

## トピックス

## $\alpha$ -ケトグルタル酸は加齢による骨粗鬆症を防ぐ Alpha-ketoglutarate prevents age-related osteoporosis

骨粗鬆症は骨量低下と骨組織の構造異常により骨折の危険性が増大する疾患である<sup>1)</sup>。我が国における大腿骨頸部の骨粗鬆症有病率は、80歳以降の男性では10%程度であるのに対して女性では60%以上もある<sup>2)</sup>。同様にC57BL6Jマウスでもこの傾向は共通し、6月齢の雌マウス大腿骨の骨梁量は2月齢に比べて70%（雄は25～35%）ほど少ない<sup>3)</sup>。既存の骨粗鬆症治療薬であるビスホスホネート製剤<sup>4)</sup>、組換えヒト副甲状腺ホルモン<sup>5)</sup>などは、有効性や副作用に未だ課題も残る。

近年、エネルギー(ATP)産生に重要なTCA回路の中間体である $\alpha$ -ケトグルタル酸(alpha-ketoglutarate,  $\alpha$ KG)が胚性幹細胞の多分化能性維持やヒト多能性幹細胞の分化促進、そして線虫の寿命やマウスの健康寿

命の延伸に寄与することが報告され注目されている(図1)<sup>6-8)</sup>。昨年、Wangら<sup>9)</sup>はマウスに $\alpha$ KGを投与することにより老齡マウスの骨粗鬆症リスクを抑え、また老齡由来骨髄由来間葉系幹細胞の生理機能および骨分化能を回復させることを報告した。本稿では、Wangらの研究報告を概説する。

ヒトとマウスの血漿 $\alpha$ KG濃度は加齢により低下する<sup>10)11)</sup>。実際に19月齢のC57BL6Jマウスの血漿 $\alpha$ KG濃度は、3月齢の半分以下であった。そこで18月齢マウスに0.25、0.75%の $\alpha$ KG含有飲料水を1か月間与えて飼育した。すると血漿 $\alpha$ KG濃度は3月齢と同程度にまで回復した。また、19月齢マウスでの第4腰椎の骨体積、骨梁数、骨梁幅は3月齢マウスに比べて低く、

