

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24500662

研究課題名(和文)クエン酸添加透析液の肝細胞内エネルギー貯蔵効果による透析患者運動持久力の改善

研究課題名(英文)The improving effect of dialysis patients' physical activity endurance using the glycogen synthesis efficiency in hepatocytes caused by citrate-containing dialysate.

研究代表者

大橋 篤(OHASHI, Atsushi)

藤田保健衛生大学・医療科学部・准教授

研究者番号：30310585

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：透析液(AD)に添加される酢酸は生体適合性に問題がある。ADに比し代替のクエン酸添加透析液(CD)は透析後の倦怠感抑制効果がある。ヒト肝細胞(HHpC)に対するCDのグリコーゲン(Gly)合成への影響を分子生物学的に検討した。EMEM培地にADとCDを混和した溶液でHHpCを培養しGly量と代謝関連酵素の発現量を比較した。HHpCのGly量はAD/EM $5.1 \pm 0.9 \mu\text{g/gTP}$ に比しCD/EM 5.8 ± 0.8 で有意に高値、さらに、CD/EMによるGYS2の発現量はAD/EMに比し1.2倍高値であった。CDはADに比し肝細胞のGly合成能を促進させ、透析患者の持久力を向上させ可能性が示唆される。

研究成果の概要(英文)：Citrate-containing dialysate (CD) has been considered to cause post-dialysis fatigue to a lesser extent than acetate-containing dialysate (AD). The aim of this study was to validate from a molecular biological perspective a robust glycogen synthesis effect by qRT-PCR. Normal human hepatocytes (HHpC) were cultured with EMEM and AD (AD/EM) or CD (CD/EM) for 4 h. The cells were then lysed, and the glycogen level, as well as the expression levels of glycogen synthase (GYS2), was measured. The glycogen level in HHpC incubated in CD/EM was $5.8 \pm 0.8 \mu\text{g/g}$, which was significantly higher than 5.1 ± 0.9 observed when incubated in AD/EM. The expression levels of GYS2 in CD/EM was 1.2 fold of that in AD/EM. In this study, it was found that increased glycogenesis capacity of hepatocytes cultured in CD, compared with AD, causes less fatigue feeling after dialysis, which is due to an increased energy level during dialysis in the presence of CD, and contributes to the energy supply after dialysis.

研究分野：生体機能代行技術学

キーワード：血液透析 酢酸添加透析液 クエン酸添加透析液 生体適合性 グリコーゲン産生 エネルギー代謝

1. 研究開始当初の背景

本邦で維持血液透析療法が開始されて半世紀が経過している。透析療法の開始時は腎不全患者の救命に重点が置かれ、患者のクオリティーオブライフ (QOL) に関する影響は問題にされなかった。しかし、透析の長期化に伴い、様々な合併症が生じ、今日では汚染された透析液からエンドトキシンが半透膜を介し血液へ逆拡散・濾過で入り単球を刺激して透析アミロイド症による骨関節の運動機能障害の一因になっている。さらに、透析患者は尿毒素や余剰の水分を治療中に除去しなければならず、細胞内外液の環境が急激に変化するため、心臓機能や末梢循環への負荷が高まり、全身倦怠感が顕著となり、高齢患者においては透析困難症などの合併症が大きな問題となっている。血液透析液で使用する透析液には pH 調整剤として酢酸が添加されているが、酢酸が逆拡散で慢性的に体内へ入ると単球を刺激作用や血圧低下を引き起こす。そこで、近年、酢酸添加重炭酸透析液 (Acetate-containing bicarbonate dialysate : A-BD) の代替にクエン酸を添加した重炭酸透析液 (Citrate-containing bicarbonate dialysate : C-BD) が使用されるようになった。Daimon らは A-BD と C-BD のクロスオーバー試験の際、SF-36 を用いた QOL アンケート調査を行い、C-BD は A-BD に比し透析治療後の疲労感を軽減させると報告している。しかしながら、C-BD の疲労感改善に関する細胞レベルでの検討はされていない。

2. 研究の目的

透析液のグルコース濃度は血糖値よりも高く設定され、細胞へ取り込まれエネルギー合成に関与している可能性がある、さらに、pH 調整用に添加される酢酸やクエン酸は細胞内の代謝系に影響を及ぼしている事が推測される。当該研究の目的は、A-BD に対する C-BD のヒト細胞におけるエネルギー産生系と運動持久力の関連性を分子生物学的方法で検討することである。

