生体に対する AGE の作用

永井 竜児 堀内 正公

〈要 約〉 AGE は加齢に伴って生体蛋白に蓄積し、又、糖尿病合併症、粥状動脈硬化症、アルツハイマー病など、老化が促進した病態で蓄積が増加することが明らかになった。一方、AGE 蛋白は、種々の細胞の膜表面に存在する受容体 (AGE 受容体) に作用して、様々な細胞現象を惹起する。例えば、AGE 蛋白は *in vitro* で網膜血管内皮細胞と反応し、血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) を産生し、血管新生を促進することから、現在、AGE は糖尿病性増殖網膜症の発症因子の一つと考えられている。従って、生体の病変局所に蓄積 (生成) した AGE 構造体は、単なる蓄積物ではなく、AGE 受容体を介してマクロファージや血管内皮細胞と反応し、糖尿病性の血管合併症 (microangiopathy 及び macroangiopathy) の増悪因子として作用している可能性がある。生体における AGE の意義に関する基礎研究から、AGE 生成の阻害剤、並びに AGE によって誘発される種々の細胞現象に対する抑制剤を開発し、今後、増々増加すると予想される加齢を基盤とする慢性疾患の予防・治療に関して基礎的な情報を提供できるものと期待される。

Key words : AGE, 糖尿病合併症, 老化, 抗 AGE 抗体, フリーラジカル

(日老医誌 1998 ; 35:258—264)

はじめに

わが国は、21世紀初頭には65歳以上の人口が国民の4分の1以上を占めるという急激な高齢化社会を迎えようとしている。これを反映して、加齢に依存し、また食生活の西洋化の波を受け、糖尿病慢性合併症・動脈硬化症などの発症頻度が急増し、社会問題となっている。この中でも老化 (エイジング) に伴う病態との関連からメイラード反応後期生成物 (AGE: Advanced Glycation End product) が注目されている。AGE とは、蛋白が糖と反応し、 Schiff 塩基やアマドリ転位生成物などの前期反応生成物を経て、最終的に生成される蛍光・褐色・分子架橋形成を特徴とする物質である。当初メイラード反応は、食品の加工、貯蔵する際に起こる褐変反応として広く食品化学者の間で研究されてきたが、1975年にヘモグロビン β 鎖の N 末端バリン残基にグルコースが結合したアマドリ転位産物である HbA1c が生体から同定され、さらに、1980年代に入り AGE 化蛋白の特徴の1つである蛍光性物質 (excitation: 370 nm, emission: 440 nm) が、脳硬膜 (dura mater) のコラーゲンに加齢に伴って蓄積すること、又、糖尿病患者は健常人よりも有意に高値であることが示され、生体でのメイラード反応が注目され

るようになった¹⁾。1990年代に入り、AGE を特異的に認識する抗体 (抗 AGE 抗体) を用いた免疫学的解析によって、AGE が老化及び、老化を基盤とした病態と密接な関連があることが明らかとなった。本稿では、蛋白の AGE 化が生体に対してどのような影響を及ぼすかを、その生物医学的意義について述べたい。

メイラード反応 (グリケーション) とは

メイラード反応は前期及び後期反応に分けることができる。前期反応では、還元糖のアルデヒド基が N 末端アミノ基や、リジン残基の ϵ -アミノ基と反応して Schiff 塩基を形成した後、1,2-エナミノールを経てアマドリ転位産物が生成する。これらの前期反応生成物は、酸化・脱水・縮合などの複雑な反応を経て、物理化学的には、褐色化・蛍光・架橋形成を、又、生物学的には、AGE 受容体によってリガンドとして認識される AGE 構造体へと変化する (Fig. 1)。即ち、AGE とは前期反応生成物が複雑な反応を経て不可逆的に生成された構造体の総称であり、現在、生体に存在する AGE 構造として蛍光性・架橋性を有するペントシジン^{2)~4)}、クロスリン⁵⁾、フルオリンク、非蛍光性・非架橋性のイミダゾロン⁶⁾、カルボキシメチルリジン (CML)^{7)~12)} やピラリン¹³⁾¹⁴⁾ などが知られている (Fig. 1)。これまで、蛋白の AGE 化は、前期生成物のうち主としてアマドリ産物から 3-deoxyglucosone (3-DG) を経由して生成されると考えられて

