

シアル酸を含む糖混合物の老化線維芽細胞に対する抗老化活性の評価

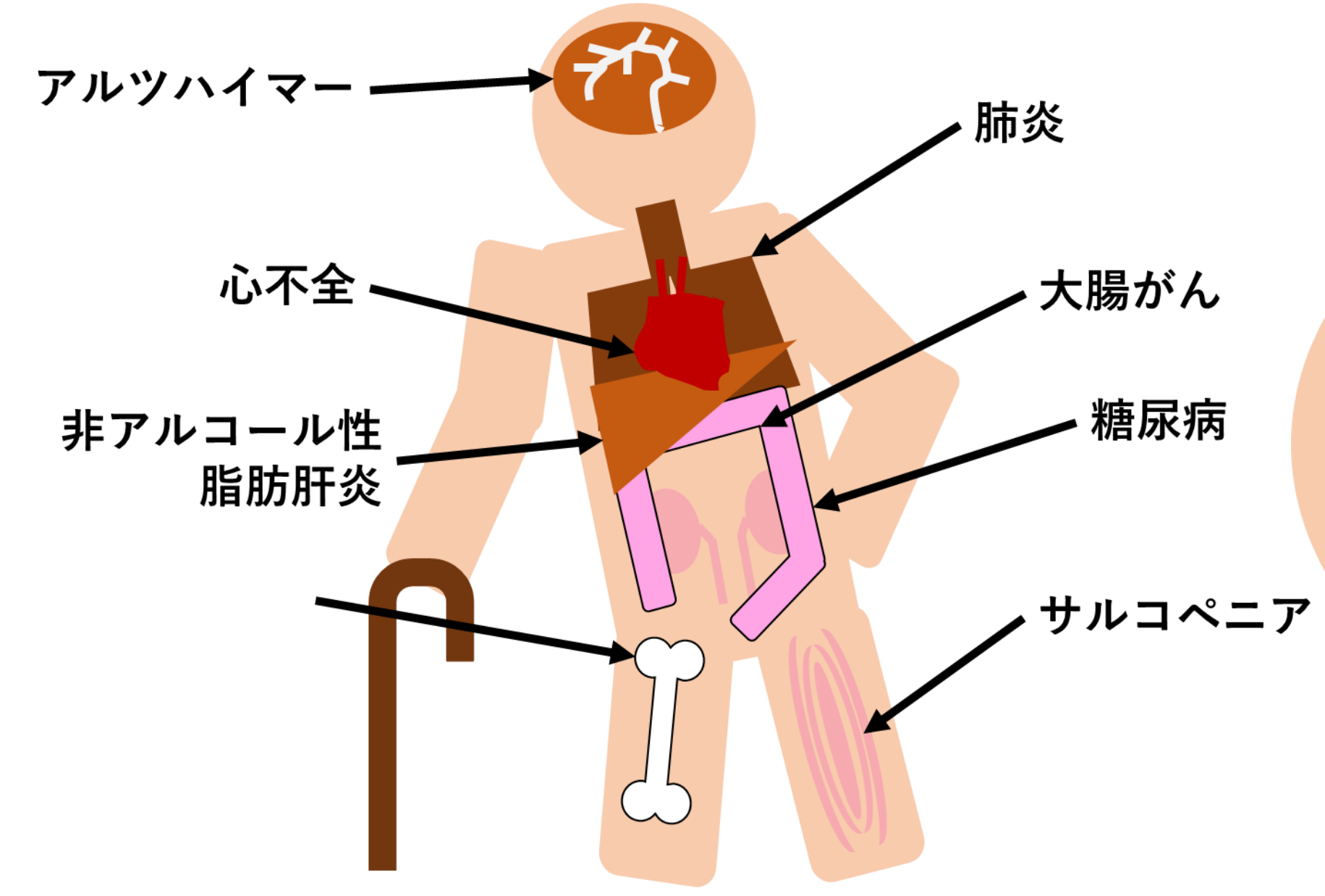
○篠原 侑成¹、藤井 理²、吉野 颯真²、中山 清美³、宇都 義浩²
 1. (株)ツツミプランニング、2. 徳島大学社会産業理工学、
 3. (株)HBCフナト

【序論】糖鎖は各種の糖がグリコシド結合によってつながりあった一群の化合物を指しており、生体内で糖蛋白質や糖脂質となり、組織を保護したり、細胞表面に発現したりすることで細胞間の情報伝達に重要な役割を果たすことが知られている。また、線維芽細胞は、創傷治癒や組織の線維化に重要な役割を果たしており、古くから老化研究に用いられ、線維芽細胞の老化は、肌の老化、創傷治癒の低下や線維化の過形成に伴う病態の発症などにつながる事が知られている。最近の研究より、線維芽細胞の老化の機序として老化に伴ってシアル酸量が低下すること、また、シアル酸が線維芽細胞の活性化に重要であることが示唆されている。そこで我々は、老化線維芽細胞に対するシアル酸を含む種々の糖混合物の抗老化活性および作用機序の解明を試みた。