3. 研究の方法

(1) 動物実験による A-BD と C-BD の腹腔内留置による運動持久力の評価

マウス (ICW, 10 週齢, 体重 50g, 各 n=4) の腹腔内へ生理食塩水を対照に A-BD (キンダリー AF-2 号、酢酸 8mEq/L、重炭酸 30mEq/L、グルコース Glc 150mg/dL) と C-BD (カーボスター、クエン酸 2mEq/L、Glc 150mg/dL、重炭酸 35mEq/L) を各々 1mL 注入投与し、4 時間飼育した後、水槽 (37 °C) に放ち、遊泳時間を測定し持久力を比較した。さらに、遊泳試験直後のマウスの肝臓組織を採取して、組織湿重量 1g 当たりのグリコーゲン (Gly) 量を比較した。

(2) ヒト肝癌細胞 (HepG2) 株に対する透析液 pH 調整剤として添加される各種酸の Gly 合成能の比較

正常ヒト肝細胞は継代培養が困難なため、ヒト肝癌細胞 (HepG2) 株を対象とした。Eagle's minimal essential medium (EMEM) に牛胎児血清 (FBS) を 5% 加えた培地で HepG2 株をコンフルエントに成るまで継代培養し、最終の培地交換の際、EMEM 中に透析液で添加される濃度の各種酸 (塩酸 HCA : 3mEq/L、酢酸 AA : 3mEq/L、クエン酸 CA : 1mEq/L) を添加した培養液に換え、治療時間に相当する 3 時間培養した。HepG2 が播種されたウエルの培地を除去後、蒸留水 100 μ L を加え 6 穴プレートをディープフリーザーで凍結し細胞を破碎し、再解凍した溶液中の Gly とタンパク質濃度を測定した。

(3) 正常ヒト骨格筋細胞 (SkMC) に対する酢酸とクエン酸の Gly 合成能に及ぼす影響

Gly は肝臓以外に骨格筋でも産生・貯蔵される。そこで、継代培養可能な正常ヒト骨格筋細胞 (SkMC) 株を用い、専用培地でコンフルエントに至るまで培養し、EMEM 培地に HCA、AA、CA 添加した溶液で各々 3 時間培養し、SkMC 中の Gly 量を測定した。

(4) SkMC に対する酢酸とクエン酸の遺伝子発現に及ぼす影響 DNA チップによるヒト

全遺伝子解析

SkMC 株を 5%FBS 入り EMEM に酢酸ナトリウム：終濃度:3mM とクエン酸ナトリウム：終濃度:1/3mM を添加した溶液で 3 時間培養し、実験 3) 同様、細胞を破碎して mRNA の抽出と cDNA 合成を行い、DNA チップ法でヒト全遺伝子の発現解析を行った。特にエネルギー代謝および生体適合性に関連する遺伝子{ アクチン(ACTB)、解糖系:[ヘキソキナーゼ(HK2)、ホスホフルクトキナーゼ(PFKM)、ピルビン酸キナーゼ(PKLR)、乳酸脱水素酵素(LDHA)、アセチル CoA 合成酵素(AACS)、リンゴ酸脱水素酵素(ME1)]、脂肪酸合成系:[クエン酸リアーゼ(ACLY)、マロニル CoA-ACP トランスアシラーゼ(FANS)]、グリコーゲン合成系:[UGP グルコース・ピロホスホリラーゼ(UGP2)、グリコーゲンシンターゼ(GSY1)、分枝酵素(GBE1)]、ペントースリン酸系:[グルコース 6-リン酸脱水素酵素(G6PD)、ラクトナーゼ(PGLS)、6-ホスホグルコン酸脱水素酵素(PGD)、グルタチオンジスルフィドレダクターゼ(GSR)]}に着目し AA と CA の発現比率を比較した。

