

納豆に含まれる生理活性物質による 骨老化制御機構の解明

城西大学 薬学部 医療栄養学科
君羅 好史

加齢に伴う骨形成の低下は骨粗鬆症などの疾患や寝たきりの原因となり⁽¹⁾、著しいQOLの低下を招く。人生100年時代を迎え、年齢を重ねてもなお健康で活躍するための健康寿命伸長技術が求められている。近年、加齢による細胞内ポリアミンの減少が細胞老化と強く関連することが指摘されている⁽²⁾。ポリアミンは正常な細胞機能に必須の因子である⁽³⁾。細胞内ポリアミン量の変化は、骨組織構成細胞の老化とも関連していることが考えられる。食品由来ポリアミンの摂取に加え、ポリアミン代謝を調節する食品機能性成分が骨芽細胞を活性化し、骨の老化を予防できると考えられる。納豆は納豆菌による発酵過程においてポリアミンの一種スペルミジンの含量が増大する。また納豆に含有される大豆イソフラボンはポリアミンの代謝を調節する作用を持つことから、骨の老化を予防する機能性食品となる可能性を有する。しかし今までに納豆に含有されるポリアミンと大豆イソフラボンの併用による骨老化制御機構は明らかとなっていない。本研究では「 納豆に含まれる生理活性物質の骨老化制御メカニズムを明らかにすること 」を目的とする。納豆に含まれる生理活性物質として、ポリアミン類はスペルミジン、イソフラボン類ではダイゼインに注目する。培養骨芽細胞を用い、ポリアミン生合成酵素阻害剤DFMOにより細胞内ポリアミン量を低下させ、低ポリアミン状態を再現する系に対し、ダイゼインならびにスペルミジンを作用させ、骨芽細胞分化マーカーおよび骨芽細胞分化関連遺伝子の発現を評価することで骨老化制御メカニズムを明らかにする。

【実験方法】

1. 細胞培養条件および試薬

MC3T3-E1 細胞は 10%FBS (Sigma) を含む α MEM 培地 (Gibco) を用いて、5% CO₂、37°Cの湿潤インキュベーター内で培養を行なった。ダイゼインは sigma、スペルミジンはナカライトスクより購入した。ポリアミン生合成阻害剤 DFMO は、植村武史准教授（城西大学）より供与いただき使用した。

2. 細胞増殖

MC3T3-E1 細胞を 96 ウェルプレートの各ウェルに 3.0×10^3 の密度で播種し、24時間培養したのち、DFMO を 0.001~1mM の濃度で添加し 3 日間培養した。細胞増殖は、WST-1 法 (Cell Counting Kit; 同仁堂研究所) を用いて評価した。

3. 骨芽細胞分化活性評価

骨芽細胞の分化指標として、アルカリフосфатаз (ALP) 染色を用いて評価した。細胞を 96 ウェルプレートの各ウェルに 3.0×10^3 の密度で播種し、3 日間培養した。その後 DFMO (0.001~1mM)、ダイゼイン ($0.1 \mu M$)、スペルミジン (0.1mM) を添加しさらに 4 日間培養した。培養後、細胞を 20%ホルマリンで 20 分間固定し、10 mM ナフトール AS-BI リン酸塩および 1 mM ファストレッドバイオレット LB 塩を含む 0.05

mol/12-アミノ-2-メチル-1-プロパノール (AMP) バッファー (pH 9.8) 中で 37°C で 30 分間インキュベートした。染色液を吸引し、細胞を脱イオン水で洗浄した。ALP で染色した領域をイメージスキャナーでスキャンし、ImageJ ソフトウェアを用いて定量的に解析した。

4. 骨芽細胞分化関連遺伝子発現解析

細胞を 60mm ディッシュに 3.0×10^4 の密度で播種し、3 日間培養した。その後 DFMO (0.01mM)、ダイゼイン ($0.1 \mu M$)、スペルミジン (0.1mM) を添加しさらに 2 日間培養した。RNeasy Mini Kit (キアゲン) を用いて MC3T3-E1 細胞から totalRNA を抽出し、Prime Script Reagent Kit (タカラバイオ) を用いて 5 mg の mRNA から cDNA を合成した。qPCR は TB Green® Fast qPCR Mix (タカラバイオ) を用いて行った。標的遺伝子の発現を標準化するための内部コントロールとして、Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を用いた。

