

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：21102
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2020～2022
課題番号：20K11625
研究課題名(和文)慢性腎臓病とサルコペニアの合併症における、マイオカインを介したケト酸の生理作用

研究課題名(英文)Physiological effects of ketoacids in complications of chronic kidney disease and sarcopenia

研究代表者
乗鞍 敏夫(Norikura, Toshio)

青森県立保健大学・健康科学部・准教授

研究者番号：40468111
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、グリオキシル酸(グリシンのケト酸代謝物)が、筋細胞内でグリシンに変換された後、さまざまなアミノ酸に代謝されることを明らかにした。また、我々は、グリオキシル酸が、デキサメサゾンが誘導する筋萎縮を阻害すること、筋芽細胞から筋管細胞への分化を促進すること、ミトコンドリアの生合成を促進することを明らかにした。これらは、筋肉における非必須アミノ酸由来のケト酸の生理作用を明らかにした初めての研究報告である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ケト酸は、窒素を含まないアミノ酸代謝物であり、体内でアミノ酸と相互変換される栄養素である。近年、厳格なたんぱく質の摂取制限をした慢性腎臓病患者を、ケト酸サプリメントを摂取させた時のアミノ酸代謝についての臨床研究が行われているが、いまだ実用化には至っていない。本研究により、非必須アミノ酸であるグリオキシル酸(グリシンのケト酸代謝物)が、筋細胞内において複数のアミノ酸に代謝され、筋芽細胞の分化の促進や、筋管細胞の萎縮を抑制するという新たな知見を得た。これらの成果は、今後、臨床研究で用いられるケト酸サプリメントの組成の科学的根拠として活用されることが期待される。

研究成果の概要(英文)：We have shown that glyoxylic acid (a keto acid metabolite of glycine) is converted to glycine in myocytes and then metabolized to a variety of amino acids. We also found that glyoxylic acid inhibits dexamethasone-induced muscle atrophy, promotes differentiation into myotubes, and enhances mitochondrial biogenesis. These are the first reports of physiological effects of keto acids derived from nonessential amino acids in muscle.

研究分野：基礎栄養学

キーワード：慢性腎臓病 サルコペニア ケト酸 アミノ酸 マイオカイン

1. 研究開始当初の背景

腎臓は再生力が弱いことから、遣い潰しの臓器であるともいえる。腎機能は加齢とともに低下するため、高齢になるほど慢性腎臓病 (CKD) の頻度・重篤度が増してくる。CKD 患者は、我が国の成人の 8 人に 1 人が該当し (Jha V, Lancet, 2013)、新たに要介護となるリスクは 1.6 倍高くなる (Imai E, Clin Exp. Nephrol, 2009)。

高齢者では慢性腎臓病とサルコペニアの合併症 (CKD-SP) が高頻度で見られるが、それぞれの食事療法 (CKD のたんぱく質の摂取制限 or サルコペニアの積極的なたんぱく質の摂取) が適用できない。よって、超高齢社会が急速に進行する我が国において、CKD-SP の食事療法の確立は極めて重要かつ喫緊の課題である。

経口摂取したたんぱく質 (アミノ酸) が、筋肉のたんぱく質合成を促進することは周知の事実である。一方で、経口摂取したケト酸は、アミノ酸よりも小腸における吸収率が低く、吸収されてもエネルギー源として利用されやすいため、筋肉のたんぱく質合成 (サルコペニアの進行予防) における有用性は、アミノ酸よりも低いとされてきた (Swain LM, Am J Clin Nutr, 1990)。しかし、経口摂取したケト酸 (窒素を含まないアミノ酸の代謝物) は、アミノ酸と相互変換 (アミノ基転移反応) するため安全性が高く (Shah AP, Am J Kidney Dis, 2015)、CKD において体内に蓄積しやすい尿素や尿毒素 (窒素を含む老廃物) を生じさせない。

ケト酸と必須アミノ酸のサプリメントを併用した厳格なたんぱく質制限食が、CKD の進行予防に有効であるという臨床研究が報告されている (Satirapoj B, Kidney Res Clin Pract, 2018)。しかしながら、CKD の食事療法へのケト酸の有用性は検証レベルであり、いまだ実用化には至っていない。なお、臨床研究では、必須アミノ酸由来のケト酸のみが用いられており、非必須アミノ酸由来のケト酸の役割や、それらの混合割合に関する科学的根拠は皆無である。

2. 研究の目的

本研究は非必須アミノ酸由来のケト酸に着目し、これらのケト酸が筋細胞のアミノ酸代謝および筋形成に及ぼす生理機能を明らかにすることも目的とする。

3. 研究の方法

細胞培養

マウス由来の筋芽細胞株 (C2C12 細胞) を実験に用いた。増殖培地 (10% FBS を含む DMEM 培地) でサブコンフルエントまで培養した C2C12 筋芽細胞を分化誘導培地 (2% Horse Serum を含む DMEM 培地) に培地交換した後、2~6 日間の本培養により、筋管細胞まで分化誘導した。グリオキシル酸 (GA) とデキサメタゾン (Dex) を培地添加した時の筋形成および筋委縮に及ぼす影響を評価した。

