

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K22806

研究課題名（和文）カルボニルストレス解毒システムをターゲットとした骨格筋老化抑制の検証

研究課題名（英文）Verification of skeletal muscle aging suppression targeting the carbonyl stress detoxification system

研究代表者

江川 達郎（Egawa, Tatsuro）

京都大学・人間・環境学研究科・助教

研究者番号：00722331

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究の検討により、加齢に伴い骨格筋のカルボニルストレスが増加することが明らかになった。さらには、このカルボニルストレスの増加はミトコンドリアタンパク質や細胞外構造体の糖化状態を進行させ、骨格筋の機能低下をもたらしている可能性が示された。しかしながら、その対抗策として、カルボニルストレスの抑制につながる化合物Aの投与が、骨格筋老化抑制に有効であることも明らかになった。以上より、骨格筋老化抑制のターゲットとしてカルボニルストレスの抑制は有効であるものと考えられ、今後は薬物療法などの臨床応用へ展開することで、高齢者の介護予防に貢献することが期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高齢社会の進行に伴い介護高齢者の増加が社会問題となっている。介護に至る最大要因として運動器疾患が挙げられ、中でも骨格筋の機能低下を防ぐ手段の構築は喫緊の課題である。本研究では、骨格筋老化を進行させると考えられているカルボニルストレスに焦点を当て、カルボニルストレスの抑制が骨格筋老化抑制に有効であるかを検証した。その結果、老化骨格筋で増加しているカルボニルストレスを薬物で抑制することにより、筋萎縮抑制や血管新生促進がもたらされることを明らかにした。この成果により、将来的にカルボニルストレスの抑制をターゲットにした老化抑制剤の開発が進むことで、健康社会の構築に有益な効果をもたらすことが期待できる。

研究成果の概要（英文）：Examination of this study revealed that carbonyl stress in skeletal muscle increases with aging. Furthermore, it was shown that this increase in carbonyl stress may promote the glycation state of mitochondrial proteins and extracellular structures, resulting in a decrease in skeletal muscle function. However, as a countermeasure, it was also revealed that administration of compound A, which leads to suppression of carbonyl stress, is effective in suppressing skeletal muscle aging. Based on the above, suppression of carbonyl stress is considered to be effective as a target for suppression of skeletal muscle aging, and it is expected that it will contribute to the prevention of long-term care for the elderly by expanding it to clinical applications such as drug therapy.

研究分野：運動生物学

キーワード：サルコペニア 骨格筋 老化 カルボニルストレス glyoxalase 糖化

### 1. 研究開始当初の背景

わが国における要介護に至る最大の要因は運動器障害である。特にサルコペニア（加齢性筋減弱症）の有病率は年々増加しており、高齢者の身体機能低下において筋量や筋力をいかに維持するかが大きな課題となっている。

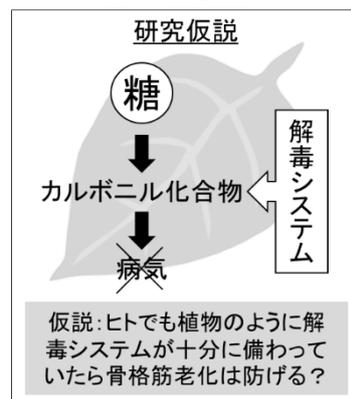
“植物”は光合成により莫大な量の糖を貯めこむ。しかし、糖尿病という概念はない。なぜならば、糖由来の毒性物質に対する解毒システムが上手く機能しているからである。そのシステムがカルボニルストレス解毒システムである。

植物およびヒトの体内では、解糖系によりカルボニル基 (C=O) を有するカルボニル化合物が生成している。カルボニル基は化学反応を起こしやすいため、カルボニル化合物はタンパク質を変性させてしまう。このような、カルボニル化合物の生成や変性タンパク質の蓄積によって、組織・細胞障害（傷害）が起きることをカルボニルストレスと呼んでいる。

