

令和 4 年 5 月 27 日現在

機関番号：37116

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17995

研究課題名（和文）終末糖化産物を介した低骨代謝回轉型糖尿病性骨粗鬆症の分子制御機構の解明と治療応用

研究課題名（英文）Elucidation of molecular regulation mechanism of low turnover diabetic osteoporosis via advanced glycation end products and its therapeutic application

研究代表者

田中 健一（Tanaka, Kenichi）

産業医科大学・医学部・助教

研究者番号：90596686

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：糖尿病患者は骨粗鬆症や骨折リスクが高く、慢性高血糖によって生成される終末糖化産物(AGEs)や糖尿病で特徴とされる低回轉型の骨代謝異常が原因とされている。in vitroにおいてAGEsは骨芽細胞機能低下をきたすが、破骨細胞分化への影響は不詳である。また糖尿病でみられる低骨代謝異常のメカニズムは不詳である。グリコールアルデヒド由来AGEはNF- κ Bを介したIL-10の産生作用により、ヒト単球から破骨細胞への分化を抑制することが示された。2型糖尿病患者ではAGE濃度が高く、AGE濃度と骨代謝マーカーが負相関を認めたことから、高AGE血症が低骨代謝回轉の骨代謝異常に寄与する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病患者は心血管疾患のみならず、骨粗鬆症や骨折リスクが高いことが問題である。糖尿病で特徴とされる低回轉型の骨代謝異常のメカニズムとして、グリコールアルデヒド由来AGEのIL-10産生を介したヒト単球から破骨細胞への分化作用が関与している可能性が示され、AGEの新たな分子基盤が明らかにされた。また糖尿病患者の高AGE血症と低回轉型の骨代謝異常との関連が示唆された。現在の高齢社会において糖尿病、骨粗鬆症患者が増加し続けることで今後さらに医療費が増大することが予想される。糖尿病患者の高AGE血症をターゲットとした治療法の確立が、糖尿病のみならず糖尿病性骨粗鬆症に対しても有用となることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Diabetic patients are at high risk for osteoporosis and bone fractures, which have been attributed to endogenous glycation products (AGEs) produced by chronic hyperglycemia and the low-turnover bone metabolism abnormalities characterized in diabetes mellitus. Although AGEs inhibit osteoblast functions, little is known about their roles in regulation of human osteoclast differentiation. In addition, the mechanism of the low bone metabolism observed in diabetes mellitus is unknown. Glyceraldehyde-modified AGEs inhibited human osteoclast differentiation from human monocytes through induction of IL-10 expression via NF- κ B. Serum AGE levels were significantly higher in patients with diabetes, and serum AGE levels were negatively correlated with bone metabolism markers. It can be assumed that AGE bioaccumulation in diabetic patients increases the risk of bone fracture, through inhibition of osteoclast differentiation, reduction of bone turnover, and disruption of bone remodeling.

研究分野：内分泌代謝糖尿病

キーワード：終末糖化産物 破骨細胞 糖尿病 低骨代謝回轉

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

in vitroにおいて終末糖化産物が骨芽細胞機能低下により骨形成低下をきたすことが知られている。一方で終末糖化産物のヒト破骨細胞分化に及ぼす影響は不詳である。さらに糖尿病患者で見られるといわれる低回転型の骨代謝異常において、AGEsが寄与しているかは不明である。

2. 研究の目的

糖尿病は細小血管合併症、大血管合併症だけでなく、骨粗鬆症や骨折リスクが高いことが示されており、糖尿病性骨粗鬆症とも呼ばれる。その原因として、慢性高血糖によって生成される終末糖化産物(AGEs)の骨組織への蓄積や糖尿病で見られる低回転型の骨代謝異常が想定されている。in vitroにおいてAGEsが骨芽細胞機能低下により骨形成低下をきたすことが知られている。一方でAGEsの破骨細胞分化に及ぼす影響は不詳である。さらに糖尿病患者の低回転型の骨代謝異常とAGEsとの関与は不明である。糖尿病性骨粗鬆症の病態の解明を目指し本研究を開始した。

