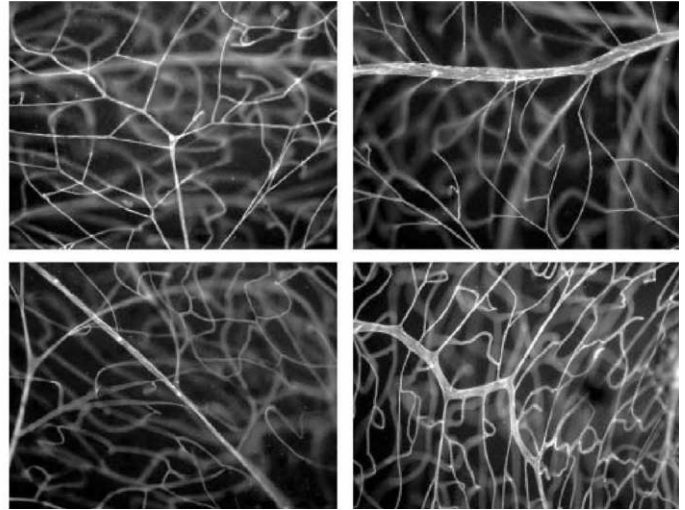
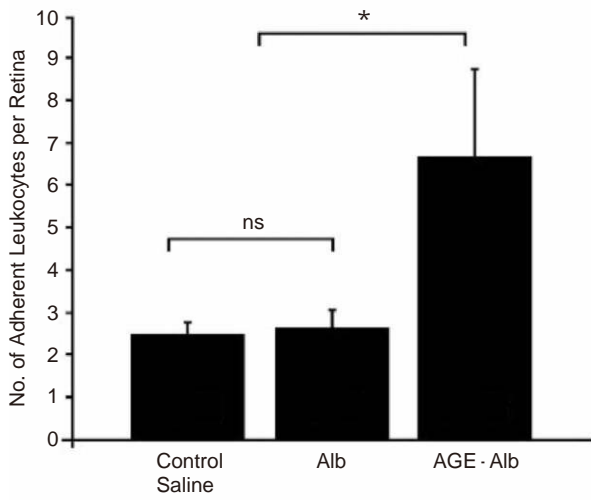


図 14 AGE 化アルブミンの全身投与後における網膜血管への白血球粘着.

アルブミン (Alb) を全身投与しても網膜血管への白血球粘着は影響を受けないが, AGE 化されたアルブミン (AGE-Alb) を全身投与すると網膜血管へ粘着した白血球数が有意に増加する. 右図は網膜血管に粘着した白血球の例を示す. *: $p < 0.05$, ns: 有意差なし, $n = 16$.

(文献 30 より許可を得て転載)

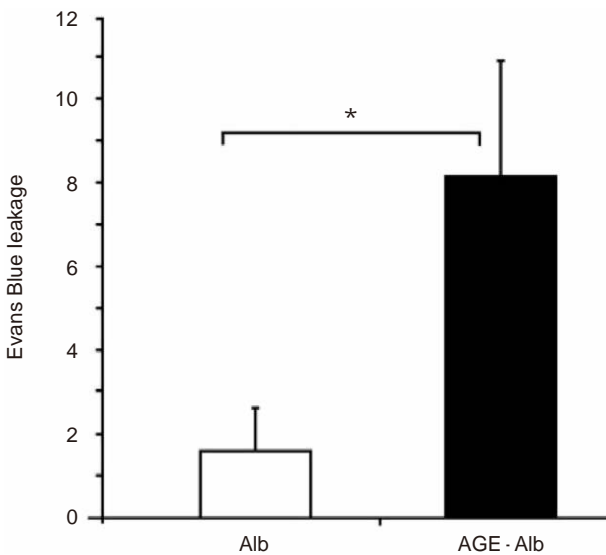


図 15 AGE 化アルブミンの全身投与後における網膜血管透過性.

AGE 化アルブミン (AGE-Alb) を全身投与すると, 網膜血管の透過性が亢進し, 血液中に注入した色素である Evans Blue が網膜内に漏出して来る. *: $p < 0.001$, $n = 10$.

(文献 30 より許可を得て転載)

網膜血管透過性 (図 15) が亢進した³⁰⁾. これらの所見は, 検眼鏡的に糖尿病網膜症が発症する前より見出される所見として知られている. よって, 血液中の AGE 濃度の増加は, 糖尿病網膜症と類似する変化を網膜にもたらすことを確認することができた.

次に, 網膜血管における AGE 受容体の発現を増加させた遺伝子改変マウスにおける糖尿病網膜症の変化を検討した. まず, RAGE トランスジェニックマウスにお

いて, RAGE の発現が増加しているかどうかを免疫組織化学的に観察した. RAGE は網膜において恒常的に発現されているが, 高血糖マウスあるいは RAGE トランスジェニックマウスにおいて網膜血管における RAGE の発現が亢進していること, さらに高血糖を誘導した RAGE トランスジェニックマウスにおいては, さらに多くの RAGE の発現が誘導されていることが明らかになった²⁹⁾ (図 16).

その結果, RAGE 遺伝子発現増強遺伝子改変マウスにおいては血糖値が正常であるにもかかわらず, 網膜血管への白血球粘着 (図 17) や網膜血管透過性の亢進 (図 18) が得られること, さらに RAGE トランスジェニックマウスに高血糖を誘導することによって, さらに網膜血管への白血球粘着や網膜血管透過性が亢進することが明らかになった²⁹⁾.

さらに, AGE と AGE 受容体の相互作用を抑制するために, 可溶化した RAGE を全身投与することによって糖尿病網膜症の所見がどのように変化するかを観察した. すると, RAGE トランスジェニックマウスだけではなく, 高血糖のマウスにおいても可溶化 RAGE は網膜血管への白血球粘着や網膜血管透過性の亢進を軽減させることができた. 以上の結果は, AGE 受容体の作用を阻害することは糖尿病網膜症に対して治療効果を持つことを示している.

