

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20628

研究課題名(和文) ケトン体の骨代謝への影響の解析

研究課題名(英文) Analysis of the effect of ketone bodies on bone metabolism

研究代表者

斉藤 彰大 (Saito, Akihiro)

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：20736665

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、アセト酢酸(AA)とb-ヒドロキシ酪酸(HB)のALP活性・石灰化物形成調整の機序の解析とその影響が骨芽細胞特異的な作用なのか調べていくこととした。AAとHBは骨芽細胞様細胞MC3T3-E1細胞でも初代培養骨芽細胞でも濃度依存的・時間依存的にALP活性と石灰化物形成を上昇・抑制していることがわかった。さらに、軟骨芽細胞様細胞ATDC5細胞と破骨細胞様細胞RAW細胞培養時にAAもしくはHBを培地に添加し、その影響を解析したが、ATDC5細胞とRAW細胞はAAとHBを添加しても有意な変化はみられなかった。このことから、AAとHBは骨芽細胞特異的に作用することがわかった。

研究成果の概要(英文)：In this study, it was decided to investigate the mechanism of acetoacetate (AA) and b-hydroxybutyrate (HB) ALP activity / calcification formation regulation and its influence on osteoblast specific action. It was found that AA and HB increased and suppressed ALP activity and calcification formation in a concentration-dependent and time-dependent manner in osteoblast-like cells MC3T3-E1 cells and primary osteoblasts. Furthermore, AA or HB was added to the medium during chondroblast-like cell ATDC5 cells and osteoclast-like cell RAW cell culture and the influence was analyzed. However, even when AA and HB were added, significance No change was seen. From this, it was found that AA and HB act on osteoblast specific.

研究分野：歯周病

キーワード：ケトン体 骨芽細胞 骨代謝

1. 研究開始当初の背景

(1) 糖尿病患者では骨代謝異常を発症する

代表的な糖代謝異常疾患である糖尿病は、世界で2億人以上の患者が存在する、最も一般的な代謝疾患の一つである。糖尿病では、インスリン分泌・作用不全により骨芽細胞機能が低下し、さらに骨芽細胞を介して破骨細胞機能も低下することが報告されている (Ferron M. et al. Cell 142:296-308, 2010)。この結果、糖尿病患者では低回転型骨粗鬆症を呈する。

(2) 糖尿病患者では血中ケトン体濃度が上昇する

糖尿病では、インスリン欠乏・作用不足が原因で肝臓や筋肉からグルコースを取り込むことが出来なため、脂肪酸のβ酸化によりアセチル CoA を作りだし、TCA サイクルを動かすことでエネルギーを得る。アセチル CoA の一部からケトン体(アセト酢酸 acetoacetate:AA)、ヒドロキシ酪酸(β-hydroxybutyrate:HB)が合成され、血中ケトン体濃度上昇し、アシドーシスとなる。健康人での血中 AA・HB 濃度は数十μM であるが、糖尿病患者での血中 AA・HB 濃度は 10mM に達すると報告されている (Fukao T. et al. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 70:243-251, 2004, Laffel L. et al. Diabetes Metab Res Rev 15:412-426, 1999)。現在まで、ケトン体と骨代謝との関係を示した報告は少なく、メカニズムも不明な点が多い。

(3) 申請者らの研究グループは、ケトン体が骨芽細胞分化を調節することを見出した

申請者らの研究グループは、AA もしくは HB を培地中に添加し BMP-2 により骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 細胞 (E1 細胞) を刺激すると、AA は時間依存的・濃度依存的に骨芽細胞分化の指標の一つである ALP 活性を上昇させ、HB は時間依存的・濃度依存的に ALP 活性を抑制させることを見出した。また、石灰化誘導培地に AA と HB を添加し骨芽細胞を培養すると、AA では石灰化物形成を促進し、HB では石灰化物形成を抑制させることを見出した。

これらより、ケトン体は骨芽細胞分化を調節している可能性が示唆された。

(4) 申請者らは、骨芽細胞のモノカルボン酸トランスポーター (MCT) の機能を阻害することで、ケトン体による ALP 活性の変化が抑制されることを見出した

ケトン体は細胞膜に存在する MCT により細胞内に取り込まれることが報告されている (Müller F. et al. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 283:G1139-114, 2002)。申請者らの研究グループは、細胞内に取り込まれたケトン体が骨芽細胞分化に関与していると仮定し、MCT を siRNA や阻

