

〔研究ノート〕

卵巣摘除された慢性腎臓病モデルラットの骨代謝維持に対する食餌アルギニンあるいは大豆イソフラボン抽出物投与の有効性評価に関する基礎的研究

海老沢秀道・岩谷美咲・鬼窪麻衣・瀧山花穂
竹本歩実・松本美寿穂・清水史子

A Basic Study of the Efficacy of the Dietary L-Arginine and
Soy Isoflavone-Extracted on the Bone Metabolism in
Ovariectomized Chronic Kidney Disease (CKD) Model Rats

Hidemichi EBISAWA, Misaki IWATANI, Mai ONIKUBO,
Kaho TAKIYAMA, Ayumi TAKEMOTO,
Mizuho MATSUMOTO and Fumiko SHIMIZU

The present study was carried out to elucidate the protective effects of dietary L-arginine and soy isoflavone-extracted on the bone metabolism in the ovariectomized chronic kidney disease model rats.

Nine-week-old female rats received 360mg/kg BW of adenine intragastrally for four consecutive days so that they would develop chronic kidney disease (CKD). After six days of recovery, rats received ovariectomies (OVX) under anesthesia. A sham operation was carried out on another group of rats (group Intact).

Seven days after the OVX, the rats were given either a control diet (20% casein protein diet (group CA); 0.5% L-arginine supplemented diet (group Arg); or 0.20% soy isoflavone-extracted supplemented diet (group IF), 13g per day for 12 weeks. Rats in group Intact were, like group CA, given the control diet.

The results were as follows:

- 1) Group CA developed moderate chronic kidney disease which was manifested as elevated kidney weight, increased serum creatinine, relatively lower creatinine clearance and reduced femoral-BMD than that of group Intact.
- 2) The L-Arginine supplemented diet did not improve renal function and femoral BMD-loss. But, increased mRNA expression levels of IGF-1, BMP-2 and Osterix were observed in the femurs.
- 3) Soy isoflavone-extracted supplemented diet had no preventative effects on BMD loss, although estrogen receptor-beta mRNA expression levels in the femurs were elevated.

From these results, bone-protective functions of L-arginine via activation of osteoblast differentiation and bone formation process were suggested. Further investigation to clarify the efficacy of L-arginine-IGF-1 signal transduction on the bone metabolism is required to determine whether a therapy based on this approach can help people suffering from osteoporosis in CKD patients.

Key words: chronic kidney disease model rat (慢性腎臓病モデルラット), L-Arginine (アルギニン), soy isoflavone-extract (大豆イソフラボン抽出物), BMD (骨密度), osteoporosis (骨粗鬆症)

目 的

人口構成の高齢化にともなって慢性腎臓病 (CKD) 患者数は今後も増加すると予測される。慢性腎臓病罹患女性が閉経を迎えた時、電解質異常と骨密度低下の一層の悪化が予測されるにもかかわらず、閉経を迎えた CKD 患者の骨代謝を正常化して骨密度低下を抑制するための食事条件を明らかにするための研究はほとんど行われていない。

雄ラットを用いた先行研究¹に引き続き本研究は、卵巣摘除手術を施した慢性腎臓病モデルラットに L-アルギニンあるいは大豆イソフラボン抽出物を食餌として摂取させ、これら食事成分が大腿骨骨密度あるいは骨代謝関連遺伝子の mRNA 発現レベルに影響して骨代謝を改善するか否かを明らかにすることを目的とした。

実験方法

実験動物

実験動物は、9 週齢の Wistar 系雌ラット (三共ラボラトリーズ) を用いた。ラットは、1 群 6~8 匹として 4 群に分け、それぞれ CA 群, Arg 群, IF 群および Intact 群とした。

慢性腎臓病モデルの作成

アデニン胃内投与によって慢性腎臓病モデルを作成できる。先行研究に従って、CA 群, Arg 群, IF 群に対して、体重 1 kg 当たり 360 mg のアデニンを 2% メチルセルロース懸濁液として毎日 1 回連続 4 回胃内投与し、慢性腎臓病モデルラットを作成した¹。

閉経モデルの作成

アデニン胃内投与終了後 7 日間市販固形食 (CRF-1) を自由に摂取させて体重の回復を確認した後、麻酔下に卵巣摘出手術 (OVX) を行い、閉経後モデルを作成した。OVX 後 4 日間市販固形食を自由に与えて手術からの回復を図った。以上の操作によって 4 匹のラットが死亡し、ラット例数はその結果、CA 群, Arg 群および IF 群でそれぞれ 5, 7 および 5 匹となった。

Table 1. Compositions of experimental diet

Ingredients	Groups		
	CA/Intact	Arg	IF
Isoflavone extracted	0	0	2
L-Arginine	0	10	0
Casein	220	220	220
α -Corn starch	406.7	400	405.3
Sucrose	203.3	200	202.7
Cellulose powder	50	50	50
Mineral mixture	50	50	50
Vitamin mixture	20	20	20
Corn oil	50	50	50
Total amounts (g)	1000	1000	1000

Isoflavone extracted: Soyaflavone-E (isoflavone contents: 50%), gifted from Fuji Oil Co. LTD.