5. ルシフェラーゼレポータープラスミドの構築

マウス ALP プロモーター領域は、マウス骨芽細胞株 MC3T3-E1 から抽出したゲノム DNA を用いて PCR を用いて增幅し、XhoI 消化した pGL4 ベクターにサブクローニングした。サブクローニングされたベクターの配列はシークエンシングにより確認した。

6. ルシフェラーゼレポーターассеイ

MC3T3-E1 細胞を 96 ウェルプレートで 24 時間培養した。マウス ALP プロモーターを含む pGL4-プラスミド 100 ng と pNL (Promega) 1 ng を、Lipofectamine 2000 を用いて、製造元の指示 (Thermo Fisher Scientific) に従ってトランスフェクションした。細胞を 48 時間インキュベートした後、トランスフェクション試薬を除去し、分析のために DFMO (0.01mM)、ダイゼイン ($0.1 \mu M$)、スペルミジン (0.1mM) を添加し、さらに 48 時間培養した。ルシフェラーゼアッセイは Dual-Glo Luciferase Assay System (Promega) を用いて行った。各ファクター処理終了後、 $80 \mu l$ の Dual-Glo 試薬を各ウェルに添加し、サンプルを室温で 10 分間インキュベートした。ホタルルシフェラーゼの発光は、Glo-Max Discover Microplate Reader を用い、積分時間 1 秒で記録した。その後、 80 マイクロリットルの Dual-Glo Stop & Glo 試薬を各ウェルに加え、室温で 5 分間インキュベートした後、NanoLuc 発光を記録した。ホタル:NanoLuc 発光比を計算し、ALP プロモーター活性を測定した。

【実験結果および考察】

1. MC3T3-E1 細胞の増殖および分化に対する DFMO 添加の影響

MC3T3-E1 細胞を用いて、細胞増殖に対する DFMO の影響を調べたところ、0.01mM 以下の濃度では細胞増殖に影響を与えたかったが、0.1mM 以上の濃度の DFMO 添加により細胞増殖が有意に低下した（図 1）。また、骨芽細胞の分化指標である ALP 活性を評価したところ、DFMO は 0.01mM 以上の濃度で ALP 染色面積が有意に低下した（図 2）。さらに骨芽細胞分化に関連する遺伝子群について DFMO 添加の影響を評価したところ、骨芽細胞分化のマスター調節因子である Runx2 の mRNA 発現量については、DFMO 添加は影響を与えたかった。一方で ALP の mRNA 発現量は、ALP 活性測定時と同様に 0.01mM 以上の濃度で有意に低下していた（図 3）。これらの結果から、MC3T3-E1 細胞に対して、DFMO の添加は、0.01mM の濃度で添加、細胞増殖に影響を与えることなく、骨芽細胞分化抑制作用を有する濃度として考えられることから、以降の実験には DFMO については 0.01mM の濃度で用いることとした。

