

Toxic AGEs (TAGE) と健康 : I. 細胞障害因子としての TAGE

坂井(逆井)亜紀子[#], 竹田健史, 竹内正義^{**}

金沢医科大学総合医学研究所先端医療研究領域糖化制御研究分野

要約 : 果糖ブドウ糖液糖 (high-fructose corn syrup, HFCS) や砂糖の習慣的過剰摂取は, 生活習慣病 (lifestyle-related diseases, LSRD) の発症・進展に関連している。近年, 終末糖化産物 (advanced glycation end-products, AGEs) は, LSRD に関する研究の焦点となっている。AGEs の影響を抑えることが, LSRD の予防および治療に応用できると考えられるが, AGEs の構造は反応する糖やカルボニル化合物の種類によって異なるため, どのAGEs構造が病因であるかを確定することは困難を極めている。筆者らは, glucose および fructose の代謝中間体である三炭糖の glyceraldehyde (GA) に由来する GA-AGEs の細胞内蓄積が, 様々な細胞に障害を及ぼして LSRD の発症・進展に関連していることを明らかにし, toxic AGEs (TAGE) という概念を提唱している。現代の食生活の特徴 (HFCS や砂糖, 食事性AGEs の習慣的な過剰摂取) に伴って生じる糖代謝の歪みから, 細胞内で過剰に産生されたGAが細胞内蛋白質と結合してTAGEを生成・蓄積し, 各種細胞障害を引き起こすことが示されている。本総説では, ヒトの健康に対する「新規ターゲットTAGE」の細胞障害因子としての研究概要について述べる。

キーワード : 終末糖化産物 (AGEs), toxic AGEs (TAGE), 細胞障害因子, 生活習慣病

はじめに

果糖ブドウ糖液糖 (high-fructose corn syrup, HFCS) や砂糖などを多く含む飲料ならびに加工食品の習慣的な過剰摂取は, 肥満やメタボリックシンドローム (metabolic syndrome, MetS) の発症に関連しているほか, 糖尿病 (diabetes mellitus, DM) やDM血管合併症, 心血管疾患 (cardiovascular disease, CVD), 非アルコール性脂肪肝炎 (nonalcoholic steatohepatitis, NASH), アルツハイマー病 (Alzheimer's disease, AD) などの発症・進展に関与していることが報告されているが, そのメカニズムは不明な点が多い (1-4)。高血糖状態で促進的に形成される終末糖化産物 (advanced glycation end-products, AGEs) は, 蛋白質と糖の間の非酵素的糖化反応 (別名, Maillard反応) を介して生成される (5, 6)。この反応に関与する糖 (glucose, fructose, glyceraldehyde (GA) など) またはカルボニル化合物 (glyoxal (GO), methylglyoxal (MGO), 3-deoxyglucosone (3-DG), glycolaldehyde など) は, 生成

されるAGEsの構造に影響を及ぼす。また, AGEsは複雑な反応を繰り返して生成されるため, 生体内では数十種類のAGEs構造が共存していると推定されるが, 未だ全てのAGEs構造の解明には至っていない (5-9)。

糖質の過剰摂取による糖代謝経路 (解糖経路, ポリオール経路, および果糖代謝経路) の亢進は, 細胞内におけるGAの過剰産生につながり (10, 11), GA由来AGEs (GA-AGEs) の生成・蓄積に関与する。GA-AGEsは他のAGEsに比べて細胞毒性が強い (12, 13)。これまでの研究により, 体内におけるTAGEの生成・蓄積は, DMおよびDM血管合併症, NASH, CVD, AD, および癌などの生活習慣病 (lifestyle-related disease, LSRD) の発症・進展の病因に関与していることが示唆されている (14-24)。最近の研究では, TAGEの細胞内蓄積は多くの細胞で細胞障害を引き起こすことが明らかになってきている (25-37)。また, 細胞障害に伴って細胞外へ漏出したTAGEは, AGEs受容体 (receptor for AGEs, RAGE) に結合して細胞内シグナル伝達や遺伝子発現, 炎症誘発性分子の放出などに影響を与え, 様々な細胞において活性酸素種 (reactive oxygen species, ROS) の産生を増加させる (11, 17)。本総説では, 各種細胞内TAGE蓄積と細胞障害に関する研究概要について述べる。

* 金沢医科大学総合医学研究所先端医療研究領域糖化制御研究分野
石川県河北郡内灘町大学1-1

E-mail: takeuchi@kanazawa-med.ac.jp

[#] 坂井(逆井)と竹内は共同筆頭著者とみなす

2023年3月31日受理

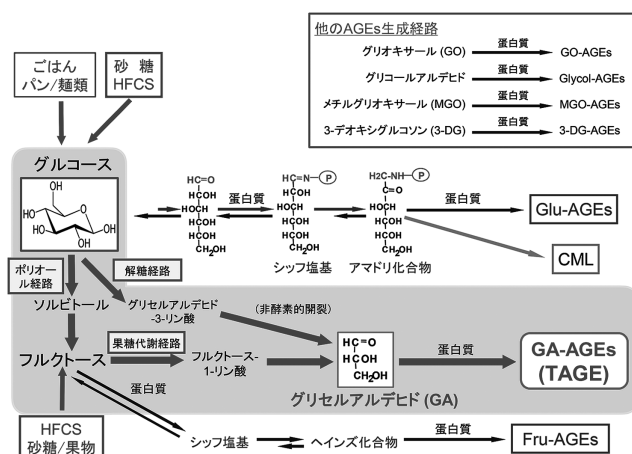


図1. 生体内におけるAGEs生成経路の概要

GA-AGEs: グリセルアルデヒド由来AGEs, TAGE: 毒性AGEs, Glu-AGEs: グルコース由来AGEs, Fru-AGEs: フルクトース由来AGEs, CML: N^ε-カルボキシメチルリジン, GO-AGEs: グリオキサール由来AGEs, Glycol-AGEs: グリコールアルデヒド由来AGEs, MGO-AGEs: メチルグリオキサール由来AGEs, 3-DG-AGEs: 3-デオキシグルコン由来AGEs, HFCS: 果糖ブドウ糖液糖。

1. AGEs生成経路

これまでAGEsは、生体内において主に glucose と蛋白質から生成される (glucose由来AGEs, Glu-AGEs) と考えられてきたが、glucoseの代謝中間体や分解物、Maillard反応中間体などからも生成されることが明らかになっている。実際、糖尿病性腎症 (diabetic nephropathy, DN) の血液透析 (hemodialysis, HD) (DN-HD) 患者血中においては、7つの異なるクラスのAGEs (GO-, glycolaldehyde (Glycol)-, MGO-, 3-DG-, Glu-, fructose (Fru)-AGEs, およびTAGE) と N^ε-(carboxymethyl)lysine (CML) が検出されている (38-41)(図1)。

各種AGEsのなかでも、CMLやMGO-AGEsあるいはGlu-AGEsがLSRDの分野での研究の焦点となっている。一方、DN-HD患者の血清AGEs画分は神経細胞毒性を発揮することが示されているが、この細胞毒性作用はTAGE構造に対し中和作用を発揮する抗TAGE抗体の添加によってのみ抑制されることが明らかとなっている (22, 42)。言い換えれば、神経細胞障害は抗TAGE抗体によって認識されるTAGE構造によって誘発される。また、TAGEはRAGEに対して強い結合親和性を持ち (43, 44)、その結合はnicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced (NADPH) oxidase (NOX) によるROSの産生、血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) の発現、および多くの細胞における炎症性サイトカインの産生を誘導し (11, 17, 45, 46)、これら全ての現象がLSRDの発症・進展に関与することが知られている。

2. TAGE前駆体GAの産生経路

体内における TAGE 前駆体 GA の産生経路として、次の 3 つの経路が知られている (10, 11)。1) 解糖経路中間体として生成する glyceraldehyde-3-phosphate (GA-3-P) が、非酵素的な脱リン酸化を受けて GA が産生する経路。2) 果糖代謝経路の鍵酵素である fructokinase および aldolase B の作用により、fructose から直接 GA が産生される経路。3) 高血糖状態において解糖経路の副経路であるポリオール経路で生成された fructose が、上記果糖代謝経路により GA を産生する経路である。