リアルタイム PCR

QuickGene RNA cultured cell kit S (クラボウ) を用いて、培養細胞から total RNA を抽出した。Qubit RNA BR Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて total RNA の濃度を測定した後、同濃度に調整した total RNA から ReverTra Ace qPCR RT Master Mix を用いて cDNA を合成した。遺伝子の発現量は、Thunderbird SYBR qPCR Mix を用いた real-time PCR 法により測定した。各遺伝子の相対定量値 (RQ) は、内部標準遺伝子を Actb とした $\Delta\Delta Ct$ 法により算出した。

メタボローム解析

細胞内の代謝物 (38 種類) は、誘導体化 (メトキシム化と TMS 化) した後、ガスクロマトグラフィー質量分析装置 (GC-MS) を用いて相対定量した。

4. 研究成果

結果 1

分化誘導培地への GA の添加濃度に依存して、分化マーカーである mRNA とタンパク質の細胞内

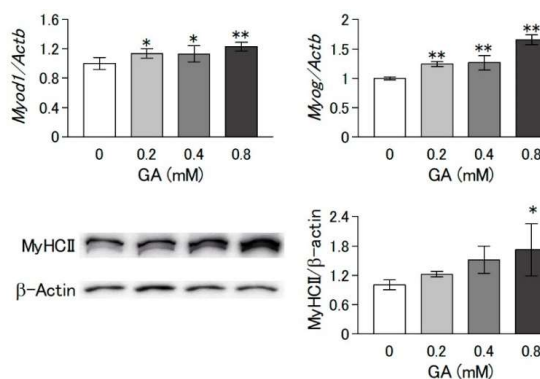


図 1 GA の分化に及ぼす影響

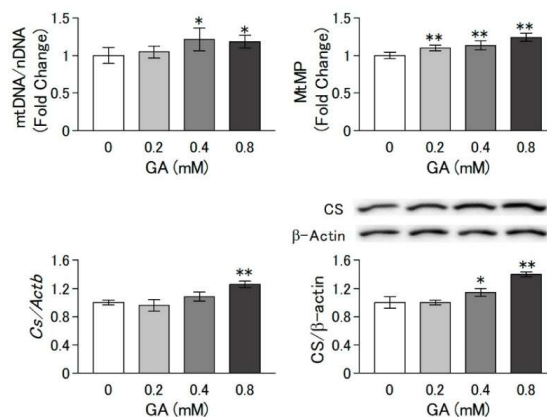


図 2 GA のミトコンドリアへの影響

の発現量が増加した (図 1)。

考察 1

GA は、筋芽細胞の筋細胞への分化を促進することで、筋形成を促進することが示唆された。

結果 2

分化誘導培地への GA の添加濃度に依存して、ミトコンドリア機能の指標であるタンパク質の発現量とミトコンドリア DNA 含量が増加した (図 2)。また、GA の添加濃度に依存して、ミトコンドリア生合成のマーカである mRNA の細胞内の発現量が増加した (図 3)。

考察 2

筋肉のミトコンドリア含量の低下は、サルコペニアの代表的な特徴である。GA は、ミトコンドリア生合成を促進することで、筋肉のミトコンドリア含量を増加させることが示唆された。

結果 3

分化誘導培地へのデキサメタゾン (Dex) の添加により、萎縮のマーカ遺伝子の発現量が顕著に増加した。これらの増加は、分化誘導培地への GA の添加濃度に依存して抑制された (図 4)。

考察 3

Dex によって誘導された筋細胞の筋萎縮は、GA によって抑制されることが示唆された。

結果 4

分化誘導培地への GA の添加により、細胞内のグリシン含量が顕著に増加した。また、グリシンから代謝されるアミノ酸 (セリン、アラニン等) およびケト酸 (クエン酸、コハク酸等) も顕著に増加した (図 5)。

