



# Immunohistochemical detection of advanced glycosylation end products in diabetic tissues using monoclonal antibody to pyrraline

宮田, 哲

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1994-09-07

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙1863

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2001863>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・（本籍）	宮 田 哲 <sup>みや た さとし</sup> （広島県）
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学位記番号	博ろ第1420号
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位授与の日付	平成6年9月7日
学位論文題目	Immunohistochemical Detection of Advanced Glycosylation End Products in Diabetic Tissue Using Monoclonal Antibody to Pyrraline (糖尿病組織における後期糖化反応産物ピラリンの単クローン抗体を用いた免疫組織化学的同定)
審査委員	主査 教授 春日 雅 人 教授 前田 盛 教授 横山 光 宏

## 論文内容の要旨

### 【緒言】

糖尿病性合併症や老化の成因として蛋白質の糖化反応（グリケーション）が注目されている。グルコースを始めとする還元糖は、蛋白質のアミノ基と非酵素的に反応して比較的安定なアマドリ化合物を形成する。ここまでの反応は可逆的でありグリケーションの初期段階と呼ばれる。それ以後のグリケーション後期段階のメカニズムは未だ不明の点が多いが、最近になり後期段階終末産物（Advanced glycosylation end products: AGEs）の同定が成され始めた。我々は、*in vitro*でグルコースとネオペンチルアミンを生理的条件下で反応させるとAGEsとして5-hydroxymethyl-neopentylpyrrole-2-carbaldehyde（いわゆるneopentyl pyrraline）が生成されることを示してきた。今回、pyrraline（ピラリン）に対する単クローン抗体を作製し、*in vitro*で蛋白質をグルコースあるいは3-deoxyglucosoneとインキュベーションすると時間依存性にピラリンが形成されることをELISA法を使って確認するとともに、*in vivo*においても、ラットおよびヒトで糖尿病に伴って血漿ピラリン値が増加していることを示した。さらに、免疫組織化学的手法によって生体内の糖尿病性病変部および老化組織にピラリンが存在していることを証明した。

### 【方法】

#### (1) 単クローン抗体作製

caproyl pyrralineをcarbodiimide法を用いてkeyhole limpet hemocyaninに縮合したものを免疫原として6匹のBalb/c系マウスを免疫した。各マウスの抗血清力価はELISA法によってスクリーニングした。最も力価の高かったマウスを使い、Schulmanらの方法でハイブリドーマを作製して、生体内に存在しているリジン残基を側鎖に持つL-lysyl pyrralineを認識する抗体を分泌する2つのクローンをELISA法によって選択した。これらをBalb/cマウス腹腔内で増殖させた後、腹水を採取しプロテインAカラムにて抗体を精製した。

#### (2) ヒト血清アルブミン（HSA）とグルコースあるいは3-deoxyglucosone（3-DG）とのインキュ

## ベーション

HSA (50mg/ml) を 0, 5, 50, 500mM のグルコースまたは 5, 50mM のグリケーション後期段階中間体である 3-DG と pH5.4 および 7.4 の PBS 緩衝液中で 37°C においてインキュベーションした。インキュベーション反応液を 0, 6, 12, 20 および 30 日目に一部取り出し、ピラリン定量まで凍結保存した。これらのサンプルを、PBS に対して十分に透析した後、ELISA 法により HSA 上に形成されたピラリンを定量した。

### (3) ELISA 法

マウスの抗血清力価とハイブリドーマのスクリーニングは、それぞれのサンプルを BSA-pyrraline でコーティングした ELISA プレート上で反応させ、ピラリンと結合した抗体を抗マウス IgG-ALP を使い発色反応によって検出した。蛋白質上に形成されたピラリン量は、各サンプルを抗ピラリン単クローン抗体とプレインキュベーションした後に上述と同様の方法で発色させ、lysyl-pyrraline を標準物質として定量した。

### (4) ラットおよびヒト血漿の準備

200~220 g の Sprague-dawley ラット 20 匹のうち 12 匹に 65mg/kg BW のストレプトゾトシン (STZ) を尾静脈から静注して糖尿病を誘発した。糖尿病ラットおよびコントロールラットの尾静脈から定期的にヘパリン採血して遠心分離後血漿を得た。同時に得た赤血球はボロン酸アフィニティカラムによる糖化ヘモグロビンの定量に使った。20 人の糖尿病患者と同年齢層の 10 人の非糖尿病患者の血漿は Cleveland 大学病院臨床化学検査室より得た。

### (5) ヒト組織中ピラリンの検出

糖尿病あるいは同年齢層非糖尿病患者のパラフィン包埋組織ブロックは我々の施設の病理解剖室から得た。ピラリンの検出は単クローン抗体を用いた Avidin-Biotin-Peroxydase complex 法にて行った。

## 【結果】

### (1) 単クローン抗体

ピラリンの側鎖によって抗体の親和性が異なるが、生体内に存在していると考えられる L-lysyl pyrraline を認識する抗体を分泌する 2 つのクローンを得ることができ、それぞれを Pyr-A および Pyr-B と命名した。後者の方がピラリンに対して親和性が高かったので Pyr-B をピラリン検出のためのプローブとして以後の実験に使用した。

