特集 ● 腰痛の基礎研究

終末糖化産物 (AGEs) と椎間板変性

横須賀公章

Key words ■ 椎間板変性(Intervartebal disc degeneration), 終末糖化産物(AGEs : advanced glycation end-products), AGE レセプター (RAGE; receptor of AGEs)

要旨 : 近年の加速する高齢化社会において, 椎間板変性の発症機序を解明・整理することはますます重要となり, 臨床および基礎分野においてさまざまな研究が行われている. そこで, 今回われわれは最近注目されている老化関連物質である終末糖化産物(AGEs)と椎間板変性の関係について検討し, 髄核における aggrecan 分泌が AGEs の濃度かつ作用時間依存性に減少することを明らかにした. さらに, 炎症性サイトカイン(IL-1 β)が椎間板細胞の RAGE 発現を上昇させることを確認しており, 炎症による椎間板変性の悪性サイクルの可能性を示唆した. 現在のところ, この機序が AGE 化タンパクによる直接的な作用なのか RAGE を介する作用なのかは明確にされていないが, いずれにせよ, AGEs の蓄積が生体内のさまざまな場所で, 加齢性疾患の原因となっている可能性は大きい.

Summary

AGEs accumulate in all human tissues during aging and diabetes, thereby decreasing proteoglycan synthesis in articular cartilage. It was therefore hypothesized that AGE accumulation in nucleus pulposus cells might decrease the proteoglycan production, similar to that seen in articular cartilage. Our findings show that AGEs and RAGE were present in the nucleus pulposus of intervertebral discs. We have also demonstrated that AGEs suppress aggrecan expression at both the mRNA and protein levels. We propose the hypothesis that AGEs can accumulate over time in the nucleus pulposus and subsequently bind to the specific AGE receptor, thereby inhibiting the secretion of aggrecan. This might play an important role in the onset and progression of disc degeneration, similar to that seen in articular cartilage.

I. 髄核の褐色変性

変性椎間板が起こす髄核の褐色変性(図 1) (Coventry et al, 1945)の本態については,

以前より, 出血によるヘモジデリンの沈着 (HARRIS RI, MACNAB I, 1954), 髄核の壊死 (Bijlsma F, Peereboom JW, 1972), PAS 陽性細胞外顆粒状物質 (Pritzker KP, 1977) な

Kimiaki YOKOSUKA : Role of advanced glycation end-products (AGEs) in the pathogenesis of disc degeneration

久留米大学医学部整形外科 [〒 830-0011 福岡県久留米市旭町 67]

図1 髄核の褐色変性
左：正常 右：変性椎間板

図2 AGE
左：BSA 右：AGE-2

図3 アミノカルボニル反応

どがいわれていた。また、1991年にHormel SEらは、変性椎間板の髄核細胞が起す褐色変性は、特異的蛍光性のある蛋白糖化産物、すなわちAGEsの蓄積であると述べている。

Ⅱ. 終末糖化産物(AGEs: advanced glycation end products)とアミノカルボニル反応

アミノカルボニル反応(蛋白質のアミノ基と還元糖のカルボニル基の非酵素的反応=蛋白の非酵素的糖化)(図3)は、フランスの化学者Maillard LC (France)が1912年に報告し、以来、糖化反応やメイラード反応といわれるようになった。この褐変反応(browning reaction)は食品の加工や貯蔵の際に生じる、さまざまな反応に関与するため、食品化学分

野において古くから研究されてきた。その歴史を紐解くと、1953年Hodge JEらがmelanoidinという褐色色素(図2)を発見、その生成過程を報告し、1970年から生体内でも糖化反応が起こることが確認されBunn HFらがHbA1c(ヘモグロビン・エー・ワン・シー)を発見(糖尿病患者の糖化したヘモグロビンを測定)。1987年Cerami A (Rockefeller, NY, USA)がAGEs: advanced glycation end productsと命名した。