このようにして産生されたGAは、化学構造上極めて反応性の高い還元糖であることから、細胞内蛋白質と速やかに反応してTAGEを生成する。従って、glucoseおよびfructoseからGAを産生する経路を有する多くの細胞では、細胞内でTAGEが生成・蓄積することが示唆される。実際に、免疫組織染色において、DMラット血管壁 (47)、NASH患者肝組織 (48)、AD患者脳 (49)、およびヒトメラノーマ組織 (50) などにTAGEの局在を確認している。また、GA前駆体の一つであるGA-3-Pを1,3-bisphosphoglycerateに変換するGA-3-P dehydrogenase (GAPDH) は解糖経路の鍵酵素であるが、AD患者脳ではGAPDH活性の低下が報告されている (51) ことから、「AD、糖代謝異常、およびGA産生によるTAGE蓄積」の三者の関連性が示唆される。

3. 細胞内TAGE蓄積と各種細胞障害

筆者らは、TAGEがRAGEを介し、DMおよびDM血管合併症の発症・進展に強く関わっていることを明らかにしてきた(14-17)。一方、TAGEは糖代謝が行われる細胞内が産生源と考えられるため、血中TAGE量の上昇は、各種細胞内TAGEの生成・蓄積に伴う直接的な細胞障害に付随していると予想される(「II. 生活習慣病予測マーカーとしてのTAGE」参照)。そこで、細胞内TAGE蓄積と細胞障害との関連について検討した結果、細胞内TAGEの生成・蓄積は、肝細胞(25-28)のほか、心筋細胞(29)、心臓線維芽細胞(30)、中枢神経細胞(31-33)、脾 β 細胞(34)、筋芽細胞(35)、骨芽細胞(36)、および睪管上皮細胞(37)において各細胞障害を引き起こすことが明らかになってきている。

1) TAGE蓄積と肝細胞障害

生活習慣の欧米化に伴ってMetSの有病率は世界的に増加しており、MetSの表現型である非アルコール性脂肪性肝疾患 (nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD) は、現在最も多い肝疾患である (4)。NAFLDは非アルコール性脂肪肝 (nonalcoholic fatty liver, NAFL) から線維化を起こすNASHを包括する疾患群であり、肝硬変、肝不全、肝癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) へと進行する可能性がある疾患スペクトラムである。筆者らは肝細胞内におけるTAGEの生成・蓄積とNASHの発症・進展との関連について検討してきた。高果糖条件下で培養した肝細胞内 (52)、あるいは高果糖・高脂肪食で飼育したラットの肝臓内においては複数のTAGE修飾を受ける蛋白質の生成・蓄積が観察

されることを明らかにしている (53)。また、正常ラットに10% HFCSを自由摂取させると、肝組織内でのTAGEの蓄積および血中TAGEレベルの上昇がみられている (54, 55)。さらに、高AGEs含有飲料を正常ラットに投与すると肝臓内でGlu-AGEsの蓄積をきたすのみならずRAGEの発現上昇傾向が観察され (56)、飲料中には含まれていないTAGEの生成・蓄積も観察されている (17, 未発表データ)。以上の研究から、HFCSや砂糖、食事性AGEs (主に、Glu-AGEs (57)) の習慣的な過剰摂取に伴う代謝異常などが原因で肝細胞内にGAが過剰産生されてTAGEの生成・蓄積が促進されることが示唆されている。

(1) 細胞内TAGEと肝細胞障害

臨床検体におけるTAGEの局在は、疾患との関連性について論ずるにあたり重要な知見である。実際に、ヒトのNAFL患者の肝細胞にはTAGEはほとんど検出されない一方、NASH患者の肝臓にはTAGEが蓄積されていることが明らかになっている (48)。しかしながら、TAGEが疾患にどのように関与しているのかについては不明な点が多い。そこで、本章では疾患の発生機序とTAGE蓄積に伴う細胞毒性の共通点から、TAGEのNASH発症・進展への関与の可能性について議論する。

i) TAGEと細胞死

肝実質細胞の細胞死は、NASHにおける特徴の一つである。肝細胞死を引き起こす原因の解明は病態解明につながるため、筆者らはTAGEと細胞死の関係について解析を進めてきている。ヒト肝実質細胞由来の株化細胞HepG2/Hep3Bや初代培養肝細胞、およびヒト人工多能性幹細胞 (human induced pluripotent stem cells, hiPSC) から分化した肝細胞様細胞 (hepatocyte-like cells, HLC) (hiPSC-HLC) をTAGE前駆体であるGAで処理すると、TAGE蓄積と相関して細胞死が引き起こされた (25-28)。特にHepG2細胞においては周辺の細胞に大規模な炎症反応を引き起こす可能性のあるネクロシス様の細胞死が観察されている (26)。ネクロシス様細胞死はNASH疾患部位において実際に検出されていることから (58)、これらの細胞死の原因の一つがTAGE蓄積によるものである可能性が示唆される。

ii) 細胞内におけるTAGE修飾の標的蛋白質

肝細胞におけるTAGE蓄積と細胞死が相関することが示唆されるが、その過程においては様々な蛋白質のTAGE修飾による機能異常が予想される。実際に、これまでに細胞機能の維持などに重要な働きをもつ蛋白質がTAGE修飾を受けていることが報告されている。(i) Hep3B細胞においては、GA処理により分子シャペロンとして働く熱ショック蛋白質70 (heat shock protein 70, Hsp70) ファミリーであるheat shock cognate 70 (Hsc70) のTAGE修飾による異常架橋構造が観察され、シャペロン活性の低下が引き起こされることが示されている (25)。(ii) HepG2細胞においては、GA処理によりアポトーシス実行因子であるcaspase-3がTAGE修飾による異常架橋構造を形成することが明らかとなった。Caspase-3はアポトーシス誘導条件下においてはプロテアーゼ活性を発揮するが、TAGE修飾により酵素活性が失活し、下流

のpoly(ADP-ribose) polymerasesの切断が行われなくなることからアポトーシス経路の動作阻害につながることが明らかになっている (26)。(iii) GA処理または高果糖含有培地で培養したHep3B細胞内では、RNA結合蛋白質であるheterogeneous nuclear ribonucleoprotein M (hnRNPM) がTAGE修飾蛋白質として同定されている。hnRNPMは、転写および翻訳の調節、選択的スプライシング、mRNAの安定性など、核酸代謝における多くの過程に関与している。また、hnRNPMのノックダウンにより、細胞から分泌されるエクソソームを含む細胞外空間に関連する遺伝子の発現レベルが変化することから、エクソソームの機能変化と関連していることが示唆された (52, 59)。

iii) 細胞内TAGE蓄積と酸化ストレス

TAGE修飾による蛋白質の機能不全は、細胞におけるストレス防御機構の脆弱性もしくは異常蛋白質の増加といったストレスそのものの誘発につながり、細胞死を容易に引き起こすことが予想される。細胞内において引き起こされる代表的なストレスとして酸化ストレスが挙げられる。NASHとの関係においては、疾患の発症への酸化ストレスの関与が報告されている (60, 61)。そこで、細胞内TAGE蓄積と酸化ストレスについて解析を行った結果、TAGEの細胞内蓄積によって引き起こされる肝細胞死が抗酸化物質であるN-acetyl-L-cysteineによって抑制されることが明らかになった (27)。また、細胞内TAGE蓄積と関連したROSの上昇が観察され、TAGE蓄積による細胞死の引き金がROSであることが示唆された。細胞内酸化ストレス上昇の原因としては抗酸化機構の破綻、もしくは酸化ストレスの亢進が挙げられる。抗酸化機構については細胞内TAGE蓄積した細胞においても正常な細胞と同程度のcatalase活性が観察され、抗酸化機能は維持されていることが示された。加えて、TAGE蓄積により酸化ストレス応答に働くnuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) およびhemeoxygenase-1のmRNA発現レベルの上昇がみられ、酸化ストレスに対して防御機構が働くことが示唆された (27)。以上の結果から、これらの抗酸化機構が破綻した可能性は低いと考えられる。一方、TAGE蓄積した肝細胞においては、ミトコンドリア膜電位に異常がみられた。すなわち、ミトコンドリア異常により細胞内のROSレベルが増加して、酸化ストレスの上昇につながったと考えられる。NASHにおいてはミトコンドリアの形態異常や機能障害が発症に関与することが報告されており (62)、これらの異常におけるTAGEの関与が示唆される。

加えて、ROSは、NASHにおける炎症反応を引き起こすことが知られている。ROSは、ヒト正常肝実質細胞株L-02細胞において、炎症のマーカーであるC-reactive protein (CRP) の発現レベルを増加させることが示されている (63)。hiPSC-HLCにおいては、TAGEの蓄積に伴い、炎症関連遺伝子Interleukin-6 (IL-6)、IL-8および単球走化性因子 (monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1) の発現が上昇していることが明らかとなった (28)。これらのことから、NASHに特徴的なROSによる炎症反応の開始が細胞内TAGE蓄積に依存して引き起こされることが示唆された。

