

糖尿病合併症の発症機序 - タンパク質の Glycation と Glycosylation -

東邦大・薬 〇松本 宏治郎、東 祐太郎、桧貝 孝慈

1 はじめに

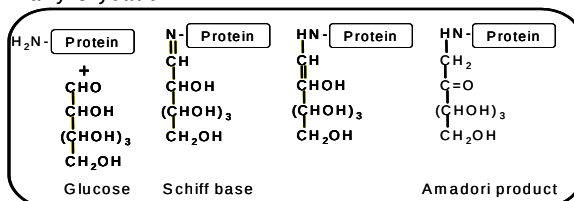
糖尿病は、インスリンの作用不足により起こる慢性の高血糖を主徴とする特徴のある代謝異常をきたす疾患群である。2002 年には有病者 740 万人、予備群 880 万人であり、40 歳以上では 10% 以上の有病率であり、高血圧症、脂質異常症とともに三大生活習慣病になっている。1999 年には日本糖尿病学会から糖尿病の診断と治療に関するガイドラインが公表され、成因に基づく病型分類、インスリン不足の程度による病態分類、治療法が基準化されている。しかし、糖尿病の合併症は、細小血管障害、糸球体性腎症、網膜症、神経系障害、易感染性など多岐にわたり、その発症機序については必ずしも明確にされていない。そこで、高血糖が持続することによるタンパク質の非酵素的 Glycation と酵素的 Glycosylation について検討した結果を話題提供する。

2. タンパク質の Glycation と合併症

グルコースは、タンパク質のアミノ末端 α -NH₂ や Lys の ϵ -NH₂ と非酵素的に反応して Schiff 塩基を形成し、一部が Amadori 転位により安定なケトアミンである Amadori 産物を生成する (図 1)。この反応は Maylard 反応としてよく知られている。前期糖化産物はさらに、酸化的開裂や架橋形成反応などでより複雑な後期糖化産物 (advanced glycation end product: AGE) を生成してタンパク質の機能が失われることが、種々の糖尿病合併症を引き起こす原因の一つと考えられている。また、Amadori 産物である赤血球中ヘモグロビンの糖化産物 (HbA_{1c}) や血漿中タンパク質の糖化産物 (Fructosamine) や糖化アルブミン (Glc-HSA) は、糖尿病の血糖値の管理の指標として臨床検査の分野で汎用されている。

我々は、Glc-HSA や AGE-HSA が血管内皮細胞や単球・マクロファージに作用して活性酸素分子種 (Reactive oxygen species: ROS) を放出して酸化傷害を誘発し、細胞内シグナル伝達系により転写因子 NF- κ B や AP-1 による遺伝子転写とタンパク質合成が亢進して細胞機能を変化させることを明らかにした。

Early Glycation



Advanced Glycation

Advanced Glycation End products (AGE)

- 1) Browning
- 2) Fluorescence
- 3) Crosslinking
- 4) Ligands for AGE receptors

図 1. タンパク質の糖化反応

1) 糖化アルブミンによる血管内皮細胞上の接着分子 E-Selectin 発現¹⁾

E-Selectin は、白血球上の糖タンパク質に発現する 4 糖構造である Sialyl Lewis X (sLeX) : NeuAc α 2, 3Gal β 1, 4(Fuc α 1, 3)GlcNAc-R を認識する接着分子であり、炎症誘発性サイトカインにより血管内皮細胞上に発現し、炎症部位へ白血球の浸潤を仲介する。

ヒト臍帯血管内皮細胞 HUVEC を Glc-HSA で刺激したところ、E-Selectin の細胞表面タンパク質発現量が、刺激 4 時間で約 30 倍増加したが、AGE-HSA での増加は 2-3 倍であった。Glc-HSA による E-Selectin 発現は、NADPH oxidase 阻害剤 DPI と ROS スカベンジャー NAC により完全に阻害された。また、PKB 阻害剤 ML-9 や IKK 阻害剤 BAY117082 では完全に、PI3K 阻害剤 Wortmannin や JNK 阻害剤 SP600125 では部分的に阻害されたが、PKC 阻害剤 Calphostin C での阻害はほとんど見られなかった。また、共焦点蛍光顕微鏡による観察で、NF κ B は Glc-HSA 刺激後 30 分で細胞質から核内に移行することが明らかになった。

2) 糖化アルブミンによる単球・マクロファージのサイトカイン IL-8 と MIP-1 発現²⁾

ヒト単球系細胞 U937 を Glc-HSA や AGE-HSA で刺激し、白血球の血管内皮細胞への接着を誘発するサイトカイン Interleukin-8 (IL-8) の mRNA

発現を RT-PCR で測定した。いずれの刺激も 2 時間で約 2-3 倍の IL-8 mRNA 発現増加がみられた。また、Glc-HSA や AGE-HSA 刺激で IL-8 のプロモーター領域、AP-1 や NF κ B 結合領域を持つレポーターの転写活性は、いずれの刺激でも約 2 倍に増加した。しかし、Glc-HSA 刺激による転写活性は、NAC で阻害されるが Calphostin C では阻害されないのに対し、AGE-HSA 刺激による転写活性は、NAC で阻害されず、Calphostin C で阻害された。従って、Glc-HSA と AGE-HSA とでは細胞内シグナル伝達の相違が示唆された。