植物はカルボニルストレスを glyoxalase system によって解毒している。Glyoxalase system は glyoxalase I および II という酵素によりカルボニル化合物の methylglyoxal を無害な乳酸に変換するシステムである。植物は光合成により数百 mmol/L の糖を蓄えている。したがって、解糖系で生成するカルボニル化合物の生成量はヒトよりはるかに多く、glyoxalase system は植物の生命維持に欠かせないシステムになっている。

ヒトにおいてもこのシステムは備わっているが、植物のような大量のカルボニルストレスを処理する能力はない。したがって、ヒト骨格筋では加齢に伴い、次第にカルボニル化合物の蓄積が進んでいき、これが加齢に伴う筋量や筋力の低下につながっている可能性が示唆されている。このため、カルボニルストレスを抑えることが骨格筋老化を防ぐ有効な手段となる可能性がある (図1)。

図1. 研究背景



### 2. 研究の目的

本研究では、カルボニルストレス解毒システムの一つである glyoxalase system をターゲットとして骨格筋老化抑制が可能であるか検証することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 加齢に伴う glyoxalase システムの変化

若齢 (3 か月齢) および老齢 (24 か月齢) の C57BL/6J マウス (各群 n=8) から骨格筋 (ヒラメ筋、足底筋、腓腹筋、前脛骨筋、長指伸筋) ならびに血液を採取し、それぞれのサンプル中の glyoxalase I 活性を Glyoxalase I Activity Assay Kit (K591-100, BioVision 社)、発現をウェスタンブロット法を用いて測定した。

#### (2) 加齢に伴う骨格筋の糖化状態測定

若齢 (3 か月齢) および老齢 (24 か月齢) の C57BL/6J マウス (各群 n=3) から摘出した骨格筋 (腓腹筋) のタンパク質抽出液に対して、抗 AGEs 抗体 (LS-C664030, LSBio) と磁気ビーズを添加して、免疫沈降法により AGEs 修飾タンパク質を抽出した。その後、LC-MS/MS 解析により AGEs 修飾タンパク質を特定した。

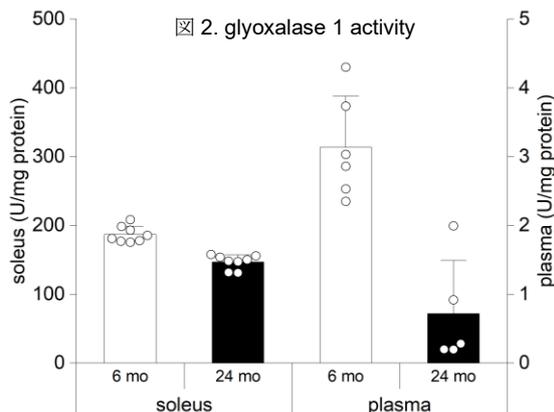
#### (3) 老化マウスへの glyoxalase システム活性化剤投与による骨格筋老化抑制の検討

老齢 (87 週齢) の雄性 C57BL/6 マウスに対して glyoxalase システム活性化作用のある化合物 A (10、50、100 nmol/kg) を 1 日 1 回、1 か月間皮下投与した (各群 n=4-6)。溶媒投与群 (0nmol/kg) を陰性対照群とし、若齢 (20 週齢) マウス群を若齢対照群とした。投与期間終了後、前脛骨筋を採取し、解析に用いた。前脛骨筋に対して免疫組織化学染色法による筋線維横断面積や最小フェレット径、血管新生マーカー分子である CD31 の測定を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 加齢に伴う glyoxalase システムの変化

まずは、加齢に伴う体内のカルボニルストレス解毒システム (glyoxalase システム) の変化について、glyoxalase 1 活性ならびに glyoxalase 1