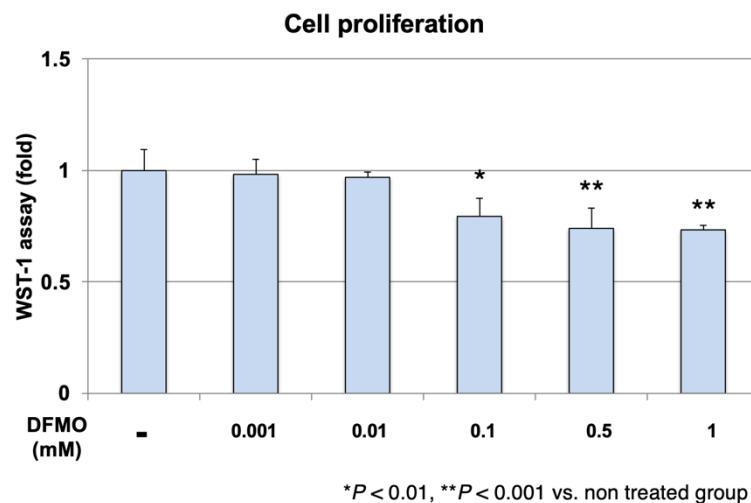


図 1 MC3T3-E1 細胞の増殖に対する DFMO 添加の影響

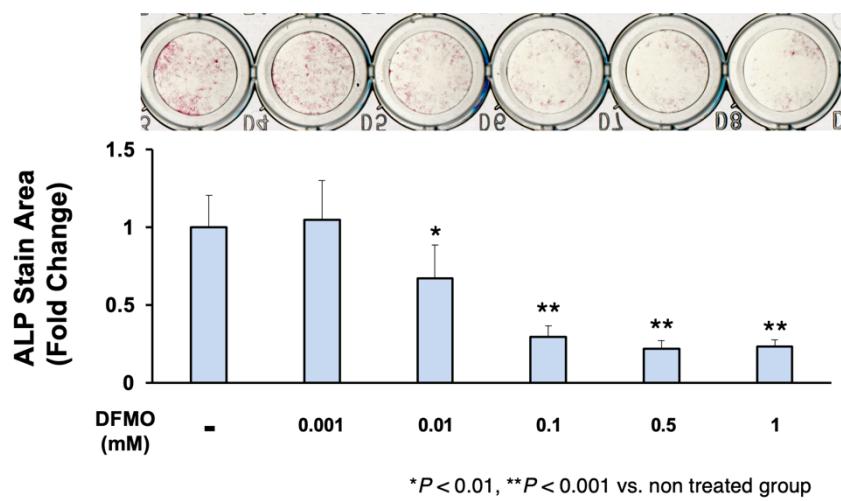


図 2 MC3T3-E1 細胞の ALP 活性に対する DFMO 添加の影響

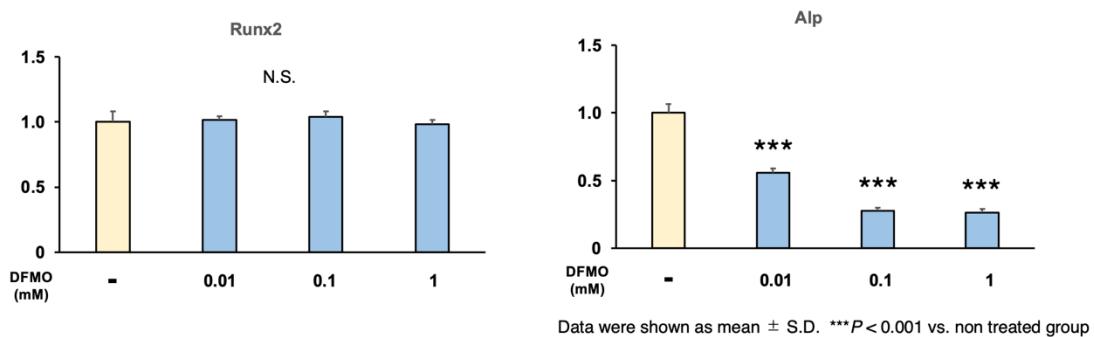


図3 DFMO 添加が骨芽細胞分化関連遺伝子に与える影響

2. MC3T3-E1 細胞の分化に対するダイゼインおよびスペルミジン添加の影響

次に、DFMO 添加による ALP 活性低下に対するダイゼインおよびスペルミジンの影響について検討した。DFMO 非添加時では、ダイゼインとスペルミジンの添加はともに ALP 染色面積をコントロールと比較して有意に上昇させた。さらにダイゼインとスペルミジンを同時に添加すると、ALP 染色面積はダイゼイン、スペルミジンの単独添加に比べてさらに増加した。DFMO 添加時では、スペルミジンの添加によって ALP 染色面積の低下を有意に抑制した。一方でダイゼインの単独添加では、DFMO 群と比較して有意な差は見られなかった。ダイゼインとスペルミジンの共添加では、ALP 染色面積のさらなる増加が確認された(図4)。これらのことから、DFMO により細胞内ポリアミン量低下を誘導した骨芽細胞においては、ダイゼインとスペルミジンの同時添加が最も ALP 活性を増加させる可能性が示された。