(2) 細胞外TAGEと肝実質細胞障害

細胞内のみならず、細胞外TAGEも肝細胞の炎症反応に関与することが報告されている。Hep3B細胞においては、TAGEの添加によりCRPの発現レベルを上昇させることが示されている(64)。一方、TAGE-RAGE相互作用を抑制する抗RAGE抗体で前処置することにより、CRPの発現は抑制される。また、CRPの発現はRAS-related C3 botulinus toxin substrate 1 (Rac-1) により転写因子である nuclear factor-kappa B (NF- κ B) や NOXが活性化される経路により制御されるが、NF- κ B や NOX4のいずれもNASH患者およびモデルマウスで強く発現している(65, 66)。NOXはROSを発生させることから、細胞外TAGEによる作用においても細胞内でのROSの上昇が引き起こされ、炎症反応を誘発することが示唆される。

細胞外TAGEの作用は炎症反応のみならず、癌への進展にも関与する可能性が示唆されている。癌細胞はVEGFを分泌し、周囲の血管新生を促すことが明らかとなっている。Hep3B細胞において、細胞外TAGEの添加処理によってVEGFの発現量が増加することが示されている(45)。また、TAGEで刺激されたHep3B細胞の培養液中には、血管内皮細胞 (endothelial cells, EC) の増殖、遊走、管腔形成を促進するなんらかの物質が含まれていることが報告されている(45)。すなわち、TAGE-RAGEシグナルによってHep3B細胞におけるVEGFの発現が上昇し、癌細胞の血管新生能が上昇することが示唆された(19)。

さらに、*in vivo*においても肝臓におけるTAGE蓄積とVEGFの関連性が報告されている。高AGEs飲料を経口投与したラットにおいて肝VEGFの発現とTAGEの蓄積が誘発され(17, 56, 未発表データ)、HCCへの進展に食事性AGEsが関与することが示唆される。これらの知見を総合すると、TAGEはRAGEとの相互作用により、癌細胞の増殖や浸潤に関与する可能性がある(「7) TAGE蓄積と癌細胞障害」参照)。

(3) 細胞外TAGEとヒト肝星細胞障害

肝線維症は、NASHを含む慢性肝障害による細胞外マトリックス (extracellular matrix, ECM) 分子の蓄積を特徴とし、その進行は肝硬変を誘発する。正常な状態ではヒト肝星細胞 (human satellite cells, HSC) は静止しており、その主な機能はビタミンAを貯蔵することである。一方、慢性肝障害では、transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1), tumor necrosis factor- α (TNF- α), platelet-derived growth factor receptor- β (PDGFR- β) およびそのリガンドPDGF subunit Bなどの様々なサイトカインによってHSCが活性化され、その後、線維芽細胞様細胞への分化とcollagen type I (COL-I) などのECM物質の大量分泌を引き起こす。

細胞外TAGEがHSC株LI90細胞に与える影響を解析した結果、TAGE-RAGE-NOXシグナル伝達を介して細胞内のROS産生の上昇が誘導された。さらに、TAGE処理細胞では線維化遺伝子 (α -smooth muscle actin, TGF- β 1, COL-I alpha 2 chain) のmRNA発現量が増加することが明らかとなった(67)。また、炎症に関与するMCP-1の発現量も上昇した。これらの結果から、TAGEは

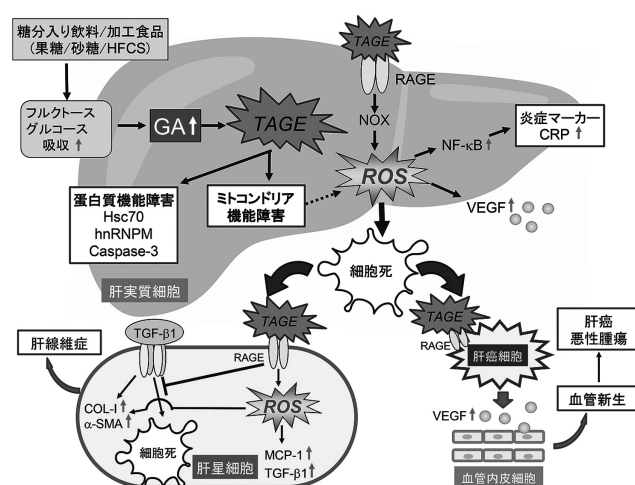


図2. TAGE蓄積と肝細胞障害

糖分入り飲料や加工食品の習慣的な過剰摂取は、糖代謝中間体のGA濃度を上昇させ、細胞内蛋白質のTAGE修飾を促進する。TAGEの生成・蓄積は、蛋白質の機能障害やミトコンドリア機能障害を引き起こしてROS産生を上昇させ、最終的には肝細胞死を引き起こす。肝細胞死に伴ってTAGEが細胞外に漏出し、TAGE-RAGE軸を介して周囲の細胞に影響を及ぼすことが示されている。HFCS: 果糖ブドウ糖液糖, GA: グリセルアルデヒド, TAGE: 毒性AGEs, RAGE: AGEs受容体, NOX: ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸還元型 (NADPH) オキシダーゼ, Hsc70: heat shock cognate 70, hnRNP: ヘテロ核リボ核蛋白質M, ROS: 活性酸素種, NF- κ B: 核内因子カッパB, CRP: C-反応性蛋白, VEGF: 血管内皮増殖因子, TGF- β 1: 形質転換増殖因子- β 1, COL-1: コラーゲンI型, α -SMA: α -平滑筋アクチン, MCP-1: 単球走化性因子-1。

RAGEを介してROSの産生とHSCの活性化を促進するため、肝線維化の発症・進展に関与していることが示唆された。

さらに、TGF- β 1処理したHSC株LX-2細胞ではcaspase経路を介したアポトーシスが検出され、この効果はTAGEの併用により有意に抑制された(68)。また、各細胞におけるCOL-IのmRNA発現量に大きな変化は見られなかったが、TGF- β 1とTAGEの共処理により、COL-I蛋白質の培養液への分泌が有意に増加した。これらの知見を総合すると、TGF- β 1処理により活性化されたHSCにおいて、アポトーシスの抑制を介してTAGEがCOL-IなどのECM分子の総産出を促進することが示唆された。

以上の結果は、NASHによる慢性炎症時における肝実質細胞死とそれに伴う活性化HSCによる線維化亢進の過程などにおいても、TAGEが重要な役割を果たしていると考えられる(69)(図2)。

2) TAGE蓄積と心筋および心臓線維芽細胞障害

CVDは、心筋細胞の機能不全と細胞死によって引き起こされる。心臓線維芽細胞 (cardiac fibroblasts, CF) は、心筋細胞からのTGF- β などの特定のシグナルによって活性化および分化し、細胞障害に重要な役割を果たしている。筆者らは、細胞内

TAGEが心筋細胞の拍動数の低下および細胞死を誘発することを明らかにした (29)。また、急性心筋梗塞患者ではatorvastatinによる血中TAGE量の低下に伴う心保護作用の効果が示されており、TAGEによるCVDへの関与が示唆された (13, 70, 71)。

(1) 細胞内TAGEと心筋細胞障害

TAGEの生成・蓄積と心筋細胞障害との関連について、心拍動の観察が可能なラット新生仔から単離した初代培養心筋細胞を用いて検討した結果、GA処理によりオートファジー活性の指標の一つであるmicrotubule-associated protein 1 light chain-3 (LC3)-IおよびLC3-II/LC3-I比が時間依存的に減少することから、細胞内TAGE蓄積はオートファジー機能の阻害と関連することが示された。また、オートファジー機能の低下を伴った拍動数の低下と、細胞死を誘導することを見出した (29)。さらに、心疾患と血中TAGE量との相関については、多くの研究成果が明らかになってきている (13, 70, 71)。加えて、GA処理によるTAGEの細胞内蓄積は、ヒトの初代培養心筋細胞でもみられ、細胞内TAGEは細胞障害を誘発して心疾患に関与する可能性が考えられる。

最近、心筋細胞内でTAGE修飾を受ける蛋白質の一つとしてHsp90 β およびその高分子量複合体を免疫学的に同定し、Hsp90 β のTAGE修飾に伴ってLC3-IIおよびLC3-II/LC3-I比の蛋白質レベルが低下することを明らかにした (未発表データ)。すなわち、TAGEはLC3-IIの生成に関与する蛋白質など、オートファジー関連経路の調節に関与する蛋白質の機能を変化させることが示唆されている。

