

## 糖化ストレスは運動抵抗性因子として働くか

京都大学大学院 江川達郎  
(共同研究者) 撰南大学 藤林真美  
豊橋創造大学大学院 伊藤理香  
同 後藤勝正  
京都大学大学院 林達也

### Does Glycation Stress Work as an Exercise-Resistance Factor?

by

Tatsuro Egawa, Tatsuya Hayashi

*Graduate School of Human and Environmental Studies,  
Kyoto University*

Mami Fujibayashi

*Student Affairs Division Sports Support Center,  
Setsunan University*

Rika Ito, Katsumasa Goto

*Graduate School of Health Sciences, Toyohashi  
SOZO University*

#### ABSTRACT

In the present study, to clear the possibility of glycation stress as an exercise-resistance factor, we investigated the effect of glycation stress on the molecules related to glucose metabolism and mitochondrial functions following to endurance exercise training in mice and on muscle power changes following resistance training in human. Four-week voluntary exercise training increased the expression levels of GLUT4,

PGC1  $\alpha$ , and HSP72 in mouse plantaris muscle. On the other hand, these changes were suppressed by the concomitant treatment of methylglyoxal, an inducer of glycation stress. In young male adults, the group in high-glycation stress showed lower leg muscle power output than that in low-glycation stress, but there was no difference between the two groups in the strength-enhancing effect of 12-week resistance training. In conclusion, it is suggested that glycation stress suppresses skeletal muscle adaptations induced by endurance exercise training and does not affect muscle power enhancement induced by resistance training.

## 要 旨

本研究では、運動トレーニング効果を妨げる運動抵抗性因子として糖化ストレスが機能するか明らかにするために、糖化ストレスを負荷させたマウスに持久性トレーニングを実施し、糖代謝やミトコンドリア機能を制御する分子の発現変化について検討した。また、ヒトにおいて筋力トレーニングを実施し、糖化ストレス状態と筋力変化との関係性について検討した。4週間の自発走運動により、マウス足底筋のGLUT4およびPGC1  $\alpha$ 、HSP72のタンパク質発現が増加した。一方、この増加は糖化ストレスを誘導するmethylglyoxalを投与したマウスでは抑制された。また、健常男性において糖化ストレス高値群は低値群に比べて脚筋力が低値であった。しかし、12週間の筋力トレーニングによる筋力増強効果に2群で差はなかった。以上の結果から、糖化ストレスは持久性トレーニングによる骨格筋適応を抑制する可能性が明らかになった。一方、筋力トレーニングによる筋力増強効果には影響しないことが明らかになった。

## 緒 言

生体内のタンパク質は、グルコースなどの還元糖と結合することにより性質が変化する。この反応は「糖化」と呼ばれ、生体内で常に生じている化学反応である。糖化反応が進むことにより糖化

反応の最終生成物である終末糖化産物 (advanced glycation end products: AGEs) の修飾を受けた変性タンパク質が生成する。糖化反応に起因する生体ストレス (組織・細胞障害やタンパク質変性、細胞内シグナル伝達障害など) は糖化ストレスと呼ばれ、生活習慣病や加齢性疾患の病態形成に関与する<sup>1)</sup>。糖化ストレスと骨格筋に関する研究では、体内へのAGEsの蓄積が高齢者の筋量や筋力、歩行速度の低下と相関することが報告されており<sup>2,3)</sup>、糖化ストレスはサルコペニアの誘発因子であると考えられている。

骨格筋の量や機能を向上させる手段として運動トレーニングが有効であることは広く知られている。しかし、運動の効果を最大限に得られるトレーニング手法を構築するためにも、運動トレーニング効果に影響をおよぼす因子の機能解析は欠かせない。これまでに、運動、特にレジスタンス運動による筋肥大にはホルモン (マイオカイン) 動態やカルシウムイオン動態などの多様な内的因子が関与することが明らかにされてきた<sup>4)</sup>。しかし、糖化ストレスに関しては、運動トレーニング効果への影響を検証するまでに至っていない。我々の最近の知見では、成長期マウスへの長期の糖化ストレス負荷が筋成長を抑制するという成果を得ており<sup>5)</sup>、糖化ストレスが運動トレーニング効果を妨げる運動抵抗性因子として働くのではないかと仮説を立てている。そこで本研究では、糖化ス