現在, AGE および AGE 受容体を標的にした糖尿病合併症の治療法は得られていない. AGE 産生抑制剤は効果が少なく副作用も多い点で開発は停止している. AGE を認識する受容体には, RAGE だけではなく, galectin-3, CD36, マクロファージスカベンジャー受容体など多数のものが報告されており⁵⁵⁾⁵⁶⁾, それぞれの役

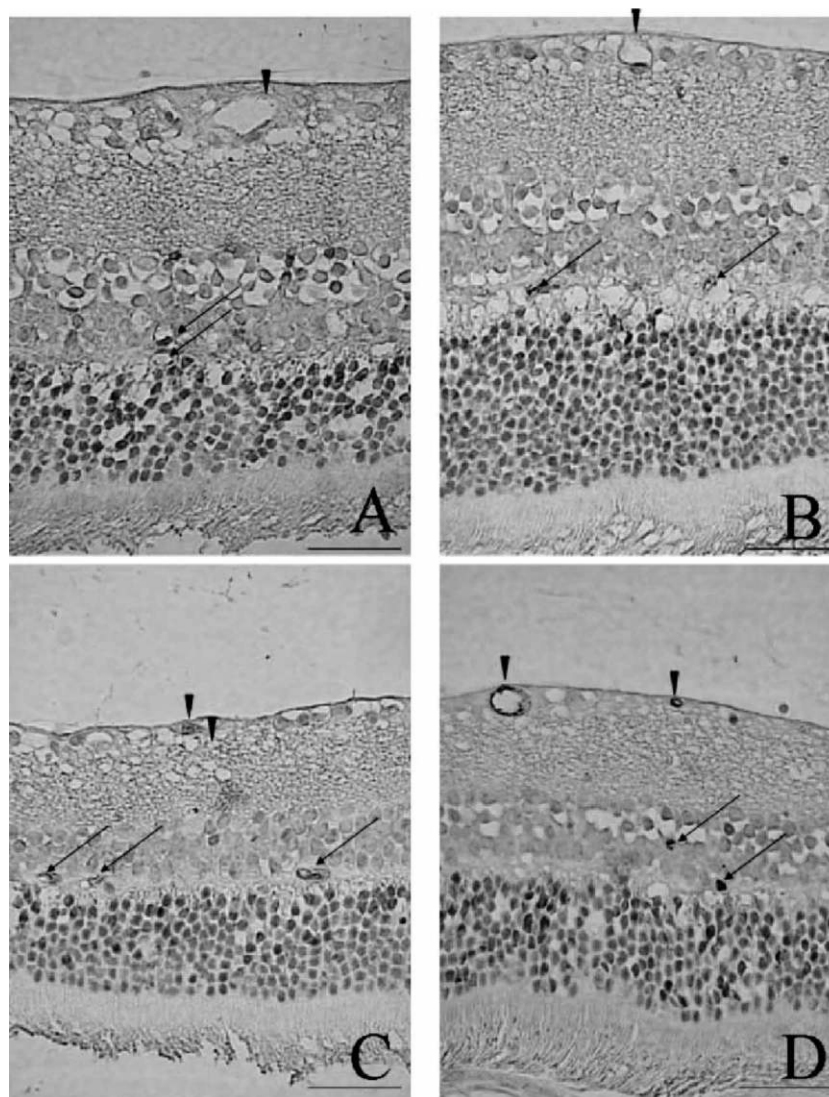


図 16 糖尿病および RAGE トランスジェニックマウスにおける RAGE の局在。

対照マウスでは、網膜血管における RAGE の発現はわずかである (A)。高血糖にして 3 か月後のマウス (B) においては、網膜深層の血管 (矢印) において RAGE の発現が亢進している。RAGE トランスジェニックマウス (C) においては、網膜表層の血管 (矢頭) および深層の血管 (矢印) の両血管において RAGE の発現が亢進している。RAGE トランスジェニックマウスを高血糖にして 3 か月後においては (D)、網膜表層の血管 (矢頭) および深層の血管 (矢印) とともに、RAGE の発現がさらに亢進している。

(文献 29 より許可を得て転載)

割には不明な点が多いため、AGE と RAGE の相互作用だけを抑制してもその効果には限界があることが考えられる。さらに、RAGE に対する特異的な阻害薬は存在しない。以上のように数多くの問題は残されているが、糖尿病合併症における AGE および AGE 受容体の相互作用を解明することは、糖尿病に対して残された問題の解決には必須であると考えられる。

VII D 型アミノ酸と加齢に伴う眼の変化

生体を構成する蛋白質には、原子レベルでの老化といえるほどの微細な変化が加齢とともに生じていることが明らかになりつつある。それが D 型アミノ酸である。生体を構成する 20 種類のアミノ酸のうち、グリシンを

除く 19 種類のアミノ酸には不斉炭素原子がある。そのため、不斉炭素原子を中心とする側鎖の付く方向によって、L 型アミノ酸と D 型アミノ酸の 2 つのアミノ酸が存在しうる。化学的に合成すると L 型アミノ酸と D 型アミノ酸は等量生成されるが、進化の過程で D 型アミノ酸は排除され、地球上のすべての生物において、蛋白質の合成に利用されるアミノ酸は L 型アミノ酸に限られる (図 19)。ところが、加齢の標的臓器において蛋白質を構成する L 型アミノ酸が D 型アミノ酸に変換され、加齢性変化の原因となることが明らかになりつつある^{57)~59)}。

