

第1章 緒言

糖尿病性慢性合併症の成因を一元的に説明することは困難である。しかしながら、近年、糖尿病性慢性合併症の発症機序にポリオール経路が深く関与しているという証拠が蓄積しつつある（1～6）。

(I) ポリオールとポリオール経路

多くの組織では、グルコースをエネルギー源としている。細胞内に取り込まれたグルコースは解糖系の最初の律速酵素ヘキソキナーゼに親和性が強いため、大部分がグルコース-6-リン酸に転換され、各種代謝経路で活用されて行く。ところが、ごく一部のグルコースはピラノース環が開環しており、環状ではなく直鎖状のアルデヒド型となっているため、ヘキソキナーゼの基質とはならず、別の経路で代謝される。これがポリオール経路なのである。

ポリオールとは多価アルコールであり、アルデヒド基を持った糖（アルドース）が還元されて生成されるソルビトール、キシリトール、ガラクトールなどがある。このうち、アルドヘキソースであるグルコースが還元されて生成されるポリオールはソルビトールであり、これを例にとってポリオール経路を示すと図1のようになる。ポリオール経路はわずか2段階の反応からなるに過ぎない。この経路における最初の段階を触媒する律速酵素がアルドース還元酵素（AR）であり、NADPHを補酵素として、グルコースをソルビトールに転換する。生成されたソルビトールは次の段階でソルビトールデヒドロゲナーゼ（SDH）によって、フルクトースへと変換される。また、ガラクトースはARによってガラクトールに変換されるが、グルコースよりもガラクトースの方がARに対する親和性が強く、一方、ガラクトールのSDHに対する親和性はソルビトールよりも弱い。したがって、ソルビトールよりもガラクトールの方がポリオールとして蓄積しやすく、ポリオールの亢進状態を実験動物で作り出すときにはグ

ルコースよりも、ガラクトースを投与することの方が多。

(II) ポリオール経路とAR研究の歴史

ソルビトールは高山植物からの抽出物質として1872年に発見され(7)、1900年にはポリオール経路の存在が明らかとなった(8)。しかし、生体におけるポリオール経路の重要性や、糖尿病性慢性合併症との関連を示す報告の出現は1950年代まで待たなければならない。1956年にHersは精子のエネルギー源となるフルクトースが、グルコースからソルビトールを介して産生されることを示した(9)。一方、1955年にFriedenwaldらは糖尿病ラットやガラクトース食を与えたラットには白内障が起こり易く、どちらにも浸透圧の変化による水晶体線維の断裂を認めた(10)。1959年にはvan Heyningenが水晶体にはARが存在し、グルコースやガラクトースをそれぞれソルビトール、ガラクトールへ変換することを示した(11)。その直後から、Kinoshitaとその共同研究者らは過剰の糖によって引き起こされる白内障の発症機序解明に取り組み、次第に糖尿病性神経症、網膜症、腎症、角膜障害、虹彩毛様体障害などの発症に関してもポリオール経路が関与していることが示されるに及び(12、13)、1980年代になると世界の多くの糖尿病研究者たちがポリオール経路を研究の対象にするようになった。

ポリオール経路の律速酵素であるARは多くの種のさまざまな組織から精製され、その特性が明らかにされるとともに、そのアミノ酸配列から推定されるDNAプローブを用いて1989年、Bohrenらによってヒト胎盤AR cDNAの全塩基配列が決定され(14)、1990年、Nishimuraらによって、ヒト網膜および筋肉AR cDNAの全塩基配列が決定された(15)。

