

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24年 5月 18日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790790

研究課題名（和文）糖化最終産物受容体の低回転骨における役割の解明

研究課題名（英文）The Role of Receptor for AGEs (RAGE) on Low Turnover Bone

研究代表者

濱田 康弘 (HAMADA YASUHIRO)

神戸大学・医学部附属病院・特命講師

研究者番号：30397830

研究成果の概要（和文）：現在までに、ストレプトゾトシン誘発糖尿病マウスが、低回転骨モデル動物であることを報告している (Hamada Y et al. Bone 40, 1408-1414, 2007)。糖尿病状態においては糖化最終産物 (Advanced glycation end products: AGEs) が蓄積していることが知られており、この AGEs が糖尿病において低回転骨をきたす原因のひとつと考え、AGEs の受容体のひとつである糖化最終産物受容体 (Receptor for AGEs: RAGE) の低回転骨病変に及ぼす影響につきモデル動物を用いた検討を行った。実験には全身で RAGE 遺伝子を欠損させた RAGE ノックアウトマウスを用い、野生型マウスとの骨代謝における違いを解析した。解析の結果、通常の状態にあっても RAGE 遺伝子をノックアウトすると骨量増加、骨吸収能の抑制がみられ、糖化最終産物の蓄積がない状態で RAGE が骨代謝に影響を及ぼすことがわかった。一方で、予想に反して糖化最終産物が蓄積し低回転骨をきたす糖尿病状態においては RAGE ノックアウトマウスと野生型マウスに違いはみられず、どちらも骨形成も骨吸収も抑制されるような低回転骨を示した。

研究成果の概要（英文）：We have reported that diabetes induced low turnover bone in streptozotocin-induced diabetic mouse. It has been reported that AGEs and the receptor for AGEs (RAGE) have been linked to the pathogenesis of diabetic microangiopathy. However, the relationship between RAGE and alteration in bone metabolism is unclear. Therefore, in order to determine the role of RAGE in bone metabolism, we investigated the effects of RAGE deletion on bone metabolism under physiological and diabetic conditions using RAGE knockout mice (RAGE-KO). Eight-week-old male RAGE-KO and wild-type littermates (WT) were intraperitoneally injected with either streptozotocin or vehicle. Mice were divided into four groups: 1) nondiabetic WT; 2) nondiabetic RAGE-KO; 3) diabetic WT; and 4) diabetic RAGE-KO. After 12 weeks of streptozotocin or vehicle treatment, the physical properties of femora and the static and dynamic parameters of bone histomorphometry of tibiae were assessed. The deletion of RAGE affected neither body weights nor hemoglobin A1c levels. RAGE deletion resulted in increased bone mineral density due to decreased osteoclast function under physiological conditions that is no accumulation of AGEs. In contrast, lacking RAGE did not affect the alteration in bone metabolism under diabetic conditions, suggesting that AGEs-RAGE interaction may not be involved in the pathogenesis of diabetic osteopenia, which expresses low turnover bone, although RAGE plays an important role in bone metabolism.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医師薬学

科研費の分科・細目：腎臓内科学

キーワード：糖尿病、骨病変、合併症

1. 研究開始当初の背景

腎機能が低下すると「慢性腎臓病に伴う骨ミネラル代謝異常 (Chronic Kidney Disease-Mineral and Bone Disorder: CKD-MBD)」という病態があらわれ (Moe S. et al: *Kidney Int.* 69:1945-1953: 2006)、この CKD-MBD は生命予後、Quality of Life (QOL) に大きな影響を及ぼす。さらにこの CKD-MBD の中でも骨代謝回転が低下したいわゆる低回転骨が近年増加しており (D' Haese PC, et al: *Kidney Int Suppl* 85:S73-S78, 2003)、効果的な治療法が存在しない。

この低回転骨の発症進展メカニズムの一つとして糖化最終産物 (Advanced glycation end products: AGEs) の受容体のひとつである Receptor for AGE (RAGE) に注目した。AGEs はグルコースなどの還元糖とたんぱく質が非酵素的な糖化反応 (メイラード反応) を起こし生成する構造体の総称であり代表的なものにカルボキシルメチルリジン、ペントシジン、ピラリンなどがある。現在までに、この AGEs は末期腎不全患者や糖尿病患者の血液中、組織中で増加していることが報告されている。