生体内で D 型アミノ酸含有蛋白質が初めて見出された組織は水晶体であった⁶⁰⁾。その後、Fujii らの研究に

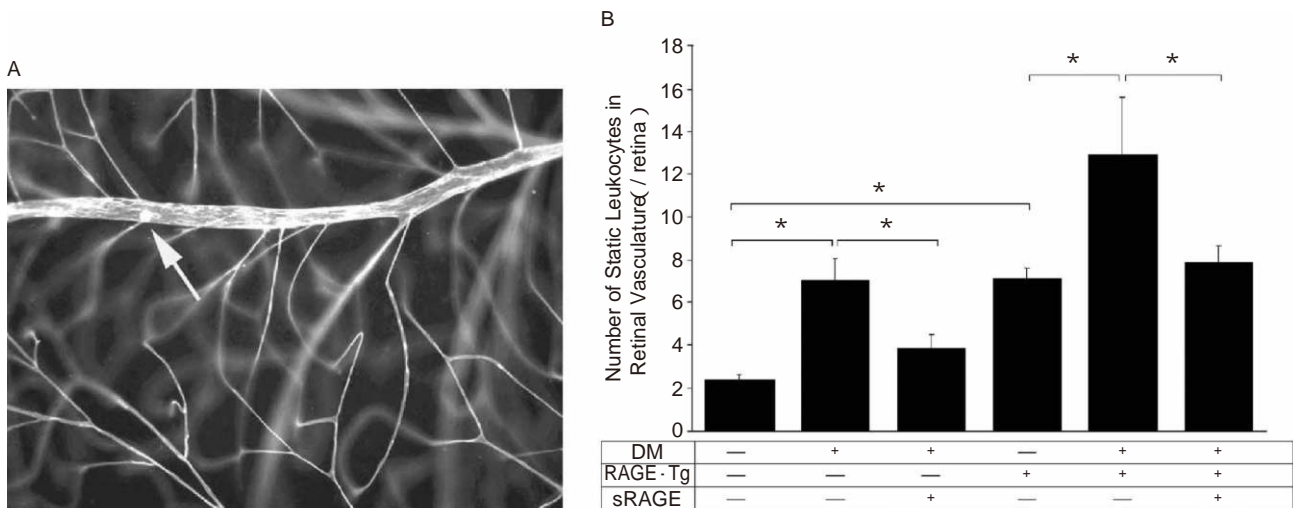


図 17 RAGE トランスジェニックマウスおよび可溶性 RAGE 投与後における網膜血管への白血球粘着。A 図のように、網膜血管に付着した白血球を計測することで、網膜血管への白血球粘着を評価できる。B：対照に比較して、高血糖マウス(DM)あるいは RAGE トランスジェニックマウス(RAGE-Tg)は網膜血管に粘着した白血球数が増加していた。さらに、RAGE トランスジェニックマウスを高血糖にすることにより、網膜血管に粘着した白血球数はさらに増大した。可溶性 RAGE(sRAGE)を全身投与すると、高血糖マウスと RAGE トランスジェニックマウスともに網膜血管に粘着した白血球数を減少させることができた。
* : $p < 0.05$, $n = 12$.

(文献 29 より許可を得て転載)

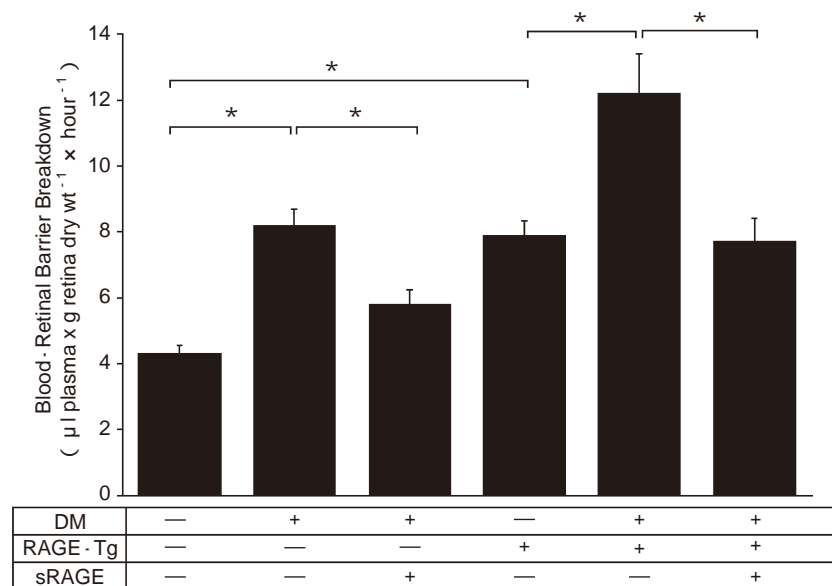


図 18 RAGE トランスジェニックマウスおよび可溶性 RAGE 投与後における網膜血管の透過性。対照に比較して、高血糖マウス(DM)あるいは RAGE トランスジェニックマウス(RAGE-Tg)は網膜血管の透過性が亢進していた。さらに、RAGE トランスジェニックマウスを高血糖にすることにより、網膜血管の透過性はさらに増大した。可溶性 RAGE(sRAGE)を全身投与すると、高血糖マウスと RAGE トランスジェニックマウスともに網膜血管の透過性亢進を抑えることができた。* : $p < 0.05$, $n = 12$.

(文献 29 より許可を得て転載)

より、 αA クリスタリン分子の中で 58 番および 151 番目のアスパラギン酸残基が、 αB クリスタリン分子の中で 36 番および 62 番目のアスパラギン酸残基は、高齢者において高率にラセミ化を受けて D 型アスパラギン酸となっていることが明らかになった^{61)~63)}。さらに、D

型アミノ酸は皮膚の老化や、Alzheimer 病や動脈硬化といった加齢関連疾患の発症に関与することが示唆されている⁵⁹⁾⁶¹⁾⁶²⁾。

我々は、白内障をはじめとする眼の加齢性変化および加齢に深く関連する眼疾患において、蛋白質を構成する

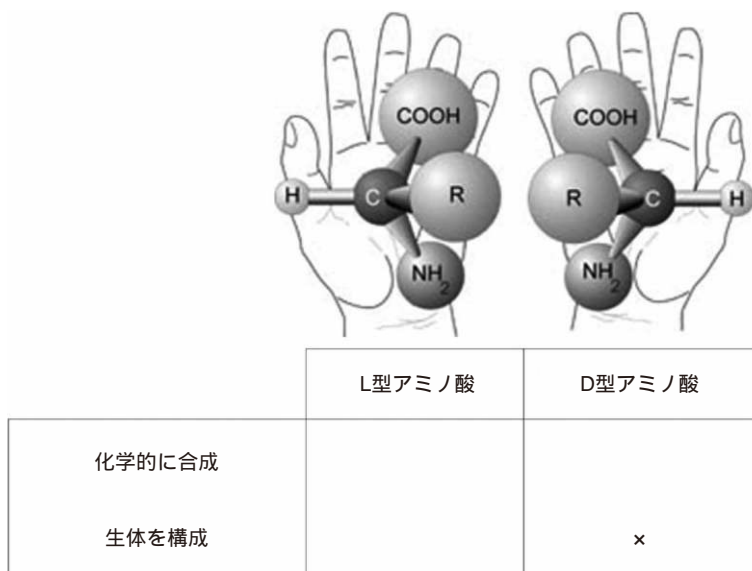


図 19 L型アミノ酸とD型アミノ酸の比較.

