

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

乗鞍 敏夫^{1)*}

1) 青森県立保健大学 栄養学科

Key Words ① インドキシル硫酸 ② 骨芽細胞 ③ 分化 ④ 慢性腎臓病 ⑤ 骨粗鬆症

I. はじめに (または「緒言」等)

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ている。つまり、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り、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。

II. 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。

III. 研究方法 (または「研究の経過」等)

1. 慢性腎臓病と骨粗鬆症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 発現レベルから評価した。

2. 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。

3. メタボローム解析

本培養終了後の細胞を冷却メタノール (-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) した後に回収した。細胞内の代謝物は、メトキシ化と TMS 化による誘導体化をした後¹⁾、ガスクロマトグラフィー質量分析装置 (GC-MS) を用いて定量分析した。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。

IV. 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) の添加によって有意に抑制された (図 1)。IS の血中濃度は CKD 患者において 0.2 mM まで上昇することが報告されている²⁾。これらの結果から、IS は CKD 患者における生理的な濃度において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ことが示唆された。

*連絡先: 〒030-8505 青森市浜館間瀬 58-1 E-mail: t_norikura@auhw.ac.jp

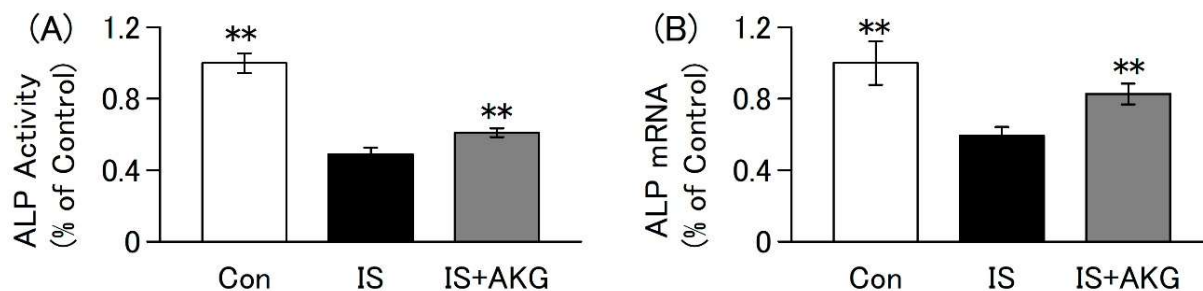


図1 分化マーカーであるALPの(A)酵素活性と(B)mRNA発現量 (** $p < 0.01$ vs IS)

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。これらの結果から、AKGは*Ibsp* と *Sp7* 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による骨芽細胞の分化の阻害を抑制することが示唆された。

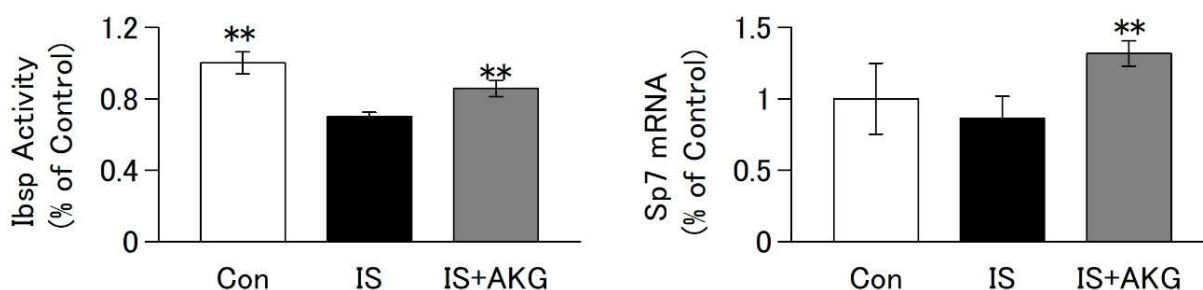


図2 *Ibsp* と *Sp7* の mRNA 発現量 (** $p < 0.01$ vs IS)

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(図3)。図3のクロマトチャートは、Y軸は検出されたイオンの総数を示すTIC (Total Ion Chromatogram) である。定量解析は、Y軸を代謝物ごとに特徴的な m/z (質量数) を選択したクロマトチャートを作成することにより、たとえ保持時間が同じ夾雑物が存在していても、精度の高い定量分析をすることができた。

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。

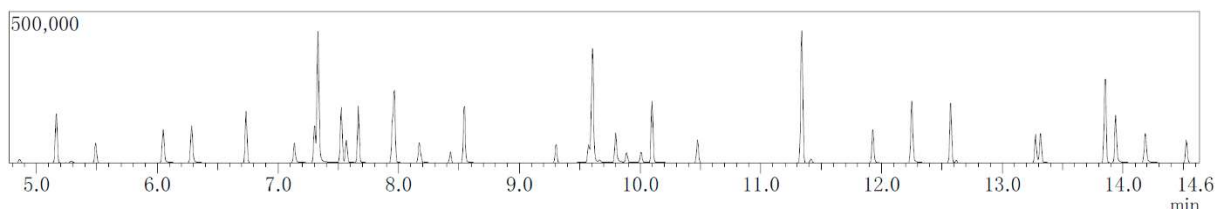


図3 メタボローム解析のクロマトチャート (TIC: Total Ion Chromatogram)

VI. 文献

- 1) Leon Z et al, Mammalian cell metabolomics: experimental design and sample preparation. *Electrophoresis* 2013.
- 2) Duranton F et al, Normal and pathologic concentrations of uremic toxins. *J Am Soc Nephrol* 2012