Fig. 1 Maillard reaction

きたが、最近ではグルコースの自己酸化によって生成したグリオキサル¹⁵⁾、 Schiff 塩基に由来するグリコールアルデハイド¹⁶⁾、あるいは、細胞内で解糖系およびポリオール経路から生成するメチルグリオキサル¹⁷⁾など、本反応中に形成されるグルコース以外のアルデヒド中間体による蛋白の AGE 化が注目されている。例えば、I 型糖尿病患者の血中メチルグリオキサル含量は正常者の 6 倍、硝子体では 2 倍程度増加していることが報告されている¹⁸⁾。しかし、このメチルグリオキサルが実際、生体内の AGE 生成にどの程度寄与しているかの詳細は

明らかでない。また、AGE 化蛋白は血管内皮細胞、血管平滑筋細胞、マクロファージ (Mφ) 等の細胞に発現する AGE 受容体にリガンドとして認識され、細胞内に取り込まれ、ライソゾーム内で分解される。この一連のプロセスのいずれかが刺激となって、これら細胞に種々の現象を惹起すると考えられる¹⁹⁾²⁰⁾。

次項で述べる抗 AGE 抗体を用いた研究結果から、ヒトの水晶体クリスタリンに AGE が加齢に伴って蓄積することが明らかとなり、エイジングに対する AGE の関与が初めて示された²¹⁾。さらに、ストレプトゾトシン誘発糖尿病ラットの水晶体²²⁾や腎臓²³⁾、ヒトの糖尿病性腎症及び慢性腎不全の腎臓²⁴⁾、粥状動脈硬化病変部 (Fig. 2)²⁵⁾、長期血液透析患者に発症する透析性アミロイドシスの Carpal Tunnel Syndrome 病変部²⁶⁾にも AGE の存在が明らかになった。また、最近、糖尿病患者網膜で新生血管の好発部位である視神経乳頭部の血管壁にも AGE 構造体のひとつである CML 蓄積が見いだされ、その蓄積部位が vascular endothelial growth factor (VEGF) の局在と酷似していることから、糖尿病増殖網膜症の進展に対する AGE の関与が推測されている²⁷⁾。AGE 蛋白は *in vitro* でも網膜血管内皮細胞と反応し、VEGF を産生し、血管新生を促進することも知ら

[Kume S et al, AJP, 1995]

Fig. 2 Immunohistochemical staining of AGE accumulation in the atherosclerotic plaque
 (A) Immunostaining with anti-AGE (6D12: brown)
 (B) Double staining with anti-AGE (6D12: blue) and anti-Mφ (PM-2K: brown)
 (C) Double staining with anti-AGE (6D12: blue) and anti-smooth muscle cells (HHF35: brown)

Fig. 3 AGE formation was accelerated by several diseases

れており²⁸⁾, AGEは糖尿病増殖網膜症の発症因子の一つと考えられている。現段階では, AGE蓄積が直接の原因で様々な疾病が発症するのか, あるいは, 逆に, 疾病の発症に伴い AGE蓄積が結果的に増加したのか, つまり AGE蓄積は原因であるのか, 単に結果に過ぎないのか依然として明らかではない。しかし, AGEが加齢に依存して増加し, さらに糖尿病合併症などで AGE蓄積が増加・亢進することから, 老化や老を基盤とする疾患の発症・進展に AGEは増悪因子として作用している可能性が考えられる (Fig. 3)。

AGEの定量法について

初期の頃の AGE化蛋白の定量系としては, AGE化に伴う褐色変化や蛍光特性を利用した吸光度計や蛍光分光光度計を用いた比色定量法がある。しかし, これらは AGE構造に対する特異性を欠いているため, 生体内のメイラード反応の結果生成される AGEの定量系として正確なものではなかった。また, 生体組織を酸加水分解などで処理後, HPLCもしくはGC/MSで定量する機器分析法が用いられてきた。本法は酸加水分解に安定な AGE構造体の定量に有効であるが, 測定までに試料を数段階にわたり処理する必要がある。また, 組織中の AGEの局在を調べるのには不向きである。これに対して近年, AGE構造に対する特異抗体 (抗 AGE抗体) が開発され, 免疫学的手法で生体組織における AGEの同定・定量が可能になった。抗 AGE抗体は, アマドリ転位産物などの前期生成物とは反応しないことから, 糖と蛋白の単なる結合物を認識しているのではなく, 後期になって始めて現れる AGE構造を特異的に認識していると考えられる²⁹⁾。