(5) SkMC に対する A-BD と C-BD の qRT/PCR による糖代謝関連酵素遺伝子発現の比較

実験 4) の DNA チップの結果を確認するため、SkMC を再度継代培養し例数を増やし検証した。EMEM を対照に置き、EMEM に A-BD または C-BD を等量で混和し FBS を 5% 添加した溶液 A-BD/EM と CBD/EM を調整し、SkMC がコンフルエントに達した時点で、A-BD/EM と CBD/EM で 4 時間培養し直ちに細胞を破碎して mRNA を抽出した。DNA チップの結果から発現に差のあった解糖系関連酵素を qRT-PCR 法で測定し、A-BD/EM に対する C-BD/EM の発現倍率を 2-法で比較した。また、DNA チップの結果、ペントースリン酸経路系酵素群とグルタチオンジスルフィドレダクターゼ(GSR)が C-BD で高値であり、CA の抗酸化作用に対する影響も検討に加え、SkMC 中の還元型グルタチオン(GSH)量を測定し比較した。

(6) ヒト正常肝細胞(HHpC)に対する A-BD と C-BD の Gly 合成に及ぼす影響評価

ヒト肝細胞の確保は容易でないため、正常ヒト肝細胞(HHpC)を購入し、専用培地(HCM)で解凍後、コラーゲン被服プレートへ播種し 2 日間培養した後、EMEM へ変更し、さらに 2 日間培養した。その後、(5)と同様、A-BD/EM と C-BD/EM 溶液で HHpC を 4 時間培養し、細胞内 Gly 量を測定し、同時に qRT-PCR 法で PFKL、GYS2、G6PD、ACLY の発現量を比較した。

4. 研究成果

(1) 動物実験による A-BD と C-BD の腹腔内留置による運動持久力の評価

ICW マウスの遊泳持続時間は生食投与群: 518 ± 96 秒、A-BD 投与群: 430 ± 152 秒、C-BD 投与群: 563 ± 51 秒で、A-BD 群は C-BD 群に比し遊泳時間が短縮する傾向があったが、対照の生食群と C-BD 群に差がないことより、C-BD が持久力を向上させた結果でなく、むしろ A-BD が持久力を抑制したと考えられる。次に、遊泳試験直後のマウスの肝臓組織湿重量 1g 当たりのグリコーゲン量は生食群: 12.0 ± 5.2 mg に対し、A-BD 投与群: 13.5 ± 5.3 mg、C-BD 投与群: 12.3 ± 3.4 mg で有意差がなかった。したがって、本生理学的評価法においては、動物の栄養摂取状態や飼育環境をはじめ個体差など個体背景の統一が困難であり、厳密な比較は困難と判断した。

(2) ヒト肝癌細胞(HepG2)株に対する透析液 pH 調整剤として添加される各種酸の Gly 合成能の比較

EMEM 培地に添加した HCA、AA および CA で 3 時間培養した HepG2 内のタンパク質 1mg 当たりの Gly 量は、対照の HCA 添加培養群: 15 ± 2 ($\mu\text{g}/\text{mg TP}$) に対し、AA 添加培養群: 42 ± 3 と CA 添加培養群: 35 ± 6 で有意 ($p < 0.01$) に高値であった。しかしながら、AA 群と CA 群には有意差を認めず、CA は当初の予想とは逆に AA よりも低値の傾向を示す結果となった。本実験においては対象に肝癌細胞を用いたため、継代培養の際、ウエル中の細胞密度や総細胞数など条件統一に問題があった可能性がある。

(3) 正常ヒト骨格筋細胞(SkMC)に対する酢

酸とクエン酸の Gly 合成能に及ぼす影響

SkMC を HCA、AA および CA を添加した EMEM で 3 時間培養した際の培養液濃度変化から求めた SkMC のグルコース消費量は各群(n=5)とも 0.42 (μmol/mg protein) で且つ乳酸産生量 0.43 μ (mol/mg protein) で各ウエルに播種した SkMC の代謝は同等と考えられる。一方、SkMC 中の Gly 量は HCA 添加群: 23.2 ± 2.7 (μg/mg protein) に比し、AA 添加群: 41.7 ± 16.7、CA 添加群: 30.9 ± 5.4 で両群間とも有意 (p<0.05) に高値であった。しかしながら、AA 添加群と CA 添加群に有意差を認めなかった。