L-Arginine: Wako pure chemical Co. LTD.

Casein, α -Corn starch, Cellulose powder, Mineral mixture, Vitamin mixture: Oriental Yeast Co. LTD.

Corn oil: Ajinomoto Co. LTD.

一方、正常な腎臓および卵巣を維持した対象条件として、2% メチルセルロース胃内投与および卵巣摘除に対する偽手術を行った Intact 群を設けた。Intact 群の例数は 6 匹となった。

食餌条件

ラットに Table 1. に示した実験食を 12 週間投与した。すなわち、CA 群にはコントロール食として AIN86 をベースとした 20% カゼインタンパク質食 (20CA) を、Arg 群には 20CA に 0.5% L-アルギニン添加食を、そして IF 群には 20CA に 0.20% 大豆イソフラボン抽出物添加食を与えた。Intact 群には CA 群と同じ飼料を与えた。

実験食は、摂食量の相違による影響を避けるために、1 日 13 g の制限食条件で 3 ヶ月間投与した。水は、水道水を自由に与えた。

屠殺条件および測定項目

尿, 血液, 臓器重量の測定

実験食期間終了前の 3 日間採尿し、尿中総タンパク, クレアチニン, NAG (N-acetyl-D-glucosaminidase) 活性などを測定した。

実験食期間終了後、ラットはペントバルビタール

麻酔下に採血屠殺し、臓器および大腿骨を摘出した。これら試料を用いて、血清 ALT/AST 活性、クレアチニンおよびカルシウム濃度、臓器重量、大腿骨構造解析および大腿骨における mRNA 発現レベルの測定を行った。

大腿骨骨密度と骨強度の測定

左大腿骨に対して、X 線 CT (Latheta, Aloka) を用いた骨密度測定および精密万能試験機 (Shimadzu EZ-SX) を用いた破断強度の測定を行った。

大腿骨における mRNA 発現レベルの測定

• T-RNA の抽出

大腿骨遠位端から近位端方向に 1.2 mm の部位で骨を切断し、この遠位端を液体窒素冷却下に破碎し、試料とした。この粉碎された大腿骨遠位端は AGPC 法²で処理して T-RNA を抽出した。

• mRNA 発現レベルの数値化と表記

大腿骨から抽出した T-RNA を用いて Table 2. に示した条件で半定量 RT-PCR を実施し、その反応生成物に対してノーザンブロットングを行った。この電気泳動像をコンピュータイメージングソフト (Image-J) により数値化し、GAPDH の発現レベルに対する比率を計算し、その結果を表にまとめた。

統計処理

数値は平均値±標準偏差として表記した。

得られた測定結果は、CA 群、Arg 群、IF 群および Intact 群について一元配置分散分析を行い、有意となった場合は Turkey の多重比較検定を行った。p<0.05 を有意差ありとした。