3. 研究の方法

(1)ヒト末梢血からCD14陽性単球を分離し、マクロファージコロニー刺激因子(M-CSF)で3日間刺激培養後、M-CSFと可溶性receptor activator of NF- κ B ligand (sRANKL)を添加後、計12日間培養した。M-CSF単独刺激時にグルコース由来AGEs-BSA(Glu-AGEs-BSA)、グリコールアルデヒド由来AGEs-BSA(Glyco-AGEs-BSA)、およびControl-BSAをそれぞれ添加した。その後、酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ(TRAP)染色、定量性PCR、Cytometric Bead Array(CBA)、ウェスタンブロット(WB)法にて破骨細胞の分化効率と機能について評価を行った。

(2)2型糖尿病患者において、血中AGE値と骨代謝マーカーとの関連の有無について検討する。
対象:当科に入院となった2型糖尿病患者、あるいは内分泌疾患で入院となった非糖尿病患者のうち、50歳以上の閉経後女性。

測定項目:年齢、BMI、糖尿病罹病期間、HbA1c、空腹時血糖値、intact-PINP(骨形成マーカー)、TRACP-5b(骨吸収マーカー)、血清Glyceraldehyde-modified AGEs(Glycer-AGE)値

主要評価項目:各群の血中AGE値と骨代謝マーカーとの相関

4. 研究成果

in vitroにおいてヒト単球細胞に対してWB法でreceptor for AGE(RAGE)タンパク質の発現を検討したところ、Glu-AGEs-BSA、Glyco-AGEs-BSA、Control-BSA刺激の有無に関わらず同程度のRAGEタンパク質の発現が検出された(Fig1)。

次にTRAP染色により、Glyco-AGEs-BSA刺激にて用量依存性にTRAP陽性細胞数(Fig2A)、NFATc1とCathepsin K遺伝子のmRNA発現が有意に抑制された(Fig2B)。RANK遺伝子のmRNA発現に関しては、刺激1日目において、Glyco-AGEs-BSA刺激のみRANK mRNA発現は有意に抑制された。RANK/RANKLシグナル下流にあるAktに着目し、Aktリン

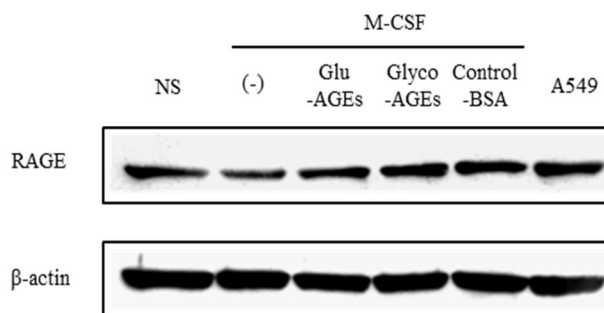


Fig.1 ヒトCD14+細胞(単球)をPBMCから分離し、0日目に25 ng/ml M-CSFで処理した後、Glu-AGEs-BSA(100 μ g/ml)、Glyco-AGEs-BSA(100 μ g/ml)またはControl-BSA(100 μ g/ml)で24時間刺激し、ヒト単球またはA549細胞の全細胞溶解液を作成、抗RAGEおよび抗 β アクトリン抗体による免疫ブロット法により解析した。

酸化の発現をFACSにて検討したが、Glyco-AGEs-BSA刺激でAktリン酸化の発現増強はみられなかった。また、ERK阻害薬とGlyco-AGEs-BSA共刺激にてRANK mRNA発現に変化があるか検討したが、Glyco-AGEs-BSA単独刺激時と不変であった。次にCBA法によりday1にてGlyco-AGEs-BSA刺激後、破骨細胞分化促進作用を担うサイトカインTNF- α 、IL-1、IL-6および破骨細胞分化抑制作用を担うサイトカインIL-10の産生が有意に亢進した(Fig3A)。IL-10の産生はday9においても依然として亢進していた(Fig3B)。一方、Glyco-AGEs-BSA単独刺激に比してIL-10中和抗体とGlyco-AGEs-BSAの共刺激にて破骨細胞分化の抑制作用は減弱した(Fig4)。最後にGlyco-AGEs-BSA刺激を受けたヒト単球において総NF- κ Bに対するNF- κ Bの相対的リン酸化が増強さ

