

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：33803

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05432

研究課題名（和文）糖化ストレス誘導性エクソソームを介した骨機能阻害における食用植物成分の効果

研究課題名（英文）Effects of components in edible plant on glycative stress-inhibited osteoclastogenesis via exosome

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） 4,600,000円

研究成果の概要（和文）：糖分とタンパク質との非酵素的な反応である糖化反応の結果、様々な終末糖化産物（AGEs）が生体内で産生される。疫学調査にてAGEsの蓄積と骨折リスクの増大の関連が報告されているが、我々は培養細胞を用いて、正常な骨形成に係る破骨細胞の分化がAGEsにより抑制されることを見出した。本研究ではAGEsによりエクソソーム内の含有量が上昇するmicroRNA（miRNA）が、破骨細胞分化に必須な転写因子であるMicrophthalmia-associated transcription factor, isoform E（MitF-E）の発現を抑制することを網羅的解析及び強制発現系を用いて示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖化ストレスにより生体内で生じるAGEsの蓄積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。本課題ではAGEsと骨折リスクに焦点を当て詳細なメカニズムに関する知見を得ることを目的としており、具体的な作用点を明らかにすることで、我々が並行して進めているAGEs産生を抑制する（抗糖化）機能を有する植物素材の有用性の検証につなげる。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、本課題の遂行により抗糖化の観点から植物素材の評価系を確立することで、新たな機能性食品候補の検証等において健康産業に貢献可能と考えている。

研究成果の概要（英文）：Glycation, a non-enzymatic reaction between sugar and protein, results in the production of various glycation end products (AGEs) in vivo. Epidemiological studies have reported an association between AGEs accumulation and increased risk of bone fracture and we found that AGEs inhibit osteoclastogenesis in culture cells. In the present study, we found that AGEs increased multiple microRNAs (miRNAs) in exosomes and some of them contribute to suppression of microphthalmia-associated transcription factor, isoform E (MitF-E), an essential transcription factor for osteoclastogenesis using comprehensive analysis and over expression study.

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、様々な終末糖化産物(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。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。それ以外にも、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っており、加齢・疾病に伴う骨量・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。
- (2) 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研究を進めており、これまでに 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。更に破骨細胞分化抑制の作用機序として、AGEs が破骨細胞分化に必須の転写因子のうち少なくとも2つ、Microphthalmia-associated transcription factor, isoform E (MitF-E)及び Nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic 1 (NFATc1)の発現を抑制すること、また MitF-E については細胞外分泌小胞であるエクソソームを介した間接的な制御によるものである可能性を示した。しかしながら、AGEs による破骨細胞分化転写因子の抑制メカニズムは明らかではない。
- (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。また、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、MitF-Eにより発現が制御さ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することも明らかにした。このことからヤーコン抽出液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、詳細なメカニズムは明らかではない。

2. 研究の目的

本研究では、糖化ストレスが引き起こす骨機能低下における AGEs の作用点を解明することを目的とした。

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、分化に必須の転写因子である MitF-E の発現量及び分化マーカーである酒石酸耐性酸性フォスファターゼ (tartrate-resistant acid phosphatase; TRAP)の活性で評価した。AGEs はヒト血清アルブミン (human serum albumin, HSA)とグリセルアルデヒドを混合し、60℃で40時間加温した後に限外濾過により未反応の低分子化合物を除去することで作製した。培養上清からのエクソソームの単離は磁気ビーズ法で行い、エクソソームから抽出した miRNA は mouse microRNA Oligo Chip (3D-Gene)を用いた網羅的解析に供した。

(2) miRNA の強制発現ベクターの作製は、RAW264.7 細胞のゲノム DNA をテンプレートとし Pre-miRNA 領域を含む 250bps ほどを PCR により増幅し、pmR-ZsGreen1 Vector (Takara Bio.) に組みこみ作製した。RAW264.7 細胞に Lipofectamine LTX 及び PLUS reagent を用いてベクターをトランスフェクションした。36 時間後に細胞に任意の刺激を与え、RNA を精製後に real-time PCR による解析を行った。