倫理的配慮

本研究は、昭和女子大学実験動物委員会の承認を得て実施された。

結果と考察

摂食量、体重変化

実験食期間を通して、全てのラットは与えた 13 g の飼料全てを摂取した。

ラットの体重は、アデニン胃内投与および卵巣摘除術により低下したが、その後は増加に転じた。

Table 2. PCR conditions

Gene	Primer sequences and thermal conditions
GAPDH	F: 5'-CCATCACCATCTTCCAGGAG-3' R: 5'-CCTGCTTCACCACCTTCTTG-3' 95°C × 1 min, 58.0°C × 30 sec, 72.0°C × 1 min, 30 cycles
ER- α	F: 5'-AATTCTGACAATCGACGCCAG-3' R: 5'-GTGCTTCAACATCTCCCTCCTC-3' 94°C × 1 min, 56°C × 1 min, 72.0°C × 1 min, 42 cycles
ER- β	F: 5'-GTCTGCTGTGATGAACTAC-3' R: 5'-CCCTCTTTGCGTTTGGACTA-3' 94°C × 1 min, 52°C × 2 min, 72.0°C × 3 min, 42 cycles
RANKL	F: 5'-CACCATCAGCTGAAGATAGT-3' R: 5'-CCAAGATCTCTAACATGACG-3' 94°C × 1 min, 55.0°C × 2 min, 72.0°C × 1 min, 42 cycles
OPG	F: 5'-TGGCACACGAGTGATGAATGCG-3' R: 5'-GCTGGAAAGTTTGCTCTTGCG-3' 94°C × 1 min, 58.2°C × 1 min, 72.0°C × 1 min, 42 cycles
IGF-1	F: 5'-TGGACGCTTTCAGTTCGTG-3' R: 5'-GTTTCCTGCACTTCTCTAC-3' 94°C × 1 min, 55.0°C × 1 min, 72.0°C × 1 min, 42 cycles
BMP-2	F: 5'-CACGAAGAAGCCATCGAGGAA-3' R: 5'-GAGACCAGCTGTGTTTCATCT-3' 94°C × 1 min, 57.8°C × 1 min, 72.0°C × 1 min, 42 cycles
Osterix	F: 5'-GTGAATTCACCTTTCAGCCCCCAAAACC-3' R: 5'-TGGGATCCCAGCTGTGAATGGCTTCTT-3' 94°C × 1 min, 62.0°C × 1 min, 72.0°C × 1 min, 42 cycles
Sema-3A	F: 5'-CTTGCATATCTGACCTATTCTAGC-3' R: 5'-TATAATCAGACTCACTTGTACGC-3' 94°C × 1 min, 55.0°C × 1 min, 72.0°C × 1 min, 42 cycles

GAPDH: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase.

ER: Estrogen receptor.

RANKL: Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand.

OPG: Osteoprotegerin.

IGF-1: Insulin-like growth factor-1.

BMP-2: Bone morphogenetic protein-2.

Sema-3A: Semaphorin-3A

Table 3. Body weights

	n	Initial	Final	Body weight gain
			g	
CA	5	191±12 ^a	262±5 ^{ab}	71±12 ^a
Arg	7	184±17 ^{ab}	265±8 ^a	81±15 ^a
IF	7	191±10 ^a	259±11 ^{ab}	68±9 ^a
Intact	6	212±5 ^b	249±5 ^b	37±8 ^b

Numbers with different superscripts indicate significant differences among the groups CA, Arg, IF and Intact at $p < 0.05$.

Table 4. Organ weights

	n	Kidney ¹	Uterus	Liver
		g/kg BW	g/kg BW	g/kg BW
CA	5	0.95±0.07 ^a	0.56±0.06 ^a	26.1±1.10 ^a
Arg	7	1.03±0.10 ^a	0.49±0.15 ^a	24.0±1.6 ^a
IF	7	0.99±0.07 ^a	0.68±0.37 ^a	24.1±1.8 ^a
Intact	6	0.86±0.04 ^a	2.53±1.15 ^b	31.4±1.5 ^b

¹: Left kidney.

Numbers with different superscripts indicate significant differences among the groups CA, Arg, IF and Intact at $p < 0.05$.

実験食投与開始時および終了時の体重を Table 3. に示した。全てのラット体重は実験食期間中増加し、平均体重増加量は CA 群, Arg 群および IF 群でそれぞれ 70.6±12.3 g, 80.9±15.5 g および 68.4±8.7 g であった。一方卵巣摘除されていない Intact 群の体重増加量は、37.0±7.9 g と低い値を示した。

臓器重量

屠殺後臓器を摘出し、その重量を Table 4. に示した。

腎臓重量は、Intact 群に比べて CA 群で有意とはならなかったが、10% 高値傾向を示し、本研究で用いたアデニン投与条件によって、腎肥大が誘導された。腎臓の肉眼所見による評価では、明らかに正常な腎臓像を示した Intact 群に比べて CA 群, Arg 群および IF 群の腎臓は色調がいずれも褐色を示し、皮質部分の肥厚が観察されるなど、明らかな異常所見が確認された。一方、CA 群と Arg 群あるいは IF 群との比較では、腎重量および肉眼所見は明らかな相違を示さなかった。

子宮重量が卵巣摘除によって著減することはよく知られている。卵巣摘除された CA 群の子宮重量は、

Intact 群の値の 1/4 以下の明らかな低値を示し、CA 群では卵巣摘除による子宮の萎縮が観察された。一方、CA 群に比べて、Arg 群および IF 群の子宮重量はいずれも有意な相違を示さず、L-アルギニンあるいは大豆イソフラボン抽出物投与による萎縮あるいは肥大は観察されなかった。

CA 群の肝臓重量は Intact 群のそれに比べて有意な低値を示したが、異常な低値とはいえ、Intact 群の平均体重が CA 群のそれよりも低かったことによるものと考えられる。CA 群に比べて Arg 群および IF 群の肝臓重量は有意差を示さなかった。

