

平成 30 年 5 月 18 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K01705

研究課題名(和文)新規2型糖尿病骨代謝モデルによる糖尿病骨代謝機構解析と運動による改善法の提案

研究課題名(英文) Analysis of bone metabolism under hyperglycemia using unique type 2 diabetes model and proposal of improvement method for bone metabolism in type 2 diabetes by exercise.

研究代表者

北村 敬一郎 (KITAMURA, Kei-ichiro)

金沢大学・保健学系・教授

研究者番号：80283117

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質主体の魚類がでんぷん給餌で高血糖が続く特徴を利用し、高でんぷん食で長時間高血糖が続く新規2型糖尿病キンギョモデルを作製した。本モデルでは、ウロコI型コラーゲン線維糖化に伴う線維間架橋割合が増加していた。また、力学的3点曲げ試験解析から糖化に伴いコラーゲン線維の弾性低下と曲げ強度の有意な低下を示した。以上より、高血糖由来の骨の主構造タンパクの糖化で骨の易骨折性が起きる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We used fish, characterized by a prolonged hour hyperglycemia after starch-rich feeding, as a unique model of type 2 DM. In this model, the interfibrillar crosslinking caused by production of advanced glycation end products accompanying the glycation of type I collagen fiber was increased. Furthermore, analysis of three-points bending test of glycated type I collagen fiber demonstrated that the increment of interfibrillar crosslinking of collagen fibers leads to decrease of collagen fiber elasticity and of bending strength of collagen fiber. Our results indicated that the glycation of bone structure proteins bring increment of fracture risk.

研究分野：スポーツ健康科学

キーワード：糖尿病 キンギョ 高でんぷん含有飼料 骨代謝 再生ウロコ コラーゲン線維 糖化 運動

1. 研究開始当初の背景

(1) インスリンは成長因子であり、インスリンの絶対不足の1型糖尿病では、骨密度の低下やそれに由来する骨強度低下が既に臨床的に知られている。近年血中インスリン低下がない2型糖尿病患者でも骨折の有意な増加が報告され、臨床的に問題になっている。しかし、2型糖尿病での骨代謝の詳細なメカニズムは未だ不明であり、一致した見解が得られていない。糖尿病での骨折には、糖尿病による骨代謝への影響以外に、高血糖により血液中の還元糖のアルデヒド基が骨基質コラーゲンタンパクのN末端や側鎖アミノ基と非酵素的に反応してシッフ塩基を形成後糖化することが知られており、この骨基質コラーゲンタンパクの糖化による骨質の変化も同時に調べる必要がある。

(2) 申請者は、破骨細胞と骨芽細胞がコラーゲンを主な骨基質とするウロコ上に共存する魚類のウロコが、添加的石灰化と直接骨化によって形成される哺乳類の頭蓋骨類似の膜性骨組織であることに注目し、ウロコを用いて破骨及び骨芽細胞活性を評価するアッセイ系を世界に先駆け開発した (Suzuki, Kitamura, et al., J. Pineal Res. 2008; 44: 326-334.)。この系では骨芽細胞株単独ではわからない骨組織の異種細胞間相互作用を評価できる。そして、この系を用いて骨代謝に關与するホルモンが哺乳類と同様に作用することを確認している。自然界で魚類はタンパク質主体のエサを摂取するので、空腹時血糖値がわずか 25 mg/dl であるが、高でんぷん含有の餌により正常個体でも容易に食後 6 時間前後にわたり 150 mg/dl を超える高血糖状態となる。また、魚類のウロコは抜いても再生する。高血糖状態でウロコを再生させると再生ウロコ上の骨芽細胞、破骨細胞さらには基質コラーゲンも高血糖状態に曝露されながら再生する。その結果、高血糖が骨代謝と骨基質コラーゲンタンパクの糖化に及ぼす影響を同時に調べられる。したがって、このモデルは *in vivo* で 2 型糖尿病骨代謝を解析できる非常に適した独創的モデルと考えられ、本研究を計画するに至った。

2. 研究の目的

(1) キンギョのエキソーム解析を実施し網羅的な遺伝子解析ができるようにする。

(2) 高でんぷん飼料を開発し、新規高血糖状態キンギョモデルを作成・飼育する。そして、高血糖群と対照群との再生ウロコの骨代謝を遺伝子発現とマーカー酵素活性の比較から高血糖が及ぼす骨代謝への影響を明らかにする。

(3) 高血糖群と対照群で再生ウロコ線維層の I 型コラーゲンの線維間架橋量を比較し、高血糖が及ぼす骨基質コラーゲンタンパク糖化の影響を I 型コラーゲンの分子量変化と線維間架橋量から解析する。