レスを負荷させた実験動物に持久性運動トレーニングを行わせ、糖化ストレスが運動トレーニング効果におよぼす影響を検討する。また、ヒトを対象にした検討により体内の糖化ストレス状態と筋力トレーニング効果との関係性についても明らかにする。

## 1. 実験方法

### 1. 1 トレーニング実験 (実験動物)

5週齢雄性C57BL/6NCrマウスを、ランダムに1) コントロール群, 2) 自発運動群, 3) 糖化ストレス負荷群, 4) 糖化ストレス負荷+自発運動群の4群 (各群n=6) に分類し、4週間飼育した。糖化ストレス負荷群には糖化産物の一種であるmethylglyoxal (MGO, 0.1% w/w) を添加した飲料水を自由摂取させた。自発運動群には、飼育ケージ内に回転ケージを設置し自発運動を行わせた。4週間の飼育後、麻酔下で足底筋を摘出し、液体窒素で急速凍結させ、解析に用いるまで-80℃の冷凍庫で保存した。本実験は京都大学が定める「京都大学における動物実験の実施に関する規程」に従い、京都大学大学院人間・環境学研究科人間情報研究・動物実験委員会の審査・承認を経て実施した。

### 1. 2 トレーニング実験 (ヒト)

被験者は健常若年男性24名とした。まず、すべての被験者に対し、近紫外光による非侵襲的AGEs測定装置 (AGEs センサ, Sharp Life Science, Kobe, Japan) を用いて体内の糖化ストレス状態 (AGEs 蓄積量) を測定した。測定結果をもとに、高値群 (High-AGEs) と低値群 (Low-AGEs) の2群に分け、最大筋力の75% (10 RM) の負荷で1セット10回, 3セット (セット間休息1分), 週3回の筋力トレーニングを12週間実施した。トレーニング種目は大腿部を対象にしたLeg Pressとした。介入前と介入後12週目に下肢筋力を測定し、

筋力増強効果の差異を2群間で比較検証した。本実験は、京都大学大学院人間・環境学研究科人間情報研究・動物実験委員会および摂南大学医療研究倫理委員会の審査・承認を受け実施した。

### 1. 3 電気泳動およびウエスタンブロット法

筋サンプルにおけるタンパク質発現量の解析にはウエスタンブロット法を用いた<sup>6,7)</sup>。各サンプルはProtease/Phosphatase Inhibitor Cocktail (5872, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) を添加したlysis buffer (CellLytic MT, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) を用いてホモジネートし、20000gで遠心したのち上清を回収した。得られた上清中のタンパク質 (10  $\mu$ g) を7.5%のアクリルアミドゲルを用いて電気泳動・分離 (SDS-PAGE) し、polyvinylidene difluoride (PVDF) メンブレンに転写した。このメンブレンをBlocking One-P (Nakarai Tesque, Kyoto, Japan) で1時間ブロッキングし、その後tris-buffered saline (TBS-T, pH 7.6) で10000倍希釈したglucose transporter 4 (GLUT4) 抗体 (4670-1704, Bio Rad, Hercules, CA, USA) または peroxisome proliferators-activated receptor  $\gamma$  coactivator-1  $\alpha$  (PGC1  $\alpha$ ) 抗体 (AB3242, Millipore, Burlington, MA, USA), 72-kDa heat shock protein (HSP72) 抗体 (ADI-SPA-812, Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA) 溶液にて4℃で一晩インキュベートした。このメンブレンを洗浄し、TBS-Tで10000倍に希釈したanti-rabbit IgG (7074, Cell Signaling Technology) と室温で1時間反応させ、これを化学発光試薬 (ECL select Western Blotting Detection System, GE HealthCare, Chicago, IL, USA) を用いて目的のタンパク質を検出した。各筋サンプルのバンドは画像解析ソフト ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) で定量化した。

