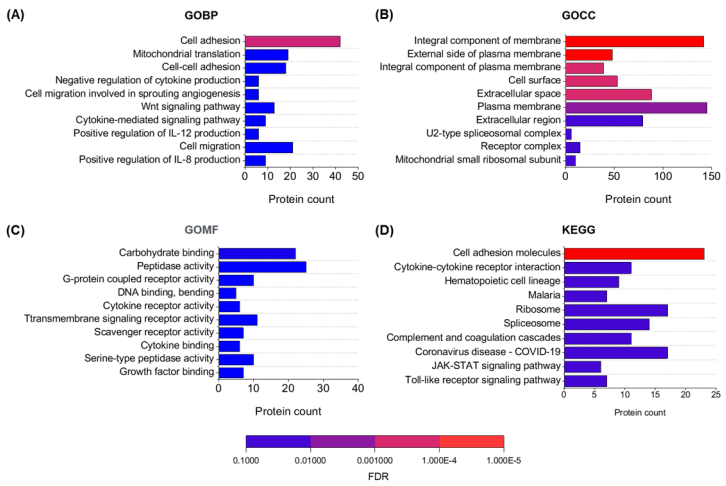
5　骨格筋糖化に着目した老化メカニズムの解明	江川　達郎

【目的】骨格筋機能の低下は、免疫系、血管系、脳を含む各臓器の機能低下を招き、個体老化を促進する。そのため、骨格筋をターゲットとした個体老化抑制策の構築は、健康寿命延伸の観点から極めて重要である。近年、老化をもたらす生体ストレスとして「糖化ストレス」が注目されている。糖化ストレスは、酸化ストレスや小胞体ストレスと悪循環を形成し、個体老化を促進することが明らかになっている。本研究では、糖化ストレスが骨格筋の機能低下を通じて個体老化を誘導する可能性を明らかにするために、1）糖化ストレスが筋細胞膜に与える影響、2）糖化ストレスが筋再生に与える影響、3）糖化ストレスが骨格筋マイオカイン発現に与える影響の 3 点に着目して研究を行った。

【方法】1）C57BL/6NCr マウスに対して、グリセルアルデヒド由来の advanced glycation-end products（AGEs 0.5 mg/g）を 1 日 1 回、1 週間にわたり腹腔内投与した。コントロール群には牛血清アルブミンを同量投与した。これらのマウスに対し、協働筋腱切除法により足底筋に過負荷を誘導し、過負荷開始 1 週間後に足底筋を摘出し解析を行った。2）1 と同様の処置により糖化ストレスを誘導したマウスおよびコントロールマウスを用い、前脛骨筋に cardiotoxin を注入して筋損傷を誘導し、損傷 1 週間後の筋再生状態を両群で比較検討した。3）C57BL/6NCr マウスに対して、メチルグリオキサールを 1%含む飲水を 1 か月間自由摂取させた。メチルグリオキサールを含まない飲水で飼育したマウスをコントロール群とした。投与開始 1 カ月後に足底筋を摘出し、サイトカインならびにケモカインの発現状態を抗体アレイにより比較測定した。

【結果】1）コントロール群では過負荷により正常な筋肥大が誘導されたが、AGEs 投与群の一部のマウスでは筋細胞の崩壊が観察された。またプロテオーム解析では、4,659 個のタンパク質が検出され、クラスター分析により AGEs 投与の影響が認められた 436 個のタンパク質を抽出した。Gene ontology 解析の結果、これらのタンパク質には、細胞膜構成に関連するタンパク質が多く含まれていることが明らかになった。2）ヘマトキシリンーエオジン染色による筋線維あたりの中心核数の検討では、AGEs 投与群はコントロール群と比較して低値であった。また、免疫組織染色により、再生期に現れる胚性ミオシン重鎖発現を定量化したところ、AGEs 投与群ではコントロール群と比較して低値であった。3）抗体アレイの結果、メチルグリオキサール投与群では検出された 111 個のタンパク質中、91 個が増加、20 個が減少した。PLS-VIP 解析では、Reg3G や CCL5、PD-ECGF などの分泌タンパク質の変動が顕著であった。ウエスタンブロット解析により DNase2 タンパク質発現の低下が認められた。以上の結果は、糖化ストレスが骨格筋脆弱化ならびに再生能の低下を招くこと、また炎症性の生理活性物質の産生分泌を介して、全身性の機能低下を惹起する可能性を示唆している。