L型アミノ酸もD型アミノ酸も化学的に合成すると1:1の割合でつくられる。ところが、地球上の生物において蛋白質を合成するために利用されるアミノ酸はL型アミノ酸に限られる。よって、生体を構成するアミノ酸はすべてL型アミノ酸に限られると考えられていた。

アミノ酸がL型アミノ酸からD型アミノ酸に変換されることが重要な役割を果たすという仮説を立てた。

まず、加齢に伴い眼のどの部位にD型アミノ酸を含んだ蛋白質が沈着するかについて検討した。現在のところ、組織に存在するD型アミノ酸を網羅的に検出する方法はない。そこで、我々はラセミ化によりD型アミノ酸に変換されやすいアスパラギン酸に着目し、D型アスパラギン酸を含有する蛋白質と結合する特異的な抗体を作製し、免疫染色やWestern blottingに用いる方法を開発した⁶⁴⁾⁶⁵⁾。

さまざまな年齢の全眼球検体において、D型アスパラギン酸を含んだ蛋白質と結合する抗体を用いて免疫組織化学的にD型アスパラギン酸含有蛋白質の局在を検討した⁶⁶⁾。その結果、水晶体の核、毛様体無色素上皮の基底膜、Bruch膜、視神経乳頭篩板、網膜血管内皮基底膜、強膜など、多くの領域でD型アスパラギン酸含有蛋白質が加齢とともに沈着することが明らかになった(図20)。これらD型アスパラギン酸含有蛋白質の沈着部位の特徴として、組織学的に加齢とともに肥厚することが挙げられる。このことより、加齢に伴うD型アスパラギン酸含有蛋白質の沈着は、蛋白質の凝集物生成や蛋白質分解酵素への耐性化を誘導することにより、組織における細胞外マトリックスの肥厚の誘因となる可能性がある。さらに、病的な加齢性変化の代表的な変化であるドルーゼンは、D型アスパラギン酸を豊富に含んでいる蛋白質の凝集物であることが明らかになった⁶⁶⁾。

さらに、瞼裂斑およびspheroid degenerationの検体においても同様にD型アスパラギン酸含有蛋白質の局在を検討した。その結果、瞼裂斑やspheroid degenera-

tionは、D型アスパラギン酸含有蛋白質の凝集物であることが明らかになった⁶⁷⁾⁶⁸⁾(図21)。

以上のように、生体には絶対に存在しないといわれていたD型アミノ酸を含んだ蛋白質が、正常な加齢性変化だけではなく、病的な加齢性変化の標的組織において沈着していることが明らかになった^{57)~59)65)~68)}。蛋白質を構成するアミノ酸にD型アミノ酸が含まれるようになると、蛋白質の立体構造が変化し、凝集・沈着傾向を示すようになる。今後D型アミノ酸は、眼にとどまらず全身臓器の加齢性変化の概念を一変させる可能性がある。

VIII D型アミノ酸と糖尿病眼合併症

D型アミノ酸は加齢とともに沈着し、加齢性変化の誘因となることが明らかになりつつあることを前項で述べた。それに対して、D型アミノ酸と糖尿病合併症に関する報告はない。食品分野においては、蛋白質が糖と混在することにより、D型アミノ酸生成が促進されることが報告されている⁶⁹⁾。我々は基底膜の構成成分であるラミニンを、熱変性を引き起こさない50℃で3か月間加温した。すると、加温前のラミニンのアスパラギン酸残基におけるD/L比は0.01であったものの、加温後は0.15に増大していた。さらに、ラミニン溶解液にグルコース6リン酸を250mM添加し、同様に50℃で3か月間加温した。その結果、ラミニン残基のD/L比は0.23に増大していた。以上のように、糖の存在はラセミ化を促進させてD型アミノ酸生成が増大することが明らかになった。すなわち、糖尿病に伴う高血糖においては、組織におけるAGEだけではなくD型アミノ酸も