### 1. 4 統計処理

すべての測定値は平均 ± 標準誤差で示した。動物実験における統計処理は、主効果をMGO刺激と運動トレーニングとした二元配置分散分析法を用い、Tukey-Kramerの多重比較検定を用いて各要因およびグループ間の比較を行った。ヒト介入実験における統計処理は、主効果を被験者間と介入期間とした対応のある二元配置分散分析法を用い、Tukey-Kramerの多重比較検定を用いて各要因およびグループ間の比較を行った。有意水準はP<0.05とした。

### 2. 結果

図1に4週間のMGO刺激および運動トレーニングを行った際の足底筋のGLUT4発現変化を示す。GLUT4発現は運動トレーニング(Ex)により1.99倍に有意に増加した(P=0.0001)。またMGO刺激下(MGO+Ex)においても運動トレーニングにより1.55倍に増加(P=0.052)したが、MGO非刺激下(Ex)よりもその増加は有意に抑制された(P=0.032)。MGO刺激のみによる変化はなかった(P=0.46)。

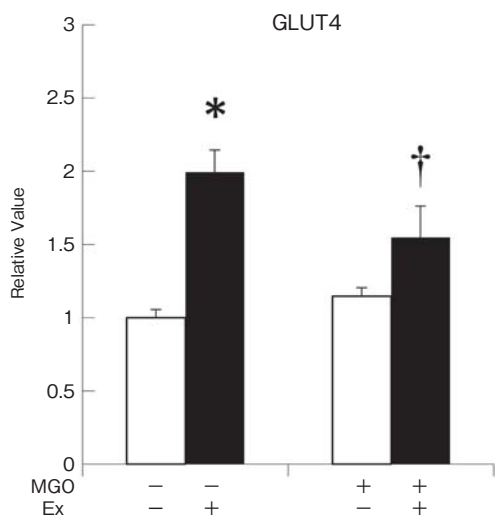


図1 足底筋におけるglucose transporter 4(GLUT4)タンパク発現量の変化

MGO: methylglyoxal (0.1%) 刺激, Ex: 自発走トレーニング, \*: P<0.05 vs. MGO (-) /Ex (-) †: P<0.05 vs. MGO (-) /Ex (+), n=6/group

図2に4週間のMGO刺激および運動トレーニングを行った際の足底筋のPGC1 $\alpha$ 発現変化を示す。PGC1 $\alpha$ 発現は運動トレーニング(Ex)により1.71倍に有意に増加した(P=0.0001)。一方、MGO刺激下(MGO+Ex)においては運動トレーニングにより1.21倍に増加したがその差は有意ではなかった(P=0.18)。またMGO非刺激下(Ex)と比較して有意に低値であった(P=0.0037)。MGO刺激のみによる変化はなかった(P=0.99)。

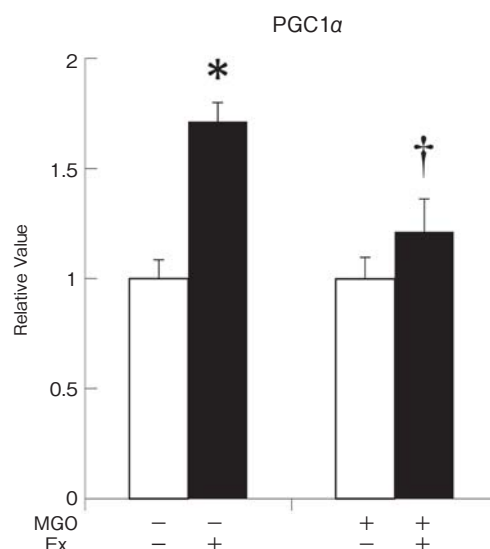


図2 足底筋におけるperoxisome proliferators-activated receptor  $\gamma$  coactivator-1  $\alpha$  (PGC1 $\alpha$ )タンパク発現量の変化  
MGO: methylglyoxal (0.1%) 刺激, Ex: 自発走トレーニング, \*: P<0.05 vs. MGO (-) /Ex (-) †: P<0.05 vs. MGO (-) /Ex (+), n=6/group