以上のように、CA 群のラットは、アデニン投与による腎臓の肥大と卵巣摘除による子宮の萎縮が観察された。

血液分析

血液分析の結果を Table 5. に示した。

血清 AST 活性は、Intact 群を含めて、いずれの群もやや高めの値を示した。しかし、CA 群, Arg 群および IF 群の値に有意差は観察されなかった。ALT 活性は全ての群において正常範囲の値を示した。

血清カルシウム濃度は、Intact 群に比べて CA

Table 5. Blood analyses

	n	AST	ALT	Calcium	Creatinine	BUN
		Karmen	Karmen	mg/100 ml	mg/100 ml	mg/100 ml
CA	5	64.8±6.4 ^a	16.6±3.0 ^a	9.2±0.4 ^a	0.77±0.09 ^a	18.7±3.4 ^a
Arg	7	73.8±25.6 ^a	17.9±8.6 ^a	9.7±0.4 ^{ab}	0.75±0.17 ^a	17.7±3.7 ^a
IF	7	72.6±22.3 ^a	16.1±7.9 ^a	9.2±0.5 ^a	0.82±0.15 ^a	18.7±3.2 ^a
Intact	6	88.2±32.3 ^a	19.3±12.4 ^a	10.3±0.8 ^b	0.65±0.07 ^a	18.6±2.6 ^a

BUN: Blood urea nitrogen.

Numbers with different superscripts indicate significant differences among the groups CA, Arg, IF and Intact at $p < 0.05$.

Table 6. Glomerular and proximal tubule injuries

	n	Proteinuria	U-creat	CCr	NAG activity	
		mg/kg BW	mg/day	ml/min	U/g Cr	mU/day
CA	5	18.9±7.2 ^a	10.21±0.50 ^a	0.924±0.101 ^a	18.9±7.8 ^{ab}	195±86 ^{ab}
Arg	7	13.4±6.0 ^{ab}	10.25±0.61 ^a	0.973±0.171 ^a	10.6±4.5 ^a	109±49 ^a
IF	7	5.8±6.7 ^b	10.21±1.17 ^a	0.879±0.146 ^a	30.7±14.9 ^b	318±179 ^b
Intact	6	18.3±10.8 ^a	9.56±0.45 ^a	1.037±0.147 ^a	24.1±18.7 ^{ab}	231±184 ^{ab}

NAG: N-acetyl D-glucosaminidase.

CCr: Creatinine clearance, calculated values from urinary creatinine excretion and serum creatinine concentration.

Numbers with different superscripts indicate significant differences among the groups CA, Arg, IF and Intact at $p < 0.05$.

群で有意な低値を示したが、低カルシウム血症と評価するほどの低値ではなかった。尿素窒素濃度は、Intact 群の値と比べて CA 群、Arg 群および IF 群のいずれも有意な相違を示さず、全ての群において正常範囲の値を示した。血液濾過機能の低下によって上昇する血清クレアチニン濃度は Intact 群の値に比べて CA 群は有意とはならなかったが 15% 高値傾向を示し、アデニン投与による腎機能障害が推定された。一方、Arg 群と IF 群の値は CA 群の値と有意な相違を示さず、これら食餌条件による腎障害抑制は観察されなかった。

腎機能及び腎障害評価指標

本研究で用いたラットの腎障害の有無およびその程度を評価するため、尿中タンパク質排泄量、近位尿細管逸脱酵素である尿中 NAG 活性および糸球体血液濾過機能評価指標であるクレアチニンクリアランス (CCr) を測定し、その結果を Table 6. に示した。

尿中タンパク質排泄量は、Intact 群を含めた全ての群で正常範囲の値を示した。

NAG 活性は、尿中クレアチニン量当たりおよび 1 日当たりのいずれにおいても、極めて大きな個体差を示し、食餌アルギニンおよび大豆イソフラボン抽出物投与のいずれの効果も確認することはできなかった。

クレアチニンクリアランスは、有意とはならなかったが Intact 群に比べて CA 群は 11% 低値傾向を示し、アデニン胃内投与による腎障害の誘導が確認された。アルギニンは、血管拡張因子である一酸化窒素 (NO) の供与体である。NO は糸球体血液動態を調節し、腎臓の血液濾過機能を高めることから、CA 群に比べて Arg 群でクレアチニンクリアランス値が高まることが予想された。しかしながら本研究では、CA 群と Arg 群との間に明らかな相違は観察されなかった。

以上の結果から本研究で用いたモデルラットは、緩やかな腎機能低下を伴う慢性腎臓病状態であると評価された。一方、腎機能および尿細管傷害に対する食餌アルギニンあるいは大豆イソフラボン抽出物の利的効果は観察されなかった。

Table 7. Femoral bone mineral density

	n	Femur weight ¹ g	Cortical-BMD mg/cm ³	Cancellous-BMD mg/cm ³	Total-BMD mg/cm ³
CA	5	0.75±0.04 ^a	794±44 ^a	363±47 ^a	471±47 ^a
Arg	7	0.74±0.03 ^a	811±71 ^a	357±39 ^a	470±22 ^a
IF	7	0.74±0.06 ^a	809±44 ^a	393±51 ^a	495±39 ^a
Intact	6	0.76±0.06 ^a	850±29 ^b	595±35 ^b	657±33 ^b

¹: Wet weight of right femur. n: Numbers of rats.
Numbers with different superscripts indicate significant differences among the groups CA, Arg, IF and Intact at p<0.05.