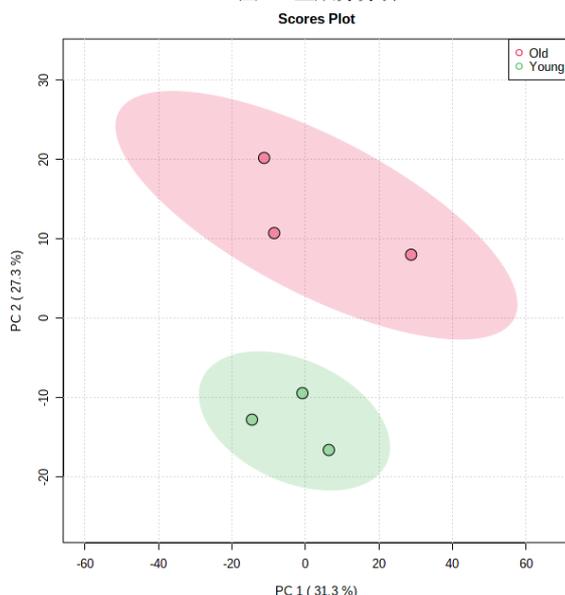


発現を解析した。その結果、glyoxalase1 活性は、老齢群のヒラメ筋および血中において若齢群と比べて有意に低下していた (図 2)。一方、glyoxalase 1 タンパク質発現は、老齢群のヒラメ筋および前脛骨筋において若齢群と比べて有意に低下していた。以上の結果から、加齢に伴い血中ならびに骨格筋内でカルボニルストレス解毒システムの機能が低下していることが示唆される。

### (2) 加齢に伴う骨格筋の糖化状態測定

加齢に伴い、筋中のカルボニルストレス解毒システムの低下が認められたため、次にカルボニル解毒システムの低下によって蓄積する糖化修飾タンパク質の状態をプロテオーム解析で検討した。結果、816 種類の糖化修飾タンパク質が検出され、490 種類が加齢により増加し、364 種類が加齢により減少した。816 種類に対して主成分分析を行ったところ、第 2 主成分で加齢の影響が認められた (図 3)。次に、第 2 主成分の負荷量が大きい 100 種類のタンパク質に対して Enrichment 解析を行ったところ、“Oxidative phosphorylation (KEGG)”、“extracellular matrix (GOCC)”、“metabolic process (GOBP)”、“cellular component organization or biogenesis”のタンパク質群が抽出され、加齢に伴って、骨格筋のミトコンドリアタンパク質や細胞外構造体の糖化が進んでいる可能性が示唆された。以上の結果から、加齢に伴うカルボニルストレスの増大により、骨格筋のミトコンドリアや細胞外構造体の糖化が進み、筋機能の低下を誘発している可能性が示唆された。

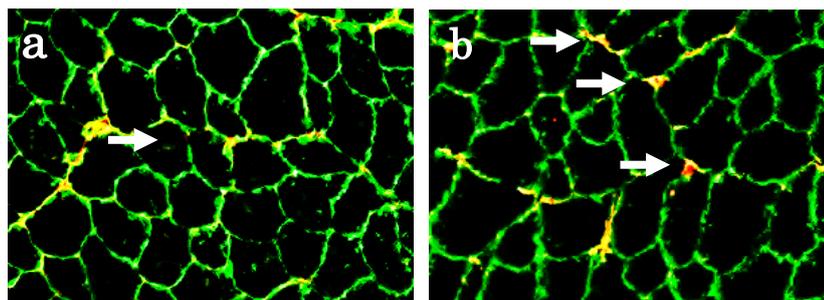
図 3. 主成分分析



### (3) 老化マウスへの glyoxalase システム活性化剤投与による骨格筋老化抑制の検討

次に、化合物 A の生体投与によって glyoxalase システムを活性化させることにより、骨格筋の老化が抑制できるか検証した。結果、筋線維横断面積および最小フェレット径では、10 nmol/kg 投与群において陰性対照群と比較して増加傾向が見られ、若齢対照群と類似した分布になることが認められた。また 50、100 nmol/kg 投与群において陰性対照群と比較して、筋線維横断面積および最小フェレット径の減少傾向が見られた。血管新生マーカー分子である CD31 では、筋線維数に対する CD31 の個数により算出した結果、50、100 nmol/kg 投与群において陰性対照群と比較して増加傾向が見られた (図 4)。以上の結果から、化合物 A 投与による glyoxalase システムの活性化は、老化に伴う筋萎縮を抑制する可能性が示唆される。