【結果・考察】19代目相比于29代目の線維芽細胞はSPiDER-β-gal活性が増加し、継代培養による細胞の老化とラパマイシンの抗老化活性が確認された。本実験系において、糖混合物およびリポソーム化糖混合物は濃度依存的に29代目の線維芽細胞のSPiDER-β-gal活性を低下させ、特に1%のリポソーム化糖混合物は糖混合物に比べて有意にSPiDER-β-gal活性を低下させた。また、糖混合物の内、N-アセチルグルコサミン、フコース、マンノース、キシロース、シアル酸をそれぞれ単剤投与し、SPiDER-β-gal活性を測定したところ、各単糖はSPiDER-β-gal活性が糖混合物と比較して、有意に低下しなかった。このことから糖混合物として投与することが抗老化に有効であることが示唆された。続いて、老化マーカーの一つであるP21、P53の発現量をqRT-PCRにより定量化すると、0.1%の糖混合物及びリポソーム化糖混合物は未添加群よりも有意にP21、P53の発現量が低下した。また、老化細胞の細胞内のTotal NAD量及びATP量を測定したところ、0.01%リポソーム化糖混合物では同濃度の糖混合物よりも有意に上昇したことがわかった。以上のことから糖混合物には抗老化作用があり、リポソーム化することでその作用が増強されることが示唆された。

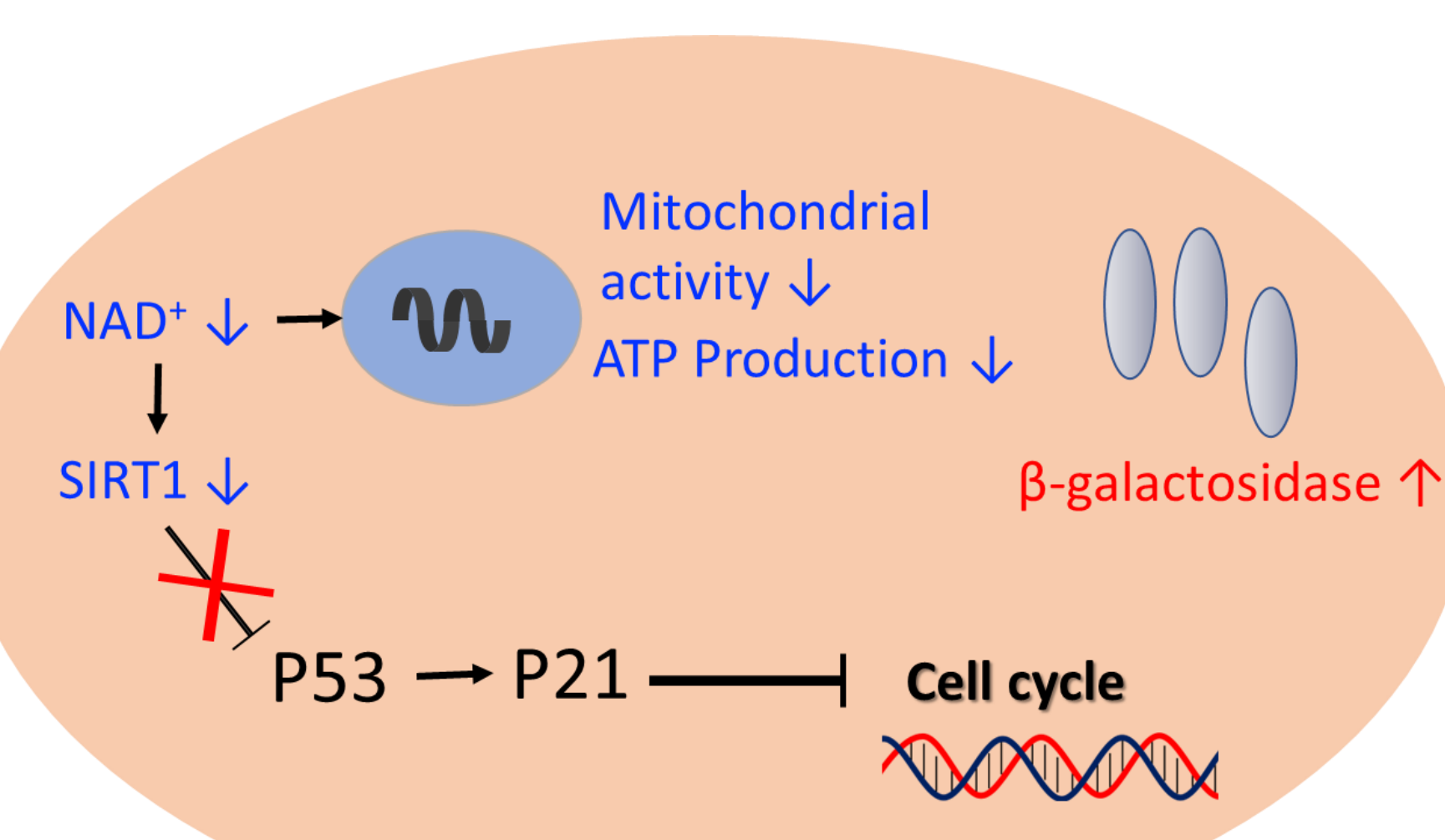
序論

老化関連疾患



老化を抑制することで種々の疾患を抑制することが期待される。

細胞の老化メカニズム



Sasaki et al. Stem Cell Research & Therapy (2017) 8:81
 X. Gu et al. Toxicology in Vitro 57 (2019) 28–38

