

令和 5 年 6 月 28 日現在

機関番号：82660

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K18548

研究課題名(和文) 脊椎靭帯骨化症の病因解明：糖尿病に伴う終末糖化産物(AGEs)の関与

研究課題名(英文) Etiology of spinal ligament ossification: involvement of advanced glycation end products with diabetes mellitus

研究代表者

矢内 嘉英 (Yanai, Yoshihide)

独立行政法人国立病院機構村山医療センター(臨床研究部)・整形外科・医員

研究者番号：70801900

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)：2型糖尿病モデルラットであるZDFラット(fa/fa)、糖尿病を発症しない肥満モデルラットであるZucker Fattyラット(fa/fa)、そのコントロールであるZucker Fattyラット(+/+)の3群間(約6か月齢)で、後縦靭帯内の終末糖化産物 Advanced Glycation End products (AGEs; MGとCML)の比較をELISAによる定量および組織学的評価で行なった。ELISAでは、MGおよびCMLのいずれにおいてもZDFラットで有意な増加は認めなかった。組織学的評価においても、同様にZDFラットにおいて他種ラットに比し有意に強く染色されることはなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脊椎靭帯骨化症は、糖尿病や肥満を多く合併している傾向があるが、その機序の詳細は不明である。高血糖状態では糖とタンパクは架橋形成により終末糖化産物(Advanced Glycation End Products; AGEs)を形成し、タンパクを変性劣化させることが注目されている。本研究においては、糖尿病ラットにおいて、脊椎靭帯にAGEsの有意な蓄積は認められなかった。この成果は、糖尿病やその他代謝疾患と靭帯骨化の研究発展の一助となると考える。

研究成果の概要(英文)：Comparison of AGEs (MG and CML) in the posterior longitudinal ligament between three groups of rats (about 6 months old): 1) Zucker Diabetic Fatty (ZDF) rats (fa/fa); model rats for type 2 diabetes, 2) Zucker Fatty rats (fa/fa); non-diabetic obese rats, and 3) their control, Zucker Fatty rats (+/+). In ELISA, there was no significant increase in either MG or CML in ZDF rats. Similarly, histological evaluation showed no significantly stronger staining of MG or CML in ZDF rats than in rats of other species.

研究分野：Orthopaedics

キーワード：AGEs diabetes mellitus

## 研究成果報告内容ファイル(アップロードファイル)

### 1. 研究当初の背景

病態に関連する因子として、靭帯骨化症と耐糖能異常や肥満との関連も指摘されているが詳細な発症機序は不明である。2型糖尿病は、腎症、網膜症、末梢神経障害、脳血管障害や虚血性心疾患など、多臓器疾患の原因となっていることは周知の事実であるが、その主な要因の一つとして注目されているのが終末糖化産物(Advanced Glycation End products ; AGEs)の蓄積である。すなわち、糖尿病に伴う高血糖状態では、糖と蛋白の非酵素的な縮合反応により、不可逆的にAGEsを形成する(メイラード反応)。AGEsが蓄積することにより、不良なコラーゲン架橋の形成や、慢性炎症が起こり、様々な臓器における糖尿病合併症が惹起されると考えられている。また、肥満患者においては、非アルコール性脂肪肝(NAFLD)の合併は一般的であるが、その他多くの代謝性疾患との関連も指摘されている。そこで、2型糖尿病、肥満、その他代謝異常に加え、脂肪肝を認める場合、metabolic dysfunction-associated fatty liver disease(MAFLD)という概念が確立しつつあり、MAFLDは高率に後縦靭帯骨化症を認める。肥満患者においては、AGEsが脂肪組織に蓄積されやすいとも報告されている。そこで我々は、糖尿病による高血糖状態が長期間続くと後縦靭帯を構成するタンパク質であるコラーゲンが糖と結合しAGEsとなり、変性劣化、慢性炎症を起こし、その結果、靭帯が徐々に肥大・骨化していくとの仮説を立てた。