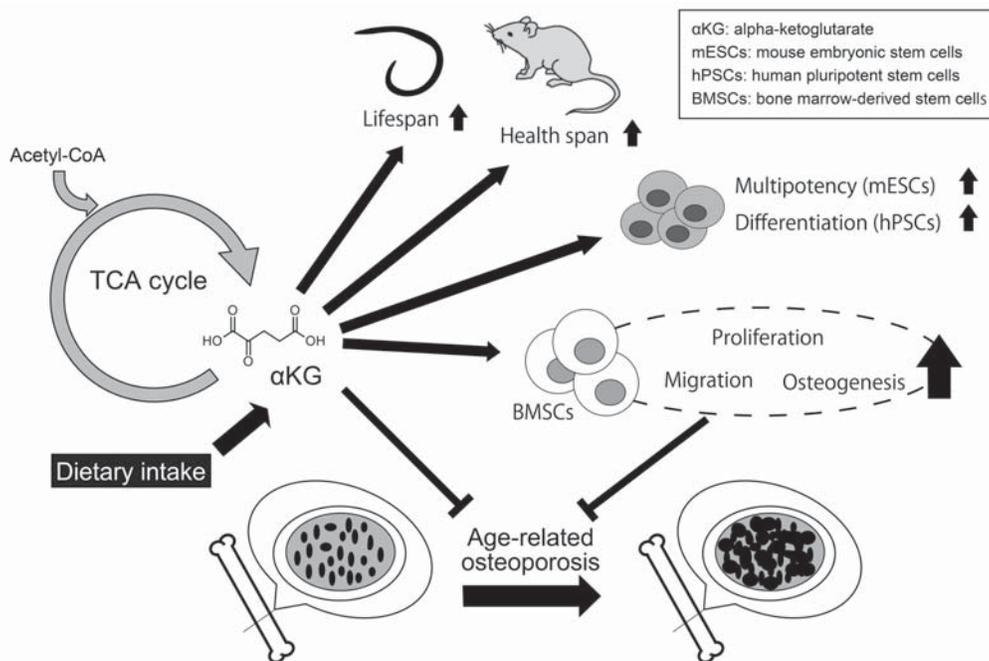


図1  $\alpha$ KGの生体への有用性

TCA回路の中間体である $\alpha$ -ケトグルタル酸( $\alpha$ KG)は、胚性幹細胞の多分化能性維持やヒト多能性幹細胞の分化促進、そして線虫の寿命やマウスの健康寿命の延伸に寄与することが報告されている<sup>6-9)</sup>。

骨梁間隔が大きい。そして、同様に  $\alpha$ KG 含有飲料水で飼育すると3月齢と同程度にまで回復した。次に、骨石灰化を評価するため、リン酸カルシウム塩と炭酸カルシウム塩を検出する Von Kossa 染色、破骨細胞数を評価するため、酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼを検出する Tartrate-Resistant Acid Phosphatase (TRAP) 染色を第4腰椎の断面で行った。すると19月齢マウスでは単位骨梁周囲長あたりの骨芽細胞数および破骨細胞、石灰化速度、骨形成速度が3月齢マウスの半分程度に低下していたが、 $\alpha$ KG 含有飲料水の摂取により回復した。さらに0.75%  $\alpha$ KG 含有、または不含飲料水(対照群)で1か月間飼育した老齢の雌マウスから間葉系幹細胞を単離し、骨形成誘導培地で培養後にアルカリフォスファターゼ染色、およびアリザリンレッドS染色を行い、骨形成能を評価した。0.75%  $\alpha$ KG 含有培地で培養した場合、対照群に比べてカルシウム沈着量が多く、骨形成に関わる *Runx2*, *Alp*, *Bglap* の遺伝子発現が高かった。しかし、アルカリフォスファターゼ活性や骨形成に関わる *Sp7*, *Colla1* の遺伝子発現に差はみられなかった。

C57BL6J マウスの骨梁体積は、性成熟が完了する2月齢でピークを迎える<sup>3)</sup>。Wang らは、 $\alpha$ KG が加齢による骨量減少を抑えると考え、C57BL6J 雌マウスを2月齢から  $\alpha$ KG 含有、または不含飲料水(対照群)で飼育した。すると対照群に比べて  $\alpha$ KG 含有飲料水で飼育した4月齢および6月齢マウスの大腿骨は、加齢による骨体積、骨梁数の減少が抑制され、骨梁間隔の増加も抑制された。一方、骨梁幅は対照群と変わらなかった。また、大腿骨の単位骨梁周囲長あたりの骨芽細胞数および破骨細胞数は、加齢により減少した。しかし、 $\alpha$ KG 含有飲料水の摂取により4月齢および6月齢マウスでは2月齢マウスよりも単位骨梁周囲長あたりの骨芽細胞数および破骨細胞数が増加した。また、頸椎、腰椎でも  $\alpha$ KG 摂取による同様の効果が確認された。

骨折後の回復速度は加齢に伴い遅くなる<sup>12)</sup>。Wang らは骨折後の回復速度を  $\alpha$ KG 摂取が高めるかを検証するため、24~26月齢の Sprague Dawley ラットに0.75%  $\alpha$ KG 含有、または不含飲料水(対照群)を与えて飼育し、2週間後に大腿骨をドリルで損傷させた。 $\alpha$ KG 含有飲料水で飼育したラットの術後2週間目での大腿骨の骨密度、骨量、単位骨梁周囲長あたりの骨芽細胞数および破骨細胞数は対照群に比べて多かった。これは、 $\alpha$ KG 摂取が骨折後の回復速度を高めたことを示している。

