

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：33930

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26560371

研究課題名(和文)糖化ストレスが骨格筋機能およびシグナル伝達ネットワークにおよぼす影響の包括的探索

研究課題名(英文)The effect of glycative stress on functions and signal transduction networks in skeletal muscle

研究代表者

江川 達郎(EGAWA, Tatsuro)

豊橋創造大学・健康科学研究科・協力研究員

研究者番号：00722331

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、糖化ストレスによる骨格筋機能への影響を明らかにすることを目的とした。培養骨格筋細胞(C2C12)を用いた検討により、終末糖化産物(advanced glycation end products: AGEs)が糖代謝および筋形成に関わるタンパク質のリン酸化状態を変動させることが明らかになった。また、マウスでの生体実験により、AGEsが筋形成やタンパク質合成を抑制して、骨格筋成長を阻害することが明らかになった。以上の結果は、糖化ストレスが骨格筋機能を低下させる可能性を示唆している。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to investigate the effect of glycative stress on skeletal muscle functions. The treatment of advanced glycation end products (AGEs) in C2C12 skeletal muscle cells affected phosphorylated state of proteins associated with glucose metabolism and/or muscle development. In addition, the consumption of diets containing high AGEs suppressed skeletal muscle growth via inhibiting muscle development and protein synthesis in mice. These data suggest that glycative stress deteriorates skeletal muscle functions.

研究分野：骨格筋生化学

キーワード：糖化 AGEs 骨格筋 リン酸化 タンパク質合成 タンパク質分解 筋形成 筋成長

1. 研究開始当初の背景

生体内のタンパク質は、メイラード反応によって徐々にグルコースなどの糖と結びついている。これを「糖化」と呼んでおり、糖化を受けたタンパク質は劣化し機能障害を生じる。また糖化を受けたタンパク質は最終的に毒性の強い終末糖化産物 (advanced glycation end products : AGEs) に変化し、「糖化ストレス」により組織・細胞傷害を引き起こしたり、細胞内シグナル伝達を障害したりして、生活習慣病や加齢性疾患などの病態を形成することが知られている。しかし、糖化ストレスが骨格筋にどのような影響をもたらしているのか、そして作用メカニズムについてのエビデンスは乏しい。

2. 研究の目的

本研究において明らかにしようとする点は以下の2点である

(1) 糖化ストレスによる骨格筋シグナル伝達ネットワークへの影響

糖化ストレスがどのタンパク質を標的にして筋組織・細胞の機能調節に影響を与えているのかについて明らかにするために、タンパク質リン酸化状態を包括的に解析し、糖化ストレスが制御する骨格筋シグナル伝達ネットワークの全体像を把握する。

(2) 糖化ストレスによる骨格筋の形態的および機能的特性への影響

糖化ストレス負荷を受けた骨格筋において、形態的観察や分子生物学・生化学的手法を用いた解析を行い、糖化ストレスによる骨格筋が受ける形態的・機能的変化およびその制御メカニズムを特定する。

3. 研究の方法

(1) マウス由来筋芽細胞 C2C12 を用い、タイプ I コラーゲンがコーティングされた培養プレート上で、増殖培地 (D-MEM, 4.5 g/l glucose, 10% fetal bovine serum) でサブコンフルエント状態にまで増殖させた。その後、分化培地 (D-MEM, 1.0 g/l glucose, 2% horse serum) に交換して、5 日間分化させ筋管細胞を形成させた。分化誘導 5 日目の C2C12 の分化培地中に、糖化アルブミン (AGEs-BSA) を 0.1 mg/ml の濃度で添加し 24 時間の糖化ストレス負荷を行った。AGEs-BSA は N ϵ -carboxymethyl lysine (CML)-BSA、N ϵ -carboxymethyl lysine (CEL)-BSA、glycolaldehyde (GA)-BSA を用い、対照群には BSA のみを添加した。

細胞抽出液に対して逆相タンパク質アレイ (Reverse phase protein array: RPPA) 法による 180 種類のタンパク質リン酸化状態の包括的解析を行った。

(2) 5 週齢雄性 ICR マウスを用い、1) 低 AGEs 食摂取群 (L-AGEs) と 2) 高 AGEs 食摂取群 (H-AGEs) の 2 群に分け 16 週間飼育した。低 AGEs 食摂取群には AIN-93G 準拠食、高 AGEs 摂取群には AIN-93G を 160 で 1 時間加熱した餌を摂取させた。餌および水は自由摂取とした。飼育終了 1 週間前に握力およびぶらさがり試験を行った。飼育終了後、骨格筋 (ヒラメ筋、長指伸筋、腓腹筋、足底筋) を摘出し、筋湿重量を測定した。足底筋に対しては、単離筋電気刺激収縮法により筋張力を測定した。ヒラメ筋および長指伸筋に対しては、ウエスタンブロット法によりタンパク質合成に関わる分子の発現、リアルタイム RT-PCR 法により筋形成およびタンパク質分解に関わる分子の発現を測定した。また、ELISA 法によりヒラメ筋、長指伸筋のタンパク質抽出液および血漿中の CML 発現量を測定した。

