

Original article

Evaluation *in vitro* of AGE-crosslinks breaking ability of rosmarinic acid

Daniel Jean¹⁾, Maryse Poulignon¹⁾, Claude Dalle²⁾

1) Institut des Substances Végétales, Beaumont, France

2) World Society Interdisciplinary Anti-aging Medicine, Paris, France

Glycative Stress Research 2015; 2 (4): 204-207

(c) Society for Glycative Stress Research

(原著論文：日本語翻訳版)

ロスマリン酸のAGE架橋 *in vitro* 分解能に関する考察

Daniel Jean¹⁾, Maryse Poulignon¹⁾, Claude Dalle²⁾

1) Institut des Substances Végétales, Beaumont, France

2) World Society Interdisciplinary Anti-aging Medicine, Paris, France

抄録

【目的】 様々な物質の糖化最終生成物 (advanced glycation end products: AGE) 分解に関する研究が数多くなされているが、我々が知る限りではそれらの物質の蛋白質架橋を分解する能力に関する研究は行われていない。本研究の目的は、ローズマリー (*Rosemarinic officinalis*) から抽出したポリフェノール酸 (ロスマリン酸 [rosmarinic acid]) が、リボースとアルブミンとの反応により形成されたアルブミン重合体を分解する能力を明確にすることである。

【方法】 アルブミンとリボースの *in vitro* 糖化反応により形成されたアルブミン重合体をサイズ排除クロマトグラフィー (SEC: Size Exclusion Chromatography) および蛍光定量法により分析した。透析膜を用いてアルブミン重合体からリボースを除去後、試験品のロスマリン酸、比較対照のアミノグアニジン (aminoguanidine) カルノシン および陽性対照 Alagebrium (ALT-711: Alteon) と反応させた。架橋分解による糖化反応回復能は、試験物質処理前と後の重合アルブミンと未反応アルブミンの比で評価した。

【結果】 ロスマリン酸は Alagebrium と同程度の架橋分解能を有することが示された。一方、糖化反応阻害剤であるアミノグアニジンとカルノシンには有意なアルブミン架橋分解作用が認められなかった。

【考察】 リボースとアルブミンによる糖化反応によって生成されるできる重合物は SEC および蛍光定量法で測定出来る。我々はロスマリン酸がこの重合反応を Alagebrium と同程度に回復出来ることを示した。

【結論】 ロスマリン酸は安全で *in vitro* では現在までこの分野の陽性対照物質とされている Alagebrium と同程度の効率で蛋白質 AGE 架橋を分解できる有望な物質だと思われる。この物質は糖尿病、皮膚老化、高齢者における血管損傷に起因性の腎症、神経障害及び網膜症などの病気の有望な治療法になる可能性がある。

KEY WORDS: 糖化最終生成物 (advanced glycation end products: AGEs)、
ロスマリン酸 (rosmarinic acid)、AGE 架橋、AGE 分解

はじめに

蛋白質窒素ラジカルと還元糖はいわゆるメラード反応に関与し、そのメカニズムは1953年に初めてHodgeにより凝集産物をつくると報告された¹⁾。糖化最終生成物 (advanced glycation end products: AGEs) は複雑な酵素が介在しない化学反応の最終産物で、それは隣接する蛋白質の分子間および分子内の架橋を引き起こし、それら蛋白質の持つ本来の機能を阻害しかつ本来の物理的特性を変えてしまう^{2,3)}。蛋白質の架橋は病態生理学的機構で糖尿病の合併症や加齢に関係する病気⁴⁾、例えば腎症、網膜症、血管機能障害および皮膚の柔軟性喪失などの原因因子である。一般に健常人では蛋白質の機能喪失は加齢に伴いゆっくりと進行する⁵⁾。糖尿病患者ではAGEsの蓄積と蛋白質の架橋形成が、グルコース濃度が高いために早く進む⁶⁾。