糖鎖：8種類の単糖類がグリコシド結合で重合した化合物の総称 本研究の新規性

糖鎖

- 細胞表面に存在
- 細菌やウイルスなどの異物の識別・排除
- 細胞間の情報伝達
- 神経系やホルモン系などの制御

糖と老化研究

糖鎖を添加した際のSA-β-gal量の変化

糖鎖の種類

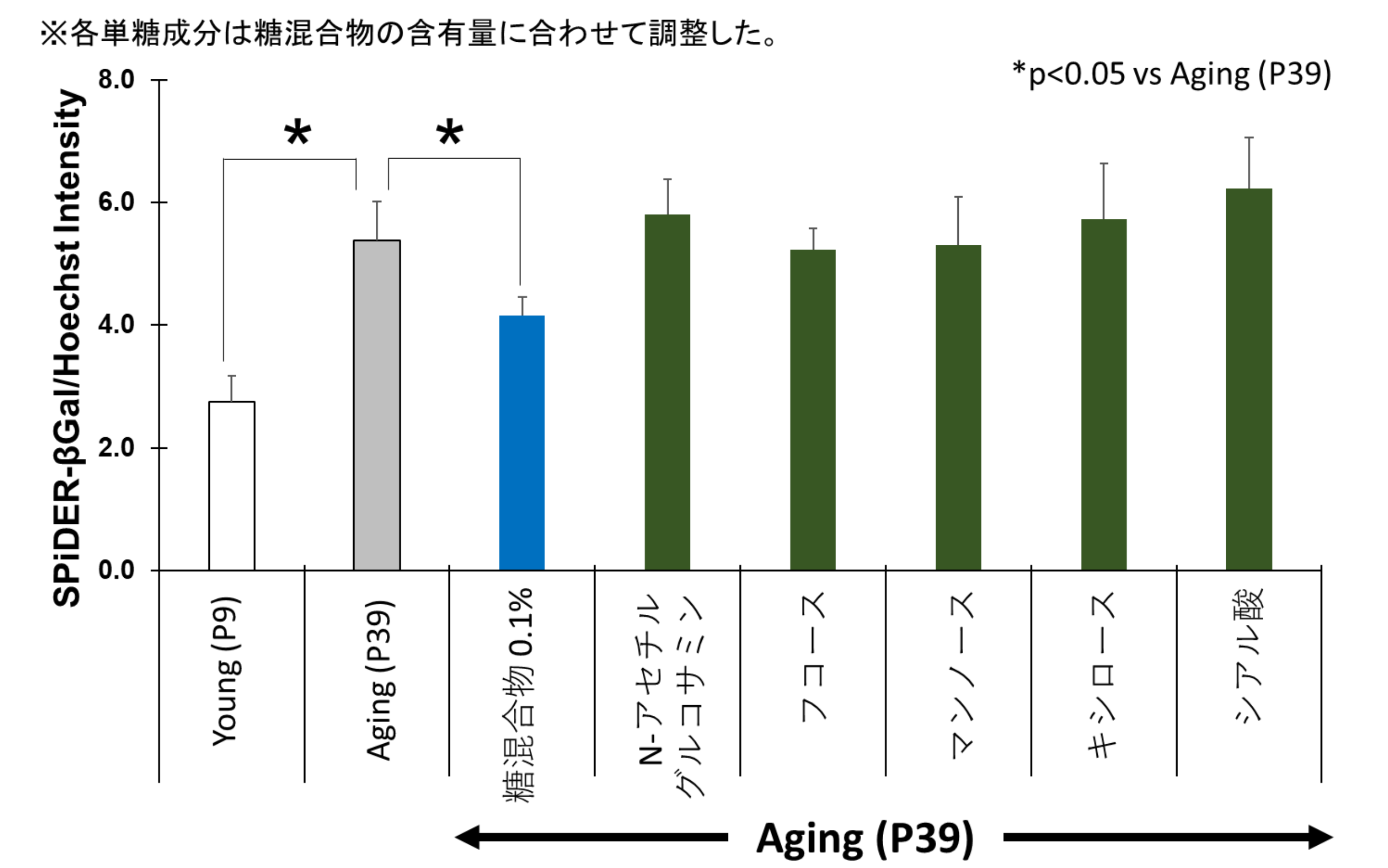
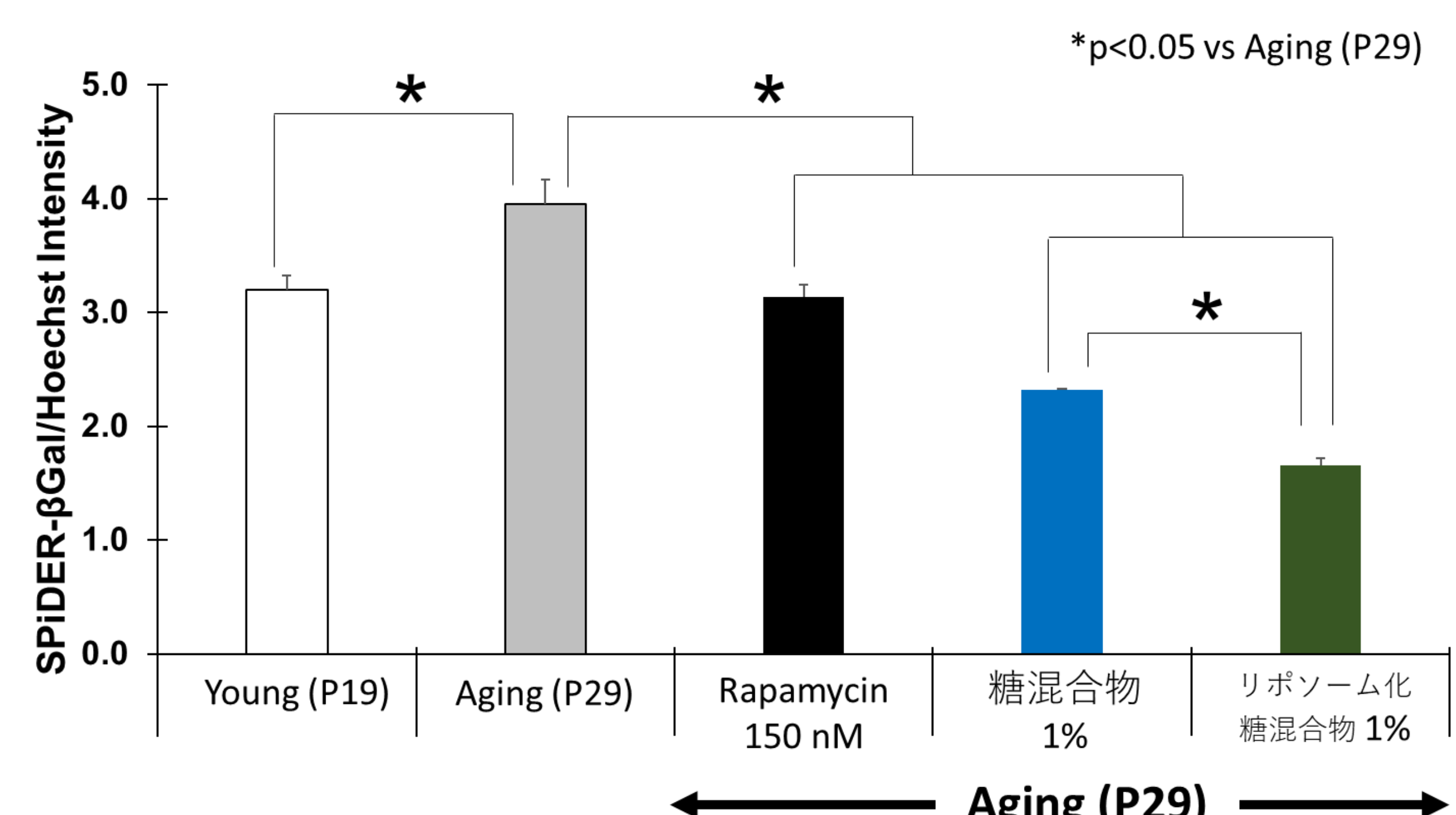
糖混合物及びリポソーム化糖混合物の抗老化に対する有用性を評価