老齢由来間葉系幹細胞は増殖能、コロニー形成能、遊走能、骨分化能が低下している<sup>13)</sup>。Wang らは、老

齢由来間葉系幹細胞での  $\alpha$ KG の効果を評価するため、3月齢および18月齢マウスの脛骨と大腿骨から骨髓由来間葉系幹細胞を単離した。18月齢マウスの骨髓由来間葉系幹細胞内の  $\alpha$ KG 濃度は、3月齢に比べて低かった。そして、2mM の  $\alpha$ KG 含有培地で培養すると18月齢マウスの骨髓由来間葉系幹細胞の細胞内  $\alpha$ KG 濃度、5-エチニル-2'-デオキシウリジン(EdU)の取り込み、コロニー形成数、遊走能、細胞数、アルカリフォスファターゼ活性、カルシウム沈着量は増加した。また、*Runx2*, *Sp7*, *Colla1*, *Alp* の遺伝子発現は対照群に比べて高かった。これは、 $\alpha$ KG が骨髓由来間葉系幹細胞の老化により低下した増殖能、コロニー形成能、遊走能、骨分化能を高めたことを示している。

次に、細胞老化を誘導した骨髓由来間葉系幹細胞を用いて  $\alpha$ KG の効果を検討した。2mM  $\alpha$ KG 含有培地で培養した18月齢マウスの骨髓由来間葉系幹細胞の分裂回数は対照群に比べて多く、継代可能な回数も増加した。また、細胞老化で遺伝子発現が高くなることが知られる *p16*, *p21*, *p53*, *Il6* の遺伝子発現は対照群より低かった。さらにDNA傷害の指標である  $\gamma$ H2A-X の蛍光免疫染色、および細胞老化の指標として用いられる SA- $\beta$ -Gal 染色も対照群に比べて陽性細胞数が少なかった。また、過酸化水素水により細胞老化を誘導した骨髓由来間葉系幹細胞の SA- $\beta$ -Gal 陽性細胞数は、 $\alpha$ KG 添加により減少した。これらの結果は、骨髓由来間葉系幹細胞の細胞老化を  $\alpha$ KG が改善することを示している。

骨髓由来間葉系幹細胞では、加齢により骨形成や幹細胞性に関わる遺伝子発現を制御するヒストン修飾が変化する<sup>14)</sup>。Wang らは  $\alpha$ KG が骨髓由来間葉系幹細胞でのヒストン修飾に及ぼす影響を調べた。18月齢マウス骨髓由来間葉系幹細胞での遺伝子発現抑制に寄与するヒストン修飾である H3K9me3(ヒストン H3 の9番目リジンのトリメチル化)と H3K27me3 の総量は、 $\alpha$ KG 添加により減少した。一方、遺伝子発現の亢進に寄与するヒストン修飾である H3K9ac(ヒストン H3 の9番目リジンのアセチル化)と H3K27ac の総量に変化はみられなかった。また、老齢マウスの腰椎切片を用いて間葉系幹細胞マーカーである LepR と H3K9me3 または H3K27me3 を二重蛍光免疫染色したところ、LepR 陽性細胞あたり H3K9me3 または H3K27me3 陽性細胞の占める割合は、 $\alpha$ KG 含有飲料水を1か月摂取することにより減少した。これらの結果は、 $\alpha$ KG がヒストン H3 のメチル化を減らすことにより骨髓由来間葉系幹細胞の遺伝子発現に影響する可能性を示唆している。

