

老化線維芽細胞に対する リポソーム化糖鎖の有効性試験 <学会発表内容説明資料>

発表学会 : 日本薬学会 第143年会
会場 : 北海道大学
開催期間 : 2023年3月25日(土) ~ 28日(火)
発表日時 : 2023年3月26日(日) 13:00~13:50
発表題目 : 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
評価機関 : 国立大学法人 徳島大学 社会産業理工学研究部
生物資源産業学域 教授 宇都 義浩

<目 次>

- 今回の学会で発表した結果と分かったこと 1
- 表 1 学会発表における試験結果概要一覧表 2
- 図 1 老化マーカー (β -Gal) の測定 3
- 図 2 単糖投与による老化マーカー (β -Gal) の測定 . . . 4
- 図 3 qRT-PCRによる解析 (P53遺伝子) 5
- 図 4 qRT-PCRによる解析 (P21遺伝子) 6
- 図 5 細胞内ATP量の測定 7
- 図 6 細胞内Total NAD+(H)量の測定 8
- まとめ 9
- 実際に発表したポスター 10

【今回の学会で発表した結果と分かったこと】

- リポソーム糖鎖は、老化が原因で活性が上昇する酵素「 β -Gal（ β -ガラクトシダーゼ）」の活性を抑える挙動を示した。
→リポソーム糖鎖の老化予防・改善作用が示唆された。
- また、「 β -Gal」の活性は糖鎖成分を個別に作用させても抑制作用はないが、全てを混合すると抑制作用が得られることが分かった。
→抗老化には糖単体では作用はなく、糖鎖で作用することが示唆された。
- 老化はDNAの損傷が激しく起きるため、これを修復する遺伝子P53及びP21の発現量が上昇するが、リポソーム糖鎖はこれらの発現を減少させた。
→リポソーム糖鎖は、老化を誘導する遺伝子を抑制することが認められた。
- 老化ではエネルギーであるATP量が減少し、連動してサーチュイン遺伝子（長寿遺伝子）を活性化するNADも減少するが、リポソーム糖鎖はATP量を増加させると同時に、NADも増加させた。
→リポソーム糖鎖の老化予防・改善作用を更に裏付ける結果を得た。

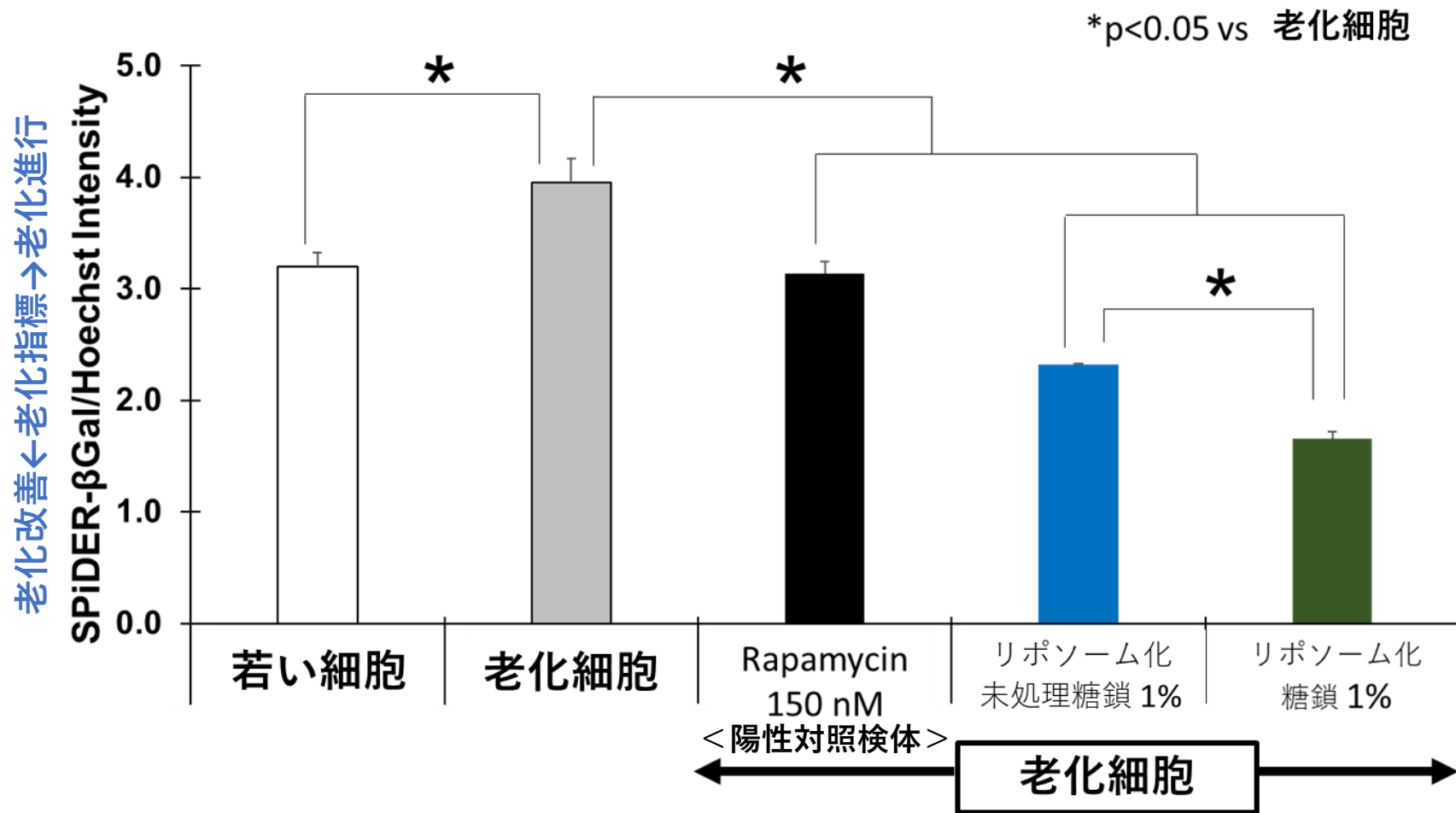
総評として、リポソーム糖鎖は老化を誘導する遺伝子やたんぱく質を抑制すると同時に、細胞のエネルギーを増加させることによって、抗老化に大きく寄与していることが示唆された。