### 2. 研究目的

AGEsが後縦靭帯骨化の要因となる可能性を確認することを最終的な目標とし、まず2型糖尿病モデルラットを用いて、高血糖状態の持続により、糖尿病を発症しない肥満モデルラットとそのコントロールラットに比し、AGEsが後縦靭帯に有意に蓄積するかを検証することを本研究の目的とする。

### 3. 研究の方法

2型糖尿病モデルラットである Zucker Diabetic Fatty (ZDF) ラット (fa/fa)、糖尿病を発症しない肥満モデルラットである Zucker Fatty ラット (fa/fa)、そのコントロールである Zucker Fatty ラット (+/+) の3群間で後

縦靱帯内の AGEs 蓄積の程度を比較した。比較は、約 6 ヶ月間飼育した各群のラットにおいて、摘出した後縦靱帯の AGEs の ELISA による定量および組織学的評価により行なった。

#### 1) 血糖、HbA1c の測定

購入時および sacrifice 時に体重、血糖および HbA1c を測定した。ラットの尾静脈から血液を採取し、チェッカーリーダー（東洋紡、大阪）を用いて血糖および HbA1c の測定した。

#### 2) ELISA 測定

イソフルラン吸入により安楽死させた。頸椎～胸椎部の後縦靱帯を摘出し、ELISA 測定までの間 -80℃ で保存した。Zucker fatty ラット (+/+)7 匹、Zucker fatty ラット (fa/fa)13 匹、ZDF ラット (fa/fa)14 匹について、2 種類の AGEs (MG および CML, ng/μg protein) の比較を行った。

#### 3) 組織学的評価

ELISA 測定用とは別に、灌流固定後に頸椎～胸椎を摘出し、パラホルムアルデヒドで固定し保存した。標本に脱灰処理を行った後、標本を横断・薄切し、抗 MG 抗体および抗 CML 抗体を用いた免疫染色を施し、後縦靱帯内における MG と CML の蓄積の程度を評価した。

### 4. 研究成果

#### 1) ELISA

Zucker Fatty ラット (+/+) 7 匹、Zucker Fatty ラット (fa/fa) 13 匹、ZDF ラット (fa/fa)14 匹について、MG および CML (ng/μg protein) の比較を行った。MG (ng/μg protein ± 2SD) については、Zucker fatty ラット (+/+)、Zucker fatty ラット (fa/fa)、ZDF ラット (fa/fa) がそれぞれ  $11.66 \pm 8.19$ 、 $18.08 \pm 7.60$ 、 $18.50 \pm 5.28$  であった。Zucker fatty ラット (+/+) に比較し Zucker fatty ラット (fa/fa)、ZDF ラット (fa/fa) がいずれも有意に高かったが (P=0.03, P=0.02)、Zucker fatty ラット (fa/fa) と ZDF ラット (fa/fa) 間では有意差は認めなかった。(P=0.85)

CML (ng/μg protein ± 2SD) については、Zucker fatty ラット (+/+)、Zucker fatty ラット (fa/fa)、ZDF ラット (fa/fa) がそれぞれ  $0.37 \pm 0.08$ 、 $0.22 \pm 0.12$ 、 $0.16 \pm 0.01$  であった。Zucker fatty ラット (+/+) に比較し Zucker fatty ラット (fa/fa)、ZDF ラット (fa/fa) がいずれも有意に低く

( $P=0.003$ ,  $P<0.001$ )、Zucker fatty ラット(fa/fa)とZDF ラット(fa/fa)間では有意差は認めなかった。(P=0.13)

## 2) 組織学的評価

糖尿病モデルラット(ZDFラット)は、他のラットと比較しても靭帯そのものが菲薄化しており、MGとCMLの染色も弱かった。

## 3) 結論

当初は、糖尿病ラット(ZDFラット)ほど靭帯は肥厚し、AGEsが定量や組織学的評価において有意に蓄積しているであろうと想定していたが、AGEsは他のラットと比較しても有意差をもって蓄積しているわけではないという結果であった。靭帯骨化症と糖尿病が合併しやすい原因には、「糖尿病では靭帯にAGEsが蓄積しやすいため」ということ以外の要因が関与していると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
---------	---------