(III) ポリオール経路と糖尿病性慢性合併症

① ソルビトールの過剰蓄積と浸透圧仮説

通常、細胞内に取り込まれたグルコースはヘキソキナーゼに対して親和性が強いのでポリオール経路を介して利用されるグルコースはわずか3%に過ぎない(16)。しかし、糖尿病で高血糖状態になるとヘキソキナーゼによるグルコースの利用に限界が生じ、過剰のグルコースはARによってソルビトールに変換される。糖尿病状態ではARによるグルコースの利用は正常状態の4倍にも達し(16、17)、しかも、ARによるソルビトールの産生はSDH活性によるソルビトールからフルクトースへの転換を上回るため、細胞内にソルビトールが蓄積することになる。ソルビトールに代表される多価糖アルコールは極性を持っているので、一度、細胞内で生成されると細胞膜と反発し合い、膜外への拡散は阻害され、これも過剰蓄積の一因となっている(18)。さらに、フルクトースをエネルギー源として利用できる精子や肝臓などではフルクトキナーゼが存在し、フルクトースをフルクトース-6-リン酸に変換して解糖系を介して消費することが可能であるが、フルクトキナーゼの存在しない組織ではポリオール経路は袋小路となり、ソルビトールをフルクトース-6-リン酸を介して消費することができない。また、インスリン依存性のグルコース取り込みを行う筋肉、脂肪などの組織では、糖尿病状態においてインスリンに対して抵抗性を示すことも多く、高血糖にも拘らず細胞中のグルコース濃度の増加は少ない。逆に糖尿病性慢性合併症と関連の深い血管、末梢神経、水晶体、網膜、腎など、インスリン非依存性のグルコース取り込みを行う組織では、高血糖状態において細胞内グルコース濃度が上昇し、ARによってソルビトール、さらにはフルクトースが蓄積することになる(18~21)。

ソルビトールやフルクトースの過剰蓄積は細胞内浸透圧を上昇させ、細胞外からの水分移動を促進して細胞浮腫を引き起こす。その結果、細胞膜の機能維持に支障を来し、重篤な糖尿病性慢性合併症の発症を来すというのが「浸透圧仮説」である。この仮説は

糖尿病性白内障などの発症機序として有力視されており、細胞浮腫に伴う水晶体蛋白の変性・白濁が白内障として観察される（18、22、23）。

一方、ポリオール経路の生理的意義は十分に解明されていないけれども、細胞外の浸透圧上昇に対する防御反応として、細胞内の浸透圧上昇に寄与していることが腎髄質由来の培養細胞で示されており（24～26）、ポリオールは細胞内浸透圧調節に与るオスモライトであると考えられている（27、28）。

② ミオイノシトールの減少とポリオール経路

ミオイノシトールは9種の異性体を持つシクロヘキサンの総称であり、イノシトールの1種で構造的にはグルコースとよく似ている。ミオイノシトールの生理的意義は細胞膜機能の維持に重要なイノシトールリン脂質の一部を構成し、細胞外からの情報を捉えて細胞内に伝えるセカンドメッセンジャーの役割を担っていることである（29）。イノシトールリン脂質の代謝回転において、シチジンジホスホジアシルグリセロールはイノシトールホスファチジルトランスフェラーゼによる触媒作用でミオイノシトールと反応してホスファチジルイノシトール（PI）が生成される。さらに2つのリン酸基が付加され、PIはPIP₂となる。PIP₂はホスホリパーゼCの作用によって1、2-ジアシル-sn-グリセロール（DG）とイノシトール-1、4、5-三リン酸（IP₃）とに加水分解される。生成したDGはプロテインキナーゼCを活性化し、IP₃は細胞内Ca²⁺貯蔵部位からCa²⁺遊離を惹起する。したがって、細胞内のミオイノシトール濃度が減少すればイノシトールリン脂質の代謝回転は円滑に動かず、DG、IP₃の生成も不十分となり、細胞の情報伝達系に障害が生じると考えられる（図2）。正常の神経組織では、Na⁺/K⁺-ATPaseの作り出すNa⁺の濃度勾配に依存してミオイノシトールが細胞内に取り込まれ、その濃度は血中の30～100倍（30～32）にも達するが糖尿病状態の神経組織では細胞内のミオイノシトール量が正常組織に比べて14～39%減少する（30、33）。このミオイノシトールの減少は、以下の3つの原因によって説明されている（6）。まず第1に、ミオイノシトールとグルコースは構造類似

体であるため、高血糖によってミオイノシトールの取り込みが拮抗阻害される。第2に、③で説明するように、糖尿病状態の神経組織では Na^+/K^+ -ATPase活性が低下しているので、 Na^+ 依存性であるミオイノシトールの取り込みが低下する。第3に、詳細な機序に関しては不明であるが、AR阻害剤の投与によってミオイノシトールの減少が抑制されることから、ポリオール代謝の亢進もミオイノシトール減少の原因と考えられる（34、35）。