(2) 細胞内TAGEとCF障害

CFは、心筋細胞からのTGF- β などの特定のシグナルによって活性化されて心臓線維芽細胞に分化し、collagenなどのECMに関連する蛋白質を産生および分泌して心臓組織を保護する (72)。また、障害を受けた心臓組織のリモデリングにも重要な役割を果たしている。CFをGAで処理した結果、細胞内TAGEの生成・蓄積に伴って細胞死が誘導された (30)。一方、生理的濃度よりも約10~30倍高いTAGEの添加処理では細胞死を誘発しなかった (30)。すなわち、細胞内TAGEがCFの細胞死を誘発し、心臓の修復を直接抑制する可能性が推察された。

(3) 細胞外TAGEと心筋細胞およびCF障害

細胞外TAGEはCVDとの関連性が示されており (13, 70, 71)、CVDに関与すると考えられる血管系の細胞 (内皮細胞、周皮細胞、平滑筋細胞) とTAGEによる細胞障害性について解析が行われている。細胞外TAGE-RAGE軸の活性化がROSの細胞内産生と周皮細胞におけるNF- κ Bの活性化につながることが報告されている (17)。これはさまざまな遺伝子の発現を上昇させることが報告されているアテローム性動脈硬化症と炎症に関連し、DMにおけるCVDの発症・進展を促進する。心筋細胞とCFは両細胞ともにRAGEを発現するため、TAGE-RAGE軸によってこれらの細胞に細胞毒性反応が誘発される可能性がある (図3)。しかしながら、CFと同様TAGE修飾を受けたbovine serum albumin (BSA) をモデルとして行った研究では、細胞外TAGEは心筋細胞

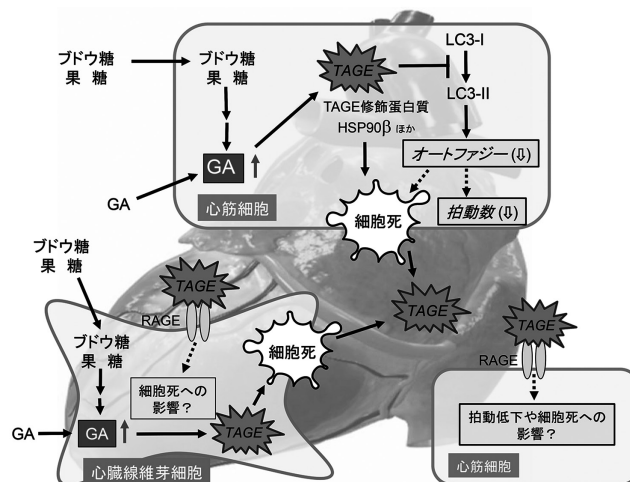


図3. TAGE蓄積と心筋および線維芽細胞障害

心筋細胞内におけるGAの産生は、蛋白質を含む細胞成分のTAGE修飾につながり心筋細胞死を引き起こす。その結果、細胞外に漏出したTAGEはRAGEを発現している周辺の心筋細胞や線維芽細胞に影響を及ぼす可能性が示唆される。心臓線維芽細胞におけるTAGEの細胞内生成・蓄積とその細胞毒性、および心臓線維芽細胞に対する細胞外TAGEの影響はまだ詳細に解明されていない。GA: グリセルアルデヒド, TAGE: 毒性AGEs, LC3 (MAP1LC3): microtubule-associated protein light chain 3, RAGE: AGEs受容体。

細胞の拍動を直接阻害せず、心筋細胞の細胞死も誘発しなかった (29, 30)。細胞外TAGEの関与については、モデルとして使用したTAGE修飾BSAでは心筋細胞やCFにおける影響が観察されにくい可能性が考えられ、さらなる解明が必要である。

3) TAGE蓄積と神経細胞障害

筆者らは、中枢神経細胞初代培養系において、細胞外TAGEが他のAGEsやCMLよりも強い細胞毒性を引き起こすことを明らかにした (22, 42)。また、ヒト血中を循環している各種AGEsのなかでもTAGEが唯一神経細胞毒性を示し (42)、さらに、AD患者剖検脳においてはTAGEがAD脳病変部の海馬および海馬傍回の神経細胞内に局在していることを明らかにしている (49)。

(1) 細胞内TAGEと神経細胞障害

ヒト神経芽細胞腫SH-SY5Y細胞を用いてGA処理による細胞内TAGE生成・蓄積と神経細胞障害との関連を検討した結果、i) GA濃度依存的な神経細胞内TAGE蓄積に伴った神経細胞死が観察されること、ii) GAPDHの活性低下および解糖経路の阻害を誘発すること、iii) 細胞培養上清中のamyloid β protein 42 (A β 42)の減少と総タウ蛋白質 (tTau) およびリン酸化タウ蛋白質 (pTau)の増加は、AD患者脳脊髄液 (cerebrospinal fluid, CSF) 中の変化と一致していたこと、iv) 細胞内tTauおよびpTau/tTau比はGA添加処理により有意に上昇していたことから、AD患者脳内の神経原線維変化の形成と相関することが明らかになった (31)。また、AD患者CSF中では、VEGFのほか、TGF- β やamyloid precursor

protein (APP) の増加が報告されているが、GA処理したSH-SY5Y細胞ではVEGF、TGF- β の発現量がいずれも増大していることが示されている (31)。さらに、GA処理したSH-SY5Y細胞を用いてTAGE修飾された蛋白質を網羅的に解析した結果、細胞骨格蛋白質である β -tubulinが著しくTAGE修飾を受けることが明らかになった (32)。加えて、 β -tubulinのTAGE修飾は微小管形成の異常重合を引き起こして軸索伸長を抑制する結果、神経軸索の形成に異常をきたし、神経機能を障害していることが示唆された (32)。最近では、AGEs生成阻害作用を有するaminoguanidineやpyridoxamineがTAGE修飾 β -tubulinの形成を抑制してGAによる神経突起伸長の阻害を軽減し、かつpTauレベルの上昇を抑制することが明らかになった (33)。一方、グリア細胞内TAGE蓄積はラット初代培養アストロサイトの細胞死を誘導して血液脳関門の破綻に関与している可能性があることも示されている (未発表データ)。

従って、細胞内TAGEの生成・蓄積はADの発症・進展の原因となる可能性がある。

(2) 細胞外TAGEと神経細胞障害

ADとの関連において、ラット胎仔大脳皮質神経細胞を各種AGEsで処理したところ、i) TAGEの添加処理においては強力な神経細胞死がみられ、この細胞毒性は抗TAGE抗体の添加により抑制されること、ii) DN-HD患者血中から得たAGEs画分を神経細胞に添加すると神経細胞死が再現され、この作用は抗TAGE抗

体で完全に抑制されること、iii) AD患者剖検脳病変部にTAGEおよびRAGEが局在することから、生体内で生成・蓄積する各種AGEsの中でもTAGEがRAGEを介して神経細胞障害を引き起こし、ADの発症・進展に関与することを明らかにしている (15, 22, 42) (図4)。

(3) 細胞外TAGEと脳EC障害

ECは、血管内を通る血液成分の浸透を調節するバリアとして機能している。TAGEが正常な止血と病的血栓症の主要な調節因子である組織因子 (tissue factor, TF) を増加させ、TFの発現がROSの過剰産生に関連していることが示されている (73)。また、大動脈ECに比べて脳内細小ECがTAGEに対する感受性が高く、TAGE-RAGE-ROS軸を介して血管透過性促進作用をあわせてVEGFの発現を増加させて、脳内の血管透過性を亢進させることが明らかになっている (74)。

最近、TAGEがROSおよび非ROS経路を含む複雑なシグナル伝達を介してECの接着結合および密着結合を破壊して血管透過性の増強を誘導することが明らかになった (75)。一方、small G proteinsを活性化するRas guanyl nucleotide releasing protein 2 (RasGRP2) は、血管の透過性亢進を阻害する接着結合の破壊を防ぐことを明らかにした。これらの知見は、血管透過性に対する保護因子としてのRasGRP2の重要な役割を示唆しており、TAGE誘発性LSRDの新しい治療戦略の開発に貢献できることが期待される。従って、DM患者の脳では血管透過性が高まり、血中TAGEの脳内への移行が促進されることが危惧される。

