

令和元年6月17日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K01725

研究課題名(和文) 糖尿病性骨代謝異常における分子制御機構の解明とその治療戦略の構築

研究課題名(英文) The elucidation of underlying mechanism and the establishment of therapeutic strategy on the abnormal bone metabolism of diabetes

研究代表者

高橋 和人 (Takahashi, Kazuto)

杏林大学・医学部・助教

研究者番号：80508292

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)：代表的な破骨細胞由来サイトカインであるTNF- $\alpha$ 刺激で骨芽細胞モデルであるUMR106細胞から、糖尿病骨代謝異常において破骨細胞分化活性化因子と想定されているMCP-1分泌が増大し、IL-1 $\beta$ 刺激で同様な因子であるVEGF120分泌が増大するが、41℃ 20分間の短期温熱処理はこれら増大したMCP-1、VEGF120分泌を減弱させた。そしてこの負の制御作用は、転写後レベルで働いていた。しかしながら、この制御にはHSP72の関与は否定的であった。従って、短期温熱療法は糖尿病骨代謝異常の進展を抑制し、その作用は転写後レベルで働いていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病骨代謝異常は、新たな糖尿病合併症として注目されているが、その病態に関し正確なメカニズムが不明であった。従って、本研究により、糖尿病骨代謝異常における基盤病態の一端が明らかになったと考えられる。そして、本研究を基に糖尿病骨代謝異常の病態のさらなる解明、ならびにその治療法や予防策に関する研究が進行していくものと信じられる。

研究成果の概要(英文)：TNF- $\alpha$ , a main cytokine derived from osteoclasts, stimulation have increased MCP-1 secretion from UMR106 osteoblast, and IL-1 $\beta$ , the same factor, enhanced VEGF120, and both MCP-1 and VEGF120 are considered to be the factors which can differentiate monocytes into osteoclasts and activate them in the abnormal bone metabolism of diabetes. On the other hand, the heat treatment at 41℃ for 20 min diminished the augmentation of MCP-1 and VEGF120 secretions. Furthermore, this down-regulation appears to play on the post-transcription levels. But HSP72 had no effects on the attenuation of MCP-1 and VEGF120 secretions by heat treatment. Thus, short term heat exposure may block the development of the abnormal bone metabolism of diabetes, and this inhibitory effect seems to operate in the post-transcription levels.

研究分野：医学

キーワード：骨代謝 糖尿病

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

#### 1. 研究開始当初の背景

(1) 近年新たな糖尿病合併症として、糖尿病性骨代謝異常が注目を集めている。これに関し、骨吸収の異常亢進が糖尿病性骨代謝異常における本質的病態と考えられるようになったが、その根底をなす分子メカニズムについては、いまだ明確な答えが見つかっていなかった。

(2) 一方、血管新生因子の VEGF が、骨芽細胞から豊富に分泌され、RANKL と同様に破骨細胞の分化誘導ならびに活性化を促進することが確認された。加えて、糖尿病性骨代謝異常の発症には、2型糖尿病に高頻度に合併する脂質異常症（高脂血症）が関与している可能性が推定された。

#### 2. 研究の目的

(1) 高脂血症下での骨芽細胞からの VEGF 分泌動態とその制御機構を解明し、さらに、糖尿病骨代謝異常の発症・進展に非常に重要であることが想定されている骨芽細胞と破骨細胞間の相互作用に関連する因子を同定し、その制御機構を解明する。

(2) 糖尿病骨代謝異常の進展を防御・抑制する因子を同定し(特に、インスリン抵抗性を改善することが実証された温熱処理と mitochondrial uncoupling、ならびに抗炎症作用を有する IL-10 の影響を中心に解析する)、最終的に糖尿病骨代謝異常の発症予防法及び治療戦略を確立することを目的とする。

#### 3. 研究の方法

(1) 高脂血症状態を模倣する高濃度パルミチン酸存在下、ならびに血糖値変動条件下に骨芽細胞分化モデルの UMR106 細胞などを培養し、完全分泌型 VEGF である VEGF<sub>120</sub> の mRNA 発現量と蛋白分泌量の変化を評価する。そしてこれら状態下での細胞ストレスの影響ならびに関与する細胞表面レセプターとシグナル伝達経路を解明し、加えて VEGF 発現に関与する責任転写因子を同定する。その後、VEGF が破骨細胞を活性化させる機序を、RAW264.7 細胞などを破骨細胞へ分化誘導し、これに VEGF を添加することにより解明する。