③ Na^+/K^+ -ATPaseの活性低下とポリオール経路

上に述べたように、ポリオール代謝の亢進は細胞内ミオイノシトールの減少をもたらす。イノシトールリン脂質の代謝回転の障害によって、DGと IP_3 の生成が不十分になり、プロテインキナーゼCと細胞内 Ca^{2+} による情報伝達に支障を来す。 Na^+/K^+ -ATPaseはプロテインキナーゼCや Ca^{2+} 依存性蛋白キナーゼによって、その活性調節を受けているので、これらの情報伝達の障害は Na^+/K^+ -ATPaseの活性低下を引き起こすと説明されている（4）。実際、糖尿病状態の神経組織中のプロテインキナーゼCを活性化すると、すみやかに Na^+/K^+ -ATPaseの活性低下やミオイノシトールの低下は改善される（36）。また、 Na^+/K^+ -ATPase活性の低下は Na^+ 依存性のミオイノシトール取り込みを低下させるので、悪循環が起こる（6、図2）。

④ ARの存在部位（37～42）

ARに対する抗体を用いた免疫組織染色などの結果より、ARの存在する組織あるいは細胞の種類が明らかにされている。眼では水晶体上皮、角膜上皮、網膜毛細血管の周辺細胞などである。神経組織では末梢神経のシュワン細胞にARが存在し、中枢神経系にはシュワン細胞がないので、糖尿病性慢性合併症の直接の標的臓器にはならないと説明されている。また、神経内鞘毛細血管の周辺細胞にも網膜と同様にARの存在が示されている。腎糸球体においては、足細胞とメサンギウム細胞とにARが存在する。

⑤ A R 阻害剤

ポリオール経路が糖尿病性慢性合併症と深く関わっているという所見が集積されるにつれて、その律速酵素であるA Rを阻害すれば合併症の発症を予防したり、進行を阻止したりできるのではないかと考えられるようになった。しかしながら、A Rの3次元構造は明らかにされていないので、現在までに合成されたA R阻害剤はほとんど全て、経験的に合成された多くの化合物の中からA R活性の阻害効果をスクリーニングして選出されたものである。したがって、A R阻害剤の中には効果の弱いものや副作用が強くて臨床的には使用できないものもある(6、43)。また、動物実験ではA R阻害剤を早期から大量に投与してその予防効果を検討することが多いのに対して、糖尿病患者においては合併症が発症してからA R阻害剤を投与することが多く、投与量も比較的少ないので、その効果は動物実験から期待されたほどではなかった。したがって、今後、優れた効果を有し、副作用の軽微なA R阻害剤の開発が待たれている。

(IV) 研究目的

糖尿病性慢性合併症の克服は世界共通の課題であり、ポリオール代謝の亢進はその発症に深く関与している。しかし、ポリオール代謝亢進のkey enzymeであるA Rを分子生物学的に詳細に検討した研究は少ない。また、臨床的にはより良いA R阻害剤の開発が待たれている。そこで我々はヒトアルドース還元酵素(h A R)のc D N Aをバキュロウィルス-昆虫細胞系に導入してh A Rを大量発現し、詳細な検討を加えるとともに、A R阻害剤のスクリーニングテスト用の標準蛋白標品として、均質で高純度のh A Rを供給できる系の確立を目指した(第2章)。さらに、部位特異的変異誘発法を用いて、変異A Rを発現させ、h A Rの構造活性相関を検討した(第3章)。

一方、糖尿病性慢性合併症の成因は多元的であるため、合併症の発症機構における

ポリオール経路の位置付けを明らかにする必要がある。すなわち、実験動物において、ポリオール代謝の亢進だけで糖尿病合併症をどこまで再現し得るか、どこまで説明し得るかという問題が提起される。そこで我々はhARcDNAを授精卵に導入したトランスジェニックマウスを作成し、それを解析することによってポリオール代謝の亢進と糖尿病性慢性合併症の発症機構との関連を検討することを目指した。(第4章)。