表 1 学会発表における試験結果概要一覧表

試験内容	試験方法	試験概要と老化への作用	結果	参考
β-ガラクトシダーゼ (β-gal)活性	老化HDF細胞に対し、検体を添加し、β-gal活性を測定した。	β-galは細胞老化に伴い、細胞内でのβ-galのタンパク質量が上昇する。そのため、細胞老化の指標として広く用いられている。検体添加後β-gal活性が低下すれば、老化が改善したといえる。	糖鎖を添加した場合、β-gal活性が低下し、リポソーム化によりさらに増強された。また、構成単糖のみを添加した場合、β-gal活性が低下しなかった。	図1 図2
P53, P21の発現量解析	P53, P21の遺伝子量をRT-PCRを用いて測定した。	老化細胞ではDNAの損傷が激しくなる。この損傷を修復するP53やP21の発現量が上昇するため、検体添加でこれらの発現量が減少すれば老化を改善できたといえる。	糖鎖を添加した場合、P53, P21の発現量が共に減少した。	図3 図4
細胞内ATP量測定	老化HDF細胞に対し、検体を添加し、細胞内ATPを測定した。	細胞のエネルギーであるATP量を測定する。一般に老化細胞においてミトコンドリア活性が低下するため、ATP量が減少する。検体添加後ATP量が上昇すれば、老化が改善したといえる。	糖鎖の添加により細胞内ATP量が上昇し、リポソーム化によりさらに増強された。	図5
細胞内NAD ⁺ (H)量測定	老化HDF細胞に対し、検体を添加し、細胞内NADを測定した。	ATPを使用して細胞内でNADはNMNから作られる。NADは長寿遺伝子のサーチュイン (SIRT) を活性化させる。老化細胞ではATP量の減少に伴い、NAD量も減少する。検体添加後NAD量が上昇すれば、老化が改善したといえる。	糖鎖の添加により細胞内NAD ⁺ (H)量が上昇し、リポソーム化によりさらに増強された。	図6