(4) SkMC に対する酢酸とクエン酸の遺伝子発現に及ぼす影響 DNA チップによるヒト全遺伝子解析

表 1. は SkMC を酢酸 Na 添加 EMEM とクエン酸 Na 添加 EMEM で培養した際の DNA チップによるヒト全遺伝子発現の結果より糖代謝関連酵素の発現率を比較したものである。クエン酸 Na の添加は酢酸 Na 添加に比し、Gly 産生系とペントースリン酸系ならびに GSR の発現比が高値であった。よって、(5) の qRT/PCR による検討では Gly 産生系とペントースリン酸系に焦点をあてた。

symbol	global normalization		ratio
	EMEM 培地 + 酢酸 Na 3mM	EMEM 培地 + クエン酸 Na 1/3mM	
ACTB	6530	6731	1.03
HK2	30	30	1.00
PFKM	260	248	0.95
PKLR	10.1	9.6	0.95
LDHA	8669	8179	0.94
AACS	129	82	0.64
ME1	348	308	0.89
ACLY	479	483	1.01
FASN	1625	1891	1.16
UGP2	1468	1614	1.10
GYS1	124	132	1.06
GBE1	972	1292	1.33
G6PD	419	463	1.11
PGLS	783	888	1.13
PGD	2543	2520	0.99
GSR	91	107	1.18

表 1. DNA チップによるヒト全遺伝子発現解析

(5) SkMC に対する A-BD と C-BD の qRT/PCR による糖代謝関連酵素遺伝子発現の比較

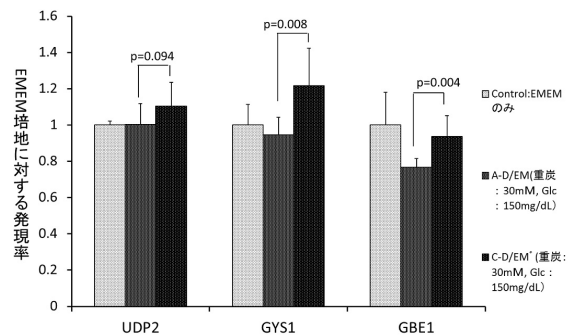
SkMC を A-BD/EM、CBD/EM で培養した際の PFK と GAPDH の発現率を qRT/PCR で比較したところ、A-BD/EM 群と C-BD/EM 群間に有意差

は無かった。一方、Gly 合成系の GYS1 と GBE1 は、C-BD/EM が A-BD/EM に比しとも有意 (p<0.01) に高値であった (図 1)。しかしながら、同時に行った SkMC 中の Gly 量測定の結果において、(A-BD/EM : 10.1 ± 3.2ng/ μg protein vs C-BD/EM: 11.0 ± 1.4) で有意差がなかった (図 2)。

ペントースリン酸系の遺伝子 G6PD と PGLS ならびに GSR 発現比はいずれも A-BD/EM に比し C-BD/EM は有意 (p<0.05) に高値であった (図 3)。

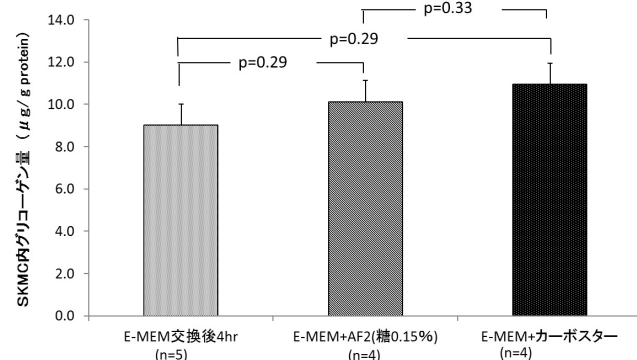
しかしながら、GSH 量は、A-BD : 0.5 ± 0.4 μmol/g protein に比し C-BD は 0.2 ± 0.2 μmol/g で有意差がなく、GSH 量は GSR 発現量と一致しなかった (図 4)。