(2) 加えて、高濃度パルミチン酸存在下などで骨芽細胞から分泌が増大する VEGF 以外の破骨細胞活性化因子に関しても同様に解析する。さらに、骨芽細胞からの VEGF と他の破骨細胞活性化因子の分泌増大ならびにこれらによる破骨細胞活性化を改善させる要因を確定し、関与する分子制御機構を明らかにする。

#### 4. 研究成果

(1) UMR106 骨芽細胞において、パルミチン酸は完全分泌型 VEGF である VEGF<sub>120</sub> の分泌を増強させるが、これには TLR-4、PI3K 経路の活性化が関与していた。従って、2型糖尿病に高頻度に合併する脂質異常症（高脂血症）状態下で、骨芽細胞から破骨細胞の分化・活性化因子である VEGF<sub>120</sub> の分泌が増大することが、糖尿病骨代謝異常のイニシエーションとなる可能性が考えられた。

(2) 分化・活性化された破骨細胞に由来する代表的因子の TNF- $\alpha$  刺激により、UMR106 骨芽細胞から、破骨細胞を分化・活性化させる因子として確認された MCP-1 分泌が増大した。さらに、他の代表的破骨細胞由来因子の IL-1 $\beta$  刺激で、UMR106 骨芽細胞から VEGF<sub>120</sub> 分泌が上昇した。これらの結果は、高脂血症状態下で増大する VEGF<sub>120</sub> により分化・活性化された破骨細胞に由来する TNF- $\alpha$  で、骨芽細胞から MCP-1 分泌が上昇、IL-1 $\beta$  で VEGF<sub>120</sub> 分泌が増大し、この MCP-1 と VEGF<sub>120</sub> がさらに破骨細胞を分化・活性化させる悪循環が、糖尿病骨代謝異常の進展における

基盤病態の一部であることを初めて示したものと考えられた。

(3) TNF- $\alpha$  刺激は、UMR106 骨芽細胞から MCP-1 分泌を増大させたが、これに加え MCP-1 細胞内含量ならびに mRNA も増大させた。一方、IL-1 $\beta$  刺激は、VEGF<sub>120</sub> 分泌と同様に VEGF<sub>120</sub> 細胞内含量も増大させたが、VEGF<sub>120</sub> を含む VEGF-A mRNA 発現量には影響を及ぼさなかった。これらの結果は、骨芽細胞に由来する代表的破骨細胞分化・活性化因子の MCP-1 と VEGF<sub>120</sub> に関し、それらの制御機構が相異なっている可能性を示している。

(4) 41°C20 分間の短期温熱処理により、TNF- $\alpha$  刺激で増大した UMR106 骨芽細胞からの MCP-1 分泌が減弱し、加えて、IL-1 $\beta$  刺激により増大した UMR106 細胞からの VEGF<sub>120</sub> 分泌も 41°C20 分間の温熱処理は減弱させた。従って、短期温熱療法は糖尿病骨代謝異常の進展を抑制しうる可能性があり、効果的な治療法になりうると推測された。

(5) 41°C20 分間の短期温熱処理は、TNF- $\alpha$  刺激で増大した UMR106 骨芽細胞からの MCP-1 分泌を減弱させたが、mRNA 発現レベルには有意な影響を及ぼさなかった。同様に、41°C20 分間の温熱処理は、IL-1 $\beta$  刺激により増大した UMR106 細胞からの VEGF<sub>120</sub> 分泌を減弱させるが、その mRNA 発現レベルには影響を与えなかった。これらの結果により、短期温熱処理が、UMR106 骨芽細胞において転写後のレベルで MCP-1 及び VEGF<sub>120</sub> 分泌を負に制御する機構を働かせていると想定された。