4) TAGE蓄積と膵 β 細胞障害

インスリンを産生および分泌する膵 β 細胞の細胞数の減少は、DMの病態生理に関与しており、 β 細胞死と機能不全は糖毒性や脂肪毒性、酸化ストレスの発症などに関係している (76, 77)。一方、オートファジーはDMにおける機能不全と細胞死から β 細胞を保護することが知られている (77)。TAGEと膵 β 細胞について解析を行った結果、細胞内TAGE蓄積は β 細胞死を誘導してLC3-IやLC3-II、ならびにp62を減少させ、それらの分解を抑制することによりオートファジーを阻害する可能性が示唆された (34)。一般的に、オートファジーはLC3-IIの蛋白質レベルの増加とLC3-Iおよびp62の蛋白質レベルの減少に関連しており、これらすべての蛋白質のレベルはDMにおいては減少することが知られている。LC3-I、LC3-II、およびp62の蛋白質レベルのいずれもが減少するこのようなパターンはまれであり、膵 β 細胞内TAGEの生成・蓄積によるオートファジー機能の阻害を示唆している。DMと膵 β 細胞の損傷は糖毒性について明らかにする上でも非常に重要であり、今後のオートファジーとの関連性の解明が待たれる。

5) TAGE蓄積と筋芽細胞障害

T2DMやNASHを含むLSRDの患者では、サルコペニアのリスクが高くなることが報告されている (78)。サルコペニアは進行

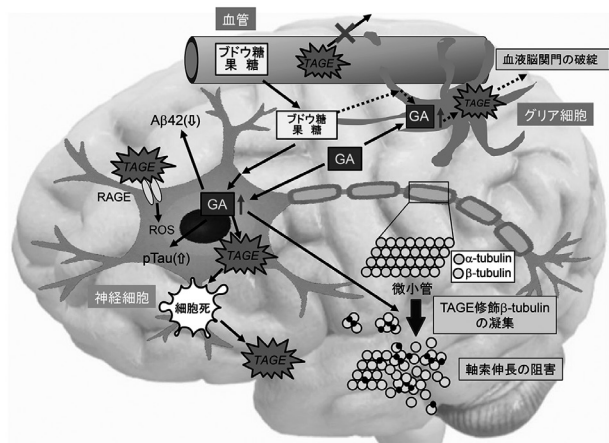


図4. TAGE蓄積と神経細胞障害

TAGEは主にAD脳神経細胞体に局在している。GAは神経細胞内におけるTAGEの生成・蓄積を誘導して、神経細胞障害を引き起こす。神経細胞死の結果、細胞外へ漏出したTAGEはTAGE-RAGE-ROS軸を介して周囲の細胞に影響を与える可能性がある。TAGE蓄積は、細胞外A β 42の濃度を低下させ、細胞内pTauレベルを増加させる。GA処理は異常な β -tubulinの凝集を誘発し、TAGE修飾 β -tubulinを形成して神経突起の伸長を阻害する。また、アストロサイト内におけるTAGE蓄積は血液脳関門破綻に関与していることが示唆される (未発表データ)。GA: グリセルアルデヒド, TAGE: 毒性AGEs, RAGE: AGEs受容体, ROS: 活性酸素種, A β 42: アミロイド β 蛋白質42, pTau: リン酸化タウ蛋白質。

性で全身性の骨格筋障害であり、筋肉量と機能の喪失が加速することを特徴とし、日常生活動作 (activities of daily living, ADL) や生活の質 (quality of life, QOL) の低下に加えて、転倒と死亡のリスクが上昇する (79, 80)。骨格筋前駆細胞の筋芽細胞は、分化して筋管を形成し、最終的には筋線維を形成する。以前の研究では、筋芽細胞死または機能不全が骨格筋の喪失をもたらすことが示されているが (78, 81, 82)、筋芽細胞死が誘発されるメカニズムはまだ詳細に解明されていない。

筆者らは、マウス筋芽細胞株C2C12細胞をGAで処理すると、細胞内TAGEの生成・蓄積に伴って細胞死が誘導されることを明らかにした (35)。加えて、C2C12細胞に対する細胞外TAGEの影響を検討した結果、生理的濃度より5倍高い量のTAGEの添加処理においても細胞死を誘発しなかった。細胞外TAGEの関与については、実験に用いたTAGE修飾BSAでは筋芽細胞における影響が観察されにくい可能性が考えられ、さらなる解明が必要である。

6) TAGE蓄積と骨芽細胞障害

骨は、破骨細胞による継続的な骨吸収と、骨芽細胞によって形成される新しい骨との置換によってリモデリングされている。新生骨の形成には骨芽細胞の分化・成熟が必須であり、骨芽細胞の枯渇は骨粗鬆症を引き起こす。DMは、骨粗鬆症性骨折の危険因子の一つとして認識されており、DM患者においては骨折のリスクが高いことが示されている (83, 84)。骨折は、ADLやQOLを著しく低下させ、生命予後を悪化させる (85)。

筆者らは最近、マウス骨芽細胞のGA処理が様々な蛋白質をTAGE修飾させ、TAGEの蓄積と相関して細胞死を引き起こすことを報告した (36)。さらに、骨芽細胞の分化に必須な転写因子であるRunx-related transcription factor 2 (Runx2) やCOLの発現量低下と細胞内TAGE生成・蓄積の間に相関があることも確認された。また、GA処理により細胞内のCOLの正常な蛋白質レベルが減少したことから、TAGEによるCOL蛋白質の修飾が異常な構造を形成していることが推察される。これらの知見は、DMに伴う骨粗鬆症性骨折の病態にTAGEが関与していることを示唆している。

7) TAGE蓄積と癌細胞障害

TAGEはRAGEに結合し、炎症性サイトカインの放出、細胞損傷の増加、および癌細胞におけるVEGFなどの高発現をもたらすことが報告されている (17, 45, 46)。また、2種類の癌細胞を用いた研究においては、TAGEがメラノーマ (悪性黒色腫) 細胞 (50) および肺癌細胞 (86) の遊走と浸潤を促進し、癌の進展に関与する可能性が示されている。

(1) 肝癌

筆者らは、非B非C型肝炎 (NBNC-HCC) 患者ではHCCを伴わないNASH患者に比べ、血中TAGEレベルが有意に高いことを報告した (87)。TAGEはTAGE-RAGE軸を介した作用により、

肝癌患者の細胞内シグナルカスケードを変化させ、血管新生、浸潤、移動、増殖、線維化を誘導することが示唆されている。また、細胞を用いた研究においても、TAGEは肝癌細胞にCRPの発現を誘導するが、抗RAGE抗体で前処置することで、その発現は抑制された。さらに、RAGEのデコイ受容体として機能する可溶性RAGEは、肝癌の悪性化を抑制した (19)。このように、TAGE-RAGE軸はNASHおよびNASH関連肝癌の治療標的となる可能性がある。

加えて、肝癌細胞株HuH7およびHepG2細胞を用いてTAGE-RAGE軸の影響を検討した結果、RAGEのmRNAおよび蛋白質レベルでは両細胞間で差がみられないが、フローサイトメトリーによる解析ではHuH7細胞表面に過剰のRAGE発現が見出された (88)。また、細胞表面にRAGEを過剰発現しているHuH7細胞では、TAGEの添加処理により細胞増殖の亢進がみられる一方、細胞表面でのRAGE発現の微量なHepG2細胞においては、影響が全くみられないことが明らかになった。さらに、梅肉抽出物であるMK615はHuH7細胞におけるRAGE発現を抑制し、TAGEによる細胞増殖亢進作用を減弱させることが示されている (88)。

(2) 結腸直腸癌

TAGEは炎症誘発性およびROS産生促進性を有しており、結腸直腸癌 (colorectal cancer, CRC) の進展および生存率の低下に関与する可能性がある。TAGE-RAGE軸は、複数のシグナル伝達経路 (NF- κ Bおよびphosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase Bなど) を活性化し、CRC細胞の過剰増殖および転移能、CRCの進展を増加させることが示唆されている。さらに、慢性高血糖はTAGEの生成・蓄積を促進し、インスリン成長因子経路を含むさまざまな代謝経路を介したCRCの進展に関連している可能性がある。これらの知見は、CRC生存者のTAGEレベルに関する調査が、CRC進展の予防とCRC生存率関連のoutcomeの改善に関する新たな洞察を提供することを示唆している (89, 90)。

(3) 膵管上皮癌

ヒト膵管上皮癌細胞株PANC-1細胞をGAで処理すると、細胞内TAGEの生成・蓄積と細胞死が誘導された (37)。Hsp90 β 、Hsp70、およびHsp27の高分子量複合体は、GA処理後に用量依存的に産生され、これらの高分子量複合体はTAGE修飾を介した凝集を伴う二量体および三量体であると考えられた。また、細胞外TAGEはPANC-1細胞の増殖を促進した (37)。従って、細胞内TAGE蓄積は膵癌細胞の細胞死を誘発し、細胞内TAGEの漏出は周囲の膵癌細胞の増殖を促進する可能性があることが示唆された。