AGEと病態発生のメカニズムを理解するには, AGEの生体内での局在および, 正確な定量法の開発が必要と

[Nagai R et al., FEBS LETTERS, in press]

Fig. 4 CML formation in glycated human serum albumin under alkaline treatment

なるが, 特に血液中の AGE測定は, 血液採取の簡便さから, 糖尿病合併症などの病態の診断マーカーとして期待されている。蛋白上に生成した AGEを機器分析もしくは, 抗 AGE抗体を用いて定量する際に, 測定する試料の可溶性を上げる目的で, アルカリ処理, プロテアーゼ処理および, boilingを伴う SDS処理といった前処理が行われることが多い。最近われわれは, アマドリ蛋白はアルカリ処理によって, そのアマドリ含量に依存して CMLが生成することを明らかにした (Fig. 4)³⁰⁾。本結果は, アルブミンなどの蛋白の糖化率を, アルカリ処理によって CMLとして簡便に測定できる可能性を示唆するとともに, 生体試料中に含まれる AGEを測定する場合は, 試料を前処理する条件に十分注意する必要があることを意味している。

AGEとエイジング

現在提唱されている主な老化仮説として①プログラム説, ②エラー破局説, ③蛋白の翻訳後修飾説などが挙げられるが, これらはそれぞれ独立した原因ではなく, お互い multi-factorialに作用するものと考えられる。又, 時間の経過に依存した自然老化に対して, ウェルナー症候群 (Werner syndrome), ハッチンソン・ギルフォード症候群 (Hutchinson-Gilford syndrome) といった病的に老化が促進される早期老化症があることから, 老化過程は必ずしも生物学的な時間 (加齢) を単純に反映するものではなく, 遺伝因子や環境因子に影響されるものであることを意味している。特に, 糖尿病性網膜症・腎症・神経症, 虚血性心疾患, 脳血管障害などの直接の原因は, 持続する高血糖状態による細小血管および大血管に対する血管障害であるが, 「血管の老化」自体が最大

Fig. 5 Comparison of CML accumulation between senile and young erythrocytes

の促進因子として作用すると考えられる。

さて、実際、グリケーションを受けている生体内蛋白は多数存在する。血液蛋白では、先に述べた HbA1c をはじめアルブミン、LDL や HDL、又、寿命が120日と長い赤血球の膜蛋白もグリケーションを受けている。多くの生体内蛋白がグリケーションを受けているが、それらの大半がアマドリ産物までの前期反応による修飾である。最近われわれは、東京薬科大学の Beppu らとの共同研究で、赤血球膜蛋白の AGE 化を定量した。その結果、同一のヒトの血液から密度勾配遠心法によって分離した、若い赤血球 (young erythrocyte) と老化した赤血球 (senile erythrocyte) のうち、senile erythrocyte の膜蛋白には主要な AGE 構造体である CML が蓄積していることが明らかとなった (Fig. 5) (投稿準備中)。本結果は、同一個体から得られた赤血球でも、存在した時間 (寿命) の差によって、AGE 化に差があることを意味している。現時点では、赤血球膜蛋白への CML 蓄積が、種々の病態でどのように変動するかは明確ではないが、今後の成果が期待される。また、太陽光に含まれる紫外線によって、皮膚の老化が促進される病態 (日光性弾性線維症) が報告されている。Mizutani らは、同じ個体でも非露光部に比べて露光部の特に弾性線維に CML の蓄積が高いことを明らかにしており³¹⁾、皮膚に増生するエラスチンの AGE 化は日光性弾性線維症の原因の一つと考えられている。

