

老化関連疾患の予防，治療法の開発に向けた「老化と糖鎖」

佐々木 紀彦，板倉 陽子，豊田 雅士

1. はじめに

我々の体の中では，組織損傷や臓器ストレスに対して適応や修復することで機能を維持する機構が働いている。しかし，生きている長い間に，さまざまな外的な要因により，徐々に適応，修復機能が低下し，制御機構が破綻すると，組織の機能不全から，重篤な疾患の発症に至る。生体の恒常性に影響を与える一つとしてあげられるのが老化である。老化とは，生物の一生において，成熟期を迎えてから死に至るまでに起こる変化として，加齢に伴った生理機能の衰退など機能低下の過程を指す。動物個体における老化の原因はいまだはっきりと解明されておらず，プログラム説や活性酸素説など複数の要因が考えられている。培養細胞を用いた研究から細胞レベルでの老化（細胞老化）が知られ，がんをはじめとする老化関連疾患や個体老化と深く関わる現象として研究されている。生体組織から取り出した細胞を *in vitro* で培養すると，細胞分裂の回数に限界があり（ヘイフリック限界），染色体末端のテロメア長の短縮が原因とされる。分裂回数の限界に達し，細胞増殖が停止した細胞が老化細胞である。また，酸化ストレスなどのさまざまなストレスが原因で，テロメア長に依存しない老化（ストレス老化）も知られている。このように老化した細胞の共通な特徴として，細胞周期の恒久的停止，細胞の巨大化と扁平化，そして *senescence-associated secretory phenotype* (SASP) と呼ばれる炎症性サイトカインなどの種々の生理活性因子の産生増加の現象が知られている（図1）。

近年，老化細胞がさまざまな病態に関わり，寿命と関連することがマウスの個体レベルで明らかにされた¹⁾。すなわち，老化を抑えることや老化を捉えることが，老化関連

疾患の予防や治療に重要であることが再認識された。それ以後，細胞老化の抑制や *senolytic drug*（老化細胞死誘導薬）などによる老化細胞の除去に関する研究が精力的に行われており，最近の報告では，実際に加齢マウスで *senolytic drug* の使用で運動機能低下の改善や寿命延長がみられた²⁻⁴⁾。しかしながら，作用の特異性やヒトへの応用にはまだまだ時間を要すると思われる。一方，老化を捉えることに関しては，老化関連酸性 β -ガラクトシダーゼ (SA- β -Gal)⁵⁾ やサイクリン依存性キナーゼ阻害因子 (p16)⁶⁾ が古典的な老化マーカーとして知られている。SA- β -Galは高密度培養でも活性が上がることから老化特異的とはいえず⁷⁾，また，p16は細胞内タンパク質であり，老化を捉えるのによい細胞表面マーカーがないのが現状である。糖鎖は，膜タンパク質や脂質に修飾された形で細胞表面に発現しており，細胞の種類や状態などを反映する表面マーカーとしてだけでなく，さまざまな細胞機能に関わっている⁸⁾。すなわち，糖鎖は老化細胞の検出のみならず，標的の老化細胞の除去などに役立つ可能性があり，糖鎖が老化のよい細胞表面マーカーになると考えられる。しかしながら，老化と関連づけた糖鎖研究はあまり進んでいない。本稿では，老化と糖鎖との関わりについて著者らの近年の研究成果について紹介する。

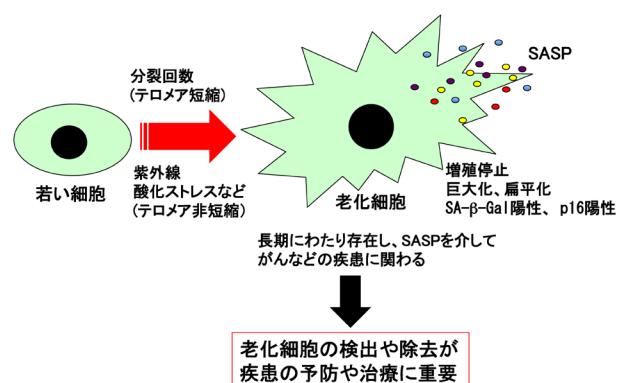


図1 細胞老化

細胞老化は，分裂に伴うテロメア短縮や，テロメア長に依存しない紫外線や酸化ストレスなどにより引き起こされる。老化細胞の特徴として，増殖停止，巨大化，扁平化，SA- β -Gal陽性，p16陽性があげられる。さらに，SASPという炎症性サイトカインなどの種々の生理活性因子の産生増加の現象も知られる。生体内で老化細胞は死滅せず長期にわたり存在することから，SASPを介した疾患への関与が考えられる。

