

博士学位論文審査要旨

2013年 2月 20日

論文題目：皮膚蛍光を用いた生体の糖化度のモニタリングに関する研究

学位申請者：埜本 慶太郎

審査委員

主査：同志社大学大学院生命医科学研究科 教授 米井 嘉一

副査：同志社大学大学院生命医科学研究科 教授 萩原 明郎

副査：近畿大学奈良病院皮膚科 教授 山田 秀和

要 旨：

本論文は機器製作と基礎実験の二本立ての構成である。主目的は、生体内糖化反応により生成される蛍光性物質の皮膚への蓄積（糖化由来蛍光）を指標とすることが糖化ストレスによる老化関連疾患の一次予防に効果的であるという仮説に基づき、非侵襲的な皮膚蛍光測定機を開発することにある。第一に *in vitro* 実験として、励起光 370nm/蛍光 440nm の蛍光強度が生体蛋白の糖化反応進行度に依存して増加すること、牛皮糖化モデルにおいて組織の糖化と硬化度に依存して蛍光が増加することを示した。第二に、ヒト皮膚における蛍光変動パターンから生体内で糖化度を促進する生活習慣を予測が可能となり、皮膚蛍光と組織老化に相関関係を認めた。第三に、牛皮およびヒト皮膚の糖化度をモニターできる蛍光測定器を自作し、ペントシジンなどの血液検査結果および皮膚色を基準にして自作機用検査アルゴリズムを作製した。その結果、ヒトにおいても励起光 370nm/蛍光 440nm の皮膚蛍光にて糖化度を、既存品に比べ高感度、高特異性で、モニターできることを明らかになった。以上の結果より、皮膚蛍光が生体の糖化に由来する老化度を反映することが確認され、本自作機は臨床応用への可能性が大きいことが示唆された。

本研究は、研究者としての知識と技術のみならず、思想、計画性、様々な交渉能力が問われるものである。申請者は新規機器を開発するにあたり、工学的知識を最大限に活かした。機器製作者と頻回に会合し、品質確認と性能向上への努力を惜しまなかったことが、研究精度の向上につながっている。新知見および新たな医療機器は、糖化ストレスの多い日本国民の健康増進に大きく貢献することが期待される。

また、申請者は、本試験を遂行するにあたり糖化ストレス指標の測定法の確立することで、抗加齢医学研究室の研究基盤を作った。後進の学部生および院生に対し教育指導を行った。

よって、本論文は、博士（理学）（同志社大学）の学位を授与するにふさわしいものであると認められる。

総合試験結果の要旨

2013年 2月 20日

論文題目：皮膚蛍光を用いた生体の糖化度のモニタリングに関する研究

学位申請者：桒本 慶太郎

審査委員

主査：同志社大学大学院生命医科学研究科 教授 米井 嘉一

副査：同志社大学大学院生命医科学研究科 教授 萩原 明郎

副査：近畿大学奈良病院皮膚科 教授 山田 秀和

要 旨：

上記審査委員は、桒本慶太郎君に対する総合試験を2013年1月15日午後4時より2時間30分実施した。時間構成は口頭発表60分、質疑応答60分、口頭試問30分であった。

総合試験において学位申請者は、提出された論文の内容に関する口頭試問に応答し、研究内容と意義、研究方法、解析法について理解を示すとともに、研究の背景について専門知識を有していることを示した。

研究内容は、申請者が中心となり研究室で確立した糖化ストレス指標の測定法が核になっている。これによって研究室全体の研究活動が飛躍的に発展した。この技術をもとに研究室配属学生および大学院修士生の研究が営まれている。さらに申請者は、非侵襲的手法によりヒト皮膚の糖化ストレス指標を測定する機器の開発に挑んだ。本学理工学部出身という背景と生化学知識を融合した生命医科学研究科の特色が活かされた独創的な研究課題であり、発光ダイオード(LED)により励起された糖化反応最終産物由来蛍光の検出機器はこれまで例がない。得られた皮膚蛍光の特性と意義付けについても、糖化ストレス指標との関連から詳細な検証がなされている。

本研究は機器製作と実験的検証の二本立ての構成であり、研究開発者としての知識と技術のみならず、思想、計画性、様々な交渉能力が問われるものであった。申請者はこの点においても優れた成果を収めた。本研究成果により、老化危険因子の一つである糖化ストレスの程度が非侵襲的、安全、迅速、安価に測定することができることから、糖尿病およびその予備軍の早期発見につながり、合併症予防に貢献できるものと予想される。

