

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08925

研究課題名(和文)末梢血破骨前駆細胞を介した糖尿病の骨脆弱化機序の解明

研究課題名(英文) Study for the osteoclast-precursor-like monocyte subset on diabetic bone fragility

研究代表者

元山 宏華 (MOTOYAMA, Koka)

大阪市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：80382068

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)：近年2型糖尿病では骨折率が高いことが明らかとなったが、その機序はまだ明らかでない。本研究では、糖尿病患者の血液中の破骨前駆細胞の変化が関与していると仮説し検証を行った。方法は、2型糖尿病患者の橈骨遠位端の皮質骨厚と血液中の単球サブセットを計測し、単球サブセットと皮質骨厚との関連を検証した。その結果、CD16陽性単球が破骨前駆細胞の性質を示し、皮質骨厚の低値な群でCD16陽性単球の比率が高いことが明らかになった。さらにCD16陽性単球の割合は皮質骨厚と逆相関し、皮質骨厚に対する独立した負の危険因子であった。これにより糖尿病患者では、血液中の単球の質が変化して骨脆弱性に関与している可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：It has been demonstrated that bone fracture rate is elevated in type 2 diabetes. However, the mechanism was not fully elucidated. In this study, we investigated the involvement of altered osteoclast precursor on bone fragility in type 2 diabetes. Cortical thickness of distal radius and monocyte subsets were measured in type 2 diabetes. It revealed that CD16+ monocytes presented osteoclast marker. The rate of CD16+ monocytes is increased in lower cortical thickness group. Furthermore, the rate of CD16+ monocytes is negatively correlated with cortical thickness. The rate of CD16+ monocytes is also an independent risk factor to cortical thickness. This study elucidated possible involvement of altered proportion of CD16+ monocyte, which is one of the osteoclast precursors, on bone fragility in type 2 diabetes.

研究分野：糖尿病 骨粗鬆症

キーワード：糖尿病 骨粗鬆症 破骨前駆細胞 単球

1. 研究開始当初の背景

(背景)

糖尿病患者では網膜症や腎症及び心血管合併症は勿論のこと、骨折率が高いことが重大な問題として認知されてきている。(Schwartz AV. et al, *J Clin Endocrinol Metab* 86: 32, 2001) 我々のグループもこれまでそのことを報告してきた。(Inaba M. et al, *Calcif Tissue Int* 76: 256, 2005) 近年のメタ解析で、糖尿病患者において骨密度では予測し得ない骨折率の上昇が示され (Vestergaard P. et al, *Osteoporos Int* 18: 427, 2007)、糖尿病の骨脆弱性の病態解明が急務とされている。

糖尿病患者の骨脆弱性の原因は、様々な機序が想定されているが、糖尿病患者の皮質骨における骨粗鬆症も原因の一つであることが報告されている。(Burghardt JA. et al, *Jclin Endocrinol Metab* 95: 5045, 2010) 皮質骨の骨吸収には破骨細胞が関与しているが、この破骨細胞の由来は未だ十分解明されていない。破骨細胞は骨髄細胞から末梢血中の単球-マクロファージ系の破骨前駆細胞を経て、RANKL や M-CSF などにより分化誘導され、最終的に骨で融合した多核の破骨細胞へと成熟すると考えられている。(Lacey DL. et al, *Cell* 93: 165, 1998) ヒトの末梢血の単球には大きく分けて CD16 陰性単球と CD16 陽性単球の2種類の単球サブセットが存在することが分かっており、近年健常者では破骨前駆細胞が CD16 陰性単球由来であることが報告される一方で (Lari R. et al, *Arthritis Res Ther* 11: R23, 2009)、乾癬性関節炎では CD16 陽性単球から破骨細胞が分化する可能性が報告されている。(Yahui, G. et al, *Arthritis Res Ther*, 12, R14, 2010)

糖尿病においても、単球サブセットから破骨前駆細胞における分化過程で変化が起き、それが骨脆弱化に関わっている可能性があると考えられるが明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究では、2型糖尿病における血中の単球サブセットと骨脆弱性との関連を明らかにし、糖尿病の骨脆弱化を抑える因子について究明することを目的とする。

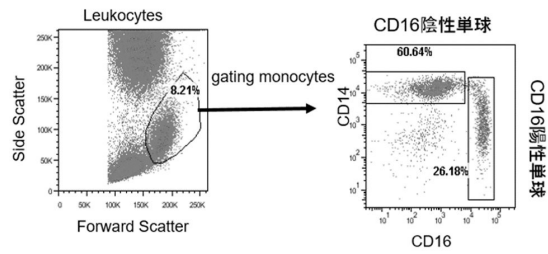
3. 研究の方法

(対象)

入院2型糖尿病患者221例を対象とした。

(単球サブセットの解析)