東京都健康長寿医療センター研究所老年病態研究チーム
(〒173-0015 東京都板橋区栄町35-2)

Senescence and glycoconjugate research toward development of prevention and therapeutic method for senescence-associated diseases

Norihiko Sasaki, Yoko Itakura and Masashi Toyoda (Research Team for Geriatric Medicine, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology, 35-2 Sakae-cho, Itabashi-ku, Tokyo 173-0015, Japan)
本論文の図版はモノクロ（冊子版）およびカラー（電子版）で掲載。

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2018.900719

© 2018 公益社団法人日本生化学会

2. 線維芽細胞の老化と糖鎖について

線維芽細胞は、全身の結合組織を構成する細胞の一つで、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てきた。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^{9, 10)}。一方、線維芽細胞の老化と糖鎖変化については、詳細は明らかにされていなかった。著者らは、年齢異なる（胎児および高齢者）ヒト皮膚由来正常線維芽細胞を用いて、細胞の老化に伴う詳細な糖鎖変化について検討した（図2）。糖鎖プロファイル解析にはレクチンマイクロアレイ法を使用し、統計的な解析とともに、細胞増殖能などと比較検討を行った。

その結果、細胞は増殖能の低下やSA- β -Gal活性の増加を示すよりも早く糖鎖の変化を示した。胎児および高齢者における糖鎖プロファイルデータを比較した結果、個体年齢に応じて特異的な細胞表面糖鎖が存在すること、なかでも胎児由来の細胞では表面に存在するシアル酸の割合が多く、細胞由来年齢により大きな差があることが示唆された。そして、いずれの細胞においても老化に伴ってシアル酸量が低下することが示唆された（図2）¹¹⁾。さらに老化に伴う細胞内代謝の変化を捉える目的で膜画分と細胞内親水性画分について糖鎖プロファイル解析を行った結果、細胞内外の糖鎖分布が老化に伴い変化すること、細胞老化が示す分布と個体の老化が示す分布が一致することを明らかにした（修正中）。