AGE 受容体

AGE 化蛋白は、血管内皮細胞、血管平滑筋細胞など

に存在する AGE 受容体と反応し、種々の細胞現象を惹起することが知られる。実際、¹²⁵I で標識した AGE 蛋白をラットの尾静脈から静注すると、半減期数分で速やかに血中より消失し、これは非標識の過剰量の AGE 蛋白の同時投与により有意に遅延する³²⁾。この速い血中クリアランスは、肝臓の類洞に存在する内皮細胞と Kupffer 細胞による受容体を介する取り込み (エンドサイトーシス) によって説明される³³⁾。このような AGE 蛋白に対する特異的結合反応、即ち、AGE 受容体は、ラット腹腔 Mφ、ヒト単球 Mφ、マウス培養 Mφ (RAW 264.7, P388 D.1) など、広く Mφ 系細胞に認められている。現在、cDNA がクローニングされている AGE 受容体としては、MSR (macrophage scavenger receptor A)³⁴⁾、galectin-3³⁵⁾、RAGE (receptor for AGE)³⁶⁾ の3つが知られている。MSR-A の cDNA を過剰発現させた CHO 細胞は MSR の本来のリガンドであるアセチル LDL 同様、AGE-BSA に対しても活発なエンドサイトーシスを示すこと³⁷⁾、又、MSR-knockout マウスの腹腔 Mφ は AGE 蛋白に対するエンドサイトーシス活性が wild に比べて30%以下であることから³⁸⁾、少なくとも Mφ あるいは Mφ 系細胞では、AGE 蛋白は主に MSR を介して取り込まれると考えられ、MSR の新たな機能として注目される。この他、スカベンジャー受容体ファミリーとして提唱されている CD36, FcγRII-B2, SR-BI (scavenger receptor B-I)、バクテリア結合蛋白質である MARCO (macrophage receptor with a collagenous structure) などについても、これら受容体が AGE をリガンドとするか否か興味あるところである。最近、AGE が内皮細胞に発現した RAGE を介して、VEGF の分泌を促進する現象が報告されているが²⁸⁾、AGE と血管内皮細胞との相互作用が全て RAGE によって説明できるか否かは慎重に検討する必要がある。また、galectin-3 は AGE 受容体としての機能以外に、細胞の分化・増殖に伴って発現が増加し³⁹⁾、さらに BCL-2 と同様に、アポトーシスに対して抑制的に作用することが報告されており⁴⁰⁾、AGE の細胞への作用に対する galectin-3 の役割について興味もたれる。

AGE 化蛋白は AGE 受容体を介して様々な細胞反応を惹起する。例えば、Mφ では TNF, IL-1, IL-6, IGF-1, GM-CSF などのサイトカインの分泌、細胞増殖・遊走が起こり⁴¹⁾、血管内皮細胞ではトロンボモジュリンの活性阻害並びに組織因子の活性化などが知られる。又、単球の血管内皮下への遊走を促進し、動脈硬化初期病変の泡沫細胞形成に関与することも示唆されている。これらの様々の細胞現象がどの AGE 受容体によって媒介され

ているのか、又、これらの細胞反応惹起に AGE 蛋白のどのような構造が関与しているかなど、今後、リガンド構造、並びに受容体の構造の両面から明らかにしていく必要がある。