図1 老化マーカー(β-Gal)の測定

β-ガラクトシダーゼ (β-gal) : 老化細胞に特異的に存在する酵素。老化研究において老化マーカーとして用いられている。

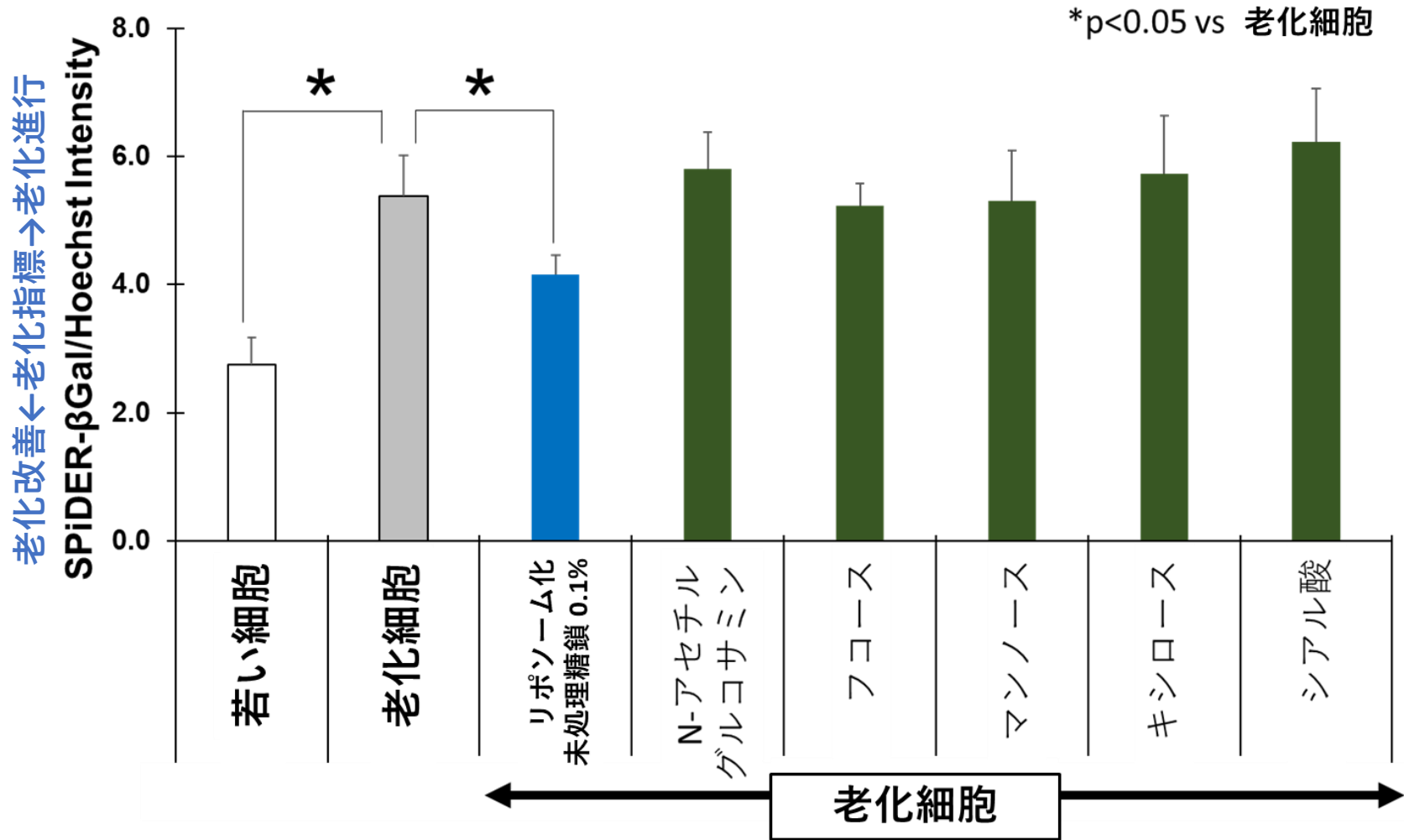


※Rapamycin : β-Gal活性を低下させることが知られている陽性対象

陽性対照であるRapamycin添加群よりも有意に糖鎖添加群がβ-gal活性を低下させた。
また、リポソーム化した糖鎖添加群で更なる低下が認められた。

図2 単糖投与による老化マーカー(β-Gal)の測定

※各単糖成分は糖混合物の含有量に合わせて調整した。

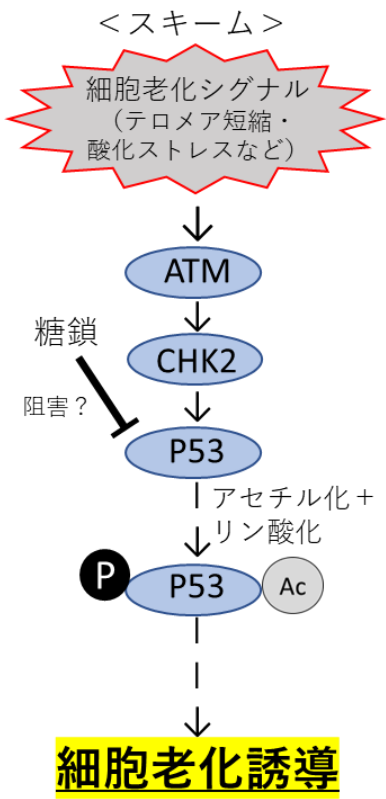


糖鎖を構成する単糖をそれぞれ単体で添加した場合、β-gal活性が低下しなかった。