れる一方(Fig5A)、IKK 阻害薬添加後、Glyco-AGEs-BSA 刺激による IL-10 発現誘導は阻害剤容量依存的に抑制された(Fig5B)。

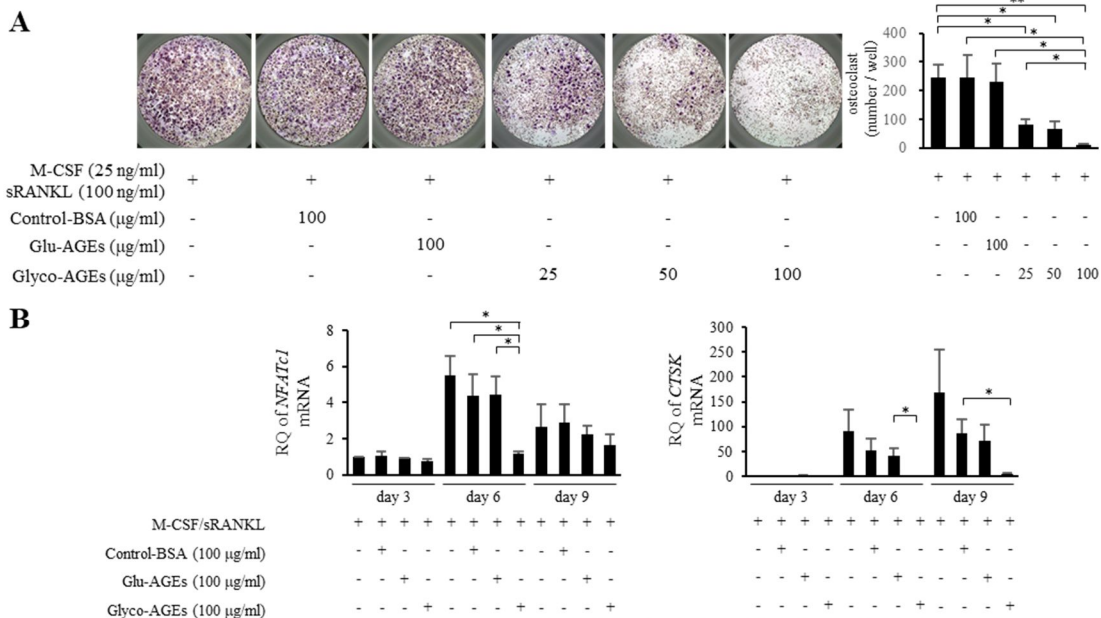


Fig. 2 RT-qPCR における NFATc1 および CTSK の mRNA 発現

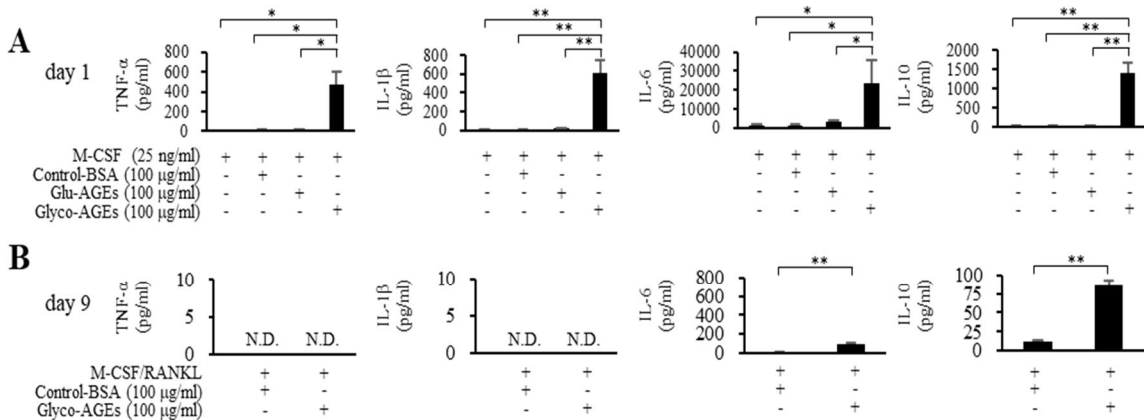


Fig. 3 Cytometric Bead Array法における上清中の各種サイトカイン濃度.