申請者は、研究成果を日本人の健康増進のために将来どのように活かすことができるかについても、明確な指針を持っており、自コースの「特殊研究」を履修し、研究科内に設置されている授業科目から合計4単位以上を履修していた。また、国際学会における英語口頭発表の経験を有し、語学試験「英語」においても学位申請者が研究遂行上必要な読解能力と作文能力を有することが確認された。

よって、総合試験の結果は合格であると認める。

博士學位論文要旨

論文題目： 皮膚蛍光を用いた生体の糖化度のモニタリングに関する研究

氏名： 桒本 慶太郎

要旨：本研究の目的は、生体の糖化反応に由来する蛍光は、生活習慣などと密接に関わる有効な老化指標であると考え、1) 生体の糖化と老化を反映するモデルを構築すること、2) 抗加齢医療の観点から皮膚蛍光と老化との関わりを検討すること、3) 新たな蛍光測定器を開発することで皮膚蛍光スペクトルを物質レベルでの検証を目指すこと、の3点である。

第1章では、本研究の位置づけを述べるに当たり、日本の高齢化社会および生活習慣病が拡大の一途を辿る中で、抗加齢医学の観点からどのような課題があり、どのような貢献ができるかを生体の糖化反応と老化の関わりとともに述べた。

第2章では、ヒト血清アルブミン(HSA)の糖化モデルおよびペントシジンを一般的な蛍光性 AGEs 測定条件である励起光 370nm で蛍光スキャンした結果、HSA のピークトップは 430nm、ペントシジンのピークトップは 444nm であり、いずれも励起光 370nm、蛍光 440nm で検出可能であった。従って、HSA-Glc およびペントシジンは上記検出条件にて測定可能なことを示した。尚、ペントシジンは極大波長である励起光 335nm/蛍光 385nm と比べ、上記条件ではおよそ 1/42.6 の感度で検出可能であった。また、HSA および I 型コラーゲンの糖化モデルを作製し、生体に近い条件下での糖化反応が実験的にもよく一致し励起光 370nm 蛍光 440nm の測定値でモニターできることを示した。さらに、牛皮糖化モデルは、グルコース反応液とのインキュベーション期間に依存して組織の褐変化、蛋白量当たりのヤング率(硬さ)の増加、蛍光値の増加、皮膚中の AGEs である CML 生成量増加を認めたことから、糖化由来の蛍光を検出することで老化度をモニターするのに適したモデルであることを示した。

第3章では、まず市販の皮膚蛍光測定器である AGE Reader を老化研究目的で使用するためには、測定部位として上腕内側部が測定精度、反射率、季節間差という点で優れていることを示した。また、上腕部の皮膚蛍光(Auto Fluorescence: AF)は、10代から80代までの暦年齢との相関性に差がなく、白人の前腕部測定結果とも同等の結果であることから、様々な人々を対象に測定可能であることを示した。また、皮膚 AF は一般的に行われている血液生化学検査結果とほとんど単相関関係を認めず、喫煙・高飲酒頻度・睡眠不足という生活習慣の乱れと強い相関関係を認めること、さらに、それらの積み重ねが皮膚 AF 増加を促進することを示した。このことから、生活習慣を背景とする生体の老化度をモニターするには皮膚 AF は有効であることを明らかにした。次に、老化指標との関係から、血管年齢(動脈硬化度)、stiffness(骨密度)、さらに皮膚弾力性という組織老化と相関関係を認め、組織中の AGEs をモニターする意義を明らかにした。AGEs との関係では、血液中よりも組織中の CML と相関すること、血清ペントシジンとも相関関係を認めることを示したものの、皮膚蛍光は短期的な AGEs の変動を反映しているわけではなかった。以上のことから、皮膚蛍光は生体の老化度をモニターするのに適した指標である可能性があるものの、AGE Reader による測定の限界を見極めた。

第4章では、自作の蛍光測定器の開発に着手した。蛍光測定では、励起光の強度が時間的に変化しないことが重要であり、同時に生体を測定するためには強い照射量も求められる。従って、光源には LED を使用した。また、将来的には様々な部位での測定を