AGEsは糖とタンパクが反応し、アマドリ化合物を経て産生され、蛋白糖化反応の最終段階(後期)で産生されることより、終末糖化産物と呼ばれている。AGEsは肉眼的にはあめ色(図2)をしており、代表的なAGEsには、CML, CEL, Pentosidineなどがあり、

AGEs レセプターには一回膜貫通型と二回膜貫通型があり、代表的なものには、一回膜貫通型の RAGE, Garectin3-complex がある。

生体内・生体外で産生される AGEs があるが、その特徴として、体外で産生される AGEs にはほとんど害はないといわれてきた。しかし、近年の研究結果によると、① AGEs を多く含む飲料をラットに経口投与すると肝臓と腎臓で AGEs, RAGE 発現量が増加した (Yamagishi S, J Am Diet Assoc. 2004)。② 食事に含まれる AGEs の量に応じて血液中の AGEs の量が増加した (Uribarri J, J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 2007) との報告があり、経口摂取した AGEs が実は体内で蓄積することが明らかになった。また、生体内 AGEs の特徴としては、① 糖尿病や加齢(老化)により増加、蓄積する。② 体内のさまざまな臓器に蓄積する。③ 代謝回転の遅い組織に蓄積増加(靱帯や軟骨細胞)がある。さらに、生体内における AGEs の研究が進むに従い、現在ではさまざまな疾患との関連が報告されている。糖尿病性血管合併症(網膜症、腎症、神経障害、動脈硬化症)、神経変性疾患(アルツハイマー、筋萎縮性側索硬化症、パーキンソン病、クロイツフェルト・ヤコブ病)、悪性腫瘍などがあり、骨関節系統疾患では変形性骨関節症・関節リウマチなどがある。

Ⅲ. 関節軟骨と AGEs

近年、AGEs が生体内でさまざまな生理作用を示すことが明らかになり、整形外科領域においては軟骨変性に関する研究が進んでいる。関節軟骨には、他の人体組織に比べ AGEs の蓄積が多く、また加齢によってその蓄積量が増加することが知られている。

さらに、AGEs の蓄積は、コラーゲンやプロテオグリカンの生成を抑制し、また代表的なマトリックス分解酵素である MMP (matrix metalloproteinase) を介し軟骨基質の分解に作用すると報告されている。関節軟骨と AGEs の関係について、Groot らは、さまざまな研究結果を報告しており、そのなかで、① AGEs は経年的に関節軟骨に蓄積する。② AGEs 蓄積増加は proteoglycan 産生を減少させる。③ 変形性膝関節症患者の関節軟骨における RAGE 発現は正常人と比べると優位に高い、と報告している (DeGroot J, et al. Netherland)。

Ⅳ. 椎間板変性と AGEs

変形性骨関節症と AGEs との関係が明らかになるに伴い、椎間板細胞の性状が関節軟骨細胞と類似していることから、椎間板変性と AGEs の関係にも注目されるようになった。近年、椎間板と AGEs の関連についての報告が散見されるが、そのなかで、Nerlich らは、AGEs を加齢性変化の 1 つのマーカーとして考え、N-(carboxymethyl) lysine (CML) の椎間板への沈着が椎間板の加齢変化を表す最もよいマーカーであると報告している⁵⁾。また、Sivan らは、ヒト椎間板細胞への pentosidine の沈着は、関節軟骨細胞同様、protein turnover の重要な決定要素であるとしている⁶⁾。AGEs のなかでも pentosidine と CML は、その生成に糖化と酸化が関与しているため、Baynes らは、これらの AGEs を glyoxidation products と称し、生体内の酸化ストレスマーカーであるとしている。

今回、われわれは、椎間板細胞への AGEs の蓄積が、関節軟骨同様、プロテオグリカン生成を抑制し、コラーゲンの分解を促進させ、

図4 AGEsの髄核細胞への影響(realtime-PCR)