図 4. 免疫蛍光染色画像 (a: control, b: 50 nmol/kg) laminin (green), CD31 (red)



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Egawa Tatsuro, Kido Kohei, Yokokawa Takumi, Fujibayashi Mami, Goto Katsumasa, Hayashi Tatsuya	4. 巻 176
2. 論文標題 Involvement of receptor for advanced glycation end products in microgravity-induced skeletal muscle atrophy in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Acta Astronautica	6. 最初と最後の頁 332 ~ 340
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.actaastro.2020.07.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Egawa T, Ohno Y, Yokoyama S, Yokokawa T, Tsuda S, Goto K, Hayashi T.	4. 巻 8
2. 論文標題 The protective effect of Brazilian propolis against glycation stress in mouse skeletal muscle.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Foods	6. 最初と最後の頁 439
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/foods8100439	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 江川達郎、横川拓海、木戸康平、後藤勝正、林達也
2. 発表標題 廃用性筋萎縮進行におけるRAGEシグナルの関与
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 江川達郎、藤林真美、伊藤理香、後藤勝正、林達也
2. 発表標題 若年男性における身体の糖化状態が筋力トレーニング効果におよぼす効果
3. 学会等名 第75回日本体力医学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Egawa T, Fujibayashi M, Ito R, Goto K, Hayashi T
2. 発表標題 The effect of glycation stress on strength-enhancing effect of resistance training in young male
3. 学会等名 APS Integrative Physiology of Exercise (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小川岳史、江川達郎、林達也。
2. 発表標題 骨格筋肥大に対する糖化ストレスの影響
3. 学会等名 第34回日本体力医学会近畿地方会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 江川達郎、横川拓海、木戸康平、後藤勝正、林達也。
2. 発表標題 後肢懸垂時に発生する糖化ストレスによるマウスヒラメ筋萎縮への影響
3. 学会等名 第65回日本宇宙航空環境医学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 江川達郎、大野善隆、横山真吾、小川岳史、後藤勝正、林達也。
2. 発表標題 自発走運動によるマウス骨格筋適応に対する糖化ストレスの影響
3. 学会等名 第74回日本体力医学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 江川達郎
2. 発表標題 The effect of advanced glycation end products on cellular signaling molecules in skeletal muscle
3. 学会等名 第74回日本体力医学会大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 江川達郎、林達也 他	4. 発行年 2019年
2. 出版社 エヌ・ティー・エス（NTS）	5. 総ページ数 342（153-161）
3. 書名 筋肉研究最前線～代謝メカニズム、栄養、老化・疾病予防、科学的トレーニング法～	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>京都大学大学院人間・環境学研究科健康運動学研究室  <a href="https://sites.google.com/site/tatsuroegawa/">https://sites.google.com/site/tatsuroegawa/</a></p>
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	黒木 英梨子  (Kurogi Eriko)		

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	井山 裕太  (Iyama Yuta)		
研究協力者	横川 拓海  (Yokokawa Takumi)  (80844323)	京都大学・農学研究科・助教   (14301)	
研究協力者	木戸 康平  (Kido Kohei)  (50822730)	福岡大学・スポーツ科学部・助教   (37111)	
研究協力者	大野 善隆  (Ohno Yoshitaka)  (80440808)	豊橋創造大学・保健医療学部・講師   (33930)	
研究協力者	後藤 勝正  (Goto Katsumasa)  (70239961)	豊橋創造大学・健康科学研究科・教授   (33930)	
研究協力者	林 達也  (Hayashi Tatsuya)  (00314211)	京都大学・人間・環境学研究科・教授   (14301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------