最後に, Wangらは $\alpha$ KGが骨髄由来間葉系幹細胞の遺伝子発現に及ぼす影響をRNA-seqを用いて網羅的に調べた. すると,  $\alpha$ KG添加により発現が亢進した遺伝子の中に骨形成に関わる2つの遺伝子群が多く含まれていた. そのうち骨分化に重要な遺伝子である *Bmp2*, *Bmp4*, および幹細胞の未分化性維持に重要な遺伝子である *Nanog* について, そのプロモーター領域のヒストン修飾をクロマチン免疫沈降法により調べた. すると $\alpha$ KG添加により, *Bmp2*, *Nanog* プロモーター領域のH3K9me3, 及び *Bmp2*, *Bmp4*, *Nanog* プロモーター領域のH3K27me3が減少していた. また, ヒストン脱メチル化酵素阻害剤のJIB 04を共存培養すると遺伝子発現の亢進が抑制された. さらに $\alpha$ KG添加によるH3K9me3およびH3K27me3の減少も抑制された. ヒストン脱メチル化酵素であるJMJCファミリーの活性化には, 補酵素として $\alpha$ KGが必要である<sup>15)</sup>. しかし, ヒストンメチル基転移酵素およびヒストン脱メチル化酵素の遺伝子発現は $\alpha$ KGの有無で変化しなかった. これらの結果は $\alpha$ KGが補酵素としてヒストン脱メチル化酵素を活性化し, *Bmp2*, *Bmp4*, *Nanog* の遺伝子プロモーター領域のH3K9me3およびH3K27me3を減らすことを示している.

Wangらは, 高齢マウスに $\alpha$ KGを与えて骨量の増加を確認した. また,  $\alpha$ KG投与は高齢マウスの低下した骨髄由来間葉系幹細胞の増殖能, 遊走能, 骨分化能を向上させた. そして, その作用メカニズムは $\alpha$ KGによる*Bmp2*, *Bmp4*, *Nanog* の遺伝子プロモーター領域のH3K9me3, H3K27me3の減少であることを示した. エネルギー産生に重要なTCA回路の中間体である $\alpha$ KGは, 他の骨粗鬆症治療薬に比べて摂取時のアレルギー反応が生ずる危険性は極めて少ない. 今後, ヒトで $\alpha$ KGの長期, または多量に摂取した際の影響を十分に検討する必要があるが, 安全な骨粗鬆症治療薬としての活用が期待できる. 高齢者が骨折により, 寝たきりの生活を余儀なくされる事態を回避できるかもしれない. また,  $\alpha$ KGは骨粗鬆症以外にもマウスの健康寿命を延伸する効果が報告されている(図1)<sup>8)</sup>. 今後,  $\alpha$ KG含有製品が市販され, 日常的に多くの人々が気軽に $\alpha$ KGを摂取できるようになればヒトの健康寿命も延伸できるかもしれない.

**Key words** :Aging, Alpha-ketoglutarate, Histone modification, Osteoporosis

<sup>1)</sup>Molecular Regulation of Aging, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology

<sup>2)</sup>Department of Biological Science, Tokyo Metropolitan University

Yuta Doshida<sup>1,2</sup>, Akihito Ishigami<sup>1,2</sup>

<sup>1)</sup> 東京都健康長寿医療センター研究所 分子老化制御

<sup>2)</sup> 東京都立大学 理学研究科 生命科学専攻

土志田 裕太<sup>1,2</sup>, 石神 昭人<sup>1,2</sup>

利益相反自己申告: 申告すべきものなし

(2021.2.5 受付)