大腿骨骨密度

腎機能障害は、電解質異常に伴う骨吸収促進により、骨密度低下の要因となる。

本研究では屠殺後左大腿骨を切除し、大腿骨遠位端の成長線から近位端側 1.2 mm の海綿骨リッチな部位に対して、X 線 CT による骨密度の測定を行った (Table 7.)。

大腿骨遠位端における皮質骨骨密度、海綿骨骨密度および全骨密度はいずれも Intact 群に比べて CA 群の値は有意に低い値を示し、慢性腎臓病モデルラットにおいても、卵巣摘除による骨量低下が観察された。

大豆イソフラボン抽出物が閉経後ヒトおよびモデル動物の骨密度低下を抑制することは繰り返し確認されている^{3,4}。本研究では、CA 群に比べて大豆イソフラボン抽出物添加食を投与した IF 群の海綿骨骨密度および全骨密度が、有意とはならなかったがそれぞれ 8% および 5% 高値傾向を示した。一方 Arg 群のこれら骨構造パラメーターは CA 群のそれとほぼ同値を示し、明らかな相違は観察されなかった。

以上の通り、骨構造解析の結果からは食餌大豆イソフラボン抽出物およびアルギニンの有効性が示されなかった。そこで次に、左大腿骨の破断強度を測定し、結果を Table 8. に示した。

測定方法を簡単に説明すると以下ようになる。すなわち、左大腿骨長中央部から遠位端側に 10 mm および筋位端側に 10 mm の位置で大転子が下側になるように大腿骨を保持し、骨長中央部を骨が破断して折れるまで押し続け、大腿骨の破断強度を測定した。

その結果大腿骨の破断強度は、Intact 群に比べて

Table 8. Femoral breaking strength

	n	Bending strength N
CA	5	95.4±7.7 ^a
Arg	7	93.5±4.5 ^a
IF	7	96.0±11.2 ^a
Sham	6	99.3±9.8 ^a

N: Newton.
Numbers with different superscripts indicate significant differences among the groups CA, Arg, IF and Intact at p<0.05.

CA 群で 4% 低値傾向を示した以外、CA 群、Arg 群および IF 群の間ではほぼ同値を示し、大腿骨破断強度に対して、食餌アルギニンおよび大豆イソフラボン抽出物による有意な影響は観察されなかった。

骨代謝関連遺伝子発現

以上の通り本研究で用いた“閉経を迎えた慢性腎臓病モデル”では、これまでの卵巣摘除雌ラットを用いた報告と異なり、骨密度低下に対する大豆イソフラボン抽出物の有意な抑制効果が観察されなかった。この理由は不明だが、慢性腎臓病状態にある骨はイソフラボンに対する反応性が正常ラットのそれと異なるのかもしれない。

イソフラボンによる主な骨代謝調節メカニズムはエストロゲン受容体機能を介した破骨細胞の分化増殖の抑制であるが、閉経を迎えた慢性腎臓病患者の骨代謝に対する大豆イソフラボンの調節メカニズムは、十分明らかにされていない。

そこで次に、大腿骨におけるエストロゲン受容体および骨吸収および骨形成関連因子の mRNA 発現レベルを測定し、大豆イソフラボン抽出物およびア

ルギニンが閉経を迎えた慢性腎臓病発症ラットの骨代謝に対する影響を観察した。

エストロゲン受容体 mRNA 発現レベル

エストロゲンは骨に対して、破骨細胞の分化増殖を抑制して骨吸収に対して抑制的に作用する。

エストロゲン受容体の発現レベルは臓器によって多様性を示し⁵、骨の細胞には α 型 (ER- α) よりも β 型 (ER- β) が優勢に発現し、大豆イソフラボン は ER- α よりも ER- β に高い結合親和性を示す。一方食餌アルギニンと骨代謝の関係は、十分研究されていないため、ほとんど不明である。大腿骨遠位端におけるエストロゲン受容体 mRNA 発現レベルを測定し、その結果を Figure 1. に示した。