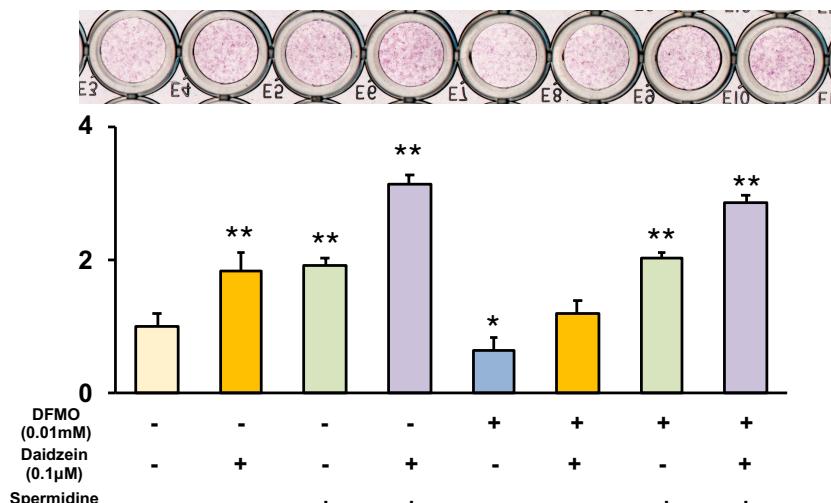


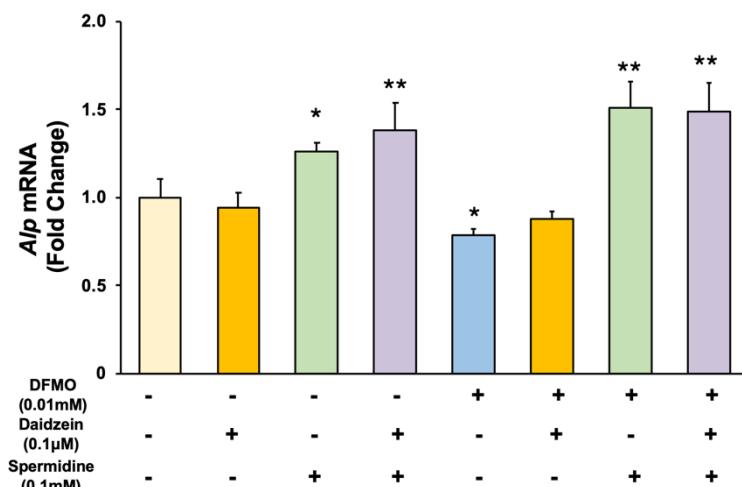
図4 MC3T3-E1 細胞の ALP 活性に対するダイゼインおよびスペルミジン添加の影響

3. MC3T3-E1 細胞の ALP 遺伝子発現に対するダイゼインおよびスペルミジン添加の影響

次に、DFMO 添加によって低下する ALPmRNA 発現量に対するダイゼインおよびスペルミジンの影響について検討した。DFMO 非添加群では、スペルミジンの添加によって ALPmRNA 発現量が有意に上昇した。さらにダイゼインとスペルミジンを同時添加した場合においても ALPmRNA 発現量が有意に上昇した。0.01mM の DFMO 添加により低下した ALPmRNA 発現量に対して、スペルミジン添加により、その低下を有意に抑制した。ダイゼインとスペルミジンの共添加は、スペルミジンの単独添加と同様に ALPmRNA 発現量の低下を顕著に抑制していた（図 5）。

次に、ALP プロモーター領域におけるダイゼインおよびスペルミジンの転写調節活性について検討した。マウス ALP プロモーター領域を含む pGL4-プラスミドをトランسفエクションした MC3T3-E1 細胞に DFMO を添加することで、ルシフェラーゼ活性の有意な低下がみられた。これに対し、ダイゼインおよびスペルミジンの添加は、コントロールと同等レベルまでルシフェラーゼ活性を上昇させた。さらにダイゼインとスペルミジンの同時添加では、コントロールと比較して有意なルシフェラーゼ活性の上昇がみられた（図 6）。これらの結果からダイゼインとスペルミジンによる ALPmRNA 発現量への影響は、ALP プロモーター領域への作用による転写調節機構を有することによるものと推察できた。

以上の結果より、ポリアミンの低下による骨芽細胞分化抑制に対し、スペルミジンおよびダイゼインは、ALP 転写活性調節によって骨芽細胞分化を促し、骨老化制御に役立つ可能性を有することが示唆された。