(6) 小胞体ストレスの最初期で生じ、全般的翻訳抑制に関与する eIF2 $\alpha$  のリン酸化は、UMR106 骨芽細胞において、短期温熱処理ならびに TNF- $\alpha$  刺激によっては有意な変化が生じなかった。さらに IL-1 $\beta$  刺激によっても eIF2 $\alpha$  のリン酸化は変化しなかった。従って、蛋白が変性した結果生じる小胞体ストレスが誘導されないと考えられることより、細胞内において TNF- $\alpha$  刺激に温熱処理を加えたことで MCP-1 蛋白が変性した結果、分解が亢進し、その分泌も減弱する可能性は低く、温熱処理は TNF- $\alpha$  刺激性 MCP-1 分泌の増大を転写後調節の段階で選択的に負に制御していると推察された。加えて、IL-1 $\beta$  刺激に温熱処理を加えたことで VEGF<sub>120</sub> 蛋白が変性して分解が増強し分泌も減弱する可能性も同様に低いと考えられ、温熱処理は IL-1 $\beta$  刺激性 VEGF<sub>120</sub> 分泌の増大を転写後調節の段階で選択的に負に制御している可能性が示唆された。

(7) 温熱処理により発現が明らかに増大する分子シャペロンの HSP72 が抗炎症作用を有することが報告されたことより、UMR106 細胞において、TNF- $\alpha$  刺激性 MCP-1 分泌増大の温熱処理による減弱に HSP72 が関与するかを、HSP72 mRNA に対する siRNA を使用した RNAi により解析した。結果、HSP72 のノックダウンによっても、TNF- $\alpha$  刺激による MCP-1 分泌増大は温熱処理により有意に減弱した。さらに、予備的実験ながら、HSP72 のノックダウンによっても、UMR106 細胞における IL-1 $\beta$  刺激性 VEGF<sub>120</sub> 分泌増大が温熱処理により減弱することが確認された。これらに結果は、TNF- $\alpha$  刺激性 MCP-1 分泌増大及び IL-1 $\beta$  刺激性 VEGF<sub>120</sub> 分泌増大の両者に対しての温熱処理による減弱に、HSP72 の関与が否定的であることを示している。

(8) インスリン抵抗性改善作用を有する mitochondrial uncoupling、ならびに抗炎症作用を有し肥満脂肪組織の慢性炎症を抑制してインスリン抵抗性を改善させうる IL-10 が、UMR106 細胞における TNF- $\alpha$  刺激性 MCP-1 分泌増大に有意な影響を与えることは確認できなかった。さらに、IL-1 $\beta$  刺激性 VEGF<sub>120</sub> 分泌増大に影響を及ぼすことも観察することはできなかった。従って、mitochondrial uncoupling と IL-10 は、糖尿病骨代謝異常の進展抑制因子にはなりえないと推察された。

## 5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 6 件)

- ① (代表者) 高橋和人 : 2型糖尿病における骨代謝異常進展に関与する機序の解明, ならびにそれに対する温熱処理の影響の検討. 第 61 回日本糖尿病学会年次学術集会, 東京, 2018 年 5 月 24 日-26 日.
- ② 高橋和人 : (シンポジウム) [臓器チーム] 内科学的側面からの糖尿病の骨病変へのアプローチ. 糖尿病骨代謝異常の基盤病態の解明とこれに対する温熱処理の影響の検討. 第 32 回日本糖尿病合併症学会・第 23 回日本糖尿病眼学会総会, 東京, 2017 年 10 月 27 日-29 日.
- ③ (代表者) 高橋和人 : 糖尿病における骨代謝異常の進展メカニズムの解明, ならびにこれに対する温熱処理の影響の検討. 第 60 回日本糖尿病学会年次学術集会, 名古屋, 2017 年 5 月 18 日-20 日.
- ④ (代表者) 高橋和人 : 温熱処理は, 2型糖尿病における骨代謝異常の進展を HSP72 非依存性経路で抑制する. 第 59 回日本糖尿病学会年次学術集会, 京都, 2016 年 5 月 19 日-21 日.
- ⑤ (代表者) 高橋和人 : 2型糖尿病における骨代謝異常増悪・進展に関与する分子機構の解明ならびにそれに対する温熱処理の影響の検討. 第 30 回日本糖尿病合併症学会総会・第 21 回日本糖尿病眼学会総会, 名古屋, 2015 年 11 月 27 日-28 日.
- ⑥ (代表者) 高橋和人 : 2型糖尿病における骨代謝異常の増悪・進展機構の解明とそれに対する温熱処理の影響の解析. 第 58 回日本糖尿病学会年次学術集会, 下関, 2015 年 5 月 21 日-23 日.

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名 : 石田 均

ローマ字氏名 : Ishida Hitoshi

所属研究機関名 : 杏林大学

部局名 : 医学部

職名 : 教授

研究者番号 (8 桁) : 80212893