考察 4

筋細胞内のアミノ酸とケト酸の代謝の変化を介して、GA は骨格筋細胞における生理作用を示していることが示唆された。

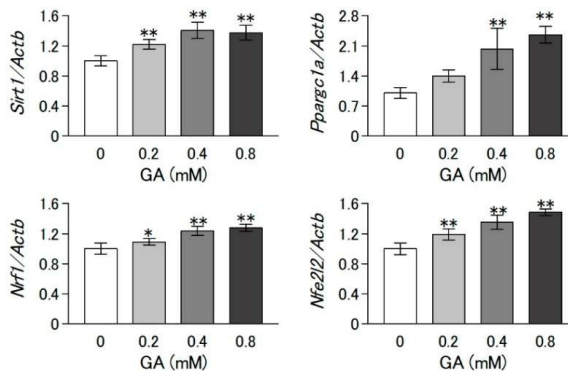


図 3 GA の遺伝子発現量への影響

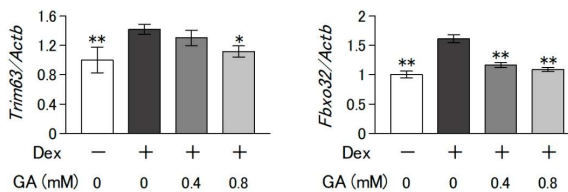


図 4 GA の筋萎縮への影響

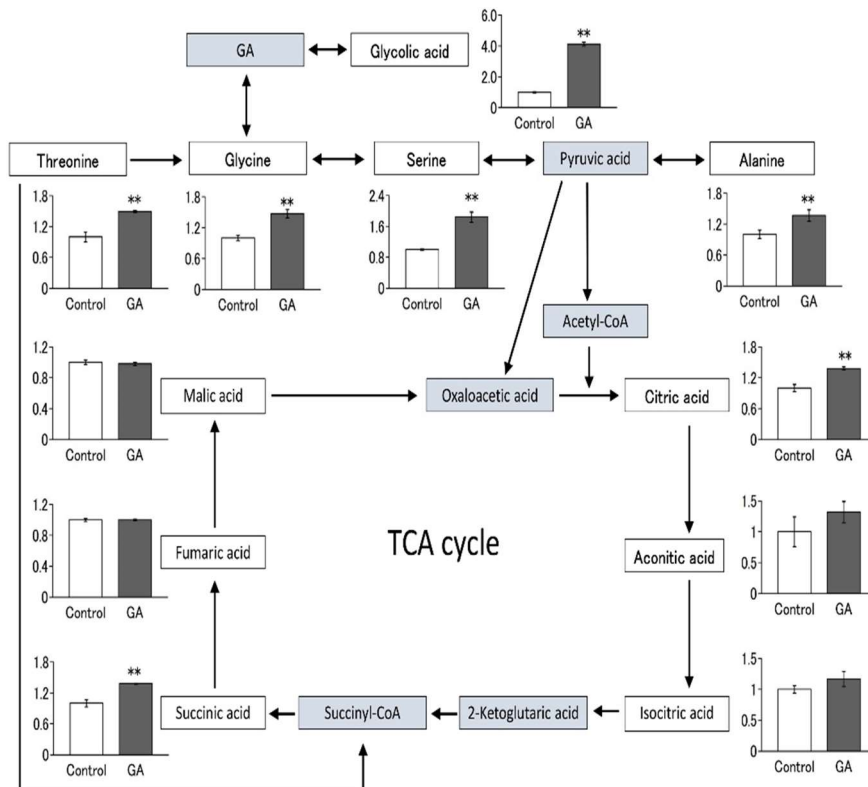


図 5 GA の筋細胞における代謝産物のプロファイルに及ぼす影響

【まとめ】

本研究は、非必須アミノ酸由来のケト酸の筋肉における生理作用をはじめて明らかにしたものであり、CDK とサルコペニアの合併症におけるあらたな食事療法として活用が期待されるケト酸タブレットの組成を検討する臨床研究への応用が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yutaro Sasaki , Akiko Kojima-Yuasa , Hinako Tadano , Ayaka Mizuno , Atsushi Kon , Toshio Norikura	4. 巻 16
2. 論文標題 Ursolic acid improves the indoxyl sulfate-induced impairment of mitochondrial biogenesis in C2C12 cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nutrition Research and Practice	6. 最初と最後の頁 147-160
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4162/nrp.2022.16.2.147	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Toshio Norikura, Yutaro Sasaki, Akiko Kojima-Yuasa, Atsushi Kon	4. 巻 15(7)
2. 論文標題 Glyoxylic Acid, an α -Keto Acid Metabolite Derived from Glycine, Promotes Myogenesis in C2C12 Cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 1763
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/nu15071763	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 阿部 朱璃、佐々木 裕太郎、乗鞍 敏夫
2. 発表標題 尿毒素による筋機能低下をウルソル酸が抑制する 作用メカニズムの解明
3. 学会等名 令和 3 年度 日本栄養・食糧学会 東北支部（第 55 回大会）・北海道支部（第 51 回大会）合同支部大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤 桃歌、乗鞍 敏夫
2. 発表標題 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
3. 学会等名 令和 3 年度 日本栄養・食糧学会 東北支部（第 55 回大会）・北海道支部（第 51 回大会）合同支部大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 齋藤 優香、館花 春佳、井澤 弘美、今 淳、乗鞍 敏夫
2. 発表標題 筋肉におけるグリオキシル酸の生理作用について
3. 学会等名 令和 3 年度 日本栄養・食糧学会 東北支部（第 55 回大会）・北海道支部（第 51 回大会）合同支部大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 乗鞍 敏夫
2. 発表標題 グリオキシル酸は、C2C12細胞における筋形成を促進し、デキサメタゾンが誘発する筋萎縮を抑制する
3. 学会等名 2022 年度 青森県保健医療福祉研究発表会 日本ヒューマンケア科学学会第 15 回学術集会 合同集会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	湯浅 明子 (小島明子) (Yuasa Akiko) (90295709)	大阪市立大学・大学院生活科学研究科・准教授 (24402)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------