

【ヘルスプロモーション戦略研究】

尿毒素による骨形成阻害モデルにおけるケト酸の生理作用

栄養学科 乗鞍 敏夫

背景

- ✓ 高齢者では、慢性腎臓病(CKD)と骨粗鬆症(OST)の合併症が高頻度で見られる。
- ✓ CKDの食事療法は、一般的にたんぱく質(アミノ酸)の摂取制限が行われている。一方、十分量(推奨量)のたんぱく質(アミノ酸)の摂取は、高齢者の骨密度の低下と腰部骨折のリスクの低減に寄与することが明らかとなってきた。
- ⇒ CKD患者におけるたんぱく質の摂取制限は、OSTのリスクファクターであるといえる。
- ✓ ケト酸は、窒素を含まないアミノ酸代謝物であるため、積極的に摂取しても体内で尿毒素(窒素を含む老廃物)を生じない。近年、ケト酸サプリメントは、CKDの食事療法としての効果(少規模のRCT)が報告されているが、いまだ実用化には至っていない。

目的

本研究は、慢性腎臓病と骨粗鬆症の合併症モデルを作成し、ケト酸の生理作用をスクリーニング評価することを目的とする。

方法

慢性腎臓病(CKD)と骨粗鬆症(OST)の合併症モデルの作成

骨芽細胞(MC3T3-E1細胞)を前培養した後、インドキシル硫酸(IS)と共培養(6日間)することで、CKDとOSTの合併症モデルを構築した。骨形成の阻害は、骨形成のマーカであるALPの酵素活性とmRNA発現レベルによって評価した。

mRNA発現レベルの測定

核酸分離システムを用いて抽出した細胞内のtotal RNAをcDNAに逆転写した後に、リアルタイムPCRを用いてターゲット遺伝子のmRNA発現レベルを測定した。

メタボローム解析

本培養終了後の細胞は、冷却メタノール(-30°C)添加によるクエンチング処理(代謝物の酵素反応を停止)をした後に回収した。細胞内の代謝物は、メキシム化とTMS化による誘導体化後、ガスクロマトグラフィー質量分析装置(GC-MS)を用いて定量した。代謝物の同定は、メタボロミクス用代謝物質混合試料(GLサイエンス社製)に含まれる52成分を基に行った。

結果・考察

- ✓ 0.3 mMのインドキシル硫酸(IS)の添加により、骨芽細胞の分化マーカーである細胞内のALPの酵素活性とmRNA発現レベルはともに有意に減少した。これらの減少は、10 mMのα-ケトグルタル酸(AKG)の添加により有意に抑制した(図1)。CKD患者においてISの血中濃度は0.2 mMまで上昇することが報告されている。**生理的な濃度においてISは骨芽細胞の分化を阻害することで骨粗鬆症を誘導すること、さらにAKGはこの阻害を抑制する生理作用を有する**ことが示唆された。
- ✓ インドキシル硫酸(IS)によるIbspとSp7のmRNA発現量の減少は、α-ケトグルタル酸(AKG)の添加によって有意に抑制された(図2)。IbspとSp7は骨芽細胞の分化に関与する代表的な遺伝子である。**AKGは、これらの遺伝子発現量の減少を抑制する作用メカニズムにより、ISによる骨の形成阻害を抑制する**ことが示唆された。
- ✓ 細胞内の38種類の代謝物の定量分析(メタボローム解析)を確立することができた。ISの添加により、細胞内のフマル酸とリンゴ酸が有意に減少した。AKGの添加により、細胞内のAKGとコハク酸が顕著に増加した。オキサロ酢酸やクエン酸を添加しても、AKGのような生理活性を示さなかった。これらの結果から、**フマル酸やリンゴ酸と代謝経路が近い代謝物の減少が、ISによる骨芽細胞の分化抑制に関与している**ことが示唆された。

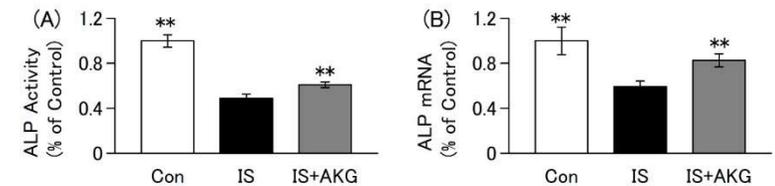


図1. 細胞内のALPの(A)酵素活性と(B)mRNA発現量

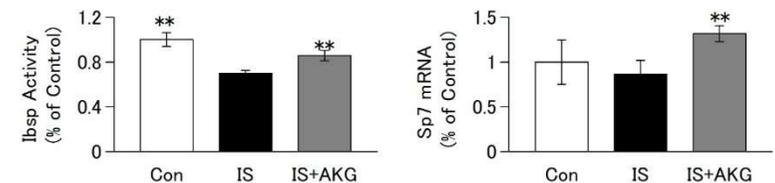


図2 細胞内のmRNA発現量