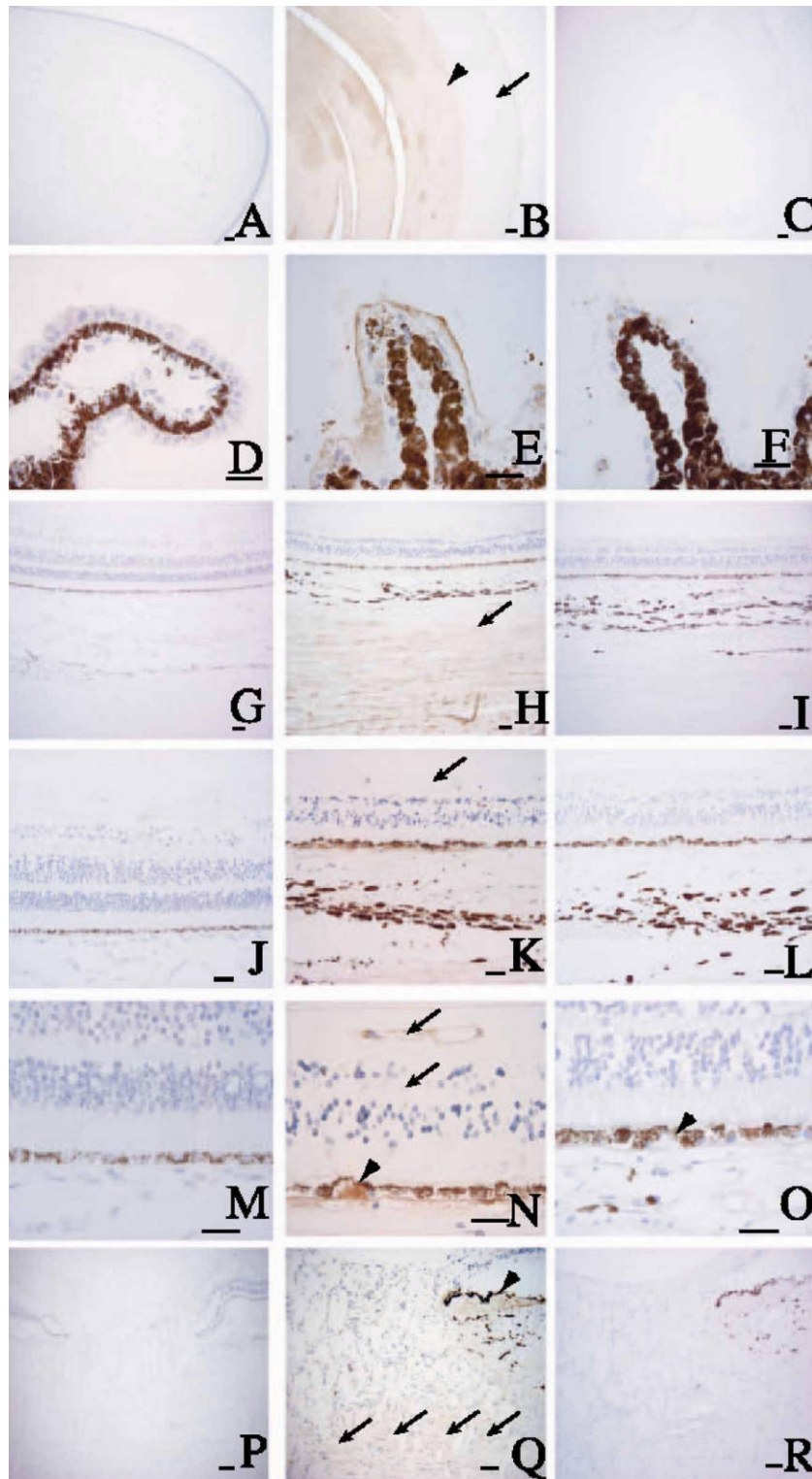


図 20 加齢に伴う D 型アミノ酸含有蛋白質の沈着.

36 週の胎児(A, D, G, J, M, P)および 74 歳の男性(B, E, H, K, N, Q)における D 型アミノ酸含有蛋白質の局在. 胎児の眼球においては D 型アミノ酸含有蛋白質は認められなかった. 74 歳の男性をはじめとする高齢者においては水晶体の核(B: 矢頭), 毛様体無色素上皮の基底膜(E), 強膜(H: 矢印), 内境界膜(K: 矢印), 網膜血管(N: 矢印), ドルーゼン(N: 矢頭), 視神経乳頭篩板(Q: 矢印), 視神経乳頭ドルーゼン(Q: 矢頭)において D 型アミノ酸含有蛋白質の沈着を認めた. 過剰な D 型アミノ酸含有蛋白質を添加することによって得られた陰性対照(C, E, I, L, O, R). バー: 100 μm (A~C, G~L, P~R), 20 μm (D~F, M~O).

(文献 66 より許可を得て転載)

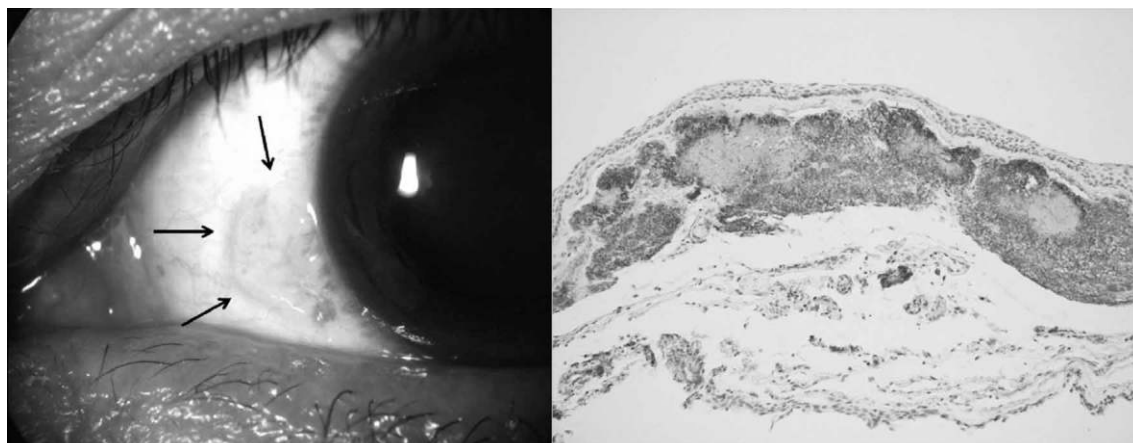


図 21 瞼裂斑における D 型アミノ酸含有蛋白質の局在.