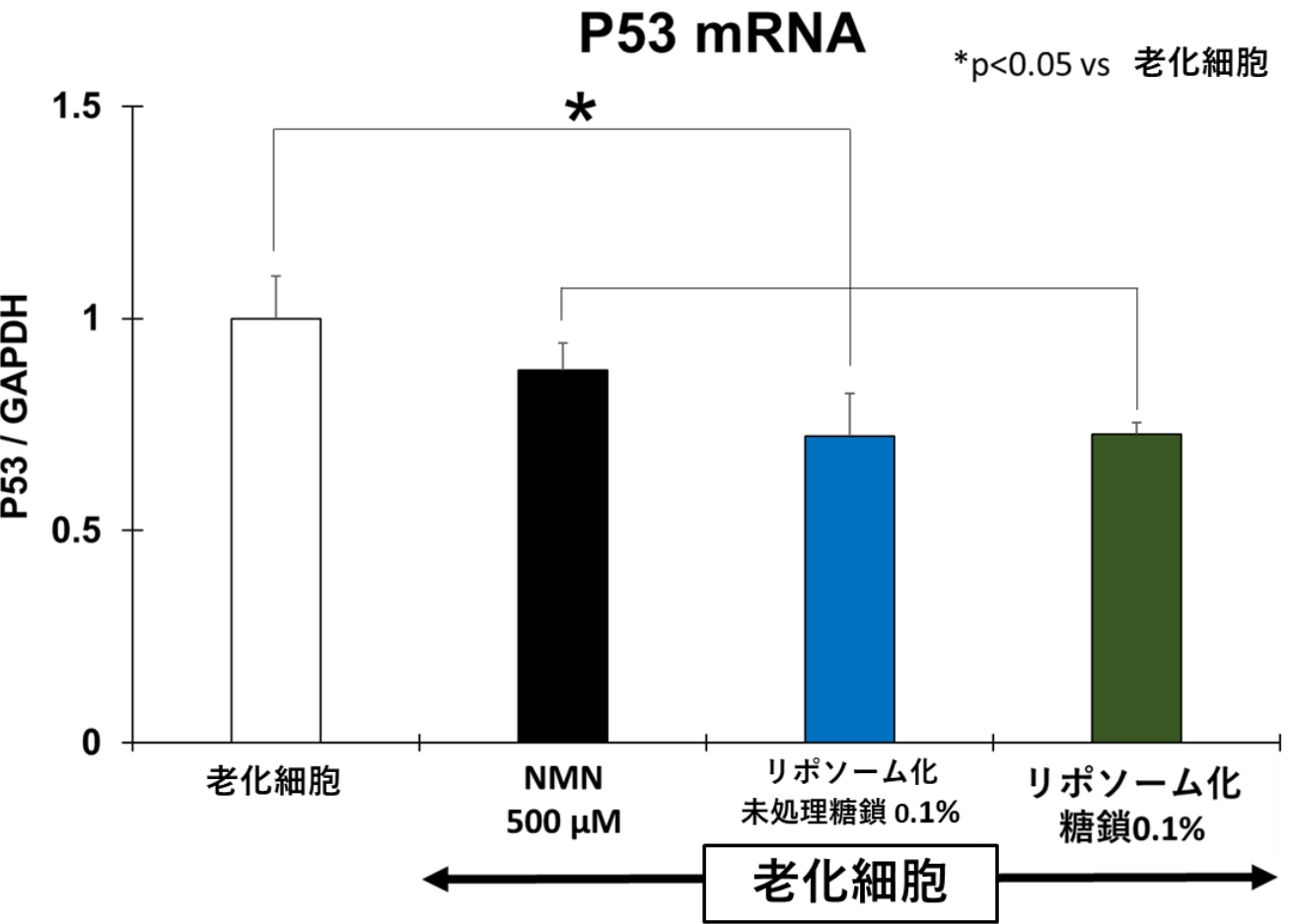
図1、図2より糖鎖の形で添加することが抗老化には重要であることが示唆された。

図3 qRT-PCRによる解析(P53遺伝子)

P53遺伝子： テロメア（染色体の末端構造であり、細胞分裂を繰り返すと徐々に短くなる。）が一定の長さまで縮むとDNAが傷つく。また、その他、酸化ストレスなどを受けてもDNAが傷つく。これらのDNAの損傷を修復するタンパク質が本遺伝子にコードされている。修復が不可能な場合、細胞の老化を誘導する。



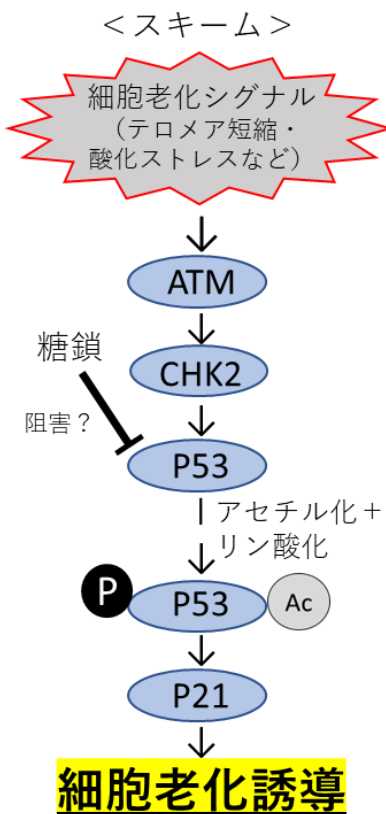
老化改善 ← 老化指標 → 老化進行
Relative mRNA expression P53 / GAPDH