左：糖混合物
右：リポソーム化糖混合物

単糖や糖鎖が老化に関与していることが示唆されているものの、その報告例は少ない。

老化マーカー：β-ガラクトシダーゼ(β-gal)活性

<Methods>
 3.0 × 10⁵ cells
 Incubation (37°C, 24 h)
 Samples (100 µL)
 Incubation (37°C, 72 h)
 1.0 × 10⁴ cells/well
 Working Solution 100 µL
 Incubation (37°C, 30 min)
 Removed supernatant
 Dilution Buffer 100 µL
 蛍光強度測定 (Ex 350 nm, Em 461 nm)
 Removed supernatant
 PBS wash
 Lysis Buffer 50 µL
 Dilution Buffer 100 µL
 Incubation (R.T., 10 min)
 SPiDER-β-Gal working solution 50 µL
 Incubation (37°C, 24 h)
 Stop solution 100 µL
 蛍光強度測定 (Ex 535 nm, Em 580 nm)



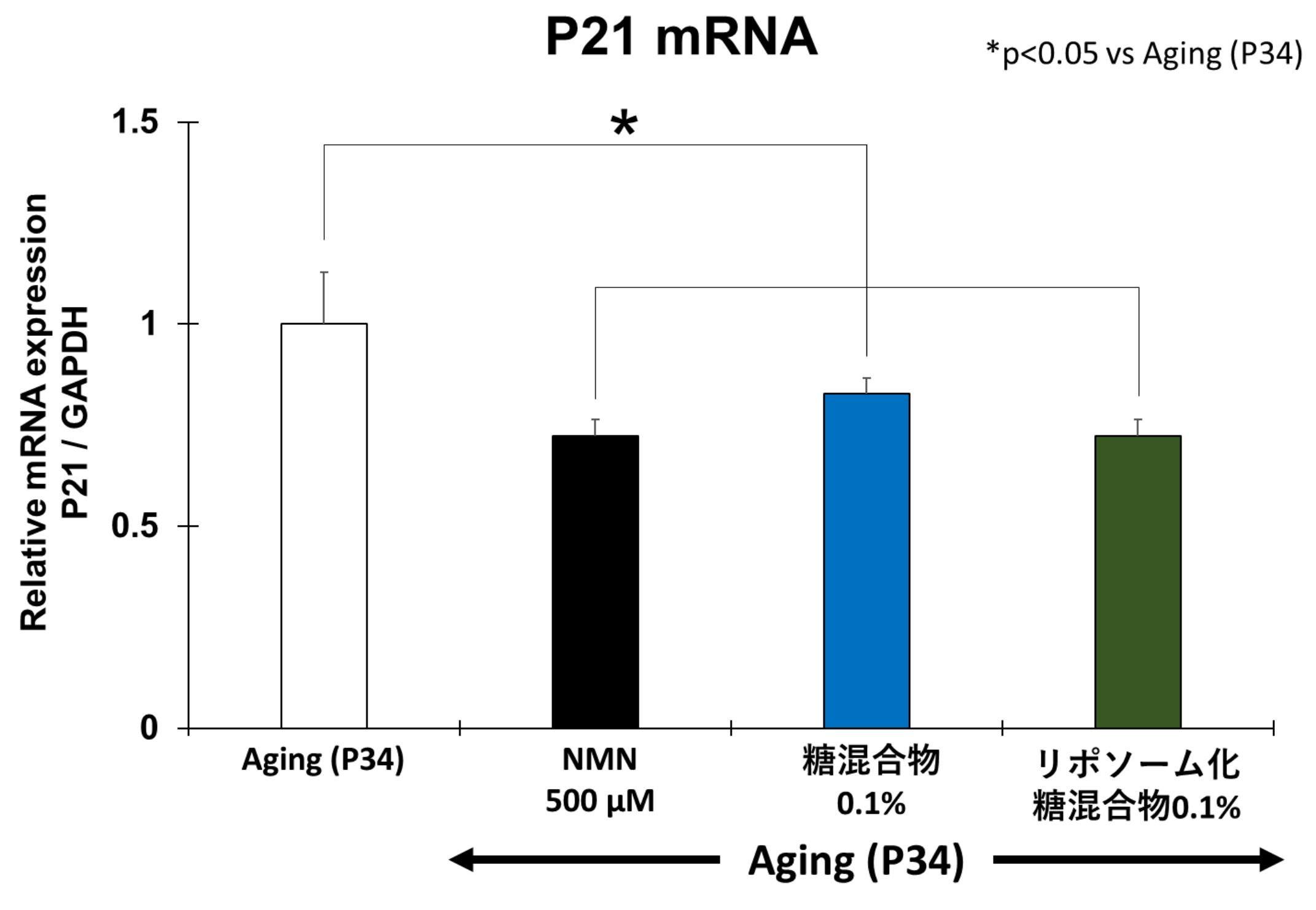
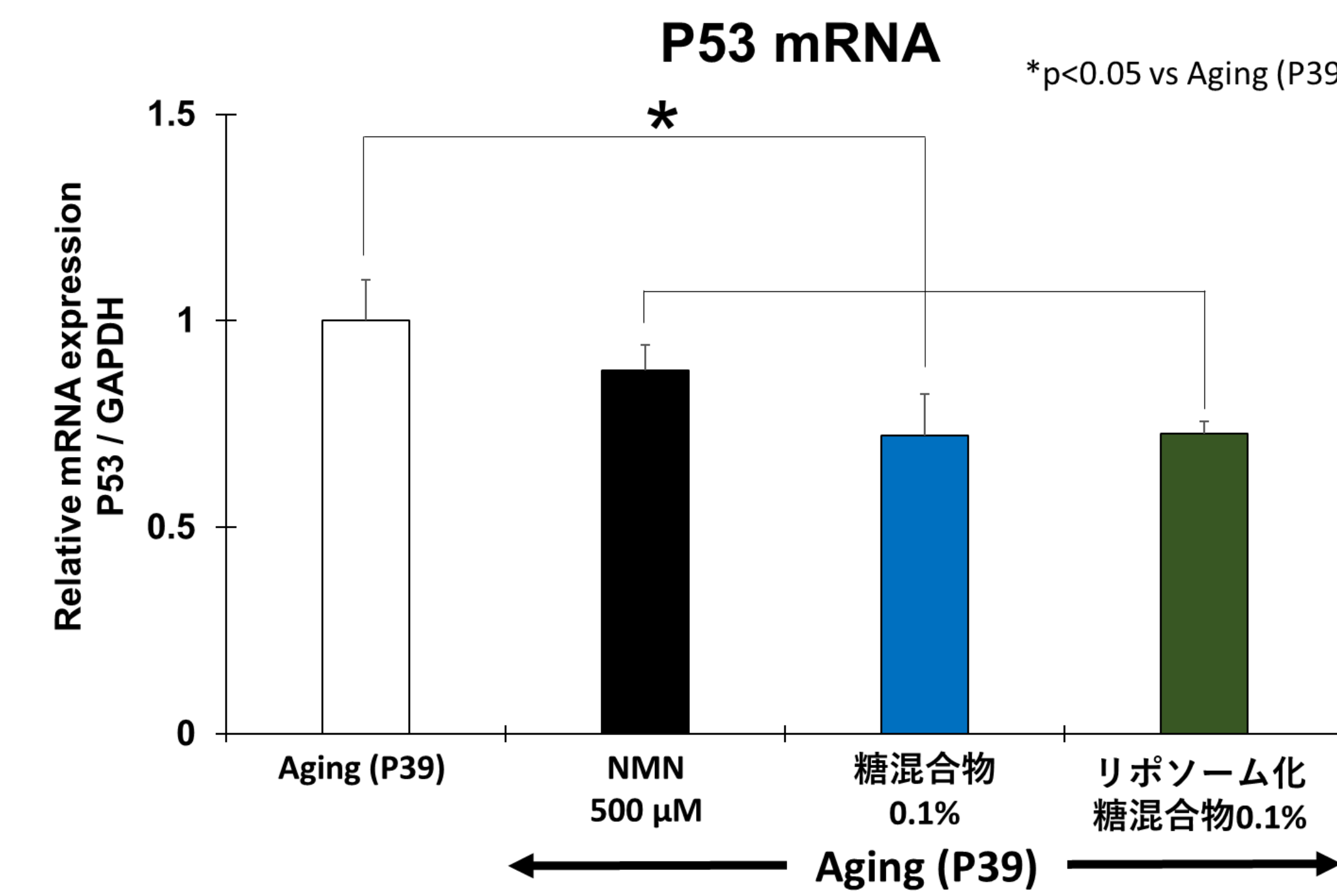
β-gal活性は糖混合物及びリポソーム化糖混合物添加群で低下し、単糖の添加においてはβ-gal活性が変化しなかった。