AGE と活性酸素

現在、虚血後再灌流障害、胃十二指腸潰瘍、腫瘍、動脈硬化症、糖尿病、白内障などの病態の発症に、活性酸素の関与が示唆されているが、メイラード反応でも活性酸素が重要な役割を果たしている。メイラード反応では、アマドリ転位産物生成までの反応には酸化反応は関与しないが、ペントシジン、CML などの AGE 構造体および、AGE の特徴の 1 つである蛍光性、架橋構造形成には酸化反応が必須である⁴²⁾。また、アマドリ産物は、活性酸素によって酸化されて AGE 化する反面、活性酸素の発生源でもあることから pro-oxidant としても作用することが知られている。Mullarkey らは、電子スピン共鳴 (ESR) によって、500mM のグルコースと 7 日間インキュベートした RNase からスーパーオキシドアニオンラジカル ($O_2^{\cdot-}$) が発生することを報告している⁴³⁾。同様に、神経原線維 (PHF) タウ蛋白においてもグリケーションによって $O_2^{\cdot-}$ が発生すると共に、神経腫瘍細胞株 (SK-N-SH) では、転写因子 NF- κ B (nuclear factor κ B) を活性化させるという⁴⁴⁾。又、 $O_2^{\cdot-}$ の消去酵素として知られる Cu-Zn-Superoxide dismutase (Cu-Zn-SOD) がグリケーションを受けると、酵素としての活性が失活すると共に、グリケーションの進行に伴って $O_2^{\cdot-}$ が発生し、その後不均化反応によって過酸化水素が生成する。発生した過酸化水素は、Cu-Zn-SOD から遊離した Cu^{2+} との間でフェントン反応を起こし、結果として、ヒドロキシルラジカル ($OH^{\cdot}$) が発生する⁴⁵⁾。 $OH^{\cdot}$ は DNA 鎖や蛋白を切断する特性を有し、種々の生体反応に Toxic に作用すると考えられる。したがって、生体におけるグリケーションの進行は、アマドリ産物からの活性酸素の発生によって、生体内の酸化ストレスを増強させる一因となるであろう。また、Kawamura らは、LDL の Cu^{2+} による酸化修飾をグルコース共存下で行うと、酸化 LDL の生成が促進されることを TBARS (チオバルビツール酸反応物質) の増加、アガロース電気泳動による陰性荷電の増加、並びに $M\phi$ に対するリガンド活性の増加によって確認している⁴⁶⁾。グリケーションの寄与の程度は明らかではないが、実際、DNA の酸化レベルの指標である 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) は、インスリン依存性糖尿病患者の血液単球細胞では、正常者に比べて有意に高く⁴⁷⁾、さらに、尿中 CML 含量も正

常者に比べて高値である⁴⁸⁾。最近、アマドリ産物は活性酸素種の 1 つであるヒドロキシルラジカル作用によって短時間で CML を形成することが明らかになった⁴⁹⁾。従って、CML は加齢に伴って漸次蓄積するだけではなく、炎症を伴う病態では発生したヒドロキシルラジカルによって、比較的短期間に組織に蓄積する可能性が考えられる。

おわりに

以上述べてきたように、AGE には老化、糖尿病合併症の進展のみならず様々な病態との関与が示唆されている。これら AGE と病態発生のメカニズムを理解するためには、生体に蓄積する AGE の構造決定並びにその生体内局在が重要課題となっている。しかし、AGE の検出に用いられている抗 AGE 抗体のエピトープは、未だ不明のものが多く、これら抗体のエピトープ解析が急がれる。また、AGE 蛋白が AGE 受容体に結合した後、細胞に対して多くの生物反応を引き起こすが、そのメカニズムは不明な点が多い。そのため、加齢を基盤とする慢性疾患の予防・治療を目的として、今後はこれらシグナル伝達経路を分子レベルで解析する必要がある。

文 献

- 1) Monnier VM, Kohn RR, Cerami A: Accelerated age-related browning of human collagen in diabetes mellitus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81: 583—587.
- 2) Sell DR, Lapolla A, et al: Pentosidine formation in skin correlates with severity of complications in individuals with long-standing IDDM. *Diabetes* 1992; 41: 1286—1292.
- 3) Sell DR, Monnier VM: End-stage renal disease and diabetes catalyze the formation of a pentose-derived crosslink from aging human collagen. *J Clin Invest* 1990; 85: 380—384.
- 4) Hayase F, Nagaraj RH, et al: Aging of proteins: Immunological detection of a glucose-derived pyrrole formed during Maillard reaction in vivo. *J Biol Chem* 1989; 263: 3758—3764.
- 5) Nakamura K, Hasegawa T, et al: Crosslines A and B as candidates for the fluorophores in age-and diabetes-related cross-linked proteins, and their diacetates produced by Maillard reaction of α -N-acetyl-L-lysine with D-glucose. *J Chem Soc Chem Commun* 1992; 14: 992—994.
- 6) Niwa T, Katsuzaki T, et al: Immunohistochemical detection of imidazolone, a novel advanced glycation end product, in kidneys and aortas of diabetic patients. *J Clin Invest* 1997; 99: 1272—1280.
- 7) Ahmed MU, Thorpe SR, et al: Identification of Ne-