図3に4週間のMGO刺激および運動トレーニングを行った際の足底筋のHSP72発現変化を示す。HSP72発現は運動トレーニング(Ex)により4.89倍に有意に増加した(P<0.0001)。また、MGO刺激下(MGO+Ex)においても運動トレーニングにより2.93倍に増加(P=0.0004)したが、MGO非刺激下(Ex)よりもその増加は有意に抑制された(P=0.0004)。MGO刺激のみによる変化はなかった(P=0.92)。

図4に12週間の運動トレーニングを行った際の1 repetition maximum (RM) の変化を示す。1

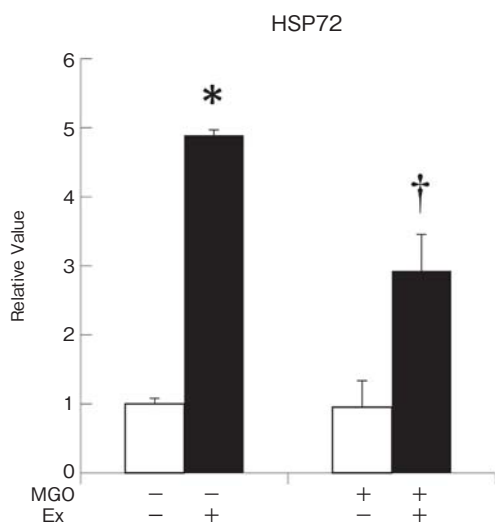


図3 足底筋における72-kDa heat shock protein (HSP72) タンパク発現量の変化  
MGO: methylglyoxal (0.1%) 刺激, Ex: 自発走トレーニング, \*: P < 0.05 vs. MGO (-) / Ex (-) †: P < 0.05 vs. MGO (-) / Ex (+), n = 6/group

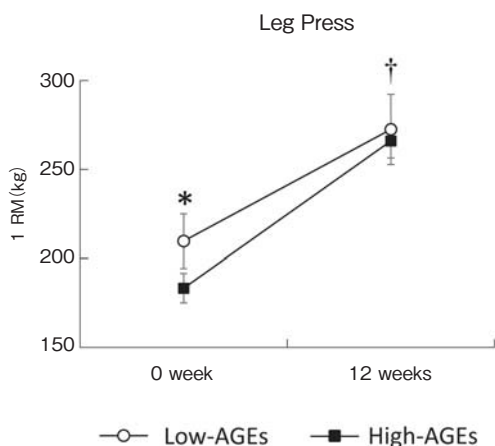


図4 Leg pressにおける1 repetition maximum (RM) の変化  
Low-AGEs: 低 AGEs群, High-AGEs: 高 AGEs群, \*: P < 0.05 vs. Low-AGEs, †: P < 0.05 vs. 0 week, n = 12/group

RMは介入前の時点でHigh-AGEs群がLow-AGEs群の方より有意に低値であった (P=0.013). 一方, 12週後において両群共に介入前よりも1 RMが有意に増加した (P < 0.0001). 12週目の時点ではHigh-AGEs群とLow-AGEs群の1 RMに有意な差は認められなかった (P=0.52).

### 3. 考 察

定期的な運動トレーニングの実施は健康維持・

増進に欠かせない. 持久性のトレーニングは骨格筋の糖代謝能の亢進をもたらすと同時にミトコンドリア生合成を高め酸化的代謝能を高める<sup>9)</sup>. 一方で, 筋力トレーニングは筋肥大や筋力増強をもたらす<sup>9)</sup>. また近年では, 運動時に骨格筋から分泌されるマイオカインが骨格筋代謝はもとより全身の様々な臓器に働きかけて代謝調節を行っていることが明らかになっている<sup>10)</sup>.