ER- α の mRNA 発現レベルは CA 群に比べて

Arg 群で有意な高値を示した。この理由は同様の実験条件での報告がほとんどないため、不明である。IF 群における ER- α の発現レベルは CA 群のそれと有意差を示さなかった。ER- β の mRNA 発現レベルは CA 群に比べて IF 群で有意に高い値を示し、閉経を迎えた慢性腎臓病モデルラットの大腿骨においても、大豆イソフラボンに対する応答性が維持されていた。一方、食餌アルギニンは ER- β の mRNA 発現レベルに対して有意な影響を示さなかった。

RANKL とオステオプロテグリン mRNA 発現レベル

破骨細胞形成必須因子である RANKL と RANKL に対する Decoy 受容体として機能する破骨細胞分化増殖抑制因子であるオステオプロテグリンの mRNA 発現レベルを測定し、その結果を Figure 2. に示し

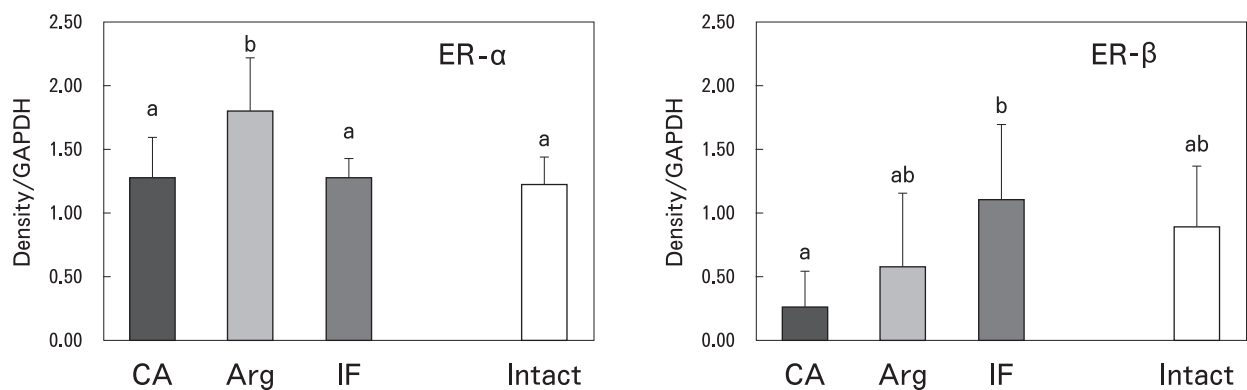


Figure 1. Effects of dietary L-Arginine and Isoflavone-extracted on ER- α and β mRNA expression levels in rat femur
Columns with different superscripts indicate significant differences among the groups CA, Arg and IF at $p < 0.05$.

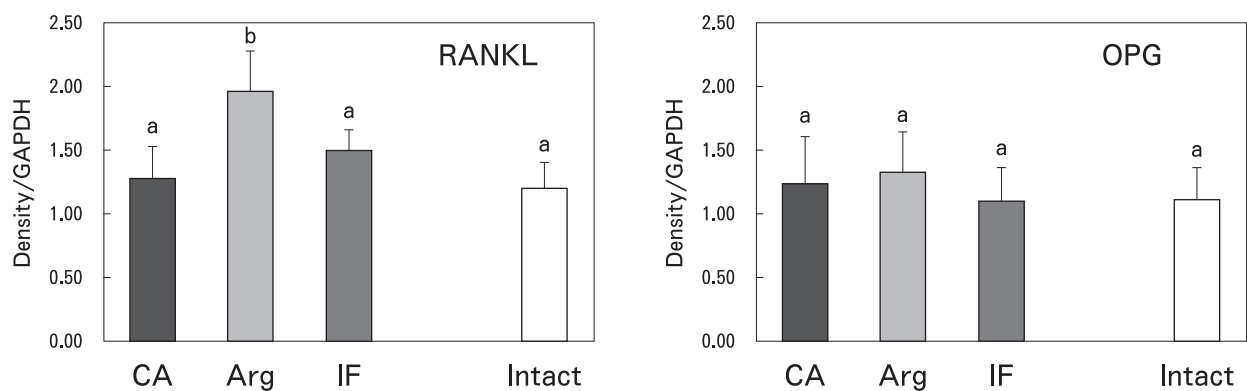


Figure 2. Effects of dietary L-Arginine and Isoflavone-extracted on RANKL and OPG mRNA expression levels in rat femur
Columns with different superscripts indicate significant differences among the groups CA, Arg and IF at $p < 0.05$.