糖尿病患者の治療には、血糖のより良いコントロールによるAGEs産生を抑制したりあるいはAGEs生成抑制剤を使ったり、蛋白質AGEs架橋を壊す物質のAGEs分解剤を使用する。今日では*in vitro* および *in vivo* で多くの糖化反応阻害物質が知られているが⁷⁾、それら物質は糖化蛋白質をゆっくりと減少させるが、対象となる蛋白質は生成速度が中等度か早い蛋白質である。しかし、それらのAGEs生成阻害物質は皮膚中のコラーゲン、関節や動脈壁中のエラスチンのような再生速度が遅い蛋白質には著しく効率が悪い。蛋白質AGEs架橋を分解する安全な物質が見つければ、加齢や糖尿病の症状改善に大きな前進となるであろう。

そのような効果のある物質を見出す上で大きな問題となるのは、蛋白質のAGEs架橋には、ペントシジン、グルコセパンおよびMOLD (methylglyoxal-derived Lysine Dimer) などの様々な物質が関与していることである⁸⁾。従って、全ての糖化架橋を分解する普遍的なAGEs架橋分解物質を見つける事は不可能に近い。1996年にチアゾリウム誘導体 Alagebrium または ALT-711 (Alteon Inc, Montvale, NJ, USA) が有効なAGE架橋分解物質であることが報告されたが⁹⁾、どのような機序によって架橋を分解したのかについては記述がなかった。2013年の後半になって、それがアマドリ物質中にある架橋形成前の α ジカルボニル構造を分解することが示されている¹⁰⁾。

蛋白質の分子間架橋は分子の重合へと進む¹¹⁾。蛋白質と還元糖の反応後の重合の程度はAGEs関連の架橋の世界的マーカーと考えることができる。この研究はロスマリン酸 (Fig. 1) が *in vitro* でAGEs架橋を分解して、アルブミン架橋の割合が減少することを示すものである。

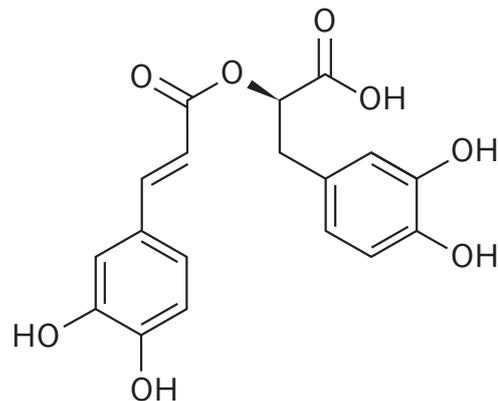


Fig 1. Structure of rosmarinic acid.

Molecular formula, C₁₈H₁₆O₈; molecular weight, 360.3.

材料と方法

糖化架橋アルブミンの準備

使用した試薬と材料は下記の通りである。：牛血清アルブミン (bovine serum albumin: BSA)、Fraction V $\geq 96\%$ (Sigma A9647, St. Louis, Mo, USA) D リボース $\geq 99\%$ (Sigma R7500)；酢酸 99.8% (Acros Organics, Geel, Belgium)；水酸化アンモニウム (A.C.S Sigma-Aldrich 22,122-8)；ベンゾイル透析チューブ、平均フラット幅 32 mm (1.27 inches) (Sigma D7884)；セファデックス G-50 (Sigma G-59-80)。

アルブミンの糖化

試料は次の様に調整した。24% (w/w) BSA を酢酸アンモニウム緩衝液 (pH 7.4) で調整。30% リボース液を酢酸アンモニウム緩衝液 (pH 7.4) で調整。その後 BSA 液 250 g とリボース液 500 g を混和、0.2 μ m 膜フィルターで濾過滅菌し、37°C にて 6 日間放置。糖化した BSA 溶液は 4 日間室温にて水で透析を行い、リボース除去により糖化反応を停止した。

サイズ排除クロマトグラフィー

(SEC: Size Exclusion Chromatography)