AGEs刺激でAggrecanの遺伝子発現量が82.4%, 74.4%, 49.2%と濃度依存性に減少。

変性へと導くのではないかと仮定し、ヒト椎間板髄核培養細胞モデルにおいて椎間板細胞とAGEsの関係について検討した。その結果、免疫染色にて、ヒト椎間板髄核細胞にAGEsとRAGEが存在することを確認し、髄核におけるaggrecan分泌がAGEsの濃度かつ作用時間依存性に減少することを初めて報告した(図4)。このことにより、AGEsは、加齢によって徐々に椎間板髄核へ蓄積していき、Aggrecanを減少させることにより、変性へと導くことが示唆された。

V. 炎症性サイトカイン(IL-1beta,etc)とRAGE (receptor of AGEs)

2005年にRichardらが、関節軟骨において、炎症性サイトカイン(IL-1betaなど)がRAGEの発現を増加させることにより、MAP kinase, NF-kB, MMP-13の活性を刺激し変性へと導くことを報告した³⁾。そこで、椎間板細胞においても同様のことが起こっているのかを調べたところ、椎間板細胞においても、IL-1beta刺激でRAGEの発現が優位に増加す

図5 IL-1βの髄核細胞への影響(realtime-PCR)

IL-1β刺激でRAGEの遺伝子発現量が増加。

ることを確認し、炎症による椎間板変性の悪性サイクルの可能性を示唆した(図5)。このことにより、変性性椎間板症、椎間板性疼痛、すなわち、疾病を引き起こす椎間板変性の原因にAGEs蓄積が関与している可能性が考えられた。

おわりに

以上より、加齢に伴うAGEsの蓄積は、髄核基質の代謝に悪影響をもたらす変性の発症や進行に関与しているものと考えられる。この機序がAGE化タンパクによる直接的な作用なのかRAGEを介する作用なのかは現在のところ解明されていない。また、炎症によりRAGE発現が増加することは、AGE-RAGE complexが椎間板変性の悪性サイクルを起こす可能性を示唆している。高齢者で変性しても痛みのない人がおり、若年者で変性があり痛みのある人がいる。また、変性して痛みがでるのか？ 痛みがでて変性するの

か？ などの疑問を解決するにはさらなる研究が必要と考える。

文 献

- 1) Scott JE, Bosworth TR, Cribb AM et al. The chemical morphology of age-related changes in human intervertebral disc glycosaminoglycans from cervical, thoracic and lumbar nucleus pulposus and annulus fibrosus. *J Anat.* 1994; 184: 73-82.
- 2) Hormel SE, Eyre DR. Collagen in the ageing human intervertebral disc: an increase in covalently bound fluorophores and chromophores. *Biochim Biophys Acta.* 1991; 1078: 243-250.
- 3) Loeser RF, Yammani RR, Carlson CS et al. Articular chondrocytes express the receptor for advanced glycation end products: Potential role in osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 2005; 52: 2376-2385.
- 4) DeGroot J, Verzijl N, Jacobs KM et al. Accumulation of advanced glycation endproducts reduces chondrocyte-mediated extracellular matrix turnover in human articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage.* 2001; 9: 720-726.
- 5) Nerlich AG, Schleicher ED, Boos N. 1997 Volvo Award winner in basic science studies. Immunohistologic markers for age-related changes of human lumbar intervertebral discs. *Spine.* 1997; 22 : 2781-2795.
- 6) Sivan SS, Tsitron E, Wachtel E et al. Age-related accumulation of pentosidine in aggrecan and collagen from normal and degenerate human intervertebral discs. *Biochem J.* 2006; 399: 29-35.
- 7) Baynes JW. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes.* 1991; 40 : 405-412.
- 8) Schleicher ED, Wagner E, Nerlich AG. Increased accumulation of the glycoxidation product N (epsilon)-(carboxymethyl) lysine in human tissues in diabetes and aging. *J Clin Invest.* 1997; 99: 457-468.
- 9) Yokosuka K, Park JS, Jimbo K et al. Advanced glycation end-products downregulate intervertebral disc cell production of proteoglycans in vitro. *J Neurosurg Spine.* 2006; 5 : 324-329.

*

*

*