た。RANKL の mRNA 発現レベルは CA 群, Arg 群および IF 群の間に明らかな相違を示さなかった。また, オステオプロテグリンも, CA 群, Arg 群および IF 群間で明らかな相違を示さなかった。

以上のように破骨細胞の分化・増殖に関わる代表的な調節因子は大豆イソフラボン抽出物および L-アルギニンのいずれの影響も受けず, 大豆イソフラボン抽出物の骨吸収抑制因子としての機能は本研究条件では観察されなかった。

IGF-1, BMP-2, Osterix および Semaphorin-3A mRNA 発現レベル

L-アルギニンは, 強力な成長ホルモン分泌誘導因子である。成長ホルモンは, 骨を含む多くの臓器・組織の細胞に対して成長因子として働く IGF-1 の合成を高める⁶。

BMP-2 は間葉系幹細胞から骨芽前駆細胞への分化誘導促進因子である⁷。Osterix は, BMP-2 の下流域に存在し, 骨芽前駆細胞から前骨芽細胞への分化を促進する⁸。

Semaphorin-3A は, 破骨細胞に対しては ITAM のシグナルを抑制して分化誘導を抑制し, 骨芽細胞に対しては骨芽細胞分化必須因子である古典的 Wnt- β -catenin シグナル経路を活性化して分化誘導を促進する⁹。

大腿骨遠位端における IGF-1, BMP-2, Osterix および Semaphorin-3A の mRNA 発現レベルを測定し, その結果を Figure 3. に示した。

IGF-1 の mRNA 発現レベルは CA 群に比べて Arg 群で有意な高値を示し, 食餌アルギニンが骨の細胞における IGF-1 の発現を高めることが示された。IGF-1 は, 前述の通り, 骨形成に対して促進的に作用することから, 食餌アルギニンは骨形成を促進することが推定された。

BMP-2 および Osterix の mRNA 発現レベルはいずれも, CA 群に比べて Arg 群で有意に高い値を示した。この結果から, 食餌アルギニンによって骨髄間葉系細胞から骨芽細胞への分化が促進されている可能性が示された。

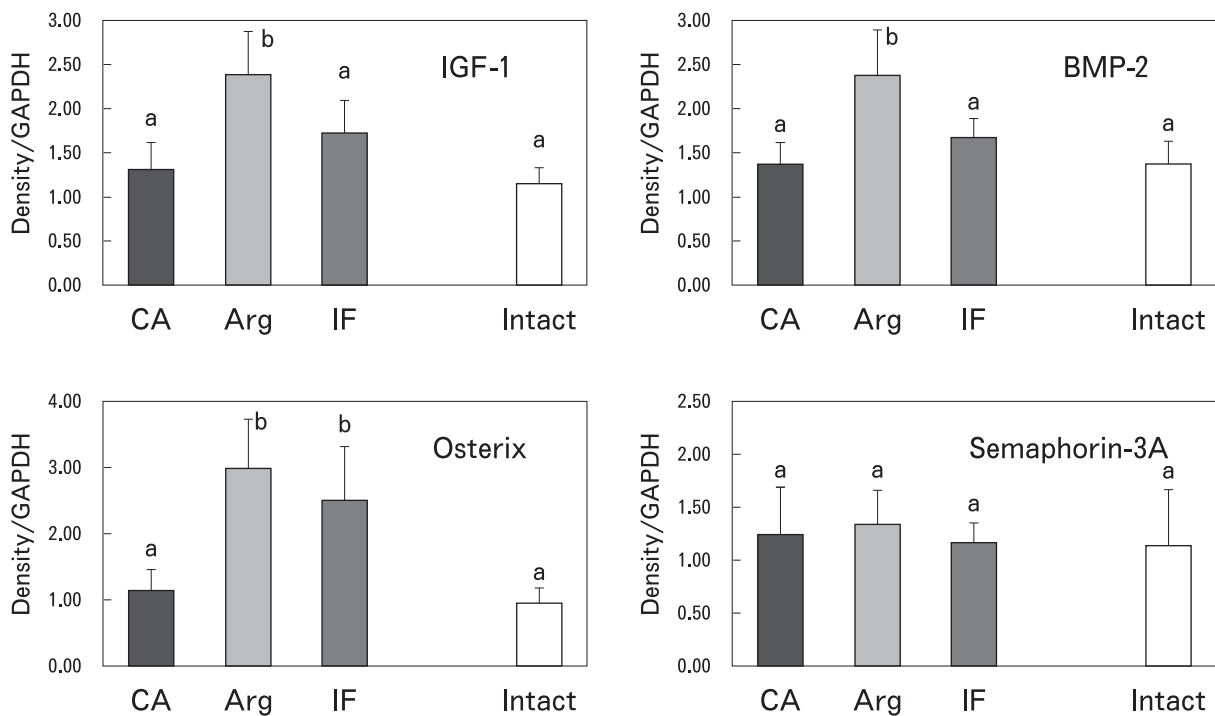


Figure 3. Effects of dietary L-Arginine and Isoflavone-extracted on IGF-1, BMP-2, Osterix and Semaphorin-3A mRNA expression levels in rat femur

Columns with different superscripts indicate significant differences among the groups CA, Arg and IF at $p < 0.05$.