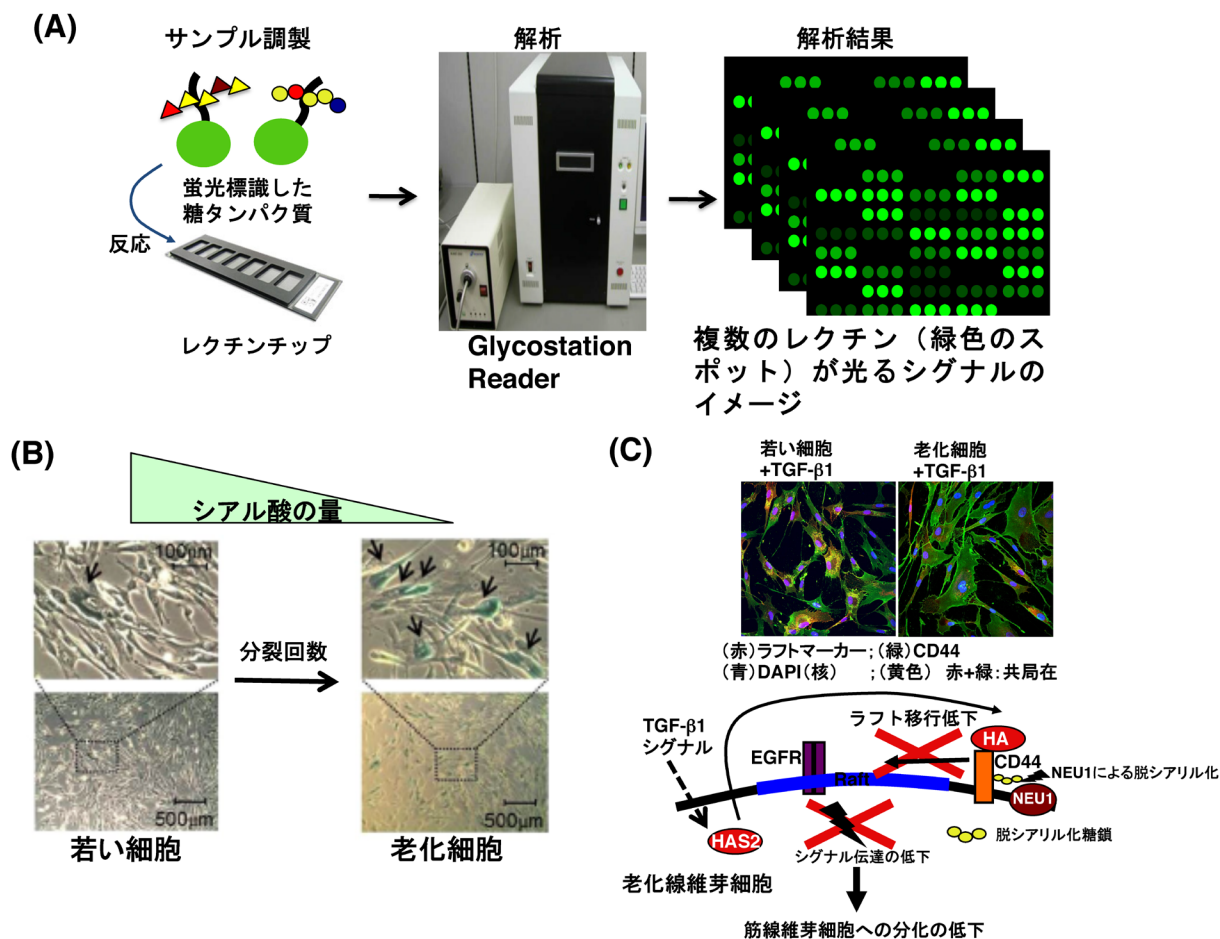


図2 線維芽細胞の老化と糖鎖

(A)レクチンマイクロアレイ法の概略。(B)線維芽細胞は分裂回数の限界に達し、老化細胞となる。矢印はSA- β -Gal陽性細胞を示す。写真は文献11より改変して掲載。糖鎖プロファイル解析の結果、老化に伴ってシアル酸修飾の低下が示唆された。(C)若い細胞では、TGF- β 1刺激によりCD44が脂質ラフトに局在しているが、老化細胞ではCD44のラフト局在性が低下していた（免疫染色像は文献12より改変して掲載）。研究の結果、老化細胞ではTGF- β 1シグナルによるヒアルロン酸合成酵素2（HAS2）の発現およびヒアルロン酸（HA）の合成はみられるが、NEU1シアリダーゼの働きでCD44上のシアル酸量が低下していることで、ラフトへの移行が低下することがわかった。CD44がラフトに移行しないと、ラフトに存在する上皮成長因子受容体（EGFR）と相互作用できず、下流へのシグナル伝達が抑制され、筋線維芽細胞への分化が起こりにくいことも見いだした（模式図は文献12より改変して掲載）。

ヒト皮膚由来正常線維芽細胞の老化に伴うシアル酸の発現低下に関わる分子メカニズムについて、著者らはさらに検討を行った。線維芽細胞は、加齢に伴い増殖能の低下、細胞老化の誘導、遊走能の低下、活性化（筋線維芽細胞への分化）の低下がみられる。このような変化にシアル酸量の低下が関わっているのか検討を行った。シアル酸の機能を調べるため、シアル酸発現の高い若い細胞についてシアリダーゼ処理を行い、シアル酸量の低下に伴う変化を観察