4. 研究成果

(1) RPPA 法により 180 種類のリン酸化タンパク質をターゲットとして解析し、96 種類のリン酸化タンパク質を検出した。そのうち、BSA 群において発現が見られた 72 種類のリン酸化タンパク質発現の変化を解析対象とした。BSA 群を比較対照として、AGEs-BSA 群の平均値が増加したリン酸化タンパク質は 8 種類、減少したリン酸化タンパク質は 64 種類であった。そのうち、signal log ratio 値で 0.5 以上に増加したリン酸化タンパク質は p-signal transduction and activator of transcription (Stat) 3 Tyr⁷⁰⁵ の 1 種類、0.5 以下に減少したリン酸化タンパク質は p-Sma- and Mad-related protein (Smad) 2 Ser^{465/467}/Smad3 Ser^{423/425}、p-extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2 Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴、p-eukaryotic translation initiation factor 4 G (eIF4G) Ser¹¹⁰⁸、p-p53 Ser³⁷、p-p53 Ser²⁰ の 5 種類であった。さらには、クラスター解析の結果、糖代謝あるいは筋形成に関わるタンパク質のリン酸化状態が顕著に変動することが明らかになった。

(2) H-AGEs 群と L-AGEs 群における体重および 1 日当たりの摂餌量に差異はなかった。H-AGEs 群の長指伸筋および足底筋の筋湿

重量はL-AGEs群に比べて有意に低値であった。ヒラメ筋重量は両群で差はなかった。また、H-AGEs群はL-AGEs群に比べて、握力およびぶら下がり時間が有意に低かった。握力およびぶら下がり時間はいずれも筋中CML量と負の相関関係が認められた。さらには、単離足底筋の筋張力はH-AGEs群が低値であった。遺伝子発現解析の結果、筋形成を促進する分子である myogenic factor 5 (Myf5) および myogenic differentiation (MyoD) の mRNA 発現が H-AGEs 群で低下していた。また、リン酸化タンパク質発現解析の結果、タンパク質合成を促進する分子である 70 kDa ribosomal protein S6 kinase (p70S6K) の Thr³⁸⁹ リン酸化が H-AGEs 群で減少していた。一方、タンパク質分解を促進する分子である muscle RING finger 1 (MuRF1) および atrogenin-1 の mRNA 発現に差異はなかった。以上の結果から、高 AGEs 含有食摂取により、筋形成シグナルやタンパク質合成シグナルの減弱を介して、骨格筋成長が阻害される可能性が明らかになった。

本研究の検討により、糖化ストレスが骨格筋のタンパク質リン酸化状態を変動させることが明らかになった。特に、糖代謝や筋形成に関わるリン酸化タンパク質への影響が顕著であった。これまでに糖化ストレスによる糖代謝（インスリン抵抗性）に対する影響については報告されていたが、筋形成シグナルネットワークに影響を及ぼすことが本研究により初めて明らかにされた。また、AGEs を摂食させた生体実験においても、多量の AGEs を長期摂取することにより、骨格筋の成長が抑制されることが示された。AGEs 摂取により、筋形成に関わる分子の遺伝子発現が低下するとともに、タンパク質合成に関わる分子のリン酸化状態が低下していたことも明らかになった。以上より、糖化ストレスは、骨格筋のタンパク質発現やリン酸化（活性化）状態に影響を及ぼし、骨格筋の成長や収縮機能の低下を引き起こすことが示唆される。

5. 主な発表論文等 〔雑誌論文〕(計 8 件)

Egawa T, Tsuda S, Goto A, Yokoyama S, Ohno Y, Goto K, Hayashi T. Potential involvement of dietary advanced glycation end products in impairment of skeletal muscle growth and muscle contractile function in

mice. *British Journal of Nutrition*, 117 (1), 21-29, 2017.

DOI: 10.1017/S0007114516004591

Yokoyama S, Ohno Y, Egawa T, Yasuhara K, Nakai A, Sugiura T, Ohira Y, Yoshioka T, Okita M, Origuchi T, Goto K. Heat shock transcription factor 1-associated expression of slow myosin heavy chain in mouse soleus muscle in response to unloading with or without reloading. *Acta Physiologica*, 217 (4): 325-337, 2016.

DOI: 10.1111/apha.12692

Egawa T, Ohno Y, Goto A, Sugiura T, Ohira Y, Yoshioka T, Hayashi T, Goto K. Caffeine affects myotube size as well as regulates protein degradation and protein synthesis pathways in C2C12 skeletal muscle cells. *Journal of Caffeine Research*, 6 (2): 88-96, 2016.