糖化ストレスは筋細胞膜構成タンパク質の発現に影響を与える



5. 骨格筋糖化に着目した老化メカニズムの解明

江川　達郎

京都大学 人間・環境学研究科 認知・行動科学講座

Key words：糖化ストレス，終末糖化産物，老化，マイオカイン，筋細胞膜脆弱化

緒　言

骨格筋は､運動器官としての役割を担うだけでなく､マイオカインと呼ばれる生理活性物質を分泌することで、多臓器の機能を調整し、個体の恒常性を維持する重要な役割を担っている。しかし、骨格筋機能の低下は、免疫系や血管系、脳を含む各臓器の機能低下に直結し、個体老化を招くことが近年明らかにされている。そのため、骨格筋をターゲットとした老化抑制策の構築は、健康寿命延伸の点から極めて重要である。

個体老化をもたらす生体ストレスとして、酸化ストレスや小胞体ストレスが注目されているが、近年「糖化ストレス」がこれらと悪循環を形成し、個体老化を促進することが明らかになっている［1］。糖化ストレスは、体内のタンパク質と還元糖が非酵素的に反応することで生じる現象であり、糖尿病合併症やアルツハイマー病、血管疾患、骨粗鬆症、サルコペニアなどの様々な加齢性疾患の発症に関与することから、個体老化に深く関係していると考えられている。

本研究では糖化ストレスが骨格筋の機能低下を通じて個体老化を誘導する可能性を明らかにするために､1) 糖化ストレスが筋細胞膜に与える影響、2）糖化ストレスが筋再生に与える影響、3）糖化ストレスが骨格筋マイオカイン発現に与える影響の 3 点に着目して研究を進めた。また、付随して脳機能に与える影響についても検討した。

本研究の結果､短期的（〜1 カ月）な糖化ストレス負荷により筋細胞膜の脆弱化が進行し筋再生が遅れること、また炎症性サイトカインやケモカイン発現が増加することが明らかになった。これらの結果は、糖化ストレスが骨格筋機能低下を通じて個体老化を促進する可能性を示唆しており、骨格筋を介した糖化ストレス抑制戦略の開発が、個体老化制御や健康寿命延伸につながる可能性があることを示唆している。

方法および結果

1. 糖化ストレスが筋細胞膜に与える影響

10 週齢の雄性 C57BL/6NCr マウスを用いて、糖化ストレスが筋細胞膜に与える影響を検討した。マウスを 2 群に分け、グリセルアルデヒド由来の AGEs（0.5 mg/g）を 1 日 1 回、1 週間にわたり腹腔内投与した糖化ストレス群（n＝34）と、牛血清アルブミンを同量投与したコントロール群（n＝32）に分けた。その後、協働筋腱切除法により足底筋に過負荷を誘導し、過負荷開始 1 週間後に足底筋を摘出した。筋細胞の崩壊を鏡顕観察で調べたところ、コントロール群では過負荷により正常な筋肥大が観察されたが、AGEs 投与群では一部のマウス（9 匹中 4 匹）で筋細胞の崩壊が観察された。さらに、プロテオーム解析により、4,659 個のタンパク質を検出し、クラスター分析を用いて AGEs 投与の影響を受けた 436 個のタンパク質を同定した。Gene ontology 解析の結果、これらのタンパク質には細胞膜の構成に関与するものが多いことが明らかになった（図 1)。

また、マウス由来筋芽細胞株 C2C12 を用いて、AGEs 刺激が細胞膜脆弱性へ与える影響を検討した。まず、AGEs（1 mg/mL）を含む培養液中で C2C12 筋芽細胞を 1 時間インキュベートし、培養プレートに播種して細胞接着能を調べた。その結果、AGEs 群ではコントロール群と比較して細胞接着能が低下していた。次に、分化し

た C2C12 筋管細胞を用いて、AGEs 刺激が細胞膜損傷へ与える影響を検討した。蛍光色素を付加した dextran 存在下でガラスビースを用いて細胞膜に物理的損傷を誘導し、dextran の細胞内への取り込み量を蛍光観察したところ、AGEs 刺激群ではコントロール群と比べて、dextran 取り込み量が増加していた。これらの結果は、糖化ストレスは筋細胞膜を脆弱化し、筋細胞崩壊を促進することを示唆している。

