

Title	The internalization and metabolism of 3-deoxyglucosone in human umbilical vein endothelial cells
Author(s)	崎山, 晴彦
Citation	大阪大学, 2005, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/46287
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	崎山晴彦
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 19863 号
学位授与年月日	平成 17 年 12 月 26 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科生体制御医学専攻
学位論文名	The internalization and metabolism of 3-deoxyglucosone in human umbilical vein endothelial cells (ヒト血管内皮細胞における 3-deoxyglucosone の取り込みと代謝)
論文審査委員	(主査) 教授 谷口 直之 (副査) 教授 高井 義美 教授 岡本 光弘

論文内容の要旨

[目的]

蛋白糖化反応とは、還元糖のカルボニル基と蛋白のアミノ基が非酵素的に反応し、アマドリ化合物を経て、最終的に advanced glycation endproducts (AGEs) を形成する反応である。Glycation は、そのターゲットの蛋白の機能を阻害する他、中間の反応にて活性酸素を発生したり、あるいは AGE が組織に沈着するなどして糖尿病合併症や動脈硬化に深く関与していると考えられている。

今回我々は、glycation の中間代謝産物の 3-deoxyglucosone (3-DG) に特に着目して、その代謝を解析するシステムを開発した。3-DG は、カルボニル基を 2 つ持つジカルボニル化合物で反応活性が極めて高く、蛋白の架橋形成に関与することが知られているほか、AGEs との関連が明らかにされている点で重要な代謝産物である。

今回の研究では、3-DG の細胞内における代謝を HPLC を用いて解析するシステムを開発し、3-DG の細胞内での代謝動態とその生理作用の関係を観察した。

[方法ならびに成績]

まず、 ^3H -3-DG は、Khadem らの方法を改変し、 ^3H -glucose より合成した。この ^3H -DG を精製ラット肝 Aldehyde reductase (ALR) と反応させることにより ^3H -3-DF を得、Amide-80 カラムを用いた HPLC での分離条件を検討した。また、 ^3H -3-DG を HUVEC および SMC と反応させ、細胞抽出液を同様に HPLC で分離し、各ピークのカウントを測定することによって細胞内への取り込みおよび代謝を計測した。

その結果、 ^3H -3-DG を 37°C で HUVEC、SMC 細胞と反応させると、時間変化とともに 3-DG が細胞内に取り込まれることが明らかとなった。この取り込みは 4°C 処理や、phosphatase の阻害剤である Phenylarsine oxide (PAO) 処理により阻害された為、何らかの能動的な輸送によると考えられた。この輸送経路について、glucose transporter の関与が考えられるため、glucose による取り込み阻害実験を試みたが、顕著な阻害効果は認められなかった。また、取り込まれた 3-DG を時間変化で観察してみると、時間が経つとともに 3-DF へと変化されることが分かった。3-DF のほかに顕著なピークが認められなかった。また、この反応は aldo-keto reductase 阻害剤 ARI によって阻害された。

これらより、1) 取り込まれた 3-DG は主に 3-DF に還元されること、また、2) この反応は *aldo-keto reductase* に触媒されることが示唆された。

細胞に ARI 存在下、非存在下で 3-DG を添加したところ、存在下においてより強くアポトーシスが起きていることが分かった。また、*caspase-3* 抗体で細胞を染色すると染められることからアポトーシスが起きていることが分かった。さらに、この条件下で *peroxide* を測定すると、ARI 存在下で *peroxide* がより発生していることも分かった。よって、細胞内に取り込まれた 3-DG は *peroxide* の発生に関与し、アポトーシスが引き起こされることが示唆された。

【総括】

以上の結果から、*glycation* の中間代謝産物の 3-DG は細胞内に取り込まれることが分かり、取り込まれた 3-DG は、*aldo-keto reductase* により還元され 3-DF になることがわかった。

正常な状態では、3-DG は細胞内に取り込まれると *aldo-keto reductase* により還元され 3-DF になるが、糖尿病態下など高血糖状態になると 3-DG の産生量が増加し、細胞内で 3-DG を処理しきれなくなるためにレドックス制御のバランスがくずれ、様々な細胞毒性を起こすと考えられる。

論文審査の結果の要旨

蛋白糖化反応は、還元糖のカルボニル基と蛋白のアミノ基が非酵素的に反応し、アマトリ化合物を経て、最終的に *advanced glycation endproducts* (AGEs) を形成する反応である。

Glycation は、そのターゲットの蛋白の機能を阻害するほか、中間の反応にて活性酸素を発生したり、あるいは AGE が組織に沈着するなどして糖尿病合併症や動脈硬化に深く関与していると考えられている。

本研究では、*glycation* の中間代謝産物の 3-deoxyglucosone (3-DG) に着目して、その代謝を解析した。

その結果、3-DG は、*endocytosis* により細胞内に取り込まれ、その後、抗酸化酵素と結合し不活性化することで酸化ストレスを誘因することが示唆された。

また、この酸化ストレスにより細胞内の ROS (活性酸素種) が増加し *apoptosis* を引き起こすと考えられた。

以上のことから、3-DG と糖尿病合併症などの成因に重要な役割を果たす酸化ストレスとの関係を明らかにしたので、学位の授与に値すると考えられる。