DOI: 10.1089/jcr.2015.0034

Ohno Y, Egawa T, Yokoyama S, Nakai A, Sugiura T, Ohira Y, Yoshioka T, Goto K. Deficiency of heat shock transcription factor 1 suppresses heat stress-associated increase in slow soleus muscle mass of mice. *Acta Physiologica*, 215 (4): 191-203, 2015.

DOI: 10.1111/apha.12600

Goto A, Egawa T, Sakon I, Oshima R, Ito K, Serizawa Y, Sekine K, Tsuda S, Goto K, Hayashi T. Heat stress acutely activates insulin-independent glucose transport and 5'-AMP-activated protein kinase prior to an increase in HSP72 in rat skeletal muscle. *Physiological Reports*, 3 (11): e12601, 2015.

DOI: 10.14814/phy2.12601

Tsuda S, Egawa T, Kitani K, Oshima R, Ma X, Hayashi T. Caffeine and contraction synergistically stimulate 5'-AMP-activated protein kinase and insulin-independent glucose transport in rat skeletal muscle. *Physiological Reports*, 3 (10): e12592, 2015.

DOI: 10.14814/phy2.12592

Egawa T, Goto A, Ohno Y, Yokoyama S, Ikuta A, Suzuki M, Sugiura T, Ohira Y, Yoshioka T, Hayashi T, Goto K. Involvement of AMPK in regulating slow-twitch muscle atrophy during hindlimb unloading in mice. *American Journal of Physiologi-Endocrinology and Metabolism*, 309 (7): E651-662, 2015.

DOI: 10.1152/ajpendo.00165.2015

Oshima R, Yamada M, Kurogi K, Ogino Y, Serizawa Y, Tsuda S, Ma X, Egawa T, Hayashi T. Evidence for organic cation transporter-mediated metformin transport and 5'-adenosine monophosphate-activated protein kinase activation in rat skeletal muscles. *Metabolism*, 64 (2): 296-304, 2015.

DOI: 10.1016/j.metabol.2014.10.037

〔学会発表〕(計5件)

江川達郎、津田諭志、後藤亜由美、後藤勝正、林達也。高AGEs含有食の長期摂取によるマウス骨格筋量および筋力発揮への影響。第55回日本栄養・食糧学会近畿支部大会。2016年10月22日。帝塚山学院大学(大阪府大阪狭山市)。

江川達郎、林達也、後藤勝正。代謝センサーAMPKの骨格筋萎縮・肥大調節機構。第62回日本宇宙航空環境医学会大会日本宇宙生物科学会第30回大会合同大会。2016年10月13日~15日。愛知医科大学(愛知県長久手市)。

江川達郎、津田諭志、後藤亜由美、横山真吾、大野善隆、後藤勝正、林達也。食事性AGEsがマウス骨格筋の成長に及ぼす影響。第71回日本体力医学会大会。2016年9月23日~25日。岩手県民情報交流センター(岩手県盛岡市)。

Egawa T, Hayashi T, Goto K. Possible role of metabolic sensor in muscle adaptations under microgravity environment. 第93回日本生理学会大会。2016年3月22日~24日。札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)。

江川達郎、大野善隆、横山真吾、後藤亜由美、津田諭志、林達也、後藤勝正。終末糖化産物AGEs蓄積に伴う骨格筋リン酸化タンパク質動態の網羅的解析。第59回日本糖尿病学会年次学術集会。2016年5月19日~21日。国立京都国際会館(京都府京都市)。

〔図書〕(計3件)

Egawa T, Tsuda S, Oshima R, Goto A, Ma X, Goto K, Hayashi T. Regulatory mechanism of skeletal muscle glucose transport by phenolic acids. In: *Phenolic Compounds* (Soto-Hernández RM. eds.), InTech, 169-191, March 2017.

Egawa T. Participation of AMPK in the control of skeletal muscle mass. In: *The Plasticity of Skeletal Muscle – From Molecular Mechanism to Clinical Applications* (Sakuma K. ed.), Springer, 251-275, March 2017.

Egawa T, Tsuda S, Hamada T, Goto K, Hayashi T. Regulation mechanism of caffeine on glucose transport and upstream signaling pathways in skeletal muscle. In: *Caffeine: Consumption, Side Effects and Impact on Performance and Mood* (Tolley AS. ed.), Nova Science Publishers, 113-138, June 2014.

〔その他〕

ホームページ

<https://sites.google.com/site/tatsuroegawa/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

江川 達郎 (EGAWA, Tatsuro)
豊橋創造大学・大学院健康科学研究科・協力研究員
研究者番号: 00722331