害剤 α-cyano-4-hydroxycinnamate (αCHC) により機能を阻害したところ、ケトン体による ALP 活性の調節を減少させることを見出した。このことより、MCT により細胞に取り込まれたケトン体が、骨芽細胞の分化に影響している可能性が示唆された。この研究成果は、ケトン体における骨代謝疾患に対する新たな予防・治療法の開発につながる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究の目的は、糖尿病時に発症する糖尿病性骨粗鬆症におけるケトン体の役割を明らかにし、その治療方法の可能性を探ることである。

(1) AA と HB が骨芽細胞分化を調整しているメカニズムを解析すること

(2) AA と HB の ALP 活性調節は骨芽細胞特異的なものなのか検討するため、骨代謝に関与する軟骨芽細胞様細胞と破骨細胞様細胞への影響を解析する

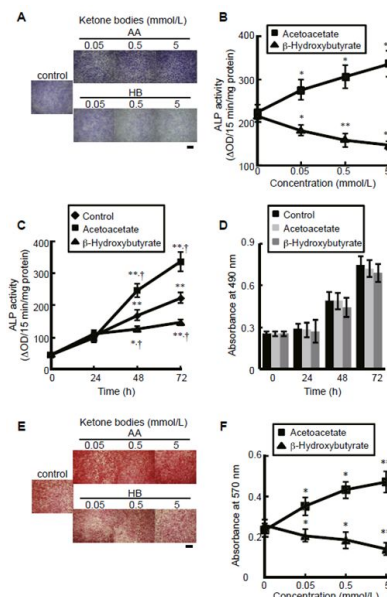
3. 研究の方法

(1) AA と HB の骨芽細胞への作用を解析するため、マウス頭蓋骨から初代培養骨芽細胞 (primary osteoblast:pOB) を採取・AA と HB を添加し培養、ALP 活性・ALP 染色・アリザリン染色を行った。

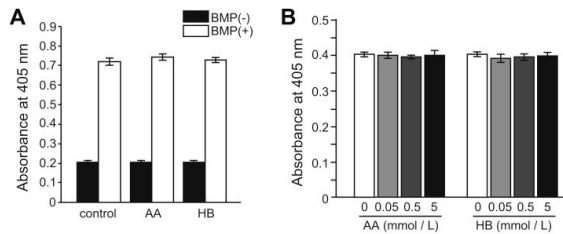
(2) AA と HB の骨代謝に関わる細胞への影響を調べるため、軟骨芽細胞様細胞 ATDC5 細胞と破骨細胞様細胞 RAW 細胞に AA と HB を添加して培養し、ATDC5 細胞はアルシアンブルー染色と ALP 活性測定、RAW 細胞は TRAP 染色・pit assay・トルイジンブルー染色を行い影響を解析した。

4. 研究成果

(1) AA もしくは HB を培地中に添加して pOB を培養したところ、E1 細胞と同様に AA により時間依存的・濃度依存的に ALP 活性と石灰化物形成を上昇させ、HB により抑制させることがわかった。

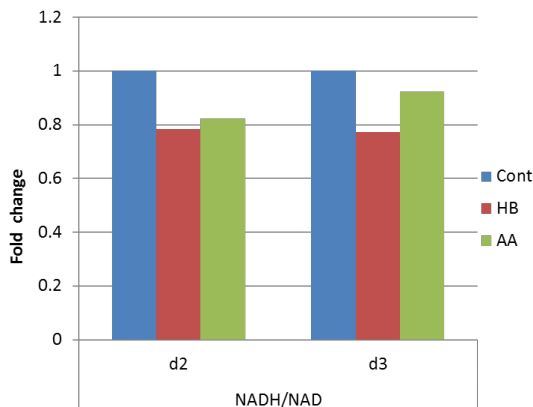


(2)骨芽細胞内へ取り込まれた AA と HB は ALP へ直接作用するか調べるために、細胞溶解液に AA と HB を添加し、ALP 活性の変化を測定したところ、有意な変化は認められなかった。このことから、AA と HB の ALP 活性への影響は直接的なものではないことがわかった。