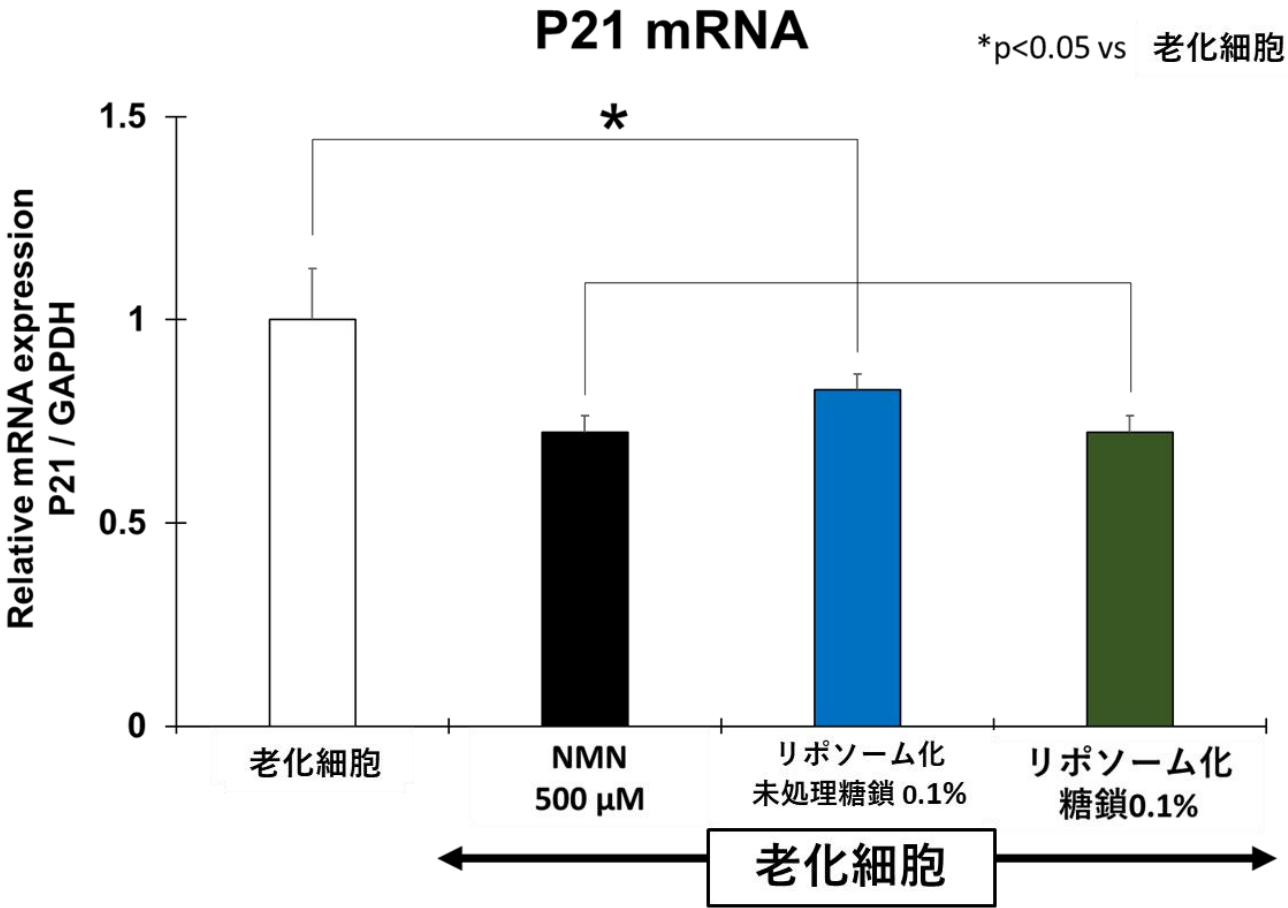
糖鎖及びリポソーム化糖鎖を添加した場合、老化細胞ではP53の発現量が低下した。
この発現量の低下は、細胞の老化誘導を解除している可能性がある。

図4 qRT-PCRによる解析(P21遺伝子)

P21遺伝子：細胞増殖におけるG1/SチェックポイントでDNAを直すタンパク質をコードしている。
DNAの傷つきが激しく、細胞増殖が不可能になった場合、細胞老化を引き起こす。
そのため、老化細胞ではP21の発現量が上昇する。



老化改善 ← 老化指標 → 老化進行



糖鎖及びリポソーム化糖鎖を添加した場合、老化細胞ではP21の発現量が低下した。
この結果からも老化誘導を解除している可能性がある。図3及び4を併せると、細胞の老化誘導解除をより強固に裏付ける結果を得たと考えた。

