

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：33803

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05510

研究課題名(和文)糖化ストレスによる骨機能障害に対する*S. sonchifolius*の効果研究課題名(英文)Effect of *S. sonchifolius* on glycative stress-induced alteration of bone remodeling

研究代表者

高部 稚子 (Takabe, Wakako)

静岡理工科大学・理工学部・准教授

研究者番号：00436594

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：糖化反応により生じたタンパク糖化最終産物(AGEs)は、タンパクの機能不全や炎症惹起に関わる。慢性的な高血糖によりAGEsが蓄積亢進している糖尿病患者は骨折の罹患率が高く、原因としてAGEsによる骨質の低下が考えられる。骨質を保つ骨代謝に関わる破骨細胞がAGEsにより分化異常を起こすことから、本課題では糖化反応を抑制する食用植物として選定した*S. sonchifolius*(ヤーコン)の有用性を検証した。結果、AGEsが破骨細胞分化に関わる遺伝子を転写因子レベルで制御すること、その転写因子の減少をヤーコン抽出物が回復させることで、ヤーコンがAGEsによる破骨細胞分化異常を軽減する可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々は長年、食用植物の抽出液を用い糖化反応抑制・分解活性の評価、並びにその作用成分の同定を行ってきた。*S. sonchifolius*は現在、日本各地で栽培されていることから、本課題の遂行により機能性食品としての新たな商品価値を付与することで、健康産業における地域振興に貢献できると考えている。糖化ストレスが関与する疾患には、糖尿病だけでなくアルツハイマー病、骨粗鬆症、変形性関節症など高齢者の生活の質を低下させるものが数多い。また、高齢者の多剤併用による副作用や医療費増大等の問題に対しても、食物として手軽に摂取できる*S. sonchifolius*の有用性を明らかにすることは意義深い。

研究成果の概要(英文)：Advanced glycation end-products (AGEs) produced by glycation reactions are involved in protein dysfunction and inflammation. Diabetic patients with high accumulation of AGEs due to chronic hyperglycemia have a high incidence of bone fractures, which is thought to be caused by AGEs-induced deterioration of bone quality. In this study, we examined the usefulness of *S. sonchifolius* (yacon), which was selected as an edible plant that inhibits glycation reactions, because osteoclasts, which are involved in bone metabolism and maintain bone quality, undergo abnormal differentiation due to AGEs. Our results showed that AGEs regulate genes involved in osteoclast differentiation at the level of transcription factors, and that yacon extracts restore the reduction of these transcription factors, indicating that yacon may reduce AGEs-induced osteoclast differentiation abnormalities.

研究分野：細胞生物学

キーワード：糖化ストレス 糖尿病 骨代謝異常 食品機能

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) グルコースやフルクトースなどの還元糖は生命活動において必要不可欠な栄養素である。その一方で、過剰な糖はタンパク質と反応し、様々なタンパク糖化最終産物(Advanced Glycation End Products, AGEs)を産生する。AGEsの蓄積がタンパクの機能不全や炎症を引き起こすことに端を発する糖化ストレスは、様々な疾病の危険因子として注目されている。その中でも糖尿病は、血管障害などの重篤な合併症の他に、近年、骨折の危険因子であることが報告されている。

(2) 骨は、骨代謝と呼ばれる「破骨細胞による骨吸収」と「骨芽細胞による骨新生」を繰り返すことで機能の恒常性を保つ。加齢・疾病に伴う骨折の要因として「骨質・骨量の低下による骨強度の低下」が考えられるが、特に架橋性の AGEs であるペントシジンは、骨コラーゲンに不要な架橋構造を形成し、骨質の低下に寄与するとされている。

骨量・骨質の低下には骨代謝の停滞、あるいは過剰な骨代謝の関与も考えられることから、我々は AGEs が破骨細胞及び骨芽細胞に与える影響について着目し、AGEs が骨芽細胞・破骨細胞双方の細胞分化を抑制することを報告した。このことから、糖化ストレスによる破骨細胞分化の抑制が、低下した骨質をもつ骨の吸収を遅らせ、更に骨新生に必須である骨芽細胞分化を抑制することで、結果的に骨質・骨量の低下を引き起こし骨折リスクの増大に繋がる可能性が考えられた。しかしながら詳細なメカニズムは不明である。

(3) 糖化ストレスが引き起こす疾病への対策として、AGEs 産生を抑制する化合物の研究が進められてきたが、副作用のため日本では認可されていない。そのため、我々は 500 種類以上の食用植物の AGEs 産生抑制作用を検証し、キク科の多年草である *Smallanthus sonchifolius* (和名: ヤーコン) を AGEs 産生抑制・分解亢進作用を有する植物として見出した。以上、ヤーコンが糖化ストレス由来の疾病の予防に有効である可能性が期待されるが、骨機能への影響は明らかではない。

2. 研究の目的

本課題を通し、糖化ストレスが破骨細胞分化に与える影響に対するヤーコンの有用性について明らかにすることを目的とした。

具体的には、AGEs が破骨細胞分化抑制を引き起こすメカニズム及び、ヤーコン抽出物が AGEs による骨代謝異常に与える影響、骨質低下に関わる AGEs の産生を抑制、または分解するヤーコンに含まれる成分の探索、について検証を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) マウスマクロファージ由来 RAW264.7 細胞に Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL) を作用させた破骨細胞分化モデルにおける AGEs の影響を、主要な分化マーカー及び転写調節因子の発現量を解析することで評価した。