qRT-PCRによる老化マーカーP53及びP21の発現量解析

RNA抽出
 Trypsin (300 µL)
 Incubation (37°C, 15 min)
 1000 rpm, 1 min
 1 × PBS 2 mL wash
 1000 rpm, 1 min
 1 × PBS 1 mL wash
 1000 rpm, 1 min
 Buffer RA1+β-mercaptoethanol mix (350 µL)
 Vortex
 NucloSpin Filter
 Collection Tube
 11000 × g, 1 min
 70% Ethanol (350 µL)
 NucloSpin Filter Column
 Collection Tube
 11000 × g, 30 sec
 Membrane Desalting Buffer (350 µL)
 11000 × g, 1 min
 Prepare DNase reaction mixture (95 µL)
 R.T. 15 min
 Buffer RAW2 (200 µL)
 11000 × g, 30 sec
 Buffer RAW3 (700 µL)
 11000 × g, 30 sec
 Buffer RAW3 (250 µL)
 11000 × g, 2 min
 RNA solution

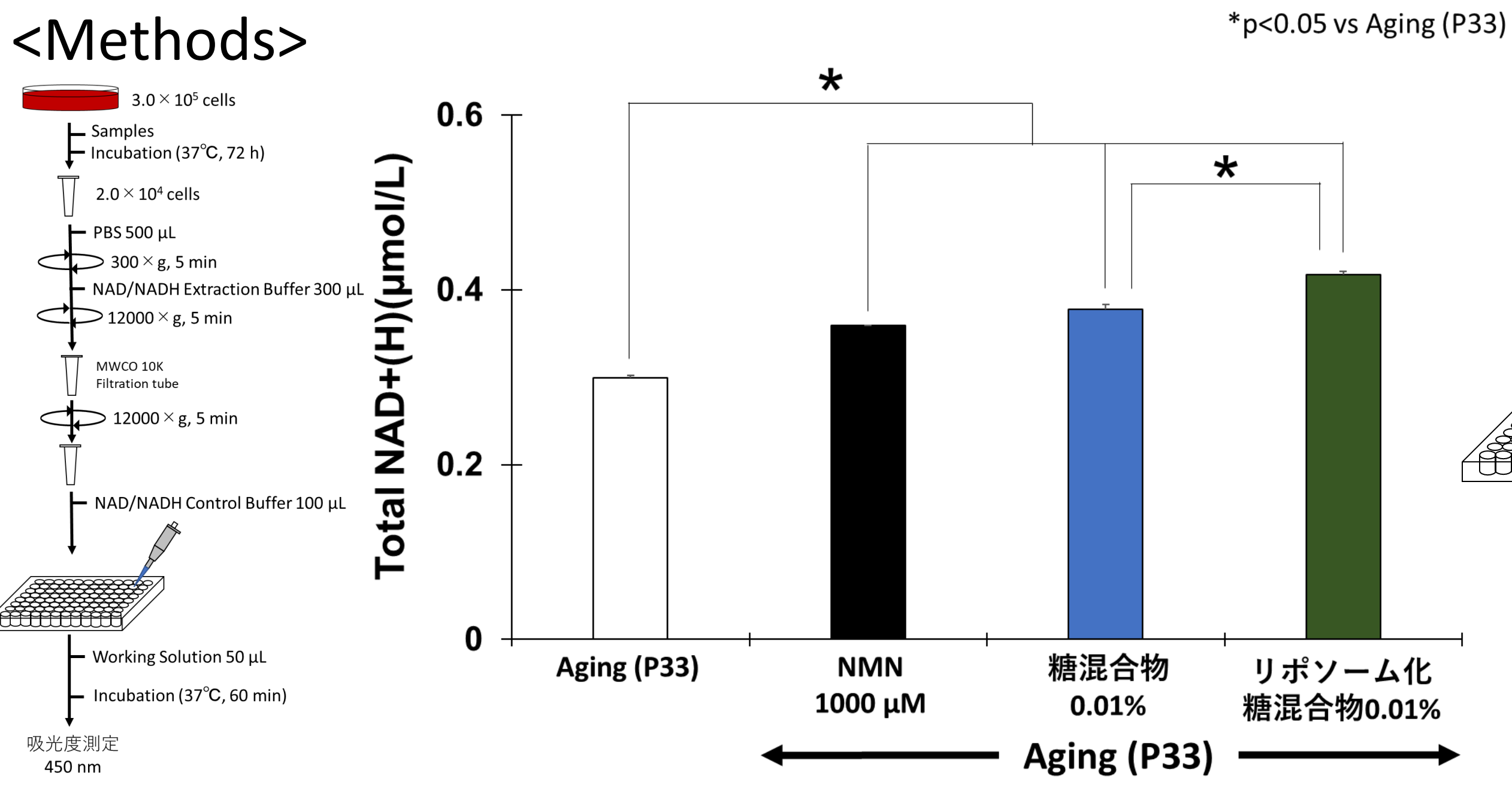
cDNA合成
 50 µM Oligo dT Primer (1 µL/sample)
 10 mM each dNTP Mixture (1 µL/sample)
 鑄型 RNA
 RNase Free dH₂O up to 10 µL
 65°C, 5 min
 On ice-bath
 Mixture 10 µL
 5 × PrimeScript II Buffer (4 µL/sample)
 40 U/µL RNase Inhibitor (0.5 µL/sample)
 200 U/µL PrimeScript II Rtase (1 µL)
 RNase Free dH₂O up to 20 µL
 Stirring gently
 30°C, 10 min
 42°C, 30~60 min
 95°C, 5 min
 On ice-bath
 cDNA solution