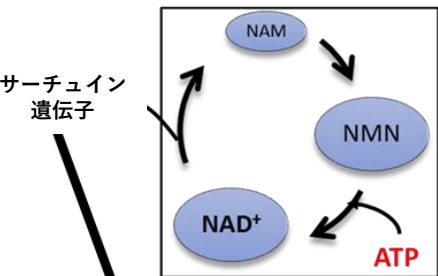
図5 細胞内 ATP量の測定

ATP： ミトコンドリアで作られる、エネルギー分子である。

老化により細胞内のミトコンドリア機能が低下するため、ATPの産生量も老化に伴い減少する。

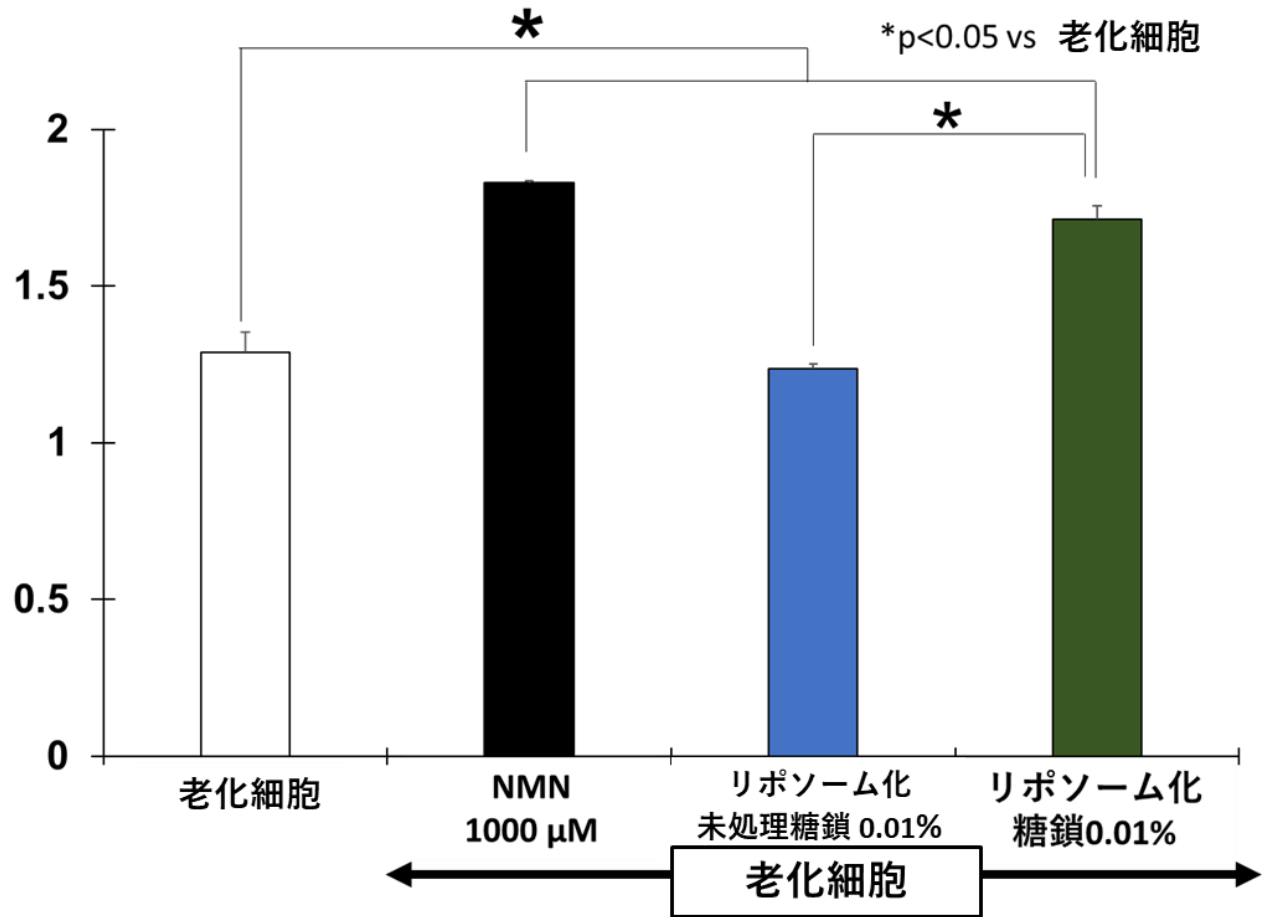
<スキーム>

ミトコンドリア



老化進行 ← 老化指標 → 老化改善

Intracellular ATP amount (μmol/L)