(2) ヤーコンは乾燥し粉末化したものを超純水に混合し、加温することで得られた抽出液を濾過することで試料とした。成分の分離にはオープンカラムを用い、更に高速液体クロマトグラフィー(HPLC)により成分の単離・精製を行った。成分の同定にはフォトダイオードアレイ検出器付き液体クロマトグラフ-飛行時間型質量分析計(LC-QTOF/MS)及び核磁気共鳴装置(NMR)を用いた。

4. 研究成果

(1) 破骨細胞分化は、主に前駆細胞からの Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP)陽性細胞への分化と、その後の細胞融合による多核化からなる。RAW264.7 細胞に RANKL を作用させた破骨細胞分化モデルにおいて、分化過程で上昇する複数の遺伝子発現及び成熟した破骨細胞の特徴である TRAP 活性の上昇が、AGEs の添加により低下した。次に破骨細胞分化の主要転写因子とされる NFATc1 及び MitF-E について AGEs による影響の検証を行った。その結果、どちらの転写因子も AGEs により抑制されることが示された。

AGEs による破骨細胞分化抑制にヤーコン抽出物が与える影響について検証を行ったところ、AGEs により発現が抑制される RANKL 誘導性遺伝子のうち、MitF-E により発現が制御さ

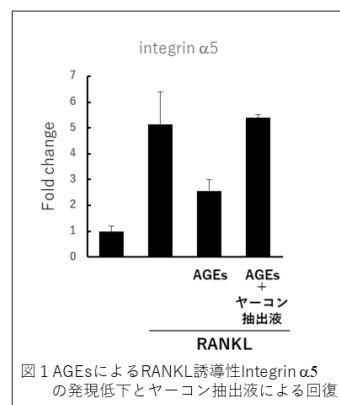
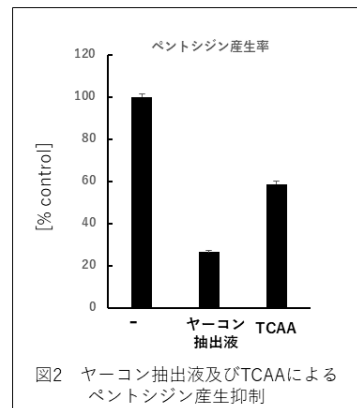


図1 AGEsによるRANKL誘導性Integrin α5の発現低下とヤーコン抽出液による回復

れる細胞融合関連遺伝子が、ヤーコン抽出液添加により有意に回復した。このことからヤーコン抽出液が AGEs による破骨細胞分化抑制を解除する作用点は、MitF-E 発現と細胞融合関連遺伝子発現との間に存在する可能性が考えられた。

(2)ヤーコン抽出液を用い、骨コラーゲンに不要な架橋構造を形成し骨質の低下に寄与するとされる架橋性の AGEs であるペントシジンの産生抑制作用成分の探索を行った。初めに複数の還元性物質(AGEs 化物質)を用い、骨コラーゲンである I 型コラーゲンと反応させ生じたペントシジン量を高速液体クロマトグラフィー(HPLC)で測定することで、今後の検証に適切な糖化モデルを構築した。次にヤーコン抽出液を HPLC にて分離分画し、各画分を糖化モデルに加え、ペントシジン産生抑制能を評価した。その結果、ヤーコンに含まれる特徴成分の 1 つである 2,3,5-トリカフェオイルアルトラル酸(TCAA)に強いペントシジン産生抑制作用が認められた。また、AGEs とタンパク質との架橋構造である α ジケトン構造を切断することにより AGEs 架橋切断能を評価する均一溶液モデルにおいても、TCAA は高い切断活性を示すことを明らかにした。このことからヤーコン抽出液及び TCAA は、タンパク質との架橋構造を生じさせる AGEs の産生抑制に加え、生じた架橋構造を切断することで変性したタンパク質の機能を回復させる可能性が示唆された。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Rina Yamamoto, Wakako Takabe, Masayuki Yagi, Yoshikazu Yonei	4. 巻 7(2)
2. 論文標題 Effect of glycated human serum albumin on BMP2-induced osteoblastgenesis in C2C12 cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Glycative Stress Research	6. 最初と最後の頁 142-151
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.24659/gsr.7.2_142	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 A. N. M. Mamun-Or-Rashid, Wakako Takabe, Masayuki Yagi, Yoshikazu Yonei	4. 巻 6(3)
2. 論文標題 Melatonin and astaxanthin modulate RANKL-induced TRAP activity in RAW264.7 cells in an opposite fashion	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Glycative Stress Research	6. 最初と最後の頁 135-141
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.24659/gsr.6.3_135	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高部稚子, 山口大輝, 八木雅之, 米井嘉一
2. 発表標題 AGEsによるMatrix metalloproteinase-1発現亢進に対するヤーコンの効果
3. 学会等名 第19回日本抗加齢医学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高部稚子・山田健二郎・北川佳瑚・八木雅之・米井嘉一
2. 発表標題 抗糖化作用とラジカル捕捉能の相関性に関する研究
3. 学会等名 第18回日本抗加齢医学会総会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 「グルコース酸化物生成抑制用組成物、AGEs生成抑制用組成物、及び、AGEsを介したタンパク質分子間の架橋の切断用組成物」	発明者 中山英樹、米井嘉一、八木雅之、高部稚子、今美知	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2019-141184	取得年 2021年	国内・外国の別 国内

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------