- Carboxymethyllysine as a degradation product of fructoselysine in glycated protein. *J Biol Chem* 1986; 261: 4889—4894.
- 8) Reddy S, Bichler J, et al: N^ε-(Carboxymethyl) lysine is a dominant advanced glycation end product (AGE) antigen in tissue proteins. *Biochemistry* 1995; 34: 10872—10878.
- 9) Ikeda K, Higashi 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* 1996; 35: 8075—8083.
- 10) Dunn JA, Patrick JS, et al: Oxidation of glycated proteins: Age-dependent accumulation of N^ε-(Carboxymethyl) lysine in lens proteins. *Biochemistry* 1989; 28: 9464—9468.
- 11) Dunn JA, Mccance DR, et al: Age-dependent accumulation of N^ε-(Carboxymethyl) lysine and N^ε-(Carboxymethyl) hydroxylysine in human skin collagen. *Biochemistry* 1991; 30: 1205—1210.
- 12) Fu M, Requena JR, et al: The advanced glycation end product, N^ε-(Carboxymethyl) lysine, is a product of both lipid peroxidation and glycoxidation reactions. *J Biol Chem* 1996; 271: 9982—9986.
- 13) Hayase F, Nagaraj RH, et al: Aging of proteins: Immunological detection of a glucose-derived pyrrole formed during Maillard reaction in vivo. *J Biol Chem* 1989; 263: 3758—3764.
- 14) Miyata S, Monnier VM: Immunohistochemical detection of advanced glycosylation end products in diabetic tissues using monoclonal antibody to pyrraline. *J Clin Invest* 1992; 89: 1102—1112.
- 15) Wells-Knecht KJ, Zyzak DV, et al: Mechanism of autoxidative glycosylation: Identification of glyoxal and arabinoxose as intermediates in the autoxidative modification of proteins by glucose. *Biochemistry* 1995; 34: 3702—3709.
- 16) Glomb MA, Monnier VM: Mechanism of protein modification by glyoxal and glycolaldehyde, reactive intermediates of the Maillard reaction. *J Biol Chem* 270: 10017—10026, 1995
- 17) Thornalley PJ: The glyoxalase system in health and disease. *Molec Aspects*, 1993; Med 14: 313—320.
- 18) Mclellan AC, Thornalley PJ, et al: Glyoxalase system in clinical diabetes mellitus and correlation with diabetic complications. *Clinical Science* 1994; 87: 21—29.
- 19) Vlassara H, et al: Biology of disease: Pathogenic effects of advanced glycosylation: Biochemical, biologic, and clinical implications for diabetes and aging. *Lab Invest* 1994; 70 (2): 138—151.
- 20) Yui S et al: Induction of macrophage growth by advanced glycation end products of the Maillard reaction. *J Immunol* 1994; 152: 1943—1949.
- 21) Araki N, Ueno N, et al: Immunochemical evidence for the presence of advanced glycation end products in human lens proteins and its positive correlation with aging. *J Biol Chem* 1992; 267: 10211—10214.
- 22) Nakayama H, Mitsuhashi T, et al: Immunochemical detection of advanced glycation end products in lens crystallins from streptozotocin-induced diabetic rat. *Diabetes* 1993; 42: 345—350.
- 23) Mitsuhashi T, Nakayama H, et al: Immunochemical detection of advanced glycation end products in renal cortex from STZ-induced diabetic rat. *Diabetes* 1993; 42: 826—832.
- 24) Makino H, Shikata K, et al: Ultrastructure of nonenzymatically glycated mesangial matrix in diabetic nephropathy. *Kidney International* 1995; 48: 517—526.
- 25) Kume S, Takeya M, et al: Immunohistochemical and ultrastructural detection of advanced glycation end products in atherosclerotic lesions of human aorta with a novel specific monoclonal antibody. *Am J Pathol* 1995; 147: 654—667.
- 26) Miyata T, Oda O, et al: β_2 -microglobulin modified with advanced glycation end products is a major component of hemodialysis-associated amyloidosis. *J Clin Invest* 1993; 92: 1243—1252.
- 27) Murata T, Nagai R, et al: The relationship between accumulation of advanced glycation end products and expression of vascular endothelial growth factor in human diabetic retinas. *Diabetologia* 1997; 40: 764—769.
- 28) Yamagishi S, Yonekura H, et al: Advanced glycation end products-driven angiogenesis in vitro. *J Biol Chem* 1997; 272: 8723—8730.
- 29) Horiuchi S, Araki N, et al: Immunochemical approach to characterize advanced glycation end products of the Maillard reaction. *J Biol Chem* 1991; 266: 7329—7332.
- 30) Nagai R, Ikeda K, et al: Conversion of Amadori product of Maillard reaction to N^ε-(carboxymethyl) lysine in alkaline condition, *FEBS LETTERS*, in press
- 31) Mizutani K, Ono T, et al: Photo-enhanced modification of human skin elastin in actinic elastosis by N^ε-(Carboxymethyl) lysine, one of the glycoxidation products of the Maillard reaction. *J Invest Dermatol* 1997; 108: 797—802.
- 32) Takata K, Horiuchi S, et al: Endocytic uptake of nonenzymatically glycosylated proteins is mediated by a scavenger receptor for aldehyde-modified proteins. *J Biol Chem* 1988; 263: 14819—14825.
- 33) Smedsrød B, Melkko J, et al: Advanced glycation end products are eliminated by scavenger-receptor-mediated endocytosis in hepatic sinusoidal kupffer and endothelial cells. *Biochem J* 1997; 322: 567—573.
- 34) Kodama T, Freeman M, et al: Type I macrophage scavenger receptor contains a-helical and collagen-like coiled coil. *Nature* 1990; 343: 531—535.