また、脂質合成系関連酵素の ACLY、FASN、ME1 を pRT/PCR で比較したところ、何れの酵



素とも有意差が無かった (図 5)。

図 1. pRT/PCR による SkMC に対する A-BD/EM



と C-BD/EM の Gly 合成系酵素の発現率

図 2. SkMC に対する A-BD/EM と C-BD/EM 培養による細胞内 Gly 量

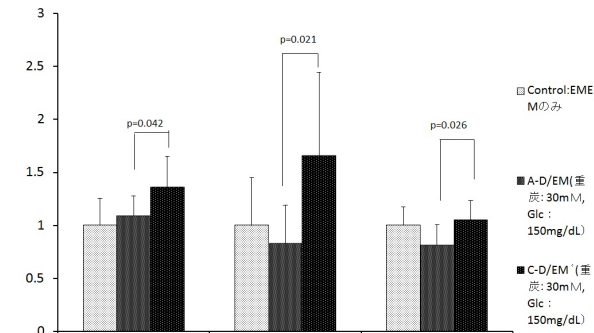


図3. SkMC に対する A-BD/EM と C-BD/EM のペントースリン酸系酵素の発現率

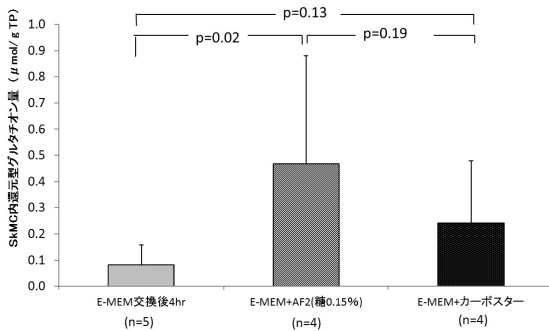


図4. SkMC に対する A-BD/EM と C-BD/EM による細胞内 GSH 量

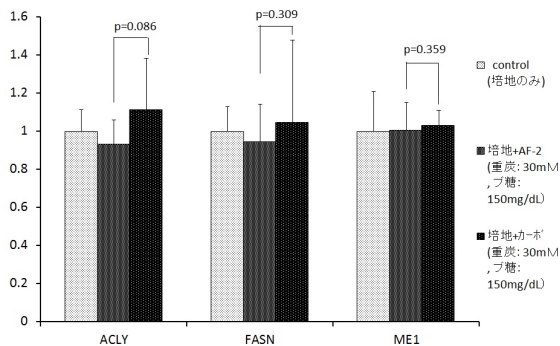


図5. SkMC に対する A-BD/EM と C-BD/EM の脂質合成系酵素の発現率

(6) ヒト正常肝細胞 (HHpC) に対する A-BD と C-BD の Gly 合成に及ぼす影響評価

Gly 以外の細胞内貯蔵エネルギーとなる脂質合成系酵素 ACLY(図 6a)とペントースリン酸系酵素の G6PD(図 6d)は C-BD/EM 群は対照の A-BD/EM 群に比し有意差は無かった。

一方、C-BD/EM 群の PFKL は A-BD/EM 群に比し 0.89 倍低い値($p < 0.05$)に低値であった(図

6b)。しかし、HHpC に対する C-BD/EM のクエン酸における PFK へのアロステリック阻害の生化学的酵素活性の測定とウエスタンブロット法による PFK の証明には至らなかった。

次に、C-BD/EM 群の GYS2 の発現量は A-BD/EM 群に比し、1.18 倍、有意($p < 0.05$)に高値(図 6.c)であった。

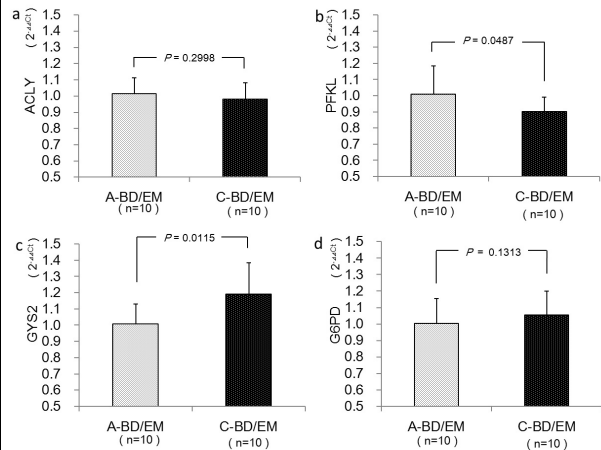


図6. 添加実験による HHpC の遺伝子発現量

HHpC を高グルコースの専用維持培地 (HCM) で 2 日間培養した際の Gly 量は $9.3 \pm 2.0 \text{ ng}/\mu\text{g TP}$ であったが、EMEM 培地に交換しさらに 2 日間培養すると Gly 量は 4.1 ± 0.9 へ有意 ($p < 0.01$)に減少した(図 7.a)。

EMEM で 2 日間培養した HHpC を A-BD/EM に換え 4 時間培養した際の Gly 量は C-BD/EM 群 5.8 ± 0.8 で、A-BD/EM 群 5.1 ± 0.9 に比し有意 ($p < 0.05$)に高値であった(図 7.b)。