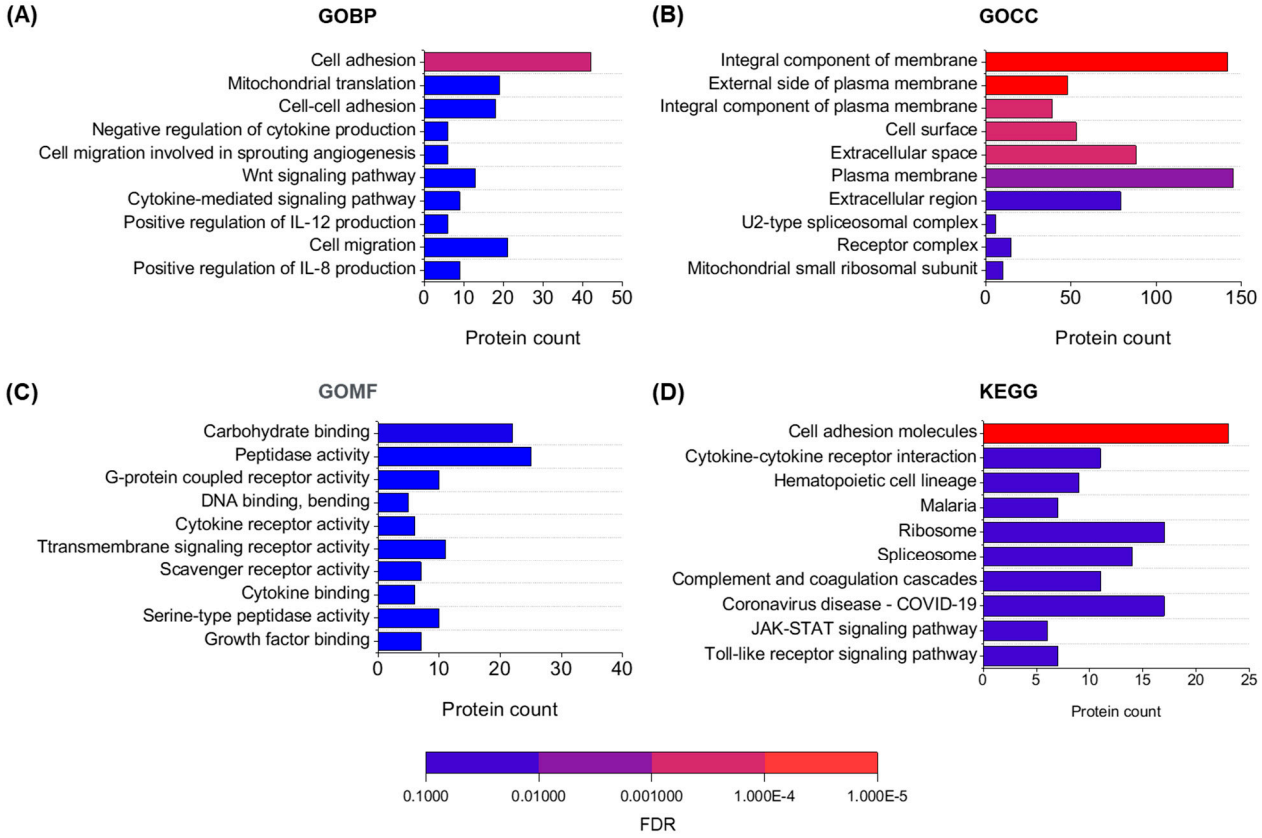


図 1. AGEs 投与により変動が見られたタンパク質の Gene ontology 解析

A) Gene Ontology Biological Process（GOBP）リストで検出された特徴的な GO term。

B) Gene Ontology Cellular Component（GOCC）リストで検出された特徴的な GO term。

C) Gene Ontology Molecular Function（GOMF）リストで検出された特徴的な GO term。

D) Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes（KEGG）リストで検出された特徴的な GO term。

グラフの横軸は各 GO term に含まれるたんぱく質の個数。色分けは false discovery rate（FDR）を示す。図は Egawa et al.［2］より許諾のうえ転載。