RT-PCR
 蒸留水 (16 µL/sample)
 SYBR® Green Realtime PCR Master Mix (25 µL/sample)
 8 µM Primer 1 (2 µL)
 8 µM Primer 2 (2 µL)
 Sample Solution (5 µL)
 Mixture 50 µL in Applied Biosystems
 95°C, 60 sec
 95°C, 15 sec
 60°C, 15 sec
 72°C, 15 sec
 PCR解析

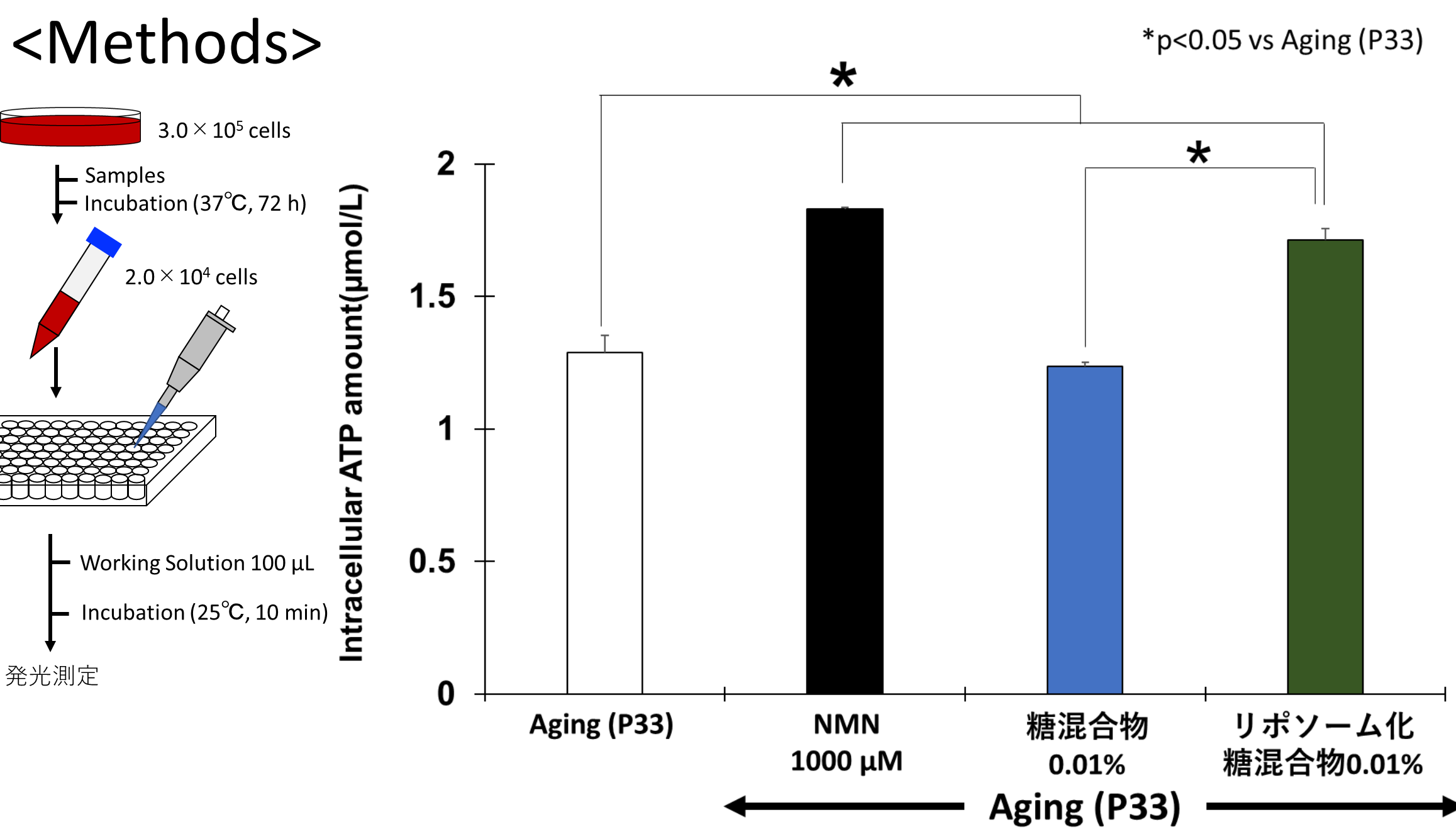