### (2) in vitro におけるピラリンの形成

HSA と 50mM の 3-DG を 37°C で 30 日間インキュベーションした場合、pH5.4 では約 2400pmol/mg HSA と pH7.4 の約 800pmol/mg HSA に比べて、3 倍のピラリンが形成され、弱酸性下の方がピラリンが形成されやすいことが示された。また、このピラリン形成は 3-DG の濃度に依存しており、5 mM の 3-DG とインキュベーションした場合は、50mM の場合と比較してそれぞれの pH において 5 ないし 10 分の 1 のピラリン形成となった。pH5.4 で HSA とグルコースをインキュベーションした場合、ピラリン形成まで約 10 日間かかっており、これは、アマドリ化合物形成を経由して 3-DG が形成されるのに要する時間と一致している。

### (3) 血漿ピラリン値

STZ 誘発糖尿病ラットの血漿ピラリン値は糖尿病発症後次第に増加し、7 週間でプラトーに達した。10 週目の血漿ピラリン値はコントロールの  $194.2 \pm 69.9 \mu\text{M}$  に対して糖尿病ラットでは  $627.4 \pm 189.0 \mu\text{M}$  と有意 ( $P < 0.001$ ) に増加していた。ヒト血漿ピラリン値においても糖尿病では  $211.8 \pm 103.4$

$\mu\text{M}$ とコントロールの $115.6 \pm 36.5 \mu\text{M}$ に比較して有意 ( $P < 0.01$ ) に増加していた。

#### (4) ピラリンの免疫組織化学的検出

糖尿病患者の腎臓では糸球体浸出性病変部にピラリンの局在が認められたと共に細小動脈硬化病変部の内膜肥厚部に一致してピラリンの蓄積が証明された。

また、80歳非糖尿病老人の腎臓内の動脈中膜においてもピラリンの存在が認められた。

#### 【考察及び結論】

今回、AGEsの1つであるピラリンが生体内に存在するかどうかを証明するためにピラリンに対する単クローン抗体を作製した。まずin vitroでグリケーションを受けたHSA上にピラリンが時間依存性に形成されていることがこの単クローン抗体を使ったELISA法にて示された。生体内では、概して細胞外マトリックスのような代謝回転の遅い蛋白質上にピラリンが形成されていたが、糖尿病ではさらに糸球体浸出性病変部や動脈硬化病変部にピラリンが特異的に蓄積していることが免疫組織化学的手法によって示された。また、老化によると思われる血管病変部にもピラリンが局在していた。このような糖尿病に特徴的な病変部や老化組織にピラリンの存在が認められたことは、ピラリンを始めとするAGEsが糖尿病性合併症の進展や老化現象に関与している可能性を示唆するものである。また、ELISA法で測定された血漿ピラリン値が糖尿病で有意に増加しており、今後、糖尿病性合併症進展度の指標としてのピラリン定量の有用性も期待される。

#### 論文審査の結果の要旨

糖尿病性合併症や老化の成因として蛋白質の糖化反応（グリケーション）が注目されている。この反応はグルコースを始めとする還元糖が蛋白質のアミノ基と非酵素的に反応して比較的安定なアマトリ化合物を形成する可逆的な初期段階と、それ以後の非可逆的な後期段階とに分けられる。特に後期段階のメカニズムは未だ不明の点が多いが、最近になり後期段階終末産物（Advanced glycosylation end products: AGEs）の同定が成され始めた。その中で、in vitroにおいてグルコースとネオペンチルアミンを生理的条件下で反応させるとAGEとして5-hydroxymethyl-neopentylpyrrole-2-carbaldehyde（いわゆるneopentyl pyrrole）が生成することが確認されており、今回、pyrrole（ピラリン）に対する単クローン抗体を作製し、免疫学的手法によってin vitro及びin vivoの両方においてピラリンが実際に蛋白質上に形成されるかどうかの検討を行った。まず、生体内におけるピラリンはリジン残基を側鎖に持つL-lysyl pyrroleという形で存在すると考えられるので、それを認識することができる抗体を分泌するクローンを選択した。結果的に、2つのクローンを得ることができ、それぞれをPYR-AおよびPYR-Bと命名した。ピラリン検出のためのプローブとしては、ピラリンに対する親和性が高い方のPYR-Bを使用している。in vitroでは、アルブミンをグルコースあるいは後期段階中間体である3-deoxyglucosoneとインキュベーションすると濃度依存性および時間依存性にピラリンが形成されることが単クローン抗体を使ったELISA法によって確認された。ヒト生体内では、概して細胞外マトリックスのような代謝回転の遅い蛋白質上にピラリンが形成されていたが、糖尿病ではさらに糸球体浸出性病変部や動脈硬化病変部にピラリンが特異的に蓄積していることが免疫組織化学的手法によって示された。また、老化によると思われる血管病変部にもピラリンが局在していた。このような糖尿病に特徴的な病変部や老化組織にピラリンの存在が認められたことは、ピラリンを始めとするAGEsが糖尿病性合併症の進展や老化現象に関与している可能性を示唆す

るものである。また、ラットおよびヒトで糖尿病に伴って血漿ピラリン値が増加していることも示され、糖尿病性合併症進展度の指標としてのピラリン定量の有用性も期待される。

本研究は、糖尿病性合併症の成因について、その蛋白質糖化反応の関与を研究したものであるが、従来ほとんど行われなかった糖化反応終末産物の生体内における局在について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。