(4) 肺癌

肺癌細胞株A549細胞を用いて、TAGEが癌の悪性度を高めるメカニズムを検討した結果、i) TAGEの添加処理により細胞増殖が抑制されること、ii) TAGEが細胞の遊走および浸潤能を増加させること、iii) 細胞外TAGEがRAGEを介してROSの産生を誘導することが示された。また、Rac1は細胞の遊走能を高めるROSの産生によって活性化され、matrix metalloproteinase 2の活

性化は浸潤能を促進した (86)。すなわち、TAGE-RAGE軸は肺癌細胞内でのROSの産生亢進を介して、癌細胞の増殖段階から転移・浸潤段階へとより悪性度を増加させていることが示唆される。

(5) メラノーマ

ヒトメラノーマ株G361細胞の増殖と遊走および浸潤がTAGEの添加処理によって促進されることが示されている (50)。抗RAGE抗体の投与は、ヌードマウスにおけるメラノーマ細胞異種移植片による腫瘍の形成を防いだ。また、細胞生存率は担癌マウスの方が高く、抗RAGE抗体はメラノーマの自然発生的な肺転移を抑制した。さらに、TAGEはヒトメラノーマ組織内に豊富にみられるのに対し、正常皮膚ではほとんど認められなかった。加えて、色素上皮由来因子 (pigment epithelium-derived factor) を過剰発現させた動物では血管新生が抑えられてメラノーマ細胞の増殖が抑えられること (91) や、bisphosphonate製剤のminodronateがVEGFシグナルをブロックすることによりメラノーマ細胞の増殖を抑制し、ヌードマウスにおける生存率を改善することが明らかになっている (92)。

すなわち、TAGE-RAGE軸は癌細胞の増殖のみならず、癌の悪性度に関連する転移・浸潤に及ぶまで影響を与えている可能性が示唆される。

お わ り に

国内外で様々な疾患に対するAGEs研究が行われているが、glucoseあるいはMGOなどのカルボニル化合物から作製したGlu-AGEs/MGO-AGEsに注目する研究者人口が多い中、筆者らはTAGEに対する研究を長年に渡り継続して遂行してきた。その結果、生活習慣病の新規原因物質として体内で生成・蓄積されるTAGEを世界に先駆けて特定し、TAGEの影響を抑えることが生活習慣病の予防や治療戦略に結びつくことを明らかにした (11, 13, 70, 71)。また、抗TAGE抗体を用いた細胞内TAGEの微量定量法を開発し、細胞内TAGE蓄積が各種細胞障害を引き起こすことを明らかにしてきており (11, 25-37, 69)、他の研究者の追隨を許さない状況にある。このように、「TAGE理論」の斬新なコンセプトは、人間の健康に関する研究に新しい洞察を提供する新規概念であり、多くの疾患の研究に新たな展望を開くことが期待される。

謝 辞

金沢医科大学創立51年目を迎え、新たな礎を築く最初の年に、本学総合医学研究所 (2011年度～現在に至る) ならびに姉妹校の北陸大学薬学部 (1996年度～2010年度) において遂行したTAGE研究の概要を金沢医科大学雑誌に総説としてまとめることができたことは、この上ない栄誉です。また、共同研究などでお世

話になりました多くの大学ならびに病院関係の先生方をはじめ、研究奨学寄付金などでご支援頂いた多くの企業や医療機関の方々に深謝致します。本研究の遂行にあたり、科学研究費補助金 (基盤研究 (A): 21H04865/16H0181, 基盤研究 (B): 25282029/2300264/19300254/13470197/11557069, 基盤研究 (C): 21K11583/21K11607/18K11003/18K11139, 若手研究 (B): 15K16239/26750056)、文部科学省地域イノベーション戦略支援プログラム事業補助金 (2013～2017年度)、北國がん基金研究助成金 (2022年度, 2015年度)、金沢医科大学アシスト科研 (K2020-26/K2019-24) ほかを受けたことを記し、ここに感謝致します。

利益相反の開示

本研究に関して、筆者らの開示すべき利益相反はない。

文 献

1. Imamura F, O'Connor L, Ye Z et al: Consumption of sugar sweetened beverages, artificially sweetened beverages, and fruit juice and incidence of type 2 diabetes: Systematic review, meta-analysis, and estimation of population attributable fraction. *Br J Sports Med* 2016; **50**: 496-504.
2. Schwingshackl L, Hoffmann G, Lampousi AM et al: Food groups and risk of type 2 diabetes mellitus: A systematic review and meta-analysis of prospective studies. *Eur J Epidemiol* 2017; **32**: 363-75.
3. Malik VS: Sugar sweetened beverages and cardiometabolic health. *Curr Opin Cardiol* 2017; **32**: 572-9.
4. Yki-Järvinen H, Luukkonen PK, Hodson L et al: Dietary carbohydrates and fats in nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2021; **18**: 770-86.
5. Takeuchi M, Makita Z: Alternative routes for the formation of immunochemically distinct advanced glycation end-products in vivo. *Curr Mol Med* 2001; **1**: 305-15.
6. Poulsen MW, Hedegaard RV, Andersen JM et al: Advanced glycation endproducts in food and their effects on health. *Food Chem Toxicol* 2013; **60**: 10-37.
7. Brings S, Fleming T, Freichel M et al: Dicarbonyls and advanced glycation end-products in the development of diabetic complications and targets for intervention. *Int J Mol Sci* 2017; **18**: 984.
8. Jud P, Sourij H: Therapeutic options to reduce advanced glycation end products in patients with diabetes mellitus: A review. *Diabetes Res Clin Pract* 2019; **148**: 54-63.
9. Twarda-Clapa A, Olczak A, Bialkowska AM et al: Advanced glycation end-products (AGEs): Formation, chemistry, classification, receptors, and diseases related to AGEs. *Cells* 2022; **11**: 1312.
10. Takeuchi M, Yamagishi S: Alternative routes for the formation of glyceraldehyde-derived AGEs (TAGE) in vivo. *Med Hypotheses* 2004; **63**: 453-5.
11. Takeuchi M, Sakasai-Sakai A, Takata T et al: Intracellular toxic AGEs (TAGE) triggers numerous types of cell damage. *Biomolecules* 2021; **11**: 387.
12. Takeuchi M, Yamagishi S: TAGE (toxic AGEs) hypothesis in various chronic diseases. *Med Hypotheses* 2004; **63**: 449-52.
13. Takeuchi M: Toxic AGEs (TAGE) theory: A new concept for preventing the development of diseases related to lifestyle. *Diabetol Metab Syndr* 2020; **12**: 105.
14. Sato T, Iwaki M, Shimogaito N et al: TAGE (toxic AGEs) theory in diabetic complications. *Curr Mol Med* 2006; **6**: 351-8.
15. Takeuchi M, Yamagishi S: Involvement of toxic AGEs (TAGE) in the pathogenesis of diabetic vascular complications and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2009; **16**: 845-58.
16. Takeuchi M, Takino J, Yamagishi S: Involvement of TAGE-RAGE system in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *J Ophthalmol* 2010; **2010**: 170393.
17. Takeuchi M, Takino J, Yamagishi S: Involvement of the toxic AGEs (TAGE)-