A. day1
B. day9

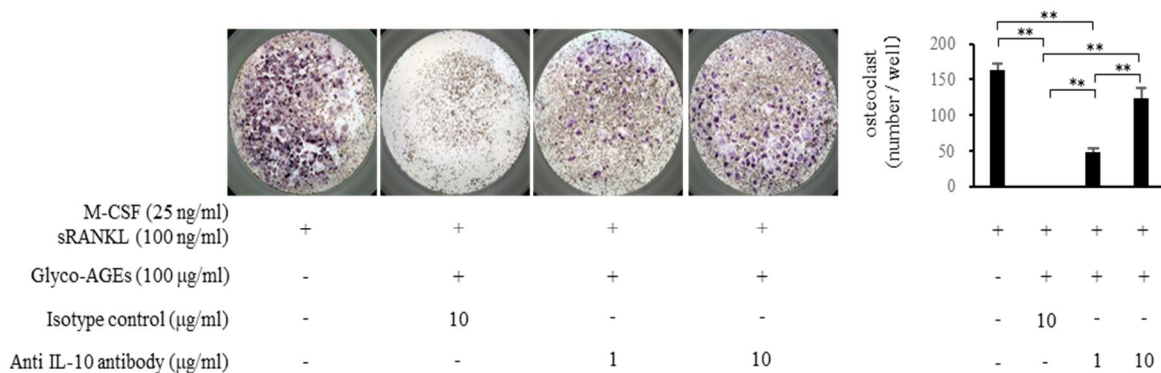


Fig. 4 TRAP染色. ヒト単球に、Glyco-AGEs-BSAの存在下でIL-10中和抗体またはアイソタイプコントロールで処理し破骨細胞を計測.