Semaphorin-3A の mRNA 発現レベルは CA 群と Arg 群の間に有意な相違を示さなかった。この結果は BMP-2, Osterix における結果と一致しない。食餌アルギニンは、古典的 Wnt- β -catenin シグナル経路を活性化しないのかもしれない。

一方 IF 群におけるこれらの mRNA 発現レベルは、Osterix は有意な高値を示した以外、IGF-1, BMP-2 および Semaphorin-3A はいずれも CA 群のそれらとほぼ同レベルの値を示し、大豆イソフラボン抽出物投与は骨形成促進に対する有効性を示さなかった。

以上のように、本研究で用いたモデルラット大腿骨ではエストロゲン受容体を介した破骨細胞分化増殖因子の発現抑制が作動していないことが推定された。その一方で食餌アルギニンは、シグナル伝達経路は不明だが、骨芽細胞分化増殖因子の発現を高めて骨形成を促進できる可能性が示された。

結 論

本研究では、大腿骨骨密度に対する有意な改善は観察されなかったが、食餌アルギニンが閉経を迎えた慢性腎臓病患者の骨形成を促進できる可能性が示された。しかしその一方で、よく知られている大豆イソフラボンによる骨吸収促進遺伝子発現の抑制および骨密度低下抑制効果は観察されなかった。この理由は不明だが、卵巣摘出した閉経後モデル動物の骨代謝はエストロゲン受容体を介した骨吸収過程抑制とは異なる経路で調節されているのかもしれない。

本研究条件の様な病態モデルにおける骨密度低下を抑制するための食餌条件を明らかにするためには、ゲニステインやエクオールなどの強力なエストロゲン性を持った食品成分を活用した骨吸収の抑制を図ると共に、L-アルギニンの骨形成促進シグナル増強作用を効果的に活用するための条件検索が必要と考えられる。今後の課題である。

参考文献

1 間野琴子, 宮内智美, 春宮覚, 海老沢秀道: 慢性腎臓病モデルラットの骨密度維持に対する食餌アルギニンあるいは大豆イソフラボン抽出物投与の有効性評価に

関する基礎的研究: 学苑・生活科学紀要, 866; 47-55, 2012.

- 2 Piotr Chomczynski, Nicoletta Sacchi: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: Anal Biochem, 162; 156-159, 1987.
- 3 Kyoko Taku, Melissa K. Melby, Mindy S. Kurzer, Shoichi Mizuno, Shaw Watanabe and Yoshiko Ishimi: Effects of soy isoflavone supplements on bone turnover markers in menopausal women: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials: Bone, 47; 413-423, 2010.
- 4 Masayoshi Yamaguchi: Regulatory mechanism of food factors in bone metabolism and prevention of osteoporosis: Yakugaku Zasshi, 126; 1117-1137, 2006.
- 5 George G. J. M. Kuiper, Bo Carlsson, Kaj Grandien, Eva Enmark, Johan Häggblad, Stefan Nilsson, and Jan-Åke Gustafsson: Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors α and β : Endocrinology, 138; 863-870, 1997.
- 6 Jianfeng Chen, Kaiyu Yuan, Xia Mao, Joseph M. Miano, Hui Wu, and Yabing Chen: Serum response factor regulates bone formation via IGF-1 and Runx 2 signals: Bone Miner Res, 27; 1659-1668, 2012.
- 7 Maureen Beederman, Joseph D. Lamplot, Guoxin Nan et al.: BMP signaling in mesenchymal stem cell differentiation and bone formation: J Biomed Sci and Engineering, 6; 32-52, 2013.
- 8 Toshihisa Komori: Regulation of osteoblast differentiation by transcription factors: J Cell Biochem, 99; 1233-1239, 2006.
- 9 Mikihito Hayashi, Tomoki Nakashima, Masahiko Taniguchi, Tatsuhiko Kodama, Atsushi Kumanogoh and Hiroshi Takayanagi: Osteoprotection by semaphorin 3A: Nature, 485, 69-74, 2012.

(えびさわ ひでみち 管理栄養学科)

(いわたに みさき 平成 27 年度管理栄養学科卒業生)

(おにくぼ まい 平成 27 年度管理栄養学科卒業生)

(たきやま かほ 平成 27 年度管理栄養学科卒業生)

(たけもと あゆみ 平成 27 年度管理栄養学科卒業生)

(まつもと みずほ 平成 27 年度管理栄養学科卒業生)

(しみず ふみこ 管理栄養学科)