- RAGE system in the pathogenesis of diabetic vascular complications: A novel therapeutic strategy. *Curr Drug Targets* 2010; **11**: 1468-82.
18. Takeuchi M, Takino J, Sakasai-Sakai A et al: Involvement of the TAGE-RAGE system in non-alcoholic steatohepatitis: Novel treatment strategies. *World J Hepatol* 2014; **6**: 880-93.
19. Takino J, Nagamine K, Hori T et al: Contribution of the toxic advanced glycation end-products-receptor axis in nonalcoholic steatohepatitis-related hepatocellular carcinoma. *World J Hepatol* 2015; **7**: 2459-69.
20. Takeuchi M, Takino J, Sakasai-Sakai A et al: Toxic AGE (TAGE) theory for the pathophysiology of the onset/progression of NAFLD and ALD. *Nutrients* 2017; **9**: 634.
21. Sakasai-Sakai A, Takata T, Takino J et al: The relevance of toxic AGEs (TAGE) cytotoxicity to NASH pathogenesis. *Nutrients* 2019; **11**: 462.
22. Takeuchi M, Kikuchi S, Sasaki N et al: Involvement of advanced glycation end-products (AGEs) in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* 2004; **1**: 39-46.
23. Sato T, Shimogaito N, Wu X et al: Toxic advanced glycation end product (TAGE) theory in Alzheimer's disease. *Am J Alzheimers Dis Other Dement* 2006; **21**: 197-208.
24. Takeuchi M, Yamagishi S: Possible involvement of advanced glycation end-products (AGEs) in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Curr Pharm Des* 2008; **14**: 973-8.
25. Takino J, Kobayashi Y, Takeuchi M: The formation of intracellular glyceraldehyde-derived advanced glycation end-products and cytotoxicity. *J Gastroenterol* 2010; **45**: 646-55.
26. Sakasai-Sakai A, Takata T, Takino J et al: Impact of intracellular glyceraldehyde-derived advanced glycation end-products on human hepatocyte cell death. *Sci Rep* 2017; **7**: 14282.
27. Sakasai-Sakai A, Takata T, Takeuchi M: Intracellular toxic advanced glycation end-products promote the production of reactive oxygen species in HepG2 cells. *Int J Mol Sci* 2020; **21**: 4861.
28. Kikuchi C, Sakasai-Sakai A, Okimura R et al: Accumulation of toxic advanced glycation end-products induces cytotoxicity and inflammation in hepatocyte-like cells differentiated from human induced pluripotent stem cells. *Biol Pharm Bull* 2021; **44**: 1399-402.
29. Takata T, Sakasai-Sakai A, Ueda T et al: Intracellular toxic advanced glycation end-products in cardiomyocytes may cause cardiovascular disease. *Sci Rep* 2019; **9**: 2121.
30. Takata T, Sakasai-Sakai A, Takeuchi M: Intracellular toxic advanced glycation end-products may induce cell death and suppress cardiac fibroblasts. *Metabolites* 2022; **12**: 615.
31. Koriyama Y, Furukawa A, Muramatsu M et al: Glyceraldehyde caused Alzheimer's disease-like alterations in diagnostic marker levels in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Sci Rep* 2015; **5**: 13313.
32. Nasu R, Furukawa A, Suzuki K et al: The effect of glyceraldehyde-derived advanced glycation end products on beta-tubulin-inhibited neurite outgrowth in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Nutrients* 2020; **12**: 2958.
33. Ooi H, Nasu R, Furukawa A et al: Pyridoxamine and aminoguanidine attenuate the abnormal aggregation of β -tubulin and suppression of neurite outgrowth by glyceraldehyde-derived toxic advanced glycation end-products. *Front Pharmacol* 2022; **13**: 921611.
34. Takata T, Sakasai-Sakai A, Takeuchi M: Intracellular toxic advanced glycation end-products in 1.4E7 cell line induce death with reduction of microtubule-associated protein 1 light chain 3 and p62. *Nutrients* 2022; **14**: 332.
35. Takata T, Sakasai-Sakai A, Takeuchi M: Impact of intracellular toxic advanced glycation end-products (TAGE) on murine myoblast cell death. *Diabetol Metab Syndr* 2020; **12**: 54.
36. Sakasai-Sakai A, Takata T, Takeuchi M: The association between accumulation of toxic advanced glycation end-products and cytotoxic effect in MC3T3-E1 cells. *Nutrients* 2022; **14**: 990.
37. Takata T, Ueda T, Sakasai-Sakai A et al: Generation of glyceraldehyde-derived advanced glycation end-products in pancreatic cancer cells and the potential of tumor promotion. *World J Gastroenterol* 2017; **23**: 4910-9.
38. Takeuchi M, Makita Z, Yanagisawa K et al: Detection of noncarboxymethyllysine and carboxymethyllysine advanced glycation end products (AGE) in serum of diabetic patients. *Mol Med* 1999; **5**: 393-405.
39. Takeuchi M, Makita Z, Bucala R et al: Immunological evidence that non-carboxymethyllysine advanced glycation end-products are produced from short chain sugars and dicarbonyl compounds in vivo. *Mol Med* 2000; **6**: 114-25.
40. Takeuchi M, Yanase Y, Matsuura N et al: Immunological detection of a novel advanced glycation end-product. *Mol Med* 2001; **7**: 783-91.
41. Takeuchi M, Iwaki M, Takino J et al: Immunological detection of fructose-derived advanced glycation end-products. *Lab Invest* 2010; **90**: 1117-27.
42. Takeuchi M, Bucala R, Suzuki T et al: Neurotoxicity of advanced glycation end-products for cultured cortical neurons. *J Neuropathol Exp Neurol* 2000; **59**: 1094-105.
43. Yonekura H, Yamamoto Y, Sakurai S et al: Novel splice variants of the receptor for advanced glycation end-products expressed in human vascular endothelial cells and pericytes, and their putative roles in diabetes-induced vascular injury. *Biochem J* 2003; **370**: 1097-109.
44. Yamamoto Y, Yonekura H, Watanabe T et al: Short-chain aldehyde-derived ligands for RAGE and their actions on endothelial cells. *Diabetes Res Clin Pract* 2007; **77** Suppl 1: S30-40.
45. Takino J, Yamagishi S, Takeuchi M: Glycer-AGEs-RAGE signaling enhances the angiogenic potential of hepatocellular carcinoma by upregulating VEGF expression. *World J Gastroenterol* 2012; **18**: 1781-8.
46. Ishibashi Y, Matsui T, Takeuchi M et al: Metformin inhibits advanced glycation end products (AGEs)-induced growth and VEGF expression in MCF-7 breast cancer cells by suppressing AGEs receptor expression via AMP-activated protein kinase. *Horm Metab Res* 2013; **45**: 387-90.
47. Matsui T, Nishino Y, Takeuchi M et al: Vildagliptin blocks vascular injury in thoracic aorta of diabetic rats by suppressing advanced glycation end product-receptor axis. *Pharmacol Res* 2011; **63**: 383-8.
48. Hyogo H, Yamagishi S, Iwamoto K et al: Elevated levels of serum advanced glycation end-products in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; **22**: 1112-9.
49. Choei H, Sasaki N, Takeuchi M et al: Glyceraldehyde-derived advanced glycation end products in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 2004; **108**: 189-93.
50. Abe R, Shimizu T, Sugawara H et al: Regulation of human melanoma growth and metastasis by AGE-AGE receptor interactions. *J Invest Dermatol* 2004; **122**: 461-7.
51. Mazzola JL, Sirover MA: Reduction of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase activity in Alzheimer's disease and in Huntington's disease fibroblasts. *J Neurochem* 2001; **76**: 442-9.
52. Takino J, Nagamine K, Takeuchi M et al: In vitro identification of nonalcoholic fatty liver disease-related protein hnRNP. *World J Gastroenterol* 2015; **21**: 1784-93.
53. Ebata Y, Takino J, Tsuchiya H et al: Presence of glyceraldehyde-derived advanced glycation end-products in the liver of insulin-resistant mice. *Int J Vitam Nutr Res* 2013; **83**: 137-41.
54. Takata T, Sakasai-Sakai A, Takino J et al: Evidence for toxic advanced glycation end-products generated in the normal rat liver. *Nutrients* 2019; **11**: 1612.
55. Inoue S, Takata T, Nakazawa Y et al: Potential of an interorgan network mediated by toxic advanced glycation end-products in a rat model. *Nutrients* 2021; **13**: 80.
56. Sato T, Wu X, Shimogaito N et al: Effects of high-AGE beverage on RAGE and VEGF expressions in the liver and kidneys. *Eur J Nutr* 2009; **48**: 6-11.
57. Takeuchi M, Takino J, Furuno S et al: Assessment of the concentrations of various advanced glycation end-products in beverages and foods that are commonly consumed in Japan. *PLoS One* 2015; **10**: e0118652.
58. Shojiaie L, Iorga A, Dara L: Cell death in liver diseases: A review. *Int J Mol Sci* 2020; **21**: 9682.
59. Takino J, Nagamine K, Suzuki M et al: Gene expression changes associated with the loss of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M function. *Am J Mol Biol* 2017; **7**: 87-98.
60. Sumida Y, Nakashima T, Yoh T et al: Serum thioredoxin levels as a predictor of steatohepatitis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* 2003; **38**: 32-8.
61. Masarone M, Rosato V, Dallio M et al: Role of oxidative stress in pathophysiology of nonalcoholic fatty liver disease. *Oxid Med Cell Longev* 2018; **2018**: 9547613.
62. Di Ciaula A, Passarella S, Shanmugam H et al: Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). Mitochondria as players and targets of therapies? *Int J Mol Sci* 2021; **22**: 5375.
63. Zhao J, Liu J, Pang X et al: Angiotensin II induces C-reactive protein expression via AT1-ROS-MAPK-NF- κ B signal pathway in hepatocytes. *Cell Physiol Biochem* 2013; **32**: 569-80.
64. Yoshida T, Yamagishi S, Nakamura K et al: Pigment epithelium-derived factor (PEDF) inhibits advanced glycation end product (AGE)-induced C-reactive protein expression in hepatoma cells by suppressing Rac-1