2. 糖化ストレスが筋再生に与える影響

上記 1 と同様の処置により糖化ストレスを誘導したマウス（n＝8）およびコントロールマウス（n＝8）を用い、前脛骨筋に蛇毒である cardiotoxin（10 μM）を 100 μL 注入して筋損傷を誘導し、損傷 1 週間後の筋再生状態を両群で比較検討した。

ヘマトキシリン－エオジン染色により筋線維あたりの中心核数を調べたところ、AGEs 投与群ではコントロール群と比較して、筋線維あたりの中心核数が低値であった（図 2）。さらに、免疫組織染色により、再生期に現れる胚性ミオシン重鎖の発現を定量化したところ、AGEs 投与群ではコントロール群と比較して低値であった。これらの結果は、糖化ストレスが筋再生を阻害していることを示唆している。

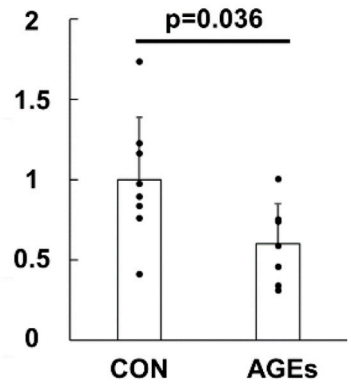


図 2. 筋再生時の筋線維あたりの中心核数
グラフの縦軸は筋線維あたりの中心核数をコントロール群（CON）に対する比率で表したもの。統計解析は対応のない 2 群間の t 検定を行った。グラフは平均値 ±標準偏差で表し、グラフ中の●は各サンプルの値を示す。

3. 糖化ストレスがマイオカイン発現に与える影響

4 週齢の雄性 C57BL/6NCr マウスを用い、メチルグリオキサールを 1%含む飲水を 1 か月間自由摂取させることにより、糖化ストレスを誘導した（n＝10）。メチルグリオキサールを含まない飲水で飼育したマウスをコントロール群とした（n＝10）。投与開始 1 カ月後に足底筋を摘出し、サイトカインならびにケモカインの発現状態を抗体アレイ（Proteome Profiler Mouse XL Cytokine Array、R&D systems 社製）により測定した。また、脳機能への影響を調べるために行動試験を実施した。

抗体アレイの結果、メチルグリオキサール投与群では検出された 111 個のタンパク質中 91 個が増加、20 個が減少した。PLS-VIP 解析では、Reg3G や CCL5、PD-ECGF などの分泌タンパク質の変動が顕著であった（図 3）。これは、糖化ストレスがマイオカインの発現を促進していることを示唆する。ウエスタンブロット解析により DNase2 発現の低下が認められた。これは、糖化ストレスが DNA 修復機構を抑制していることを示唆する。一方、Y-maze test および Barnes maze test では認知機能の低下は確認されなかったことから、短期的な糖化ストレス負荷が記憶・学習能力には影響を与えない可能性を示唆する。

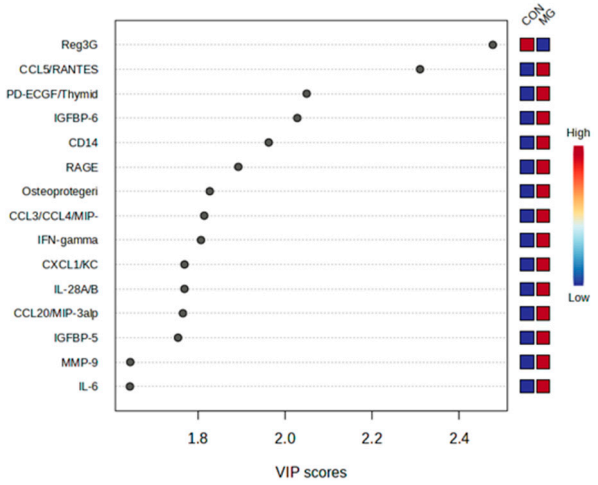


図 3. 部分最小二乗（PLS）回帰モデルの投影における変数重要度（VIP）スコア
抗体アレイで検出された 111 個のタンパク質に対して、MetaboAnalyst ソフトウェア（https://www.metaboanalyst.ca/）を用いて PLS 解析を実施し、VIP スコアを算出した。
CON：コントロール群、MG：メチルグリオキサール投与群。