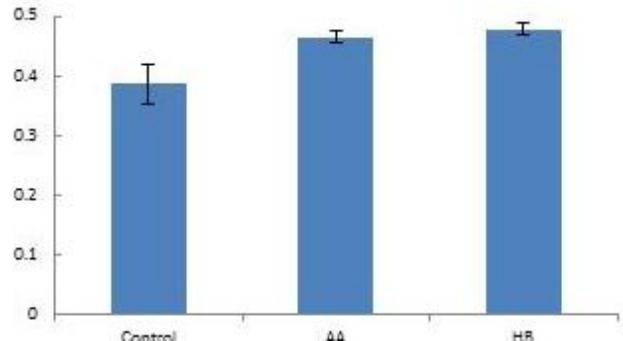


(3)過去の報告で、ヒドロキシ酪酸デヒドロゲナーゼ (hydroxybutyrate:HBDH) が NAD/NADH 比を変化させ、NAD が ALP 活性に影響を及ぼしているとあったため、E1 細胞内での HBDH 発現と NAD/NADH 比を調べた。E1 細胞での HBDH2 の発現は確認できたが、NAD/NADH 比の有意な変化は認められなかった。

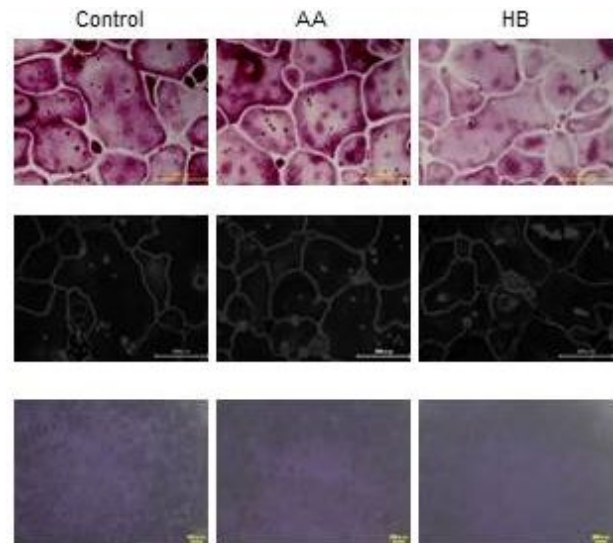
(4) 過去の報告で、AA と HB は ALP 活性に G タンパク質共役受容体 (GPR) が影響しているといわれている。そのサブタイプである GPR41 は HB により活性が阻害され、GPR41 は MAPK シグナルを活性化することが知られている。このことから、AA と HB は ALP 活性調整に影響を及ぼしている可能性があったため、AA と HB 添加時の E1 細胞内の GPR41 の発現の変化を調べたが、有意な変化は見られなかった。



(5) ATDC5 細胞に AA と HB を培地に添加し、影響を解析した。培養後、アルシアンブルー染色と ALP 活性測定を行ったが、AA と HB 添加による有意な変化は認められなかった。



(6)RAW 細胞に AA と HB を培地に添加し、影響を解析した。培養後、TRAP 染色・pit assay・トルイジンブルー染色を行い、解析を行ったが、AA と HB 添加による有意な変化は認められなかった。



## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Akihiro Saito, Kentaro Yoshimura, Yoichi Miyamoto, Kotaro Kaneko, Daichi Chikazu, Matsuo Yamamoto, Ryutarō Kamijo  
Enhanced and suppressed mineralization by acetoacetate and b-hydroxybutyrate in osteoblast cultures  
Biochem Biophys Res Commun.  
査読有 vol473 No2 P537-544  
DOI:10.1016 /j.bbrc.2016.03.109

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等  
昭和大学歯学部歯周学講座  
<http://www10.showa-u.ac.jp/~perio/index.html>  
昭和大学歯学部口腔生化学講座  
<http://www10.showa-u.ac.jp/~oralbio/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

齊藤 彰大 (SAITO Akihiro)  
昭和大学歯学部歯病学講座・助教  
研究者番号：20736665

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

### (4) 研究協力者

( )