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. non treated group

図 5 MC3T3-E1 細胞の ALPmRNA 発現量に対するダイゼインおよびスペルミジン添加の影響

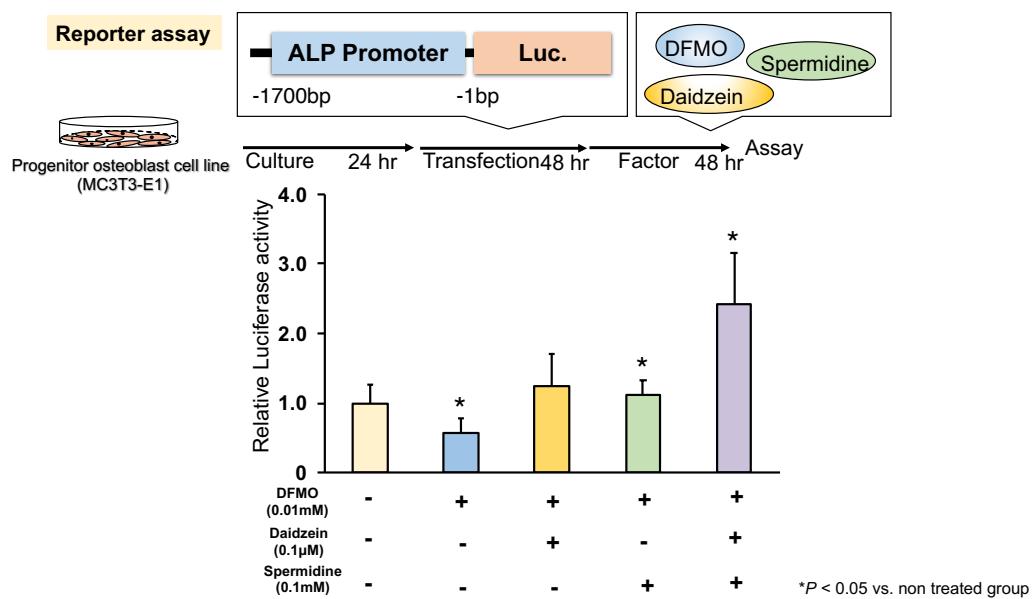


図 6 MC3T3-E1 細胞の ALP プロモーター活性に対するダイゼインおよびスペルミジン添加の影響

【要約】

ポリアミン生合成阻害剤である DFMO 存在下でマウス骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 細胞を培養すると、細胞内ポリアミン量が低下し、骨芽細胞の分化指標である ALP 活性が顕著に低下した。DFMO による骨芽細胞分化抑制作用に対するスペルミジンおよびダイゼインの添加は ALP 活性を亢進させた。ALP の mRNA 発現量をリアルタイム定量 PCR 法にて解析したところ、DFMO 添加によって骨芽細胞分化のマスター転写調節因子である Runx2 の mRNA 発現量に影響を与えることなく、ALP の mRNA 発現量が顕著に低下した。スペルミジンの添加は DFMO による ALP 活性ならびに ALPmRNA 発現量の低下を抑制した。ダイゼインとスペルミジンの同時添加では、さらに ALP 活性ならびに ALPmRNA 発現量を増加させた。これらダイゼインとスペルミジンによる ALPmRNA 発現量への影響は ALP プロモーター領域への作用による転写調節機構を有することによるものと推測できた。以上の結果より、ポリアミンの低下による骨芽細胞分化抑制に対し、スペルミジンおよびダイゼインは、ALP 転写活性調節によって骨芽細胞分化を促し、骨老化制御に役立つ可能性を有することが推察された。

【謝辞】

本研究を遂行するにあたり、研究助成を賜りました公益財団法人タカノ農芸化学研究助成財団に深く感謝申し上げます。

【参考文献】

- (1) Yu, B., & Wang, C. (2016). Osteoporosis: The Result of an 'Aged' Bone Microenvironment. *Trends in molecular medicine*, 22 8, 641-644.
- (2) Soda, K., Dobashi, Y., Kano, Y., Tsujinaka, S., & Konishi, F. (2009). Polyamine-rich food decreases age-associated pathology and mortality in aged mice. *Experimental Gerontology*, 44, 727-732.
- (3) Igarashi, K., & Kashiwagi, K. (2010). Modulation of cellular function by polyamines. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 42 1, 39-51 .