した。その結果、増殖能、遊走能、そして細胞老化誘導には変化がみられなかった。一方、筋線維芽細胞への分化を指標とする活性化の低下が観察され、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た。さらに、活性化のメカニズムとして、CD44の脂質ラフトへの移行が必要であるが、シアル酸量の低下したCD44ではラフト移行が抑制されることがわかった。実際に、加齢した線維芽細胞では、NEU1シアリダーゼが細胞表面に高発現し、これ

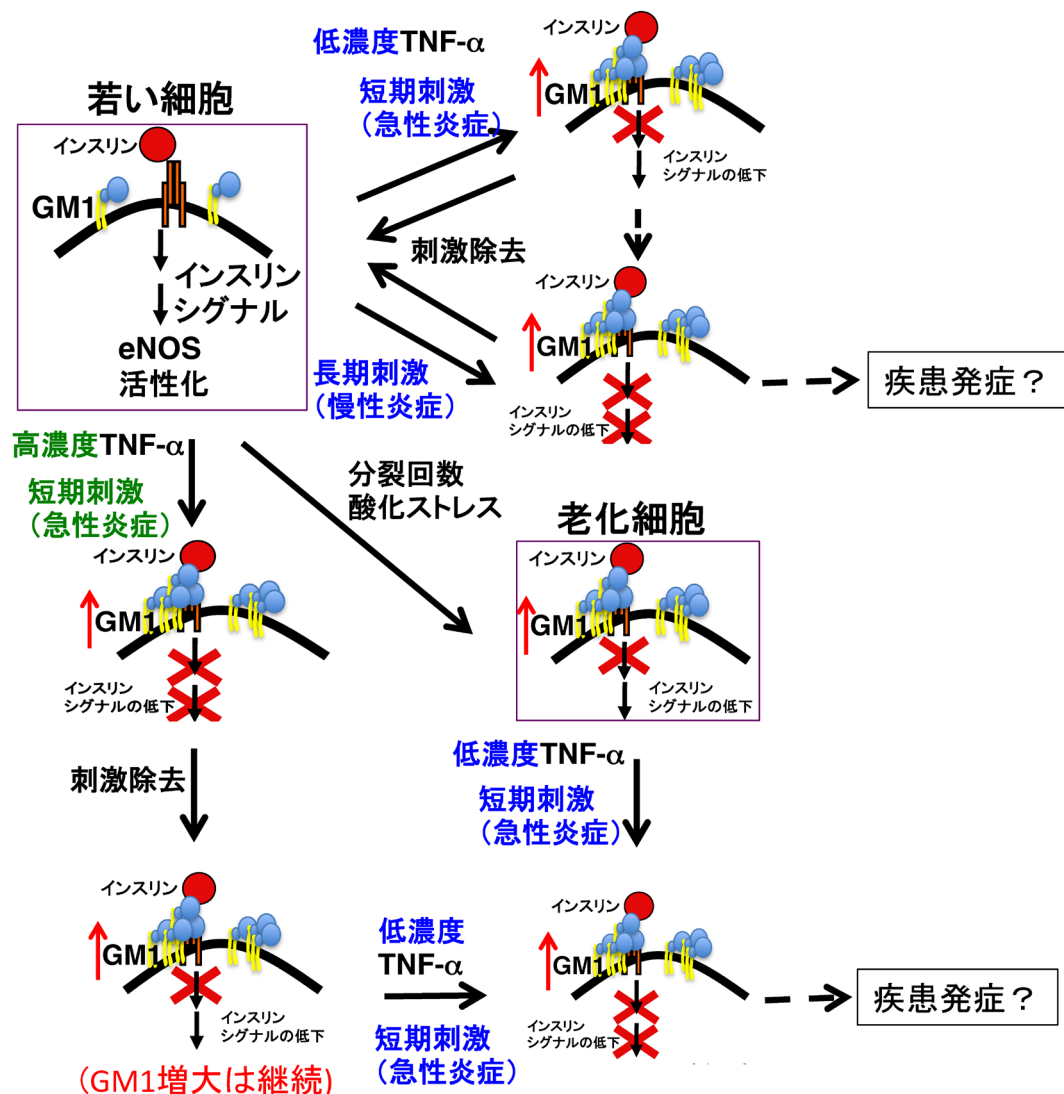


図3 血管内皮細胞の老化、炎症（個体老化）と糖鎖

若い細胞では、インスリン刺激により内皮型NO合成酵素（eNOS）の活性化が起こる。一方、頻回の細胞分裂や酸化ストレスを経た老化細胞では、GM1が増加し、インスリンシグナルの低下がみられる。炎症性サイトカインのTNF- α の作用として次のようなことがわかった。①若い細胞に低濃度のTNF- α による短期刺激（急性炎症）を行うと、GM1の増加に伴うインスリンシグナルの低下がみられ、さらに長期間刺激を行うと（慢性炎症）、eNOSの発現低下に至る。しかしながら、刺激を取り除くと正常に戻る。②若い細胞に高濃度のTNF- α による短期刺激を行うと、eNOSの発現低下にまで至る。刺激を取り除いても、GM1の増加は続き、インスリンシグナルの低下は継続する。GM1が増加している状態では、低濃度TNF- α の短期刺激でもeNOSの発現低下に至る。eNOSの低下状態が続くと、慢性的なNO産生の低下などから疾患発症につながる可能性がある。

が細胞表面のシアル酸量の低下の一因と考えられることから、NEU1の阻害薬により検討を行った結果、CD44のシアル酸含量の低下がみられず、活性化が誘導されることがわかった。このようにシアル酸含量の変化が、線維芽細胞の活性化に関与していることを見いだし（図2）、高齢者における創傷治癒の遅延や組織の線維化に関与していることを示唆する新たな知見を得た¹²⁾。

3. 血管内皮細胞の老化、炎症（個体老化）と糖鎖について