透析した BSA 液は酢酸アンモニウム緩衝液 (pH 7.4) 中でセファデックス G50 を用い SEC で精製した。その後黄褐色の分画を採取した。

アルブミン架橋の割合の決定

使用 HPLC 機材および試薬は下記の通りである。Waters 社製 Chromasolv Plus, Waters 社製 HPLC Integrity system および蛍光検出器 (Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA)、低温エバポレーター付光散乱検出器 (ELSD) (SEDEX 55:SEDERE, Alfortville, France) ; HPLC カラム (TSK Gel Super SW3000 ; 東ソーバイオサイエンス、東京、日本)。分析条件 : 流量 0.3 mL/min ; カラム温度 25°C、イソクラティック 24 min、アンモニア酢酸緩衝液 (pH 6.0) ; 酢酸 0.5mL ; 水 qs 100 mL、水酸化アンモニウム、qs (pH 6.0) ; 検出波長 ; 蛍光法 (励起波長 335 nm、放射波長 385 nm) ; 注入、10 μ L 水で希釈した試料 1/2.5 (v/v)。

BSA の架橋割合と分子の架橋分解能の測定

リボースによるアルブミンの糖化はアルブミンの重合へと導かれる。複数の重合体が分離され、それぞれの重合体に対するピーク面積から全体的に評価した。BSA 重合体の相対濃度はクロマトグラム領域の比率から求めた。

Att, Ate = 可能性のある架橋分解物による処理前と後の蛋白質の総エリア

Agt, Age = 可能性のある架橋分解物による処理前と後の蛋白質ポリマー (架橋 BSA) の総エリア

Tg = 可能性のある架橋分解物による処理前の糖化 BSA の架橋比率 (Tg = Agt/Ate)

Eg = 可能性のある架橋分解物による処理後の糖化 BSA の架橋比率 (Eg = Age/At)

可能性のある架橋分解物質の分解能 % の計算式を示す。

Dg = ((Tg / Eg) x100)

物質の AGE 分解能力

AGE 分解能評価物質として以下の試薬を使用した。Alagebrium、L-カルノシン (Sigma-Aldrich ref C9625、アミノグアニジン重炭酸塩 (Sigma-Aldrich Ref109266)、ロスマリン酸 (Sigma-Aldrich ref R4033)。

結果

試験試料の架橋切断能力を **Table 1** に、グラフを **Fig. 2** に示す。

考察

リボースとの反応の後、アルブミンは SEC で示された通り重合した。モノマーの割合は重合物に変換した。この重合は時間的に安定しており、Alagebrium とロスマリン酸で逆転された。両物質とも重合に関与したモノマーのおよそ 50% を逆転させ回収できた。ロスマリン酸はローズマリーより抽出、精製できる。

この結果は Alagebrium のアルファジカルボニル AGE ラジカルを分解する能力に加え、事前に生成された AGE 架橋アルブミンの分解も出来ることを示している。ロスマリン酸は同じような結果を示し、長期的に多くの文献で安全性が述べられている天然物質が少なくとも *in vitro* では蛋白質の架橋を逆転させることができ、それらは機械的構造的糖化蛋白質特性と機能障害の原点に関与するものである。

結語

ロスマリン酸はその安全性がよく知られた天然物である。我々は AGE 架橋の逆転の可能性を示し、それが有望な糖尿病、皮膚老化および加齢により損傷された血管に係る例えば腎症、神経障害および網膜症など多くの病気の有望な治療法となると考える。