瞼裂斑(矢印)の切除検体において、組織学的に異常な蛋白質の凝集物に一致して D 型アミノ酸含有蛋白質が豊富に認められる。

増大すること、さらに AGE と D 型アミノ酸の存在部位が組織学的に類似することの原因になっている可能性がある。このように、糖尿病に伴い D 型アミノ酸が体内で増大する可能性を明らかにすることができた。今後、D 型アミノ酸は眼の加齢性変化だけではなく、糖尿病に伴う眼合併症のメカニズムに関与していることの証明を行うことが急務となると考える。

IX ま と め

加齢に伴う眼の変化と、糖尿病眼合併症はまったく異なる臨床所見を呈する。しかし、両者の発症には長い時間が必要であるという共通点を有する。加齢および糖尿病に伴い、標的臓器にはどのような形でその影響が蓄積するかについて明らかにすることを目的に研究を行ってきた。その結果、眼を構成する蛋白質に AGE および D 型アミノ酸という形で加齢や糖尿病の影響が蓄積していくことが明らかになった。さらに AGE および D 型アミノ酸を含んだ蛋白質は、本来の蛋白質の形から大きくかけ離れてしまう結果、機能障害や沈着物の形成という形になって現れると考えることができる。AGE 化および D 型アミノ酸生成という蛋白質の翻訳後修飾反応は、さらに多くの加齢性変化や生活習慣病に関連する疾患のメカニズム解明に寄与するはずである。

本研究を発表するにあたり、ご支援を頂戴いたしました東京大学医学部眼科学教室および筑波大学臨床医学系眼科の先生方、さらに数多くの共同研究者の先生方に御礼申し上げます。さらに、著者を宿題報告の演者として選出していただきました日本眼科学会評議員の先生方に御礼申し上げます。さらに第 112 回日本眼科学会総会長の新家 眞教授(東京大学)、座長の労をお取りくださいました石橋達朗教授(九州大学)に心より御礼申し上げます。

本研究は、日本学術振興会科学研究費若手(B)(課題番号

18791259)「増殖性糖尿病網膜症における蛋白糖化最終産物の役割」の支援を受け行われました。

本総説は、第 112 回日本眼科学会総会の宿題報告の内容に基づいて執筆いたしました。しかし、講演内容の一部は現在投稿中のため、内容の一部を割愛させていただきましたこととお詫び申し上げます。

文 献

- 1) **Baynes JW** : From life to death-the struggle between chemistry and biology during aging : the Maillard reaction as an amplifier of genomic damage. *Biogerontology* 1 : 235—246, 2000.
- 2) **Schleicher ED, Wagner E, Nerlich AG** : Increased accumulation of the glycoxidation product N^ε-(carboxymethyl) lysine in human tissues in diabetes and aging. *J Clin Invest* 99 : 457—468, 1997.
- 3) **McLean WG, Pekiner C, Cullum NA, Casson IF** : Posttranslational modifications of nerve cytoskeletal proteins in experimental diabetes. *Mol Neurobiol* 6 : 225—237, 1992.
- 4) **Monnier VM, Cerami A** : Nonenzymatic browning : possible process for aging of long-lived proteins. *Science* 211 : 491—493, 1981.
- 5) **Sensi M, Pricci F, Andreani D, Di Mario U** : Advanced nonenzymatic glycation endproducts (AGE) : their relevance to aging and the pathogenesis of late diabetic complications. *Diabetes Res* 16 : 1—9, 1991.
- 6) **Brownlee M** : Advanced protein glycosylation in diabetes and aging. *Annu Rev Med* 46 : 223—234, 1995.
- 7) **Stevens VJ, Rouzer CA, Monnier VM, Cerami A** : Diabetic cataract formation : potential role of glycosylation of lens crystallins. *Proc Natl Acad Sci USA* 75 : 2918—2922, 1978.
- 8) **Horiuchi S, Araki N** : Advanced glycation end products of the Maillard reaction and their relation

- to aging. *Gerontology* 40 Suppl 2 : 10—15, 1994.
- 9) **Vitek MP, Bhattacharya K, Glendening JM, Stopa E, Vlassara H, Bucala R, et al** : Advanced glycation end products contribute to amyloidosis in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 91 : 4766—4770, 1994.
 - 10) **Yan SD, Chen X, Schmidt AM, Brett J, Godman G, Zou YS, et al** : Glycated tau protein in Alzheimer disease : a mechanism for induction of oxidant stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 91 : 7787—7791, 1994.
 - 11) **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.
 - 12) **Hammes HP, Hoerauf H, Alt A, Schleicher E, Clausen JT, Bretzel RG, et al** : N(epsilon) (carboxymethyl) lysin and the AGE receptor RAGE colocalize in age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40 : 1855—1859, 1999.
 - 13) **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.
 - 14) **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.
 - 15) **Marion MS, Carlson EC** : Immunoelectron microscopic analyses of Maillard reaction products in bovine anterior lens capsule and Descemet's membrane. *Biochim Biophys Acta* 1191 : 33—42, 1994.
 - 16) **Kaji Y, Oshika T, Amano S, Okamoto F, Koito W, Horiuchi S** : Immunohistochemical localization of advanced glycation end products in pinguecula. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 244 : 104—108, 2006.
 - 17) **Gray RH, Johnson GJ, Freedman A** : Climatic droplet keratopathy. *Surv Ophthalmol* 36 : 241—253, 1992.
 - 18) **Kaji Y, Nagai R, Amano S, Takazawa Y, Fukayama M, Oshika T** : Advanced glycation end product deposits in climatic droplet keratopathy. *Br J Ophthalmol* 91 : 85—88, 2007.
 - 19) **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.
 - 20) **Franke S, Stein F, Dawczynski J, Blum M, Kubetschka U, Stein G, et al** : Advanced glycation end-products in anterior chamber aqueous of cataractous patients. *J Cataract Refract Surg* 29 : 329—335, 2003.
 - 21) 橋本浩隆 : 糖尿病患者白内障と非酵素的糖化反応の関係. *日眼会誌* 102 : 33—41, 1998.
 - 22) **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.
 - 23) **Yeh CH, Sturgis L, Haidacher J, Zhang XN, Sherwood SJ, Bjerkce RJ, et al** : Requirement for p38 and p44/p42 mitogen-activated protein kinases in RAGE-mediated nuclear factor- κ B transcriptional activation and cytokine secretion. *Diabetes* 50 : 1495—1504, 2001.
 - 24) **Sun C, Liang C, Ren Y, Zhen Y, He Z, Wang H, et al** : Advanced glycation end products depress function of endothelial progenitor cells via p38 and ERK 1/2 mitogen-activated protein kinase pathways. *Basic Res Cardiol* 104 : 42—49, 2009.
 - 25) **Aso Y, Inukai T, Tayama K, Takemura Y** : Serum concentrations of advanced glycation end-products are associated with the development of atherosclerosis as well as diabetic microangiopathy in patients with type 2 diabetes. *Acta Diabetol* 37 : 87—92, 2000.
 - 26) **Sakata N, Imanaga Y, Meng J, Tachikawa Y, Takebayashi S, Nagai R, et al** : Increased advanced glycation end products in atherosclerotic lesions of patients with end-stage renal disease. *Atherosclerosis* 142 : 67—77, 1999.
 - 27) **Misur I, Zarkovic K, Barada A, Batelja L, Milicevic Z, Turk Z** : Advanced glycation endproducts in peripheral nerve in type 2 diabetes with neuropathy. *Acta Diabetol* 41 : 158—166, 2004.
 - 28) **Sugimoto K, Yasujima M, Yagihashi S** : Role of advanced glycation end products in diabetic neuropathy. *Curr Pharm Des* 14 : 953—961, 2008.
 - 29) **Kaji Y, Usui T, Ishida S, Yamashiro K, Moore TC, Moore J, et al** : Inhibition of diabetic leukostasis and blood-retinal barrier breakdown with a soluble form of a receptor for advanced glycation end products. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48 : 858—865, 2007.
 - 30) **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.
 - 31) **Stitt AW** : The role of advanced glycation in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Exp Mol Pathol* 75 : 95—108, 2003.
 - 32) **Stitt AW** : The maillard reaction in eye diseases. *Ann N Y Acad Sci* 1043 : 582—597, 2005.
 - 33) **Barile GR, Schmidt AM** : RAGE and its ligands in retinal disease. *Curr Mol Med* 7 : 758—765, 2007.
 - 34) **Yokoi M, Yamagishi SI, Takeuchi M, Ohgami K, Okamoto T, Saito W, et al** : Elevations of AGE and vascular endothelial growth factor with decreased total antioxidant status in the vitreous fluid of diabetic patients with retinopathy. *Br J Ophthalmol* 89 : 673—675, 2005.
 - 35) **Matsumoto Y, Takahashi M, Chikuda M, Arai K** : Levels of mature cross-links and advanced