2. 研究の目的

末期腎不全患者や糖尿病患者の血液中、組織中で増加する AGEs およびその受容体である RAGE に注目した。低回転骨は骨質の低下をきたし骨折リスクが増大するだけでなく、異所性石灰化の原因としても注目され生命予後に影響を及ぼすにもかかわらず、発症進展機序は不明な点が多く根本的な治療法も存在しない。上記背景より、低回転骨病変における AGEs-RAGE 系の関与を解明することが、新しい治療法の確立につながるのではないかと考えた。そこで、低回転骨における AGEs-RAGE 系の関与を解明するため、AGEs の受容体のうちで主要なものの一つであり、特に糖尿病性腎症、網膜症との関与が示唆されている RAGE の遺伝子を全身で欠損させた RAGE ノックアウトマウス (RAGE-K/O) に糖尿病を誘発し、血液中、組織中で AGEs を増加させ、その骨病変について骨形態計測も含めた詳細な解析を行うことを立案した。

3. 研究の方法

全身で RAGE の発現を消失させた RAGE ノックアウトマウス (RAGE-K/O) を用いて糖尿病に伴う低回転骨の詳細な解析を行った。スト

レプトゾトシン投与により糖尿病を誘発し、マウスを 1) 非糖尿病 wild type mouse、2) 非糖尿病 RAGE-K/0、3) 糖尿病 wild type mouse、4) 糖尿病 RAGE-K/0 の 4 群にわけ、RAGE が糖尿病性の低回転骨の進展増悪において果たす役割を解析した。

上記のマウス群のそれぞれにおいて血液、尿を採取し、生化学項目測定、副甲状腺ホルモン測定、骨代謝マーカー測定を行った。同時に骨の採取も行い、骨密度測定、カルセイン投与による石灰化速度 (MAR:mineral apposition rate) 等の測定を行いそれぞれのマウス群間での比較検討を行う。さらに非脱灰骨組織標本も作成し、ゴールドナー染色等の特殊染色を行い、骨梁表面が骨形成面であるか、骨吸収面であるかを判断して、骨形態計測をおこなった。

4. 研究成果

われわれはこれまでにストレプトゾトシン誘発糖尿病マウスが、低回転骨モデル動物であることを報告している (Hamada Y et al. Bone 40, 1408-1414, 2007)。糖尿病状態においてはさまざまな代謝異常が生じるが、糖尿病患者においては、血清中および臓器にお

いて糖化最終産物 (Advanced glycation end products: AGEs) が蓄積していることが知られている。そこで、この AGEs が糖尿病において低回転骨をきたす原因のひとつと考え、AGEs の受容体のひとつである糖化最終産物受容体 (Receptor for AGEs: RAGE) の低回転骨病変に及ぼす影響につきモデル動物を用いた検討を行った。実験には全身で RAGE 遺伝子を欠損させた RAGE ノックアウトマウスを用い、野生型マウスとの骨代謝における違いを解析した。解析の結果、通常の状態にあっても RAGE 遺伝子をノックアウトすると骨量増加、骨吸収能の抑制がみられ、糖化最終産物の蓄積がない状態で RAGE が骨代謝になんらかの影響を及ぼすことがわかった。一方で、予想に反して糖化最終産物が蓄積し低回転骨をきたす糖尿病状態においては RAGE ノックアウトマウスと野生型マウスに違いはみられず、どちらも骨形成も骨吸収も抑制されるような低回転骨を示した。

これら成果の一部は英文雑誌 Endocrine に投稿し受理されている (Hamada Y et al. Endocrine 38, 369-376, 2010)。また、これまでの研究結果をまとめた英文総説 (Title: Free Radicals and Diabetic Bone Disorder)

も現在、投稿済みで査読中の段階である。

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2件)

- ① Goto S, Fujii H, Kono K, Nakai K, Hamada Y, Yamato H, Shinohara M, Kitazawa R, Kitazawa S, Nishi S, Fukagawa M. Carvedilol ameliorates low-turnover bone disease in non-obese type 2 diabetes. Am J Nephrol. 2011;34(3):281-90. 査読あり
- ② Hamada Y, Kitazawa S, Kitazawa R, Kono K, Goto S, Komaba H, Fujii H, Yamamoto Y, Yamamoto H, Usami M, Fukagawa M. The effects of the receptor for advanced glycation end products (RAGE) on bone metabolism under physiological and diabetic conditions. Endocrine. 2010 Dec;38(3):369-76. 査読あり

[学会発表] (計3件)

- ① 濱田康弘、抗酸化ストレス作用が低回転骨病変に及ぼす効果の解明、第4回慢性腎臓病病態研究会、2011.7.30、東京
- ② 濱田康弘、糖尿病と骨病変、兵庫県糖尿病協会栄養部会、2011.6.11、神戸
- ③ 濱田康弘、糖化最終産物 (RAGE) の骨代謝における役割の解明、第3回CKD病態研究会、2010.7.31、東京

[図書] (計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

濱田 康弘 (HAMADA YASUHIRO)

神戸大学・医学部附属病院・特命講師

研究者番号：30397830