考　察

細胞膜脆弱化は、加齢、糖尿病、癌性悪液質における骨格筋の衰弱の特徴である［3］。本研究では、AGEs 投与群において筋細胞膜の脆弱化が確認された。これは、AGEs が RAGE を介して筋細胞膜の機能を低下させ、筋細胞崩壊を促進する可能性を示唆する。さらに、AGEs 投与群では筋肉損傷からの筋再生が遅延していた。これは、糖化ストレスが筋衛星細胞の活性化や増殖を抑制していることを示唆する。これらの結果は、AGEs による細胞膜脆弱化が筋機能異常の発症に関与する新たな要因である可能性を示唆している。

また、加齢に伴う骨格筋サテライト細胞の機能低下は筋再生能を減弱させてサルコペニアの誘導因子となる［4］。本研究では、AGEs 負投与群で損傷からの筋再生時の中心核数保有筋細胞の減少が確認された。損傷からの筋再生はサテライト細胞の活性化や増殖、分化、融合という過程を経て行われる。中心核を保有する細筋線維の減少は筋再生が遅延していることを示しており、糖化ストレスは筋再生能を低下させることを示唆している。

骨格筋で産生、分泌されたマイオカインは、血流を介して全身に運ばれ、各臓器の機能を調節している［5］。本研究では、糖化ストレス負荷により骨格筋中のマイオカイン、特に炎症性のサイトカインやケモカインの発現増加が確認された。これは、骨格筋で生じた糖化ストレスが全身性に影響をおよぼす可能性を示すものである。分子機序として、DNase2 発現が低下していたことから、組織内に損傷 DNA が蓄積し、DNA センシングシステムを介した炎症応答が惹起された可能性がある。

本研究では、糖化ストレスが筋細胞膜の脆弱化、筋再生能の低下、炎症性のマイオカイン産生を誘導することを明らかにした。これらの作用が長期的に持続することにより、骨格筋の老化が進行し、全身性に影響を与える可能性が示唆される。今後は、骨格筋特異的 RAGE 欠損マウスを用いた検討を実施し、糖化ストレスによる骨格筋機能低下のより詳細な機序や臓器連関との関連性を明らかにする必要がある。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、京都大学大学院人間・環境学研究科教授の林達也先生、豊橋創造大学大学院健康科学研究科教授の後藤勝正先生、京都大学大学院農学研究科助教の横川拓海先生である。

文　献

1） Yonei Y, Yagi M, Takabe W. Stop the “Vicious Cycle” induced by Glycative Stress. Glycative Stress Research. 2020 Mar 31. DOI: 10.24659/gsr.7.1_13

2） Egawa T, Ogawa T, Yokokawa T, Kido K, Iyama R, Zhao H, Kurogi E, Goto K, Hayashi T. Glycative stress inhibits hypertrophy and impairs cell membrane integrity in overloaded mouse skeletal muscle. J Cachexia Sarcopenia Muscle. 2024 Apr 4. PMID: 38575520. DOI: 10.1002/jcsm.13444.

3） Demontis F, Piccirillo R, Goldberg AL, Perrimon N. Mechanisms of skeletal muscle aging: insights from Drosophila and mammalian models. Dis Model Mech. 2013 Nov;6(6):1339-52. Epub 2013 Oct 2. PMID: 24092876. DOI: 10.1242/dmm.012559.

4） Huo F, Liu Q, Liu H. Contribution of muscle satellite cells to sarcopenia. Front Physiol. 2022 Aug 12;13:892749. PMID: 36035464. DOI: 10.3389/fphys.2022.892749.

5） Chow LS, Gerszten RE, Taylor JM, Pedersen BK, van Praag H, Trappe S, Febbraio MA, Galis ZS, Gao Y, Haus JM, Lanza IR, Lavie CJ, Lee CH, Lucia A, Moro C, Pandey A, Robbins JM, Stanford KI, Thackray AE, Villeda S, Watt MJ, Xia A, Zierath JR, Goodpaster BH, Snyder MP. Exerkines in health, resilience and disease. Nat Rev Endocrinol. 2022 May;18(5):273-289. Epub 2022 Mar 18. PMID: 35304603. DOI: 10.1038/s41574-022-00641-2.