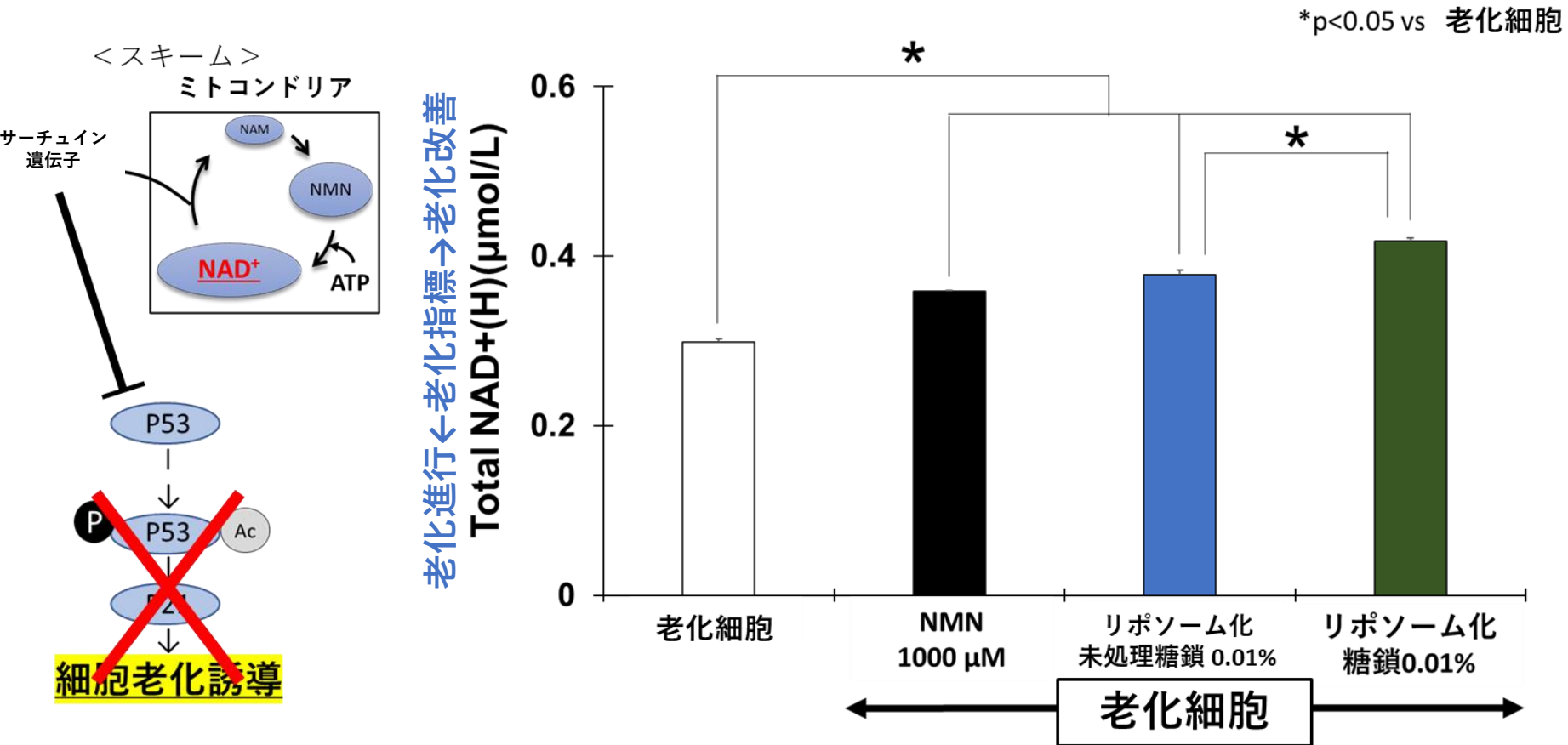
細胞老化誘導

未添加群よりも有意に糖鎖添加群が細胞内ATP量を上昇させた。また、リポソーム糖鎖添加群でさらに増強された。

ATP産生量の増加結果を得たことによって、老化改善作用が示唆された。

図6 細胞内 Total NAD⁺(H)量の測定

NAD：生物が細胞レベルで生きていくことに必須の成分。前述のATPを使用して産生される。
しかし、細胞老化により減少することが報告されている。

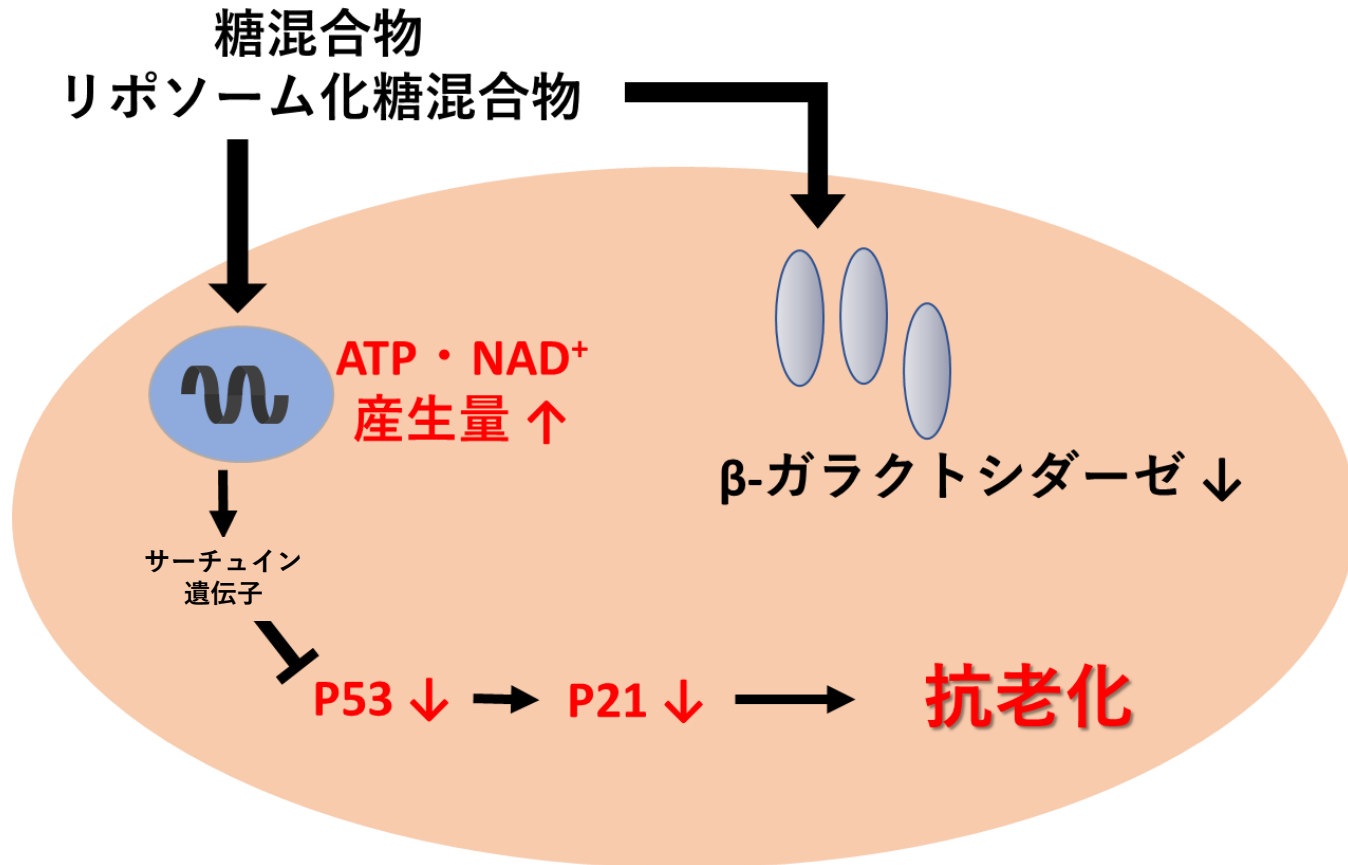


未添加群よりも有意に糖鎖添加群が細胞内NAD⁺(H)量を上昇させた。また、リポソーム糖鎖添加群でさらに増強された。

サーチュイン遺伝子（長寿遺伝子）を活性化させるNADの上昇は、抗老化作用に対して、極めて大きな好影響をもたらすと推測された。よって、図5と併せて細胞レベルでのエネルギー産生量上昇作用を裏付ける結果を得たと考えた。

まとめ

- 老化細胞の糖鎖添加群においてSA- β -Gal活性を低下させた。
- 老化マーカーの一つであるP53, P21の発現量が糖鎖添加群で低下した。
- 細胞内NAD⁺(H)量及び細胞内ATP量が糖鎖添加群で上昇した。