血管内皮細胞は、血管の最内層に存在し、血管運動神経性緊張の制御、血球の輸送、血栓機構、透過性、増殖、生存性および免疫といった多くの生理的機能に重要な役割を果たしている。これまでに、加齢や老化に伴った血管疾患の発症や進展に血管内皮機能の低下が関わると思われるが、その分子機構の詳細は、明らかにされていなかった。近年の報告により、血管内皮細胞表面の糖鎖が血管内皮の生理機能に関わっていることが明らかにされてきた¹³⁾。加齢や老化に伴う糖鎖変化についてはある程度知られてきているが、変化した糖鎖の機能的関与についての報告はほとんどされていなかった。そこで著者らは、加齢や老化に伴う糖鎖変化がヒト血管内皮細胞の機能にどのように影響するか明らかにすることを目的に研究を行った。

ヒト大動脈血管内皮細胞（HAEC）を用いて、継続培養による細胞老化または過酸化水素によるストレス性細胞老化の過程で、糖脂質の一群であるガングリオシドの発現について分子および細胞生物学的な検討を行った（図3）。種々のガングリオシドの中で、GM1の発現が血管内皮細胞の細胞老化に伴って増加することを明らかにした。GM1の増加は細胞老化の誘導には影響しないことがわかった。一方、老化に伴う内皮機能低下へのGM1の関与について検討した結果、GM1の発現上昇が、重要な内皮機能であるNO産生に関わるインスリンシグナルの低下をもたらすことを見い出した。また、高齢者由来のHAECではGM1の発現が高いこともわかり、細胞老化のみならず個体の加齢に伴う内皮機能の低下にGM1が関与していることも示唆された。これらの結果は、加齢や老化に伴うGM1の増加が、血管内皮細胞のインスリン抵抗性に関わり、内皮機能の低下や血管疾患に関与することを示唆している¹⁴⁾。

さらに、個体老化における種々の疾患の要因となる炎症の影響について検討した（図3）。HAECを用いて、炎症性サイトカインの一つである腫瘍壊死因子（TNF- α ）の濃度や曝露時間の違いによるガングリオシドの発現量について細胞生物学的な検討を行った。ガングリオシドとインスリンシグナルとの関連性についても検討した。その結果、種々のガングリオシドの中で、GM1の発現量がTNF- α の