- activation. *FEBS Lett* 2006; **580**: 2788-96.
65. Videla LA, Tapia G, Rodrigo R et al: Liver NF-kappaB and AP-1 DNA binding in obese patients. *Obesity* 2009; **17**: 973-9.
 66. Bettaieb A, Jiang JX, Sasaki Y et al: Hepatocyte nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced oxidase 4 regulates stress signaling, fibrosis, and insulin sensitivity during development of steatohepatitis in mice. *Gastroenterology* 2015; **149**: 468-80.
 67. Iwamoto K, Kanno K, Hyogo H et al: Advanced glycation end products enhance the proliferation and activation of hepatic stellate cells. *J Gastroenterol* 2008; **43**: 298-304.
 68. Takino J, Sato T, Nagamine K et al: Suppression of hepatic stellate cell death by toxic advanced glycation end-products. *Biol Pharm Bull* 2021; **44**: 112-7.
 69. Sakasai-Sakai A, Takeda K, Takeuchi M: Involvement of intracellular TAGE and the TAGE-RAGE-ROS axis in the onset and progression of NAFLD/NASH. *Antioxidants* 2023; **12**: 748.
 70. Takeuchi M: Serum levels of toxic AGEs (TAGE) may be a promising novel biomarker for the onset/progression of lifestyle-related diseases. *Diagnostics* 2016; **6**: 23.
 71. Takeuchi M, Sakasai-Sakai A, Takata T et al: Effects of toxic AGEs (TAGE) on human health. *Cells* 2022; **11**: 2178.
 72. Burke RM, Burgos Villar KN, Small EM: Fibroblast contributions to ischemic cardiac remodeling. *Cell Signal* 2021; **77**: 109824.
 73. Niiya Y, Abumiya T, Shichinohe H et al: Susceptibility of brain microvascular endothelial cells to advanced glycation end products-induced tissue factor upregulation is associated with intracellular reactive oxygen species. *Brain Res* 2006; **1108**: 179-87.
 74. Niiya Y, Abumiya T, Yamagishi S et al: Advanced glycation end products increase permeability of brain microvascular endothelial cells through reactive oxygen species-induced vascular endothelial growth factor expression. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 2012; **21**: 293-8.
 75. Takino J, Sato T, Kanetaka T et al: RasGRP2 inhibits glyceraldehyde-derived toxic advanced glycation end-products from inducing permeability in vascular endothelial cells. *Sci Rep* 2021; **11**: 2959.
 76. Bohuslavova R, Smolik O, Malfatti J et al: NUDT15 is required for the early α and β endocrine differentiation in the pancreas. *Int J Mol Sci* 2021; **22**: 6713.
 77. Ji S, Zhu C, Gao S et al: Morus alba leaves ethanol extract protects pancreatic islet cells against dysfunction and death by inducing autophagy in type 2 diabetes. *Phytomedicine* 2021; **83**: 153478.
 78. Adachi N, Kanazawa I, Tanaka K et al: Insulin-like growth factor-I protects against the detrimental effects of advanced glycation end products and high glucose in myoblastic C2C12 cells. *Calcif Tissue Int* 2019; **105**: 89-96.
 79. Petta S, Ciminnisi S, Di Marco V et al: Sarcopenia is associated with severe liver fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2017; **45**: 510-8.
 80. Bhanji RA, Narayanan P, Moynagh MR et al: Differing impact of sarcopenia and frailty in nonalcoholic steatohepatitis and alcoholic liver disease. *Liver Transpl* 2019; **25**: 14-24.
 81. Sato H, Funaki A, Kimura Y et al: Ethanol extract of *Cyclolepis genistoides* D. Don (palo azul) induces formation of myotubes, which involves differentiation of C2C12 myoblast cells. *Nutr Res* 2016; **36**: 731-41.
 82. Byun SK, An TH, Son MJ et al: HDAC11 inhibits myoblast differentiation through repression of MyoD-dependent transcription. *Mol Cells* 2017; **40**: 667-76.
 83. Vestergaard P: Discrepancies in bone mineral density and fracture risk in patients with type 1 and type 2 diabetes – A meta-analysis. *Osteoporos Int* 2007; **18**: 427-44.
 84. Romero-Diaz C, Duarte-Montero D, Gutiérrez-Romero SA et al: Diabetes and bone fragility. *Diabetes Ther* 2021; **12**: 71-86.
 85. Johnell O, Kanis JA, Odén A et al: Mortality after osteoporotic fractures. *Osteoporos Int* 2004; **15**: 38-42.
 86. Takino J, Yamagishi S, Takeuchi M: Cancer malignancy is enhanced by glyceraldehyde-derived advanced glycation end-products. *J Oncol* 2010; **2010**: 739852.
 87. Kan H, Yamagishi S, Ojima A et al: Elevation of serum levels of advanced glycation end products in patients with non-B or non-C hepatocellular carcinoma. *J Clin Lab Anal* 2015; **29**: 480-4.
 88. Sakuraoka Y, Sawada T, Okada T et al: MK615 decreases RAGE expression and inhibits TAGE-induced proliferation in hepatocellular carcinoma cells. *World J Gastroenterol* 2010; **16**: 5334-41.
 89. Kong SY, Takeuchi M, Hyogo H et al: The association between glyceraldehyde-derived advanced glycation end-products and colorectal cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2015; **24**: 1855-63.
 90. Mao Z, Baker JR, Takeuchi M et al: Prediagnostic serum glyceraldehyde-derived advanced glycation end products and mortality among colorectal cancer patients. *Int J Cancer* 2023; **152**: 2257-68.
 91. Abe R, Shimizu T, Yamagishi S et al: Overexpression of pigment epithelium-derived factor decreases angiogenesis and inhibits the growth of human malignant melanoma cells in vivo. *Am J Pathol* 2004; **164**: 1225-32.
 92. Yamagishi S, Abe R, Inagaki Y et al: Minodronate, a newly developed nitrogen-containing bisphosphonate, suppresses melanoma growth and improves survival in nude mice by blocking vascular endothelial growth factor signaling. *Am J Pathol* 2004; **165**: 1865-74.

Toxic AGEs (TAGE) and Health: I. TAGE as a Cytotoxic Factor

Akiko Sakai-Sakasai[#], Kenji Takeda, Masayoshi Takeuchi^{##}

Department of Advanced Medicine, Medical Research Institute, Kanazawa Medical University

Abstract: Overconsumption of high-fructose corn syrup (HFCS) and sugar is linked to the onset and progression of lifestyle-related diseases (LSRD). Recently in the field of LSRD, focus on advanced glycation end-products (AGEs) has increased, especially on studies that suggest that LSRD can be prevented and treated by suppressing the effects of AGEs. However, determining which AGE structure is the primary cause of LSRD is extremely difficult because AGEs structure varies depending on the type of sugar or carbonyl compound that reacts with them. We previously showed that intracellular accumulation of glyceraldehyde (GA)-AGEs, which are derived from GA, a tricarbohydrate and a metabolic

intermediate of glucose and fructose, plays a role in the onset and progression of LSRD by causing cell damage. Based on our findings, we proposed the concept of toxic AGEs (TAGE). Due to dysregulated glucose/fructose metabolism caused by the characteristics of modern diets (habitual overconsumption of HFCS, sugar, and dietary AGEs), excess GA produced in cells binds to intracellular proteins, leading to the production and accumulation of TAGE, which subsequently causes different types of cellular damage. In this review, we present an overview of studies on “novel target TAGE” as a cytotoxic factor in the context of human health.

Key Words: advanced glycation end-products (AGEs), toxic AGEs (TAGE), cytotoxic factor, lifestyle-related diseases (LSRD)

* Department of Advanced Medicine, Medical Research Institute, Kanazawa Medical University, 1-1 Daigaku, Uchinada, Kahoku, Ishikawa 920-0293, Japan

E-mail: takeuchi@kanazawa-med.ac.jp

[#] These authors contributed equally.