謝辞

この研究の一部は 2015 年 3 月 28 日モナコで行われた第 13 回抗加齢医学国際会議で発表された。

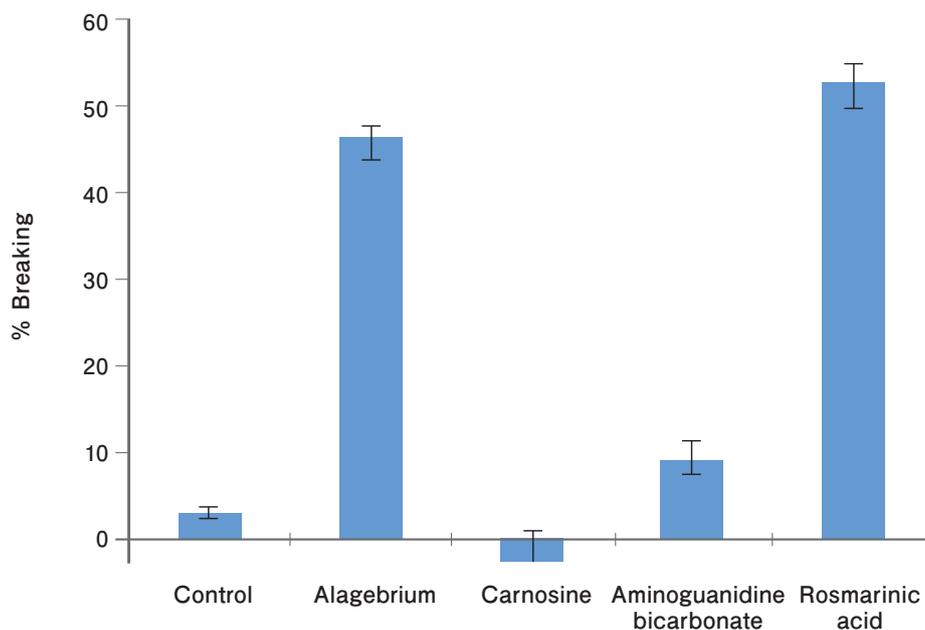
利益相反申告

この研究の一部は A2P ナクロダーム (Nacriderm) ラボラトリー (フランス、リヨン市近郊) の支援をうけた。

Table 1. Crosslinks breaking ability.

Tested molecules	Crosslinks breaking ability	P values
Control	3.18%	
Alagebrium	46.38%	< 0.001
Carnosine	-2.73%	0.345
Aminoguanidine bicarbonate	9.12%	0.072
Rosmarinic acid	52.66%	< 0.001

P values, probability values compared with control, by Student t test, n = 3.

**Fig 2. Crosslink breaking ability.**

Bars indicate standard deviation. Number of measurement; n = 3.

参考文献

- Hodge JE. Dehydrated foods: Chemistry of browning reactions in model systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1953; 1; 928-943.
- Verzija N, DeGroot J, Oldehinkel E, et al. Age-related accumulation of Maillard reaction products in human articular cartilage collagen. *Biochem J*. 2000; 350; 381-387
- Guillon JD, Le Pape A, Sizaret PY, et al. Effects of *in vitro* glycosylation on type-I collagen fibrillogenesis. *Biosci Rep*. 1981; 1; 945-954.
- Brownlee M. The pathological implications of protein glycation. *Clin Invest Med*. 1995; 18: 275-281.
- Nowotny K, Jung T, Grune T, et al. Accumulation of modified proteins and aggregate formation in aging. *Exp Gerontol*. 2014; 57: 122-131.
- Shah S, Baez EA, Felipe DL, et al. Advanced glycation endproducts in children with diabetes. *J Pediatr*. 2013; 163: 1427-1431.
- Monnier VM. Intervention against the Maillard reaction *in vivo*. *Arch Biochem Biophys*. 2003; 419: 1-15.
- Sell DR, Monnier VM. Molecular basis of arterial stiffening: Role of glycation-a mini-review. *Gerontology*. 2012; 58: 227-237.
- Vasan S, Foiles P, Founds H. Therapeutic potential of breakers of advanced glycation end product-protein crosslinks. *Arch Biochem Biophys*. 2003; 419: 89-96.
- Kim T, Spiegel DA. The unique reactivity of N-phenacyl-derived thiazolium salts toward α -dicarbonyl compounds. *Rejuvenation Res*. 2013; 16: 43-50.
- Perera HK, Handuwalage CS. Analysis of glycation induced protein cross-linking inhibitory effects of some antidiabetic plants and spices. *BMC Complement Altern Med*. 2015; 15:175.