- 35) Vlassara H, Li YM, 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. *Molecular Med* 1995; 6: 634—646.
- 36) Neeper M, Schmidt AM, et al: Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of Proteins. *J Biol Chem* 1992; 267: 14998—15004.
- 37) Araki N, Higashi T, et al: Macrophage scavenger receptor mediates the endocytic uptake and degradation of advanced glycation end products of the Maillard reaction. *Eur J Biochem* 1995; 230: 408—415.
- 38) Suzuki H, Kurihara Y, et al: A role for macrophage scavenger receptors in atherosclerosis and susceptibility to infection. *Nature* 1997; 386: 292—296.
- 39) Barondes SH, Cooper DNW, et al: Galectins, structure and function of a large family of animal lectins. *J Biol Chem* 1994; 269: 20807—20810.
- 40) Yang R, Hsu DK, et al: Expression of galectin-3 modulates T-cell growth and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 6737—6742.
- 41) Vlassara H, Bucala R, et al: Pathogenic effects of advanced glycosylation: Biochemical, Biologic, and clinical implication for diabetes and aging. *Lab Invest* 1994; 70: 138—151.
- 42) Fu M, Wells-knecht KJ, et al: Glycation, glycooxidation, and cross-linking of collagen by glucose. *Diabetes* 1994; 43: 676—683.
- 43) Mullarkey CJ, Edelstein D, et al: Free radical generation by early glycation products: A mechanism for accelerated atherogenesis in diabetes. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 173: 932—939.
- 44) Yan SD, Yan SF, et al: Non-enzymatically glycated tau in Alzheimer's disease induces neuronal oxidant stress resulting in cytokine gene expression and release of amyloid b-peptide. *Nature Med* 1995; 1: 693—699.
- 45) Kaneko H, Fujii J, et al: DNA cleavage induced by glycation of Cu, Zn-superoxide dismutase. *Biochem J* 1994; 304: 219—225.
- 46) Kawamura M, Heinecke N, et al: Pathophysiological concentrations of glucose promote oxidative modification of low density lipoprotein by a superoxide-dependent pathway. *J Clin Invest* 1995; 94: 771—778.
- 47) Dandona P, Thusu K, et al: Oxidative damage to DNA in diabetes mellitus. *LANCET* 1996; 347: 444—445.
- 48) Knecht KJ, Dunn JA, et al: Effect of diabetes and aging on Carboxymethyllysine levels in human urine. *Diabetes* 1991; 40: 190—196.
- 49) Nagai R, Ikeda K, et al: Hydroxyl radical mediates N^ε-(carboxymethyl) lysine formation from Amadori product. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 234: 167—172.
-