運動トレーニングによる糖代謝の活性化には骨格筋の GLUT4 タンパク質の増加が関与している<sup>11)</sup>. GLUT4は安静時には細胞質の GLUT4 小胞に局在しており, 筋収縮に伴う AMP キナーゼの活性化やインスリンシグナルを介して細胞膜上へトランスロケーションし, 血中のブドウ糖取り込みを促進する. このため GLUT4 の増加はインスリン感受性の亢進や糖利用促進に深く関係する. 多くの研究により運動トレーニング, 特に持久性のトレーニングは骨格筋の GLUT4 タンパク質発現を増加させることが報告されている<sup>11)</sup>. 本研究では, 4週間の自発走運動により骨格筋の GLUT4 発現の増加が認められたが, 糖化ストレス刺激はこの増加を抑制することが明らかになった (図 1). したがって, 糖化ストレスは運動トレーニングによる糖代謝活性化効果を減弱させる可能性が示唆される.

運動時の AMP キナーゼの活性化は PGC1 $\alpha$  の発現亢進をもたらす<sup>8)</sup>. PGC1 $\alpha$  はエネルギー代謝に関わる遺伝子の発現を調節する転写共役因子である. 特に, ミトコンドリア系酵素の発現を制御していることや筋線維タイプの遅筋化, すなわち酸化的代謝能力の向上に関与していることが知られている<sup>8)</sup>. 本研究では4週間の自発走運動により骨格筋の PGC1 $\alpha$  発現の増加が認められた (図 2). しかし, この増加は糖化ストレス負荷において減弱したことから, 糖化ストレスは運動トレーニングに伴う酸化的代謝能力の獲得を阻害する可能性が示唆される.

熱ショックタンパク質HSPはストレスダメージから細胞を保護する働きを有するストレス誘導性タンパク質であり、タンパク質のフォールディングなどを介助する分子シャペロンとして機能する<sup>12)</sup>。近年、誘導性のHSPであるHSP72が運動トレーニングによって増加し、肥満改善やインスリン感受性の亢進、筋肥大誘導に寄与することが明らかにされている<sup>12)</sup>。本研究においてはGLUT4やPGC1 $\alpha$ と同様に、骨格筋HSP72発現は4週間の自発走運動により増加し、糖化ストレス負荷によりその増加が抑制される結果となった(図3)。したがって、糖化ストレスはHSP72を介した運動トレーニング効果を阻害する可能性が示唆される。

糖化ストレスは加齢とともに増大していき、サルコペニアや糖尿病合併症、アルツハイマー病、骨粗鬆症などの加齢性疾患を誘発することが示唆されている<sup>1)</sup>。これまでに、体内へのAGEs蓄積状態と筋量および筋力との関係性を調べた研究では、中高齢者においてAGEsの蓄積状態と筋量および筋力とに逆相関の関係性があることが報告されている<sup>3,13)</sup>。本研究では若年男性において体内のAGEs蓄積状態が高いグループでは低いグループに比べて脚筋力が低下していることを見出した(図4)。これは中高齢者のみならず若年者においても糖化ストレス状態が筋力に影響を与えている可能性を見出した初めての結果である。一方、AGEsの蓄積状態に関わらず、12週間の筋力トレーニングにおいて脚筋力の増大が確認された(図4)。したがって、若年者においては糖化ストレス状態が高くても、筋力トレーニングによる筋力増強効果を妨げることはないものと考えられる。

#### 4. 総括

本研究により、糖化ストレスは持久性トレーニングによる骨格筋適応、特にGLUT4やPGC1 $\alpha$ 、

HSP72発現の増加を抑制することが明らかになった。これは、糖化ストレスが高い状態では持久性トレーニングによる糖代謝能や酸化的代謝能の亢進効果が得られにくいことを意味している。したがって、疾病改善を目的とした運動療法や健康増進を目指した運動トレーニングにおいても、糖化ストレスに着眼を置いた運動処方必要性が求められるであろう。また、若年者においても糖化ストレス状態は筋力に影響を及ぼす可能性が明らかになった。このため、高齢者のみならず若年期から糖化ストレス状態を把握しておくことで、将来の筋機能低下、つまりサルコペニア予防に貢献できるものと考えられる。幸い、若年者においては筋力トレーニングによる筋力増強効果は糖化ストレス状態に依存しないことも明らかになった。したがって、若年期からの筋力トレーニングを取り入れた運動トレーニングの実施が身体の糖化ストレスを軽減させ、健康寿命の延伸に寄与することが期待される。