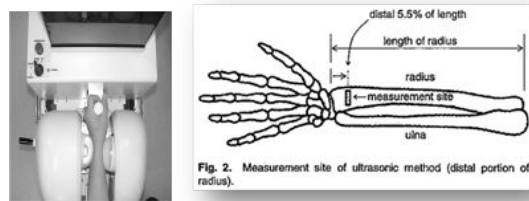
糖尿病患者の単球サブセットの解析は、患者から末梢血白血球を採取し、各種蛍光ラベル抗体で標識。フローサイトメトリーにて測定した。図1のように単球分画を gating し、CD14 および CD16 染色により CD14 陽性 CD16 陰性単球 (CD16 陰性単球)、CD14 弱陽性 CD16 陽性単球 (CD16 陽性単球) の割合を計測した。



(図1) 単球サブセットの解析

(皮質骨厚の計測)

皮質骨骨粗鬆症の評価は、2波検出型超音波骨密度計にて橈骨遠位端の皮質骨厚を測定した。(図2)



(図2) 皮質骨厚の測定

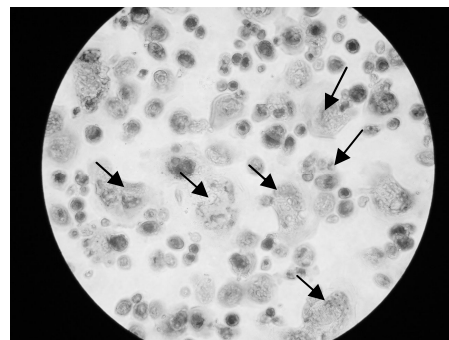
(破骨細胞の誘導)

また末梢血白血球から単球分画を分離し、MEM 培養下、GM-CSF で10日培養、その後 RANKL で刺激培養し破骨細胞分化能を評価した。

4. 研究成果

(結果1) 破骨細胞の誘導

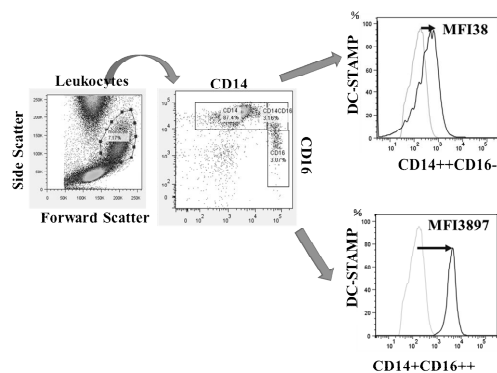
単球の破骨細胞分化培養系では、単球の分化誘導後に糖尿病患者の破骨細胞マーカーである TRAP 染色陽性の多核細胞が形成された。さらに CD16 陽性単球の比率が高い糖尿病では、より多くの破骨細胞が誘導された。(図3矢印)



(図3) 破骨細胞への分化

(結果2)

単球を CD14、CD16、および破骨前駆細胞マーカーである DC-DTAMP で多重蛍光ラベルしてフローサイトメトリーにて解析。図4のように CD16 陽性の単球は、DC-STAMP を高発現していた。



(図 4) CD16 単球の DC-STAMP 発現

(結果 4)

2 型糖尿病を皮質骨厚 Z-score 低値群と高値群に分けて比較すると、皮質骨厚 Z-score 低値群では有意に BMI が高値(27.0 ± 5.2 vs. 25.6 ± 5.4 kg/m², p = 0.014)で、握力が有意に低値(21.8 ± 9.0 vs. 24.7 ± 8.8 kg, p = 0.017)、そして CD16 陽性単球の割合が有意に高値(12.6 ± 4.9 vs. 13.9 ± 5.4 kg, p = 0.031)であった。(表 1)

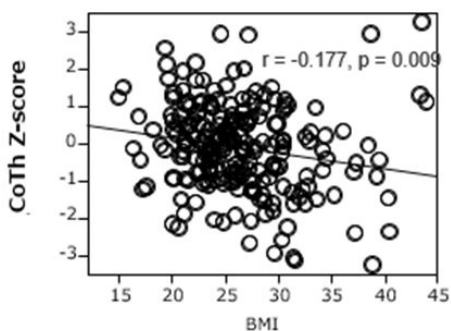
	total	皮質骨厚 high	皮質骨厚 low	p
No. (male/female)	221 (124/97)	110 (44/66)	111 (53/58)	0.001
Age (years)	61.5 ± 12.9	62.2 ± 12.0	60.7 ± 13.7	0.630
DM duration (years)	10.0 (3.0 - 20.0)	10.0 (3.8 - 20.0)	12.0 (4.0 - 20.0)	0.794
BMI (kg/m ²)	26.3 ± 5.3	25.6 ± 5.4	27.0 ± 5.2	0.014
Hand grip strength (kg)	23.3 ± 9.0	24.7 ± 8.8	21.8 ± 9.0	0.017
Serum Cre (mg/dL)	0.81 (0.66 - 1.06)	0.81 (0.61 - 0.97)	0.83 (0.66 - 1.15)	0.223
eGFR (mL/min/1.73 m ²)	67.0 (49.6 - 82.6)	67.2 (50.1 - 85.1)	66.3 (47.4 - 79.0)	0.309
FPG (mg/dL)	123 ± 40	124 ± 41	123 ± 38	0.983
HbA1c (%)	8.6 ± 1.8	8.7 ± 1.9	8.4 ± 1.7	0.251
Ca (mg/dL)	9.3 (8.9 - 9.6)	9.2 (9.0 - 9.6)	9.3 (8.9 - 9.6)	0.699
Pi (mg/dL)	3.8 (3.4 - 4.2)	3.9 (3.5 - 4.2)	3.7 (3.4 - 4.2)	0.813
CRP (mg/dL)	0.07 (0.03 - 0.18)	0.08 (0.04 - 0.21)	0.07 (0.03 - 0.15)	0.385
WBC	6103 ± 1858	6162 ± 2035	6044 ± 1672	0.986
CD14 ⁺ CD16 ⁻ (%)	80.0 ± 6.5	80.4 ± 6.1	79.7 ± 7.0	0.652
CD14 ⁺ CD16 ⁺ (%)	13.2 ± 5.2	12.6 ± 4.9	13.9 ± 5.4	0.031
CD16/CD14	0.17 ± 0.08	0.16 ± 0.07	0.18 ± 0.08	0.034