(4) コラーゲン糖化による線維間架橋量増加とウロコの曲げ強度などの機械的強度と

の関係を解析する。

(5) 高でんぷん飼料群を運動群と非運動群に分け両群での遺伝子発現および糖化コラーゲン量解析を行い、キンギョの運動(遊泳)による骨代謝改善および I 型コラーゲンへの糖化防止効果を評価し、ヒトの運動療法へ応用する。

3. 研究の方法

(1) ショットガン法により決定した多くの短い塩基配列を断片化・平滑化・リン酸化・末端処理・アダプタ連結・PCR 増幅し DNA ライブラリを作成した。キンギョの塩基配列がゼブラフィッシュと非常に相関性が高いので、Agilent SureSelect Zebrafish All Exon Kit を用いてハイブリダイゼーションし、結合したものを回収し、PCR 増幅した。シークエンスライブラリは、約 100base のアダプタを含めて 250 ~ 600base ペアエンド解析手法を用いて、HiSeq1000 でシークエンスした。Ensembl のデータベースから Zebrafish の最新の Gene transfer format (GTF) ファイルを入手し、CSV ファイルを作成し、ゼブラフィッシュのエクソン部分配列を元にマッピングツール (Bowtie2) によりゼブラフィッシュのエキソーム配列を原型として、発見された変異部位を置き換えてキンギョのキメラエキソームを作成した。

(2) 高デンプン飼料給餌開始 1, 3, 6 ヶ月目の再生ウロコを採取し、骨代謝関連遺伝子群の mRNA 発現およびマーカー酵素活性を測定し、骨代謝を解析した。

(3) 採取再生ウロコより I 型コラーゲンを抽出し、SDS-PAGE 電気泳動し α 鎖 (モノマー)、 β 鎖 (ダイマー)、 γ 鎖 (トリマー) の泳動位置や存在割合をコントロールと比較することによりタンパクへの Advanced Glycation End Products (AGE) 付加量や線維間架橋量を解析した。

(4) 高デンプン飼料給餌群にキンギョの遊泳負荷システムにより週 5 日、2 体長/秒の遊泳速度で毎日 1 時間負荷した運動群と狭い囲みで移動制限をした安静群で、骨代謝や基質コラーゲンへの AGE 付加量や線維間架橋量を比較した。

4. 研究成果

(1) Zebrafish のエクソンを結合したエキソーム (遺伝子配列含む配列) の数は 53,697 個であった。今回のマッピングで得られた変異箇所は 1,931,571 箇所であった。その結果これらの変異箇所がわかったエキソーム数は、42872 個で、79.84% のキンギョのタンパクの cDNA の約 8 割をカバーできるようになった。

(2) 8 ヶ月間継続して高デンプン含有飼料を経口投与されたキンギョ群と対照群の再生ウロコの骨代謝マーカー遺伝子の mRNA 発現とマーカー酵素活性は共に対照群との間に有意差は見られなかった。このことから血糖値が高い状態が続いても骨代謝は統計学的に有意なほどの影響を受けにくいことが示

唆された。

(3) 再生ウロコ線維層の基質コラーゲンを抽出した型コラーゲンをSDSPAGE泳動して鎖(モノマー、分子量マーカーから10万)に対する鎖(ダイマー、20万)および鎖(トリマー、30万)の存在比を定量した結果、4ヶ月後以降で / および / の割合が高デンプン含有飼料群で有意に増加した。したがって、高デンプン含有飼料群の再生ウロコの型コラーゲンでは、繊維間結合が有意に増加し、生理的コラーゲン線維の結合以外に異常な線維間結合が生じていることが明らかとなり、高血糖状態の持続により骨基質タンパクにはAGEによる分子量の増加や線維間架橋の増加していることが示唆された。

(4) 糖化コラーゲン線維の3点曲げ試験解析から糖化コラーゲン線維間架橋割合の増加と共に弾性率低下と曲げ強度(降伏応力)の有意な低下を記録した。このことから、高血糖により骨の主構造タンパクI型コラーゲン線維にも非酵素的糖化が起り、柔軟性の低下による力学的強度が低下している可能性が示唆された。

(5) 遊泳負荷システムにより週5日、2体長/秒の遊泳速度で毎日1時間負荷した運動群では骨形成マーカー遺伝子発現量の増加傾向が見られ、安静群ではコラーゲン線維の鎖の有意な分子量増加と、鎖に対する鎖や鎖の存在比が増加傾向を示した。一方、運動群では増加は見られなかった。したがって、食後の血糖増加時間帯に軽度負荷運動でも骨形成増加と骨基質コラーゲン線維の糖化を防ぐ有用性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 6件)

Ishizu H, Sekiguchi T, Ikari T, Kitamura K, Kitani Y, Endo M, Urata M, Kinoshita Y, Hattori A, Srivastav A, Mishima H, Mizusawa K, Takahashi A, Suzuki N. -melanocyte-stimulating hormone promotes the bone resorption resulting from increase both osteoblastic and osteoclastic activities in goldfish. *General and Comparative Endocrinology*, (査読有) 2018, in press.