#### 謝辞

本研究を遂行するにあたり、助成を賜りました公益財団法人石本記念デサントスポーツ科学振興財団に深く御礼申し上げます。また実験遂行に協力いただきました京都大学大学院人間・環境学研究所修士課程の小川岳史君に深く感謝いたします。

#### 文献

- 1) Fleming T.H., Humpert P.M., Nawroth P.P., Bierhaus A., Reactive metabolites and AGE/RAGE-mediated cellular dysfunction affect the aging process: a mini-review, *Gerontology*, 57: 435-443 (2011)
- 2) Kato M., Kubo A., Sugioka Y., Mitsui R., Fukuhara N., Nihei F., Takeda Y., Relationship between advanced glycation end-product accumulation and low skeletal muscle mass in Japanese men and women, *Geriatr. Gerontol. Int.*, 17: 785-790 (2017)
- 3) Momma H., Niu K., Kobayashi Y., Guan L., Sato

- M., Guo H., Chujo M., Otomo A., Yufei C., Tadaura H., Saito T., Mori T., Miyata T., Nagatomi R., Skin advanced glycation end product accumulation and muscle strength among adult men, *Eur. J. Appl. Physiol.*, **111**: 1545-1552(2011)
- 4) Lee J.H. Jun H.S., Role of Myokines in Regulating Skeletal Muscle Mass and Function, *Front Physiol.*, **10**: 42(2019)
  - 5) Egawa T., Tsuda S., Goto A., Ohno Y., Yokoyama S., Goto K., Hayashi T., Potential involvement of dietary advanced glycation end products in impairment of skeletal muscle growth and muscle contractile function in mice, *Br. J. Nutr.*, **117**: 21-29 (2017)
  - 6) Ohno Y., Yamada S., Sugiura T., Ohira Y., Yoshioka T., Goto K., Possible role of NF- $\kappa$ B signals in heat stress-associated increase in protein content of cultured C2C12 cells, *Cells Tissues Organs.*, **194**: 363-370(2011)
  - 7) Yasuhara K., Ohno Y., Kojima A., Uehara K., Beppu M., Sugiura T., Fujimoto M., Nakai A., Ohira Y., Yoshioka T., Goto K., Absence of heat shock transcription factor 1 retards the regrowth of atrophied soleus muscle in mice, *J. Appl. Physiol.* (1985), **111**: 1142-1149(2011)
  - 8) Lira V.A., Benton C.R., Yan Z., Bonen A., PGC-1 $\alpha$  regulation by exercise training and its influences on muscle function and insulin sensitivity, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **299**: E145-161 (2010)
  - 9) Hughes D.C., Ellefsen S., Baar K., Adaptations to Endurance and Strength Training, *Cold Spring Harb Perspect. Med.*, **8**(2018)
  - 10) Hoffmann C., Weigert C., Skeletal Muscle as an Endocrine Organ: The Role of Myokines in Exercise Adaptations, *Cold Spring Harb Perspect. Med.*, **7** (2017)
  - 11) Richter E.A., Hargreaves M., Exercise, GLUT4, and skeletal muscle glucose uptake, *Physiol. Rev.*, **93**: 993-1017(2013)
  - 12) Henstridge D.C., Febbraio M.A., Hargreaves M., Heat shock proteins and exercise adaptations. Our knowledge thus far and the road still ahead, *J. Appl. Physiol.*(1985), **120**: 683-691(2016)
  - 13) Semba R.D., Bandinelli S., Sun K., Guralnik J.M., Ferrucci L., Relationship of an advanced glycation end product, plasma carboxymethyl-lysine, with slow walking speed in older adults: the InCHIANTI study, *Eur. J. Appl. Physiol.*, **108**: 191-195(2010)