可能とするために、測定器をプローブとすることで測定者にとって使いやすく、被験者にとってはなるべく負担がかからないように考慮した。さらに皮膚弾力性測定器などは顔の測定にも使われていることを参考に、なるべく小型化することで用途の拡大も目指した。LEDは素子の小さな発光源なので小型化に最適で、フィラメントがないために耐衝撃性に優れており、余熱時間がなく点灯・消灯速度が速いことから、場所や時間による制限が少なく汎用化が可能となった。これらの条件から、開発した自作機を、光学特性を利用し改良することで純度の高い皮膚蛍光スペクトルが得られるようになった。その結果、牛皮の透過度に依存して420-500nmの範囲の蛍光スペクトルが増加することを示した。さらに、牛皮への蛍光性物質の添加試験結果から、自作機が蛍光性物質をモニターしており、散乱光などの別の光を検出している可能性が低いことがわかった。特に、2章検出した励起光370nm 蛍光446nm付近で検出できたペントシジン由来蛍光の変動を検出できたことは、ペントシジンは現在報告されている唯一の皮膚中蛍光性AGEsであり、現在最も研究されている蛍光性AGEsの一つであることから、今後の生体の糖化および老化度をモニターするうえで大きな意義を持つ。

さらに、4-5の結果より、ヒトの皮膚では485nmのピークも加齢に伴い増加することがわかった。ヒトの皮膚で認められ牛皮で認められなかった485nmにおける蛍光に関して、特定の物質由来の蛍光かは不明であるが、動脈硬化部位における脂質酸化由来の蛍光が500nm付近で検出されたとの報告がある。今回用いた牛皮には血管が含まれなかったことから、今後は動物の血管サンプルの蛍光分析、あるいは*in vitro*実験にて脂質酸化物の蛍光測定を実施することで、485nmの蛍光値を反映する物質が検証できるものと考えられる。

第5章では、皮膚色のうちマンセル表色系の色相および明度の補正が必要であることを示した上で、蛍光スペクトルに影響を及ぼす寄与率の大きい明度を補正する方法を示した。皮膚色を補正した結果、皮膚蛍光とペントシジンの相関係数スペクトルが、4章で示したペントシジン添加後に増加する蛍光スペクトルと同様のパターンであることを示した。さらに、老化指標である暦年齢、血管年齢、*stiffness*との相関係数スペクトルがペントシジン相関スペクトルと重なっていることを示した。今後、皮膚を中心とした組織老化との関係を検討するうえでも、自作機は十分な役割を果たすものと考えられる。また、特徴的な蛍光スペクトルを持つ他の蛍光性AGEsと生体の様々な老化度の関係を調べる上でも効果的なツールとなり得る。

【総合討論】

これら一連の研究成果は、分光学および統計学の手法を用いて*in vitro*および*in vivo*で得られる蛍光スペクトルの関係を結びつけた点に意義があるものと考えられる。また、このようなことが可能となった背景には、自作機の光源をLEDとしたことで、生体サンプルから安定した蛍光スペクトルが得られるようになった点が上げられる。蛍光光度計の光源として従来から使われているキセノンランプでは、散乱光などの影響もあり検出感度に問題があったこと、励起光370nm/蛍光440nmという条件は、ちょうど紫外光と可視光をまたぐ領域であり、高感度で純度の高いスペクトルを得るには技術的に困難な測定領域であることが妨げとなっていた。さらに、LED以外にも光学カットフィルターが容易に入手でき波長選択性が良くなったことなど、近年の光学デバイスの進歩が本研究を後押ししたところが大きい。従って、今後、これらの光学デバイスを用いた機器分析による蛍光性AGEsの研究は飛躍的に発展すると予想され、本研究はその先駆的な位置づけとなったものと考えられる。

また、蛍光性物質のスペクトル分析、蛋白モデル、組織モデルおよび血清や角層などのヒト生体サンプルと皮膚測定の関係を示すという、段階を経ての糖化由来蛍光のモニ

ターを行い、一連の結果に妥当な関係性を見出すことができた点も特筆すべきである。AGE Reader を用いた過去の研究では、*in vitro* による物質レベルの検証がなされたとの報告はない。また、AGEs や皮膚蛍光と暦年齢との相関関係を認めても、その原因が特定できていない研究が多い中、本研究では加齢に伴う皮膚 AGEs 蓄積は、その背景因子として生活習慣の乱れにより促進されることが示された。これらの成果によって、実験室レベルの現象と臨床研究を結びつけることができた。また、全人的な見方により生体の糖化度を検討できた。

【結語】

本研究の成果として、*in vitro* 実験で検証した糖化由来の蛍光と生体の糖化度を物質レベルで検証し、統計的手法により老化指標と関連付けることができた。従って、皮膚蛍光スペクトルからは生体の老化度を探索することができることを明らかにした。これらの知見から、皮膚蛍光は既存の抗加齢指標による身体機能年齢と同様、人々が自身の集団における相対的な老化度（健康度）を把握するきっかけとなり、生活習慣病などの加齢疾患の一次予防に役立てることで、健康長寿への手助けとなるものと考えた。