P53及びP21の発現量は糖混合物及びリポソーム化糖混合物添加群で低下した。

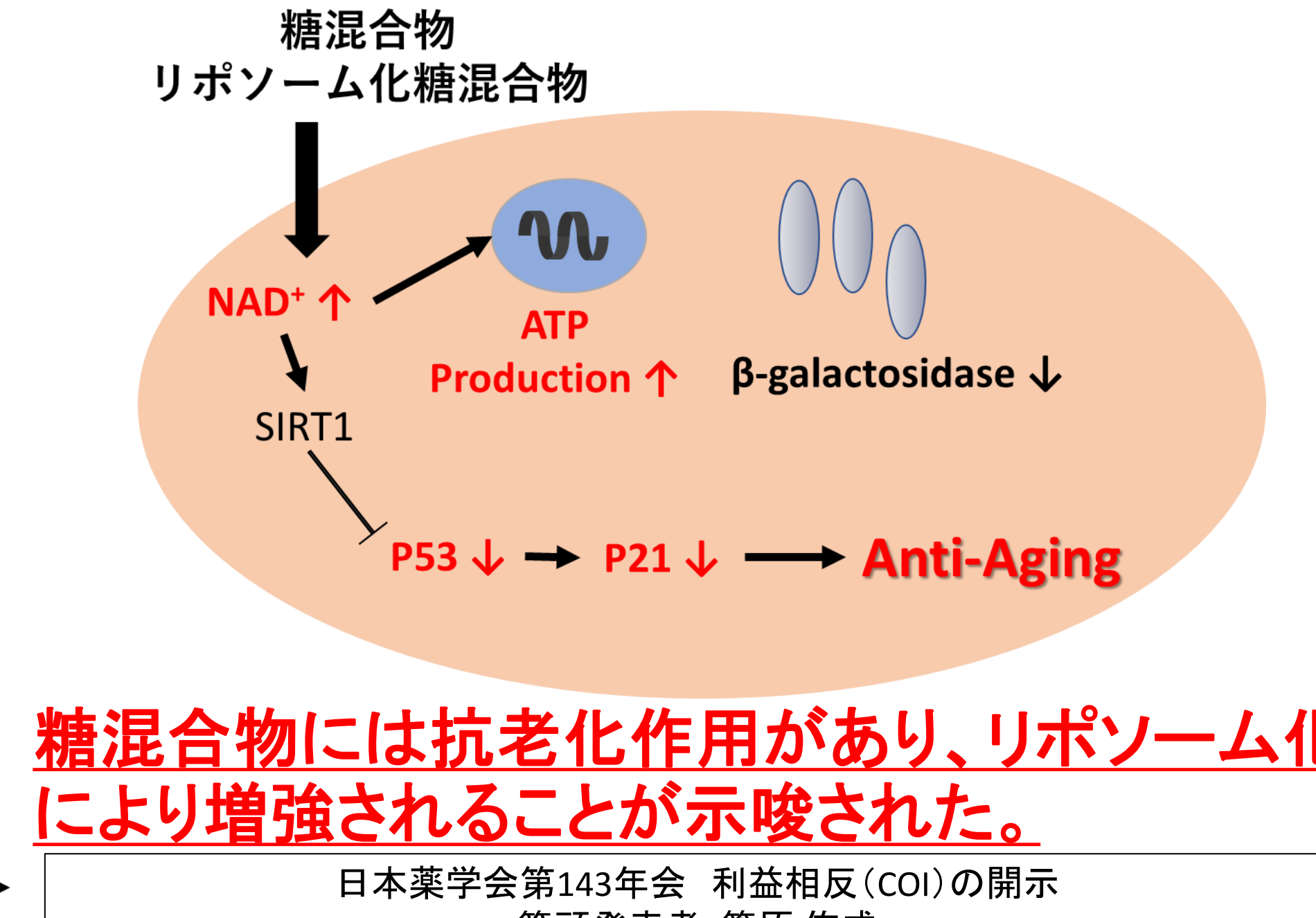
細胞内Total NAD⁺(H)量



細胞内ATP量



まとめ



糖混合物には抗老化作用があり、リポソーム化により増強されることが示唆された。

糖混合物のリポソーム化により細胞内NAD⁺(H)及びATP量が上昇した。

日本薬学会第143年会 利益相反(COI)の開示
 筆頭発表者：篠原 侑成
 筆頭発表者は(株)ツツミプランニングの社員である。
 本研究は(株)HBCフナトからの研究費により実施された。