Data are expressed the mean ± SD or median (inter-quartile range, IQR), and analyzed by Student t test, Mann-Whitney U test, or χ^2 test.

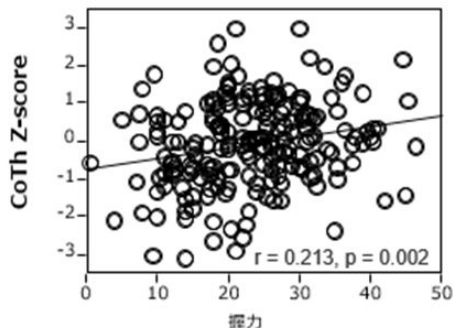
(表 1) 皮質骨厚高値と低値群の比較

(結果 5)

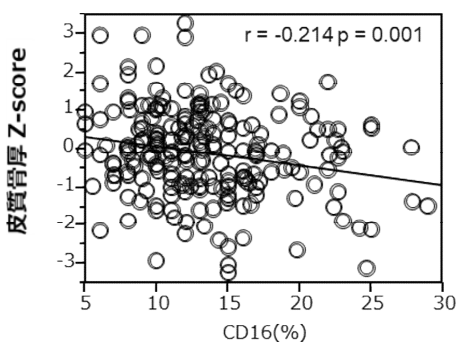
単変量解析では、皮質骨厚 Z-score は BMI と負の相関関係($r=-0.177$, $p=0.009$)、握力と正の相関関係($r=0.213$, $p=0.002$)、CD16 単球陽性の割合と有意な負の相関関係 ($r=-0.214$, $p=0.001$) を示した。(図 5 A、B、C)



(図 5 A)



(図 5 B)



(図 5 C)

(結果 6)

性別、年齢、BMI、握力、eGFR、空腹時血糖値、HbA1c、CRP、CD16 陽性単球の割合を因子に入れた多変量解析では、皮質骨厚 Z-score に対して、CD16 単球の割合は負の独立した寄与因子 ($\beta=-0.201$, $p=0.034$) であった。

(考察)

このことより、2 型糖尿病患者では CD16 陽性単球が、破骨前駆細胞の性質を示し、CD16 陽性単球の比率が高いほど、皮質骨厚が低値であり骨吸収が進んでいることが示唆された。さらに CD16 陽性単球の比率は、皮質骨骨粗鬆症に対する独立した危険因子であることが明らかとなった。

本研究において、未だ CD16 陽性単球が直接破骨細胞に分化して骨吸収を促進しているかどうかは直接には証明していない。しかし CD16 陽性単球比率が高いほど皮質骨骨粗鬆症が進行していることを説明する機序として、CD16 陽性単球から由来する炎症、もしくは CD16 陽性単球が直接破骨細胞に分化する機序の 2 つ可能性が考えられる。

今回得られた知見は、今後糖尿病の皮質骨における骨脆弱性を理解するうえで血液中の単球サブセット CD16 陽性単球が破骨前駆細胞を介した重要な修飾因子である可能性を示唆していると考えられる。将来糖尿病の骨脆弱性を対策するうえで重要な治療ターゲットを明らかにしたものと考えられる。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

発表者、元山宏華 演題名：2 型糖尿病の橈骨皮質骨骨粗鬆症に対する単球サブセットの関連：日本骨形態計測学会 2018 年 6 月大阪

発表者、元山宏華 演題名：糖尿病の皮質骨骨粗鬆症：シンポジウム,日本骨粗鬆症学会 2017 年 10 月大阪

〔図書〕(計 1 件)

編者：稲葉雅章、第 5 章元山宏華、株式会社医薬ジャーナル社、骨粗鬆症診療第 5 章糖尿病 サルコペニア、2018 刊行予定

〔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://www.med.osaka-cu.ac.jp/interm2/office/news20171020/index.shtml>

6. 研究組織

(1)研究代表者 元山宏華 (MOTOYAMA, Koka)
大阪市立大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号：80382068

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：

(4)研究協力者
()