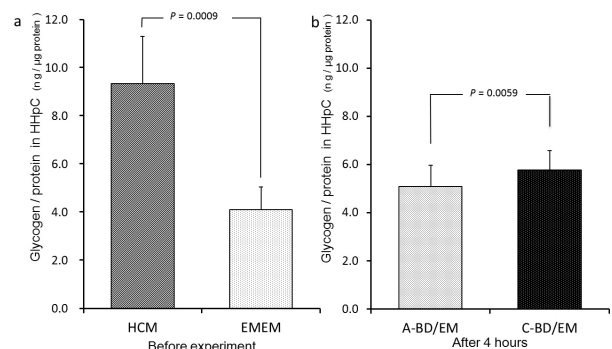


図7. 培養実験による HHpC 内 Gly 量

以上、ヒト肝細胞において、C-BD に添加されるクエン酸は A-BD の酢酸に比し、細胞質

の PFK を抑制し、透析液から供給されるグルコース代謝をグリコーゲン合成へ導く。グリコーゲン量は持久力を反映するため、A-BD に比し C-BD が透析中に肝細胞内の Gly 合成を促進すれば、治療後の持久力維持に優位に働く可能性が示唆される。(図 8)

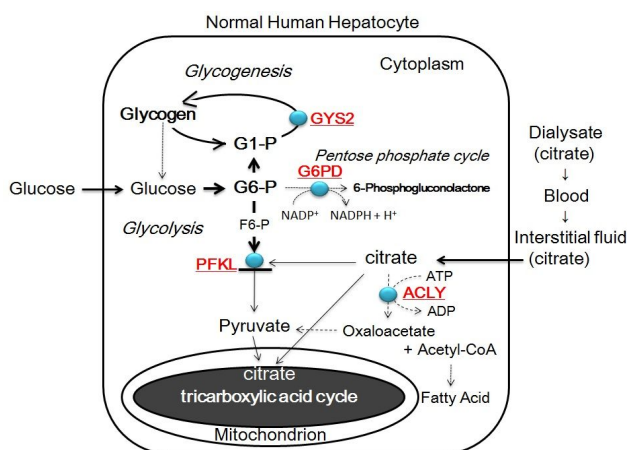


図 8. ヒト肝細胞に対するクエン酸透析液の糖代謝への影響

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 5 件)

Ohashi A, Nakai S, Kawaguchi K, Hori H, Hiki Y, Kitaguchi N, Tomita M, Hasegawa M, Yuzawa Y Vitamin-E-bonded polysulfone membrane prevent carbonylation of serum albumin and improves health-related quality of life in hemodialysis patients 12-14 September, 2013 31th Annual Meeting of the International Society of Blood Purification (ISBP), Bologna (Italy)

大橋 篤, 堀 秀生, 川口和紀, 中井 滋, 北口暢哉, 比企能之, 富田 亮, 長谷川みどり, 湯澤由紀夫 クエン酸添加透析液の正常ヒト肝細胞に対するグリコーゲン充填能の検討 2015年3月27-29日 第31回日本医工学学会 (広島国際会議場)
大橋 篤, 堀 秀生, 川口和紀, 中井 滋, 北口暢哉, 比企能之, 富田 亮, 長谷川みどり, 湯澤由紀夫 酢酸およびクエン酸

添加透析液のヒト骨格筋細胞に対するグリコーゲン代謝への影響 2014年6月13-15日、第59回日本透析医学会 (神戸ポートピアホテル)

大橋篤, 堀秀生, 川口和紀, 中井滋, 北口暢哉, 比企能之, 富田亮, 長谷川みどり, 湯澤由紀夫 抗酸化透析療法による血漿成分の酸化ストレスと SF36 を用いた QOL への影響 2013年6月第58回 日本透析医学会 (福岡国際会議場)

大橋篤, 堀秀生, 川口和紀, 中井滋, 北口暢哉, 比企能之, 村上和隆, 富田亮, 長谷川みどり, 湯澤由紀夫 維持透析患者におけるビタミン E 被覆膜の抗酸化効果の評価 2012年6月 第57回日本透析医学会 (京王プラザホテル札幌)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大橋 篤 (OHASHI, Atsushi)

藤田保健衛生大学・医療科学部・准教授
 研究者番号: 30310585

(2) 研究分担者

中井 滋 (NAKAI, Shigeru)

藤田保健衛生大学・医療科学部・教授
 研究者番号: 20345896