4. 研究成果

本研究ではエクソソームに含まれる小分子RNAであるマイクロRNA(miRNA)に着目し、破骨細胞前駆細胞の分化過程において細胞培養液中に放出されたエクソソームを分離・精製し、含まれるmiRNAについてマイクロアレイを用いた網羅的な解析を行った。その結果、AGEs添加の有無によりエクソソームのサイズや数量に有意な変化は認められなかったが、含まれるmiRNAの発現パターンは大きく異なった。AGEsにより10倍以上発現亢進が生じたmiRNAは112種類、10倍以上発現が抑制されたmiRNAは103種類であった。更にAGEs添加によりエクソソーム内で増加するmiRNAについて*in silico*解析を行い、MitF-EあるいはMitF-Eの発現制御に関わる転写因子のmRNAの制御に関わる可能性の高いmiRNAについてreal-time PCRによるデータの再現性を検証した。再現性が認められた4種類のmiRNAについて強制発現ベクターの作製を行った(図1)。作製した強制発現ベクターをRAW264.7細胞内へ導入しRANKL添加24時間後の細胞からRNAを精製し、real-time PCRを行った結果、2種類のmiRNAがMitF-Eの発現制御に関わる可能性が示唆された(図2)。

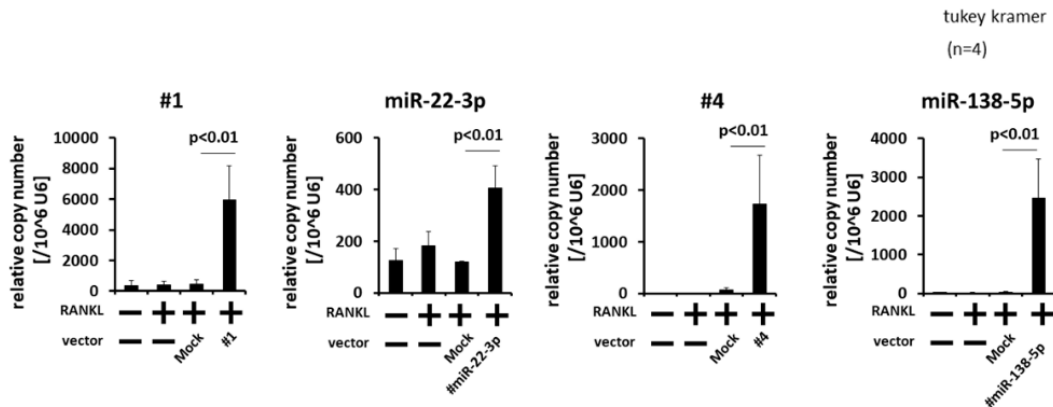


図1 miRNA強制発現ベクターによる細胞内のmiRNA発現量の変化

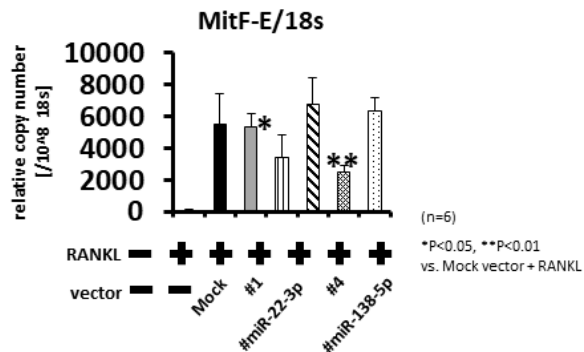


図2 miRNA強制発現がMitF-E発現レベルに与える影響

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 高部 稚子	4. 巻 31
2. 論文標題 エクソソーム中の糖化ストレス誘導性miRNAの網羅的解析	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 静岡理工科大学 紀要	6. 最初と最後の頁 14, 19
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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1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, 高津 佑太, A. N. M. Mamun-Or-Rashid, Tanzima Tarannum Lucy, 八木 雅之, 米井 嘉一
2. 発表標題 エクソソームに含まれる糖化ストレス誘導性miRNAによる破骨細胞分化抑制メカニズムの解明
3. 学会等名 第24回日本抗加齢医学会総会
4. 発表年 2024年

〔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
---------	---------