## 文 献

- 1) World Health O. (1994) Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis : report of a WHO study group [meeting held in Rome from 22 to 25 June 1992] World Health Organization
- 2) Yoshimura N, Muraki S, Oka H, Mabuchi A, En-Yo Y, Yoshida M, Saika A, Yoshida H, Suzuki T, Yamamoto S, Ishibashi H, Kawaguchi H, Nakamura K, Akune T (2009) Prevalence of knee osteoarthritis, lumbar spondylosis, and osteoporosis in Japanese men and women: the research on osteoarthritis/osteoporosis against disability study. *J Bone Miner Metab* **27**, 620-628
- 3) Glatt V, Canalis E, Stadmeier L, Bouxsein ML (2007) Age-related changes in trabecular architecture differ in female and male C57BL/6J mice. *J Bone Miner Res* **22**, 1197-1207
- 4) Maraka S, Kennel KA (2015) Bisphosphonates for the prevention and treatment of osteoporosis. *BMJ: British Medical Journal* **351**, h3783
- 5) Barrett-Connor E, Stuenkel CA (2001) Hormone replacement therapy (HRT)—risks and benefits. *International Journal of Epidemiology* **30**, 423-426
- 6) TeSlaa T, Chaikovskiy Andrea C, Lipchina I, Escobar Sandra L, Hochedlinger K, Huang J, Graeber Thomas G, Braas D, Teitell Michael A (2016)  $\alpha$ -Ketoglutarate Accelerates the Initial Differentiation of Primed Human Pluripotent Stem Cells. *Cell Metabolism* **24**, 485-493
- 7) Chin RM, Fu X, Pai MY, Vergnes L, Hwang H, Deng G, Diep S, Lomenick B, Meli VS, Monsalve GC, Hu E, Whelan SA, Wang JX, Jung G, Solis GM, Fazlollahi F, Kaweteerawat C, Quach A, Nili M, Krall AS, Godwin HA, Chang HR, Faull KF, Guo F, Jiang M, Trauger SA, Saghatelian A, Braas D, Christofk HR, Clarke CF, Teitell MA, Petrascheck M, Reue K, Jung ME, Frand AR, Huang J (2014) The metabolite  $\alpha$ -ketoglutarate extends lifespan by inhibiting ATP synthase and TOR. *Nature* **510**, 397-401
- 8) Asadi Shahmirzadi A, Edgar D, Liao C-Y, Hsu Y-M, Lucanic M, Asadi Shahmirzadi A, Wiley CD, Gan G, Kim DE, Kasler HG, Kuehnemann C, Kaplowitz B, Bhaumik D, Riley RR, Kennedy BK, Lithgow GJ (2020) Alpha-Ketoglutarate, an Endogenous Me-

- tabolite, Extends Lifespan and Compresses Morbidity in Aging Mice. *Cell Metabolism* **32**, 447-456.e446
- 9) Wang Y, Deng P, Liu Y, Wu Y, Chen Y, Guo Y, Zhang S, Zheng X, Zhou L, Liu W, Li Q, Lin W, Qi X, Ou G, Wang C, Yuan Q (2020) Alpha-ketoglutarate ameliorates age-related osteoporosis via regulating histone methylations. *Nature Communications* **11**, 5596
- 10) Harrison AP, Pierzynowski SG (2008) Biological effects of 2-oxoglutarate with particular emphasis on the regulation of protein, mineral and lipid absorption/metabolism, muscle performance, kidney function, bone formation and cancerogenesis, all viewed from a healthy ageing perspective state of the art--review article. *J Physiol Pharmacol* **59 Suppl 1**, 91-106
- 11) Tian Q, Zhao J, Yang Q, Wang B, Deavila JM, Zhu M-J, Du M (2020) Dietary alpha-ketoglutarate promotes beige adipogenesis and prevents obesity in middle-aged mice. *Aging Cell* **19**, e13059
- 12) Liu W, Zhou L, Zhou C, Zhang S, Jing J, Xie L, Sun N, Duan X, Jing W, Liang X, Zhao H, Ye L, Chen Q, Yuan Q (2016) GDF11 decreases bone mass by stimulating osteoclastogenesis and inhibiting osteoblast differentiation. *Nature Communications* **7**, 12794
- 13) Bellantuono I, Aldahmash A, Kassem M (2009) Aging of marrow stromal (skeletal) stem cells and their contribution to age-related bone loss. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* **1792**, 364-370
- 14) Wu H, Gordon JAR, Whitfield TW, Tai PWL, van Wijnen AJ, Stein JL, Stein GS, Lian JB (2017) Chromatin dynamics regulate mesenchymal stem cell lineage specification and differentiation to osteogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* **1860**, 438-449
- 15) Alves J, Vidugiris G, Goueli SA, Zegzouti H (2018) Bioluminescent High-Throughput Succinate Detection Method for Monitoring the Activity of JMJC Histone Demethylases and Fe(II)/2-Oxoglutarate-Dependent Dioxygenases. *SLAS Discov* **23**, 242-254