濃度依存的に増加することを明らかにし、インスリンシグナルの低下に関わることを見い出した。高濃度のTNF- α に曝露した場合には、TNF- α を除いてからもGM1の増加が継続することがわかった。GM1増加のメカニズムを探る目的で、GM1の合成に関わる一連の糖転移酵素について検討した結果、GM1の増加には少なくとも β 4GALNT1の増加が関わっていることが示唆された。また、長期間低濃度のTNF- α に曝露すると、GM1依存的に内皮型NO合成酵素（eNOS）の発現低下につながることを見い出した。さらに、GM1が高発現している老化細胞や高齢者由来の細胞では、短期間のTNF- α に曝露するのみでeNOSの発現が低下し、高発現量のGM1によるものと示唆された。このように、TNF- α の刺激による急性および慢性炎症の*in vitro*実験モデルを構築し、GM1が制御するインスリン抵抗性の分子機序に関わる新たな知見を得た¹⁵⁾。

4. おわりに

老化については、生物学、医学、そして社会学的観点から世界的に研究が行われているが、研究対象として取り扱いが難しく、未解明な点が多いのが現状である。今後、ますます高齢化が進み、健康寿命の延伸が求められている現代社会において、老化と病態との関わりから疾患発症に至るメカニズムについて明らかにしていく必要がある。特に、今回紹介したように糖鎖の変化という視点からの老化研究は、老化に伴うさまざまな現象の検出のみでなく、老化関連疾患の発症メカニズムの解明につながる可能性があり、これらの疾患の予防から治療にまで役立つことが期待される。

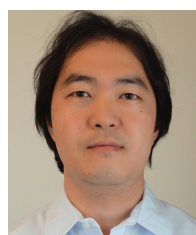
文 献

- 1) Baker, D.J., Childs, B.G., Durik, M., Wijers, M.E., Sieben, C.J., Zhong, J., Saltness, R.A., Jeganathan, K.B., Verzosa, G.C., Pezeshki, A., et al. (2016) Naturally occurring p16(Ink4a)-positive cells shorten healthy lifespan. *Nature*, **530**, 184–189.
- 2) Jeon, O.H., Kim, C., Laberge, R.M., Demaria, M., Rathod, S., Vasserot, A.P., Chung, J.W., Kim, D.H., Poon, Y., David, N., et al. (2017) Local clearance of senescent cells attenuates the development of post-traumatic osteoarthritis and creates a pro-regenerative environment. *Nat. Med.*, **23**, 775–781.
- 3) Ovadya, Y. & Krizhanovsky, V. (2018) Strategies targeting cellular senescence. *J. Clin. Invest.*, **128**, 1247–1254.
- 4) Xu, M., Pirtskhalava, T., Farr, J.N., Weigand, B.M., Palmer, A.K., Weivoda, M.M., Inman, C.L., Ogrodnik, M.B., Hachfeld, C.M., Fraser, D.G., et al. (2018) Senolytics improve physical function and increase lifespan in old age. *Nat. Med.*, **24**, 1246–1256.
- 5) Dimri, G.P., Lee, X.H., Basile, G., Acosta, M., Scott, C., Roskelley, C., Medrano, E.E., Linskens, M., Rubelj, I., & Pereira-Smith, O. (1995) A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**,