老化細胞に糖鎖を添加した場合、老化を誘導する遺伝子やたんぱく質を抑え、細胞のエネルギーであるATPを上昇させ、抗老化に誘導していると推察された。

【実際に発表に使用したポスター】 (実際は縦140cm×横90cm)

当日は数多くの閲覧者及び質問者が訪れたことから、抗老化及びリポソーム糖鎖に興味を持つ方が多いと感じられた学会であった。

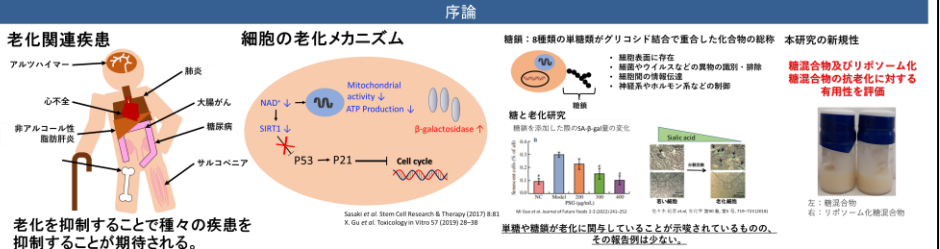
26P1-pm1-087

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、細胞表面に発見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、創傷治癒や組織の維持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。過去の研究より、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代目に比べて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強化されることが示唆された。



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。
 糖鎖や糖混合物が老化に関連していることが示唆されているものの、その解明は少ない。