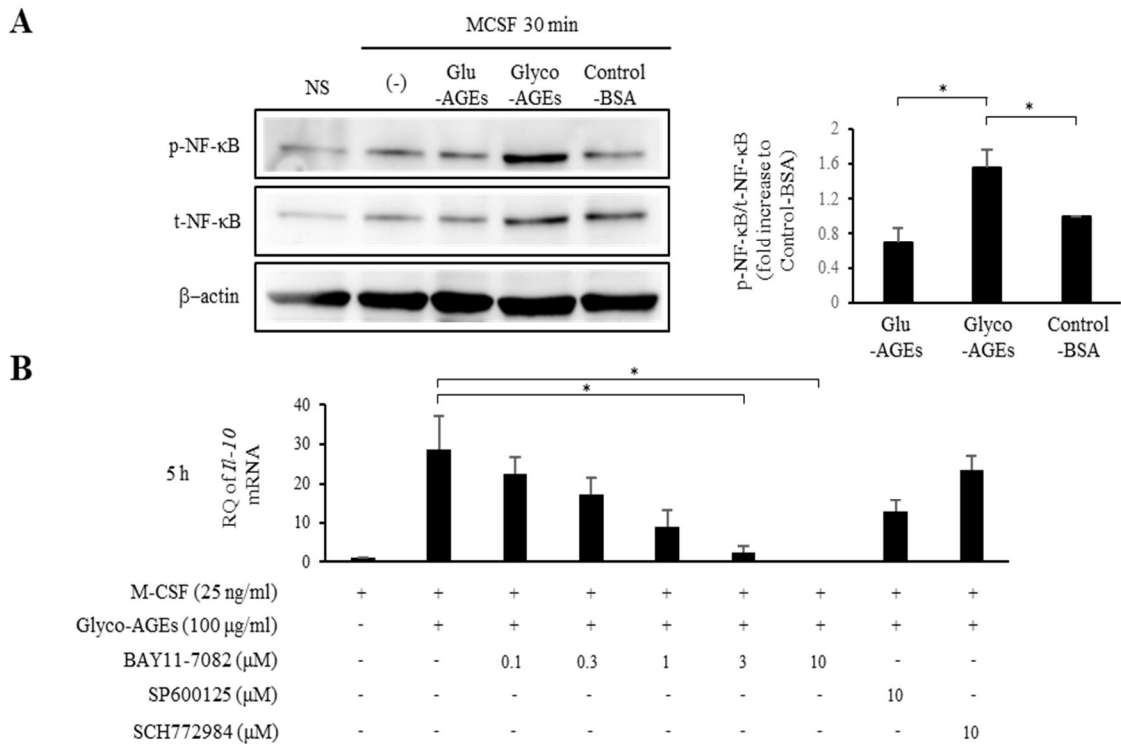


Fig. 5 (A) ヒト単球をM-CSFとGlu-AGEs-BSA (100 μg/ml)、Glyco-AGEs-BSA、またはコントロールBSA (100 μg/ml) で30分間処理後、全細胞溶解液を作成し、抗phospho-NFκB p65抗体、抗NF-κB p65抗体、抗β-アクチン抗体を用いたイムノブロッティングにより分析。右パネル:phospho/total NF-κB比。(B) RT-qPCRにおけるIL-10 mRNA発現。ヒト単球をM-CSF、Glyco-AGEs-BSAに加えBay11-7082 (IKK阻害剤)、SP600125 (JNK阻害剤)、SCH772984 (ERK阻害剤) で5時間処理。

以上より Glyco-AGEs-BSA は刺激早期に RANK 発現を抑制し、その後 NFATc1 と Cathepsin K 遺伝子を抑制させることが明らかとなった。Glyco-AGEs-BSA のヒト単球から破骨細胞への分化を負に制御するメカニズムとして、Glyco-AGEs-BSA の NF-κB を介した IL-10 産生作用が関与していることが示唆された。

次に 2 型糖尿病閉経後女性 (n=34) と、非糖尿病閉経後女性 (n=22) を対象に、血清 Glyceraldehyde-modified AGEs (Glycer-AGE) 値と骨代謝との関連性を検討した。2 型糖尿病患者の平均罹病期間が 9.7 年、HbA1c 9.2% と血糖コントロール不良であった。Glycer-AGE 値は糖尿病群が非糖尿病群より有意に高かった (20.5 ± 7.9 vs. 15.5 ± 6.6, P = 0.015)。骨形成マーカーである intact-1 型プロコラーゲン-N-プロペプチド (intact-P1NP) は、糖尿病群が非糖尿病群に比べ有意に低かった (39.7 ± 16.1 vs 59.2 ± 25.1, P = 0.001)。骨吸収マーカーである骨型酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ (TRACP-5b) の値は、糖尿病群が低い傾向であった (359 ± 131 vs. 420 ± 155, P = 0.133)。さらに、Glycer-AGE と各骨代謝マーカーの相関を解析したところ、Glycer-AGE は PINP と負の相関傾向 (r = -0.240, P = 0.074)、TRACP-5b と有意な相関 (r = 0.264, P = 0.049) がみられた。以上から 2 型糖尿病患者では AGE 濃度が高く、高 AGE 血症が低骨代謝回転に関連する可能性が示唆された。

グリコールアルデヒド由来 AGE は IL-10 産生を介してヒト単球から破骨細胞への分化を抑制し、AGE の新たな分子基盤が明らかにされた。本研究により糖尿病患者でみられる骨折リスク増加が AGE を介した低骨代謝回転型の病態によりもたらされることが示唆された。今後 AGE をターゲットとした治療が現在の高齢社会において増加している糖尿病、骨粗鬆症に対し有用となることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tanaka Kenichi, Yamagata Kaoru, Kubo Satoshi, Nakayama Shingo, Sakata Kei, Matsui Takanori, Yamagishi Sho-ichi, Okada Yosuke, Tanaka Yoshiya	4. 巻 128
2. 論文標題 Glycolaldehyde-modified advanced glycation end-products inhibit differentiation of human monocytes into osteoclasts via upregulation of IL-10	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bone	6. 最初と最後の頁 115034 ~ 115034
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bone.2019.115034	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
---------	---------