Kase Y, Ikari T, Sekiguchi T, Sato M, Ogiso S, Kawada T, Matsubara S, Satake H, Sasayama Y, Endo M, Kitamura K, Hattori A, Watanabe T, Maruyama Y, Funahashi H, Kammegawa A, Suzuki N. Sardine procalcitonin amino-terminal cleavage peptide has a different action from calcitonin and promotes osteoblastic activity in the scales of goldfish. *Comparative Biochemistry*

and Physiology, Part A, (査読有) 211, 2017, 77-83.

Suzuki N, Kitamura K, Hattori A, Fish scale is a suitable model for analyzing determinants of skeletal fragility in type 2 diabetes. *Endocrine*, (査読有) 54, 2016, 575-577.

Kitamura K, Andoh T, Okesaku W, Tazaki Y, Ogai K, Sugitani K, Kobayashi I, Suzuki N, Chen W, Ikegame M, Hattori A, Effects of hyperglycemia on bone metabolism and bone matrix in goldfish scales. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, (査読有) 203, 2017, 152-158.

Hanmoto T, Tabuchi Y, Ikegame M, Kondo T, Kitamura K, Endo M, Kobayashi I, Mishima H, Sekiguchi T, Urata M, Seki A, Yano S, Hattori A and Suzuki N, Effects of low-intensity pulsed ultrasound on osteoclasts: Analysis with goldfish scales as a model of bone. *Biomed Res.* (査読有) 38, 2017, 71-77. Hamazaki K., Suzuki N., Kitamura K., Hattori A., Nagasawa T., Itomura M., Hamazaki T. Is vaccenic acid (18:1 n-7) associated with an increased incidence of hip fracture? An explanation for the calcium paradox. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* (査読有) 109, 2016, 575-577.

〔学会発表〕(計 5件)

鈴木信雄, 石津偉統, 木谷洋一郎, 五十里雄大, 関口俊男, 北村敬一郎, 遠藤雅人, 服部淳彦, 水澤寛太. 魚類の骨代謝に対する黒色素胞刺激ホルモンの影響: in vivo 及び in vitro による解析. 平成30年度公益社団法人日本水産学会春季大会 東京海洋大学品川キャンパス(東京都港区, 2018.03.26-03.30)

鈴木信雄, 半本泰三, 田淵圭章, 近藤隆, 池亀美華, 北村敬一郎, 関口俊男, 小林功, 関あずさ, 服部淳彦, LIPUS に対する骨芽細胞及び破骨細胞の応答: キンギョのウロコを用いた in vitro 及び in vivo の解析. 第21回超音波骨折治療研究会, 品川インターシティホール(東京都港区, 2018.1.20)

北村敬一郎, 鈴木信雄. キンギョ高血糖モデルにおける骨代謝および糖化ウロココラーゲンの架橋解析. 平成29年度日本動物学会 中部支部大会, 岐阜大学応用生物科学部(岐阜県岐阜市, 2017.12.9-12.10)

Ishizu H, Sekiguchi T, Ikari T, Kitamura K, Kitani Y, Endo M, Urata M, Hattori A, Mizusawa K, Takahashi A and Suzuki N, Effects of -melanocyte-stimulating hormone on

osteoblasts and osteoclasts in the regenerating scales of goldfish. The 3rd International Symposium to Promote Joint Usage/Research Center 2017, Kanazawa University (Ishikawa, Kanazawa, 2017, Oct 9-10)
北村敬一郎, 安藤 忠, 大貝 和裕, 杉谷 加代, 鈴木信雄. アロキサン誘発高血糖キンギョモデルにおける骨代謝および糖化ウロコラーゲンの架橋解析. 第55回日本生体医工学会大会、富山国際会議場(富山県富山市, 2016.4.26-4.28)
〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
<http://ridb.kanazawa-u.ac.jp/public/detail.php?id=2619>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北村 敬一郎 (KITAMURA, Kei-ichiro)
金沢大学・保健学系・教授
研究者番号：80283117

(2) 研究分担者

鈴木 信雄 (SUZUKI, Nobuo)
金沢大学・環日本海域環境研究センター・教授
研究者番号：60242476

池亀 美華 (IKEGAME, Mika)
岡山大学・医歯薬学総合研究科・准教授
研究者番号：70282986

(3) 連携研究者

本多 政夫 (HONDA, Masao)

金沢大学・保健学系・教授
研究者番号：00272980