- 9363–9367.
- 6) Alcorta, D.A., Xiong, Y., Phelps, D., Hannon, G., Beach, D., & Barrett, J.C. (1996) Involvement of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 (INK4a) in replicative senescence of normal human fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 13742–13747.
 - 7) Yang, N.C. & Hu, M.L. (2005) The limitations and validities of senescence associated-beta-galactosidase activity as an aging marker for human foreskin fibroblast Hs68 cells. *Exp. Gerontol.*, **40**, 813–819.
 - 8) Varki, A., Cummings, R.D., Esko, J.D., Stanley, P., Hart, G.W., Aebi, M., Darvill, A.G., Kinoshita, T., Packer, N.H., Prestegard, J.H., et al. (2017) *Essentials of Glycobiology*, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press.
 - 9) Demaria, M., Desprez, P.Y., Campisi, J., & Velarde, M.C. (2015) Cell Autonomous and Non-Autonomous Effects of Senescent Cells in the Skin. *J. Invest. Dermatol.*, **135**, 1722–1726.
 - 10) Schafer, M.J., White, T.A., Iijima, K., Haak, A.J., Ligresti, G., Atkinson, E.J., Oberg, A.L., Birch, J., Salmonowicz, H., Zhu, Y., et al. (2017) Cellular senescence mediates fibrotic pulmonary disease. *Nat. Commun.*, **8**, 14532.
 - 11) Itakura, Y., Sasaki, N., Kami, D., Gojo, S., Umezawa, A., & Toyoda, M. (2016) *N*- and *O*-glycan cell surface protein modifications associated with cellular senescence and human aging. *Cell Biosci.*, **6**, 14.
 - 12) Sasaki, N., Itakura, Y., & Toyoda, M. (2017) Sialylation regulates myofibroblast differentiation of human skin fibroblasts. *Stem Cell Res. Ther.*, **8**, 81.
 - 13) Sasaki, N. & Toyoda, M. (2013) Glycoconjugates and related molecules in human vascular endothelial cells. *Int. J. Vasc. Med.*, **2013**, 963596.
 - 14) Sasaki, N., Itakura, Y., & Toyoda, M. (2015) Ganglioside GM1 Contributes to the State of Insulin Resistance in Senescent Human Arterial Endothelial Cells. *J. Biol. Chem.*, **290**, 25475–25486.
 - 15) Sasaki, N., Itakura, Y., & Toyoda, M. (2017) Ganglioside GM1 contributes to extracellular/intracellular regulation of insulin resistance, impairment of insulin signaling and down-stream eNOS activation, in human aortic endothelial cells after short- or long-term exposure to TNF α . *Oncotarget*, **9**, 5562–5577.

著者寸描

●佐々木 紀彦 (ささき のりひこ)



地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター研究所老年病態研究チーム主任研究員。薬学（博士）。

■略歴 1974年長野県に生る。97年東京大学薬学部卒業。2003年東京大学大学院薬学系研究科博士課程修了。03～10年創価大学工学部研究員。11～12年フランス国立科学センタージャックモノー研究所研究員。12年幹細胞評価基盤技術研究組合研究員を経て、13年より現職。

■研究テーマと抱負 血管の老化と糖鎖の研究および膀胱癌幹細胞の研究。血管内皮細胞の老化から心血管病の発症に至る分子メカニズムについて解明したい。また、幹細胞や糖鎖研究の経験を生かし、膀胱癌の早期発見や有効な治療法の開発に繋がる研究成果を出したい。

■ウェブサイト <http://www.tmghig.jp/research/team/rounenbyotai/shinketsukanroukasaiseigaku/>

■趣味 ドライブ、家族旅行（子供と遊びに行くことも含め）、海水魚飼育（15年目）。

●板倉 陽子 (いたくら ようこ)

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター研究所老年病態研究チーム研究員。理学（博士）。

■略歴 2005年茨城大学大学院理工学研究科修士課程修了。（独）産業技術総合研究所糖鎖医工学研究センター研究員を経て、10年筑波大学大学院生命環境科学研究科博士課程修了。同年より現職。

■研究テーマと抱負 老化と再生をキーワードに細胞の有する糖鎖の変化や機能的役割の解明をテーマとしています。将来的な心疾患治療や予防につながる研究を目指しています。

■ウェブサイト <http://www.tmghig.jp/research/>

●豊田 雅士 (とよだ まさし)

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター研究所老年病態研究チーム研究副部長。博士（工学）。

■略歴 1998年東京工業大学大学院生命理工学研究科修了。東京大学医科学研究所、三菱化学生命科学研究科、国立成育医療研究センター研究所を経て、2010年より現職。

■研究テーマと抱負 名画に学ぶ研究：「落穂拾い」、「種まく人」、そして「晩鐘」。

■ウェブサイト <http://www.tmghig.jp/research/team/rounenbyotai/shinketsukanroukasaiseigaku/>