- glycation end product cross-links in human vitreous. *Jpn J Ophthalmol* 46 : 510—517, 2002.
- 36) **Hammes HP, Martin S, Federlin K, Geisen K, Brownlee M** : Aminoguanidine treatment inhibits the development of experimental diabetic retinopathy. *Proc Natl Acad Sci USA* 88 : 11555—11558, 1991.
- 37) **Du Y, Smith MA, Miller CM, Kern TS** : Diabetes-induced oxidative stress in the retina, and correction by aminoguanidine. *J Neurochem* 80 : 771—779, 2002.
- 38) **Ling X, Nagai R, Sakashita N, Takeya M, Horiuchi S, Takahashi K** : Immunohistochemical distribution and quantitative biochemical detection of advanced glycation end products in fetal to adult rats and in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Lab Invest* 81 : 845—861, 2001.
- 39) **Schultz RO, Van Horn DL, Peters MA, Klewin KM, Schutten WH** : Diabetic keratopathy. *Trans Am Ophthalmol Soc* 79 : 180—199, 1981.
- 40) **Rao GN** : Dr. P. Siva Reddy Oration. Diabetic keratopathy. *Indian J Ophthalmol* 35 : 16—36, 1987.
- 41) **Kaji Y** : Prevention of diabetic keratopathy. *Br J Ophthalmol* 89 : 254—255, 2005.
- 42) **Kubo E, Mori K, Kobayashi T, Takahashi Y, Yokoi N, Kinoshita S, et al** : Effect of aldose reductase inhibitor on corneal epithelial barrier function in galactose-fed dogs. *J Ocul Pharmacol Ther* 14 : 181—190, 1998.
- 43) **Kinoshita JH, Fukushi S, Kador P, Merola LO** : Aldose reductase in diabetic complications of the eye. *Metabolism* 28 : 462—469, 1979.
- 44) **Kador PF, Robison WG, Jr., Kinoshita JH** : The pharmacology of aldose reductase inhibitors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 25 : 691—714, 1985.
- 45) **Chikama T, Wakuta M, Liu Y, Nishida T** : Deviated mechanism of wound healing in diabetic corneas. *Cornea* 26 : S75—81, 2007.
- 46) **Nakamura M, Kawahara M, Morishige N, Chikama T, Nakata K, Nishida T** : Promotion of corneal epithelial wound healing in diabetic rats by the combination of a substance P-derived peptide (FGLM-NH2) and insulin-like growth factor-1. *Diabetologia* 46 : 839—842, 2003.
- 47) **Watanabe H, Katakami C, Miyata S, Negi A** : Corneal disorders in KKAY mouse : a type 2 diabetes model. *Jpn J Ophthalmol* 46 : 130—139, 2002.
- 48) **Ljubimov AV, Huang ZS, Huang GH, Burgesson RE, Gullberg D, Miner JH, et al** : Human corneal epithelial basement membrane and integrin alterations in diabetes and diabetic retinopathy. *J Histochem Cytochem* 46 : 1033—1041, 1998.
- 49) **Sato N, Nakamura M, Chikama T, Nishida T** : Abnormal deposition of laminin and type IV collagen at corneal epithelial basement membrane during wound healing in diabetic rats. *Jpn J Ophthalmol* 43 : 343—347, 1999.
- 50) **Yamagishi S, Ueda S, Matsui T, Nakamura K, Okuda S** : Role of advanced glycation end products (AGEs) and oxidative stress in diabetic retinopathy. *Curr Pharm Des* 14 : 962—968, 2008.
- 51) **Yamagishi S, Nakamura K, Matsui T** : Advanced glycation end products (AGEs) and their receptor (RAGE) system in diabetic retinopathy. *Curr Drug Discov Technol* 3 : 83—88, 2006.
- 52) **Stitt AW, Bhaduri T, McMullen CB, Gardiner TA, Archer DB** : Advanced glycation end products induce blood-retinal barrier dysfunction in normoglycemic rats. *Mol Cell Biol Res Commun* 3 : 380—388, 2000.
- 53) **Yamamoto Y, Doi T, Kato I, Shinohara H, Sakurai S, Yonekura H, et al** : Receptor for advanced glycation end products is a promising target of diabetic nephropathy. *Ann N Y Acad Sci* 1043 : 562—566, 2005.
- 54) **Yamamoto Y, Kato I, Doi T, Yonekura H, Ohashi S, Takeuchi M, et al** : Development and prevention of advanced diabetic nephropathy in RAGE-overexpressing mice. *J Clin Invest* 108 : 261—268, 2001.
- 55) **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.
- 56) **Ohgami N, Nagai R, Ikemoto M, Arai H, Kuniyasu A, Horiuchi S, et al** : Cd36, a member of the class b scavenger receptor family, as a receptor for advanced glycation end products. *J Biol Chem* 276 : 3195—3202, 2001.
- 57) **Fujii N** : D-amino acid in elderly tissues. *Biol Pharm Bull* 28 : 1585—1589, 2005.
- 58) **Fujii N, Saito T** : Homochirality and life. *Chem Rec* 4 : 267—278, 2004.
- 59) **Fujii N** : D-amino acids in living higher organisms. *Orig Life Evol Biosph* 32 : 103—127, 2002.
- 60) **Masters SB, Sullivan KA, Miller RT, Beiderman B, Lopez NG, Ramachandran J, et al** : Carboxyl terminal domain of Gs- α specifies coupling of receptors to stimulation of adenylyl cyclase. *Science* 241 : 448—451, 1988.
- 61) **Fujii N, Takemoto LJ, Matsumoto S, Hiroki K, Boyle D, Akaboshi M** : Comparison of d-aspartic acid contents in α A-crystallin from normal and age-matched cataractous human lenses. *Biochem Biophys Res Commun* 278 : 408—413, 2000.
- 62) **Fujii N, Muraoka S, Harada K** : Purification and characterization of a protein containing D-aspartic acid in bovine lens. *Biochim Biophys Acta* 999 : 239—242, 1989.
- 63) **Muraoka S, Fujii N, Tamanoi I, Harada K** : Characterization of a protein containing D-aspartic