U937 細胞を低濃度ホルポールエステル PMA で刺激するとマクロファージ様に分化する。そこで分化 U937 細胞を Glc-HSA と AGE-HSA で刺激したところ、サイトカイン Macrophage inflammatory protein-1 (MIP-1) mRNA 発現がいずれも 2 時間で約 30 倍と顕著に増加した。この刺激はいずれも PKC- δ 阻害剤 Rottlerin と NADPH oxidase 阻害剤 Apocinin で阻害され、PKC- δ が細胞内シグナル伝達の上流にあることが明らかになった⁴⁾。

これらの結果は Glc-HSA や AGE-HSA が血管内皮細胞や血管外に浸潤したマクロファージから ROS やサイトカインを放出し、血管周辺組織の酸化傷害や炎症反応を増悪化し、動脈硬化を進展させることに深く関与していると考えられた。

3. タンパク質の Glycosylation と合併症³⁾

グルコース輸送担体で細胞内に取り込まれたグルコースは、大部分が解糖系により代謝されるが、一部がヘキソサミン経路により UDP-GlcNAc に変換される。細胞内 UDP-GlcNAc は O-GlcNAcT によりタンパク質の Ser/Thr に酵素的に転移され、O-GlcNAcase で酵素的に脱離される (図 2)。このタンパク質 O-GlcNAc 化反応はタンパク質のリン酸化部位あるいは近傍で起こるために、タンパク質の翻訳後修飾による機能が障害されることが予想される。

ヒト肝細胞株 HuH-7 を 25mM グルコースや O-GlcNAcase 阻害剤 PUGNAc 存在下で 1-2 日間培養すると、多くのタンパク質が O-GlcNAc 修飾され、細胞表面 E-Selectin 発現が増加した。E-Selectin mRNA の転写は、cAMP response element (CRE) 類似の NF-IL6 や AP-1 で調節されていることから、これらの転写活性をレポーターで測定したところ、CRE の転写活性は抑制され、AP-1 の転写活性は増強した。さらに、dibutylic cAMP 刺激や PKA 強制発現細胞では CRE の転写活性は抑制され、MEKK 強制発現細胞では AP-1 の転写活性は増強された。通常、CRE binding protein (CREB) は細胞質に存在し、刺激により PKA でリン酸化を受けて核内に移行して転写を調節するが、O-GlcNAc 化 CREB は核内に移行し、転写調節に関与することが明らかになった。

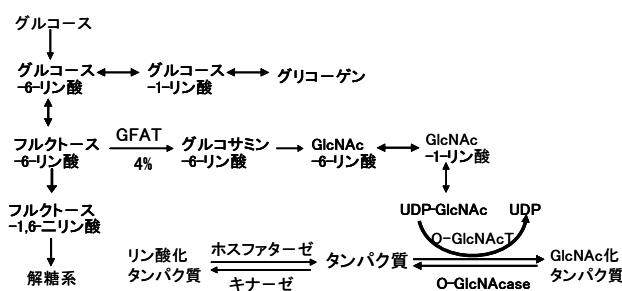


図2. ヘキソサミン生成経路とGlcNAc化タンパク質

GFAT: Glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase
O-GlcNAcT: O-N-acetylglucosamine transferase
O-GlcNAcase: protein-O-N-acetylglucosamine hydrolase

4. まとめ

糖化タンパク質の受容体はいまだ特定されていない。しかし、NADPH oxidase はマクロファージや常在性マクロファージである血管内皮細胞、腎糸球体メサンギウム細胞、眼網膜細胞などに存在し、糖尿病で蓄積する糖化タンパク質により活性酸素を細胞内外に放出し、これらの組織での細胞傷害を誘発する原因になると考えられる。

また、高血糖によるヘキソサミン経路の亢進とタンパク質の O-GlcNAc 化は O-GlcNAcT や O-GlcNAcase が普遍的に組織細胞に存在することから、糖尿病でのインスリン抵抗性の増悪や免疫能の低下などの原因となることが考えられる。

今後、これらの糖尿病合併症の発症機序を解明することが、糖尿病の管理や治療につながることを期待される。

5. 参考文献

- 1) K. Higai, A. Shimamura and K. Matsumoto: Amadori-modified glycated albumin predominantly induces E-selectin expression on human umbilical vein endothelial cells through NADPH oxidase activation. Clin Chim Acta, 367 (2006), 137-143.
- 2) K. Higai, R. Sano, M. Satake, Y. Azuma and K. Matsumoto: Glycated human serum albumin induced interleukin 8 mRNA expression through reactive oxygen species and NADPH oxidase-dependent pathway in monocyte-derived U937 cells. Biol Pharm Bull, 30 (2007), in press.
- 3) Y. Azuma, K. Miura, K. Higai and K. Matsumoto: Protein O-N-acetylglucosaminylation modulates promoter activities of cyclic AMP response element and activator protein 1 and enhances E-selectin expression in HuH-7 human hepatoma cells. Biol Pharm Bull, 30, 2007, in press.
- 4) 佐竹みさき他. 日本薬学会 127 年会 (2007) 発表. 第 80 回日本生化学会大会 (2007) 発表予定.