- acid in aged mouse lens. *Biochem Biophys Res Commun* 146 : 1432—1438, 1987.
- 64) **Miura Y, Fujimoto N, Komatsu T, Tajima S, Kawada A, Saito T, et al** : Immunohistochemical study of chronological and photo-induced aging skins using the antibody raised against D-aspartyl residue-containing peptide. *J Cutan Pathol* 31 : 51—56, 2004.
- 65) **Fujii N, Tajima S, Tanaka N, Fujimoto N, Takata T, Shimo-Oka T** : The presence of D- β -aspartic acid-containing peptides in elastic fibers of sun-damaged skin : a potent marker for ultraviolet-induced skin aging. *Biochem Biophys Res Commun* 294 : 1047—1051, 2002.
- 66) **Kaji Y, Oshika T, Takazawa Y, Fukayama M, Takata T, Fujii N** : Localization of D- β -aspartic acid-containing proteins in human eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48 : 3923—3927, 2007.
- 67) **Kaji Y, Oshika T, Okamoto F, Fujii N** : Immunohistochemical localization of D- β -aspartic acid in pinguecula. *Br J Ophthalmol* 2008 (in press).
- 68) **Kaji Y, Oshika T, Takazawa Y, Fukayama M, Fujii M** : Immunohistochemical localization of D- β -aspartic acid-containing proteins in climatic droplet keratopathy. *Br J Ophthalmol* 2008 (in press).
- 69) **Bruckner H, Justus J, Kirschbaum J** : Saccharide induced racemization of amino acids in the course of the Maillard reaction. *Amino Acids* 21 : 429—433, 2001.
-

Comment : 赤木 好男

高血糖状態では、糖は蛋白質・他の組織・血液成分と非酵素的に結合 (Maillard 反応もしくは褐色反応) する。これをグリケーションと呼ぶ。糖尿病コントロール指数である HbA1c もグリケーションの一つである。糖化蛋白質はさらにアマドリ化合物、中間反応生成物形成、脱水・重合などを経て、蛍光物質である終末糖化物質に変化する。AGEs は単一の化合物を指すのではなく、糖化によって産生された最終産物の総称である。したがって加齢によっても蓄積するし、糖尿病ではさらに蓄積が増加する。そのため、糖尿病合併症に AGEs が関与するとする報告は多く、何らかの関与をしている可能性は否定できない。しかし、関与を明確にするためには、蓄積が結果でなく、原因であるという証明が必要である。

糖尿病白内障で考えてみると、AGEs がどの部位に蓄積しているのかが問題となる。多くの研究結果では、AGEs は水晶体核部分に蓄積し、着色・混濁を引き起こすとされる。本論文でも白内障の原因として注目した D 型アミノ酸は水晶体核部分に存在すると記述されている。一方、過去の膨大な米国を中心とした疫学的調査で示されているヒト糖尿病白内障病変は、皮質もしくは後囊下混濁であり水晶体の中でも新しい線維に発症するとされている。AGEs 経年蓄積とは異なる部位に白内障が起こっているのである。この矛盾の解明が必要である。角膜症はどうであろうか。本論文で記述されているように、角膜上皮細胞接着能低下が AGEs 蓄積によって引き起こされる可能性はある。そのことをさらに確定するためには、
での証明が必要である。角膜内皮細胞が老化によって減少するのは事実であり、AGEs がその減少に関与する可能性はある。一方、糖尿病では内皮細胞数は不変であるという意見が過去の報告では優勢である。糖尿病角膜内皮細胞症というべき状態は、白内障手術時などに障害を受けやすく回復しにくいことであり、今後そのことに AGEs がどのように関与するのか解明される必要がある。合併症の中でも最も重要な糖尿病網膜症に対する AGEs の関与も著者が主張するようにあるかもしれない。

本文にも記述されているが、AGEs の関与を明確に確定するためには合併症動物モデルでの実験と阻害剤の開発がさらに必要である。また、加齢と糖尿病とをさらに厳密に分けての研究が必要であると思われた。