

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861558

研究課題名(和文)メチルグリオキサールによる骨芽細胞分化制御機序の解明

研究課題名(英文)Modulation of osteoblast functions by Methylglyoxal

研究代表者

吉村 健太郎 (Yoshimura, Kentaro)

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：10585699

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：近年、糖尿病の新たな合併症として骨粗鬆症が注目されている。2型糖尿病では骨量が減少しないにもかかわらず骨折リスクが増加するが、その理由として、骨基質が終末糖化産物(AGEs)によって変性し、劣化することで脆弱性を示すと考えられている。

我々は2型糖尿病で血中濃度が増加するAGEsであるメチルグリオキサール(MG)に着目し、MGが骨芽細胞の石灰化に及ぼす影響について解析した。マウス骨芽細胞様細胞株MC3T3-E1細胞の石灰化物はMG添加によって硬さが増し、粘弾性が低下した。このことから、MGは石灰化物の物性を変化させることで2型糖尿病患者の骨質に影響を与える可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Recently attention has been paid to the osteoporosis in diabetic patients. Bone fracture risks increase in type 2 diabetes patients without declining their bone mineral density. It is considered that denaturation of bone matrix by advanced glycation endproducts (AGEs) causes their bone fragility.

We examined the effect of methylglyoxal (MG), one of the AGEs, on calcification by osteoblastic MC3T3-E1 cells in vitro. MG caused increase in hardness and decrease in viscoelasticity of calcified nodules formed in the cultures of MC3T3-E1 cells. These results indicate a possibility that MG-induced change in physical properties of the calcified matrix causes the fragility of bones in patients with type 2 diabetes.

研究分野：口腔生化学

キーワード：メチルグリオキサール 骨芽細胞 石灰化 AGEs BMP アルカリホスファターゼ

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 糖尿病は血糖値を低下させるホルモンであるインスリンの分泌低下もしくは感受性の低下により糖代謝異常を生じる疾患である。3大合併症として神経障害・網膜症・腎症が知られているが、近年、新たな合併症として骨粗鬆症が注目されている。糖尿病はインスリン分泌が枯渇する1型と主にインスリン抵抗性を示す2型に分類され、1型糖尿病に続発する骨粗鬆症は骨芽細胞のインスリンシグナルの減少による骨形成の低下が原因と考えられている。しかし、2型糖尿病では骨折リスクは上昇することが報告されているがインスリンシグナルに依存しない骨芽細胞の糖代謝異常が骨代謝調節に及ぼす影響は不明である。

(2) 最近、メチルグリオキサール(MG)が、2型糖尿病患者の血管障害発症リスクと強い相関を持つことが報告された。MGは解糖系で副産物として生じる化学反応性の高い物質であり、糖尿病患者ではMGの血中濃度が増加する。MGは骨基質を糖化変性し骨質を劣化させる最終糖化産物(AGEs)の形成に関わることが知られているが、高MG環境下の骨芽細胞の分化制御および機能発現に対するMG代謝の影響を細胞レベルで解析した報告はない。申請者は、MGの代謝物である乳酸のトランスポーターMCT-1の阻害が、骨芽細胞のアルカリホスファターゼ(ALP)の遺伝子発現を抑制することを発見した。この知見はMGが骨芽細胞の分化および石灰化を促進する新たなシグナル分子である可能性を示唆する。そこで、MGや乳酸による骨芽細胞の代謝およびシグナル調節メカニズムを解析することで、2型糖尿病に続発する『骨量が低下しない骨粗鬆症』のパラドックスの解明が可能になると考えた

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、2型糖尿病に続発する骨代謝障害におけるメチルグリオキサール(MG)の役割を解明し、MG等の糖代謝産物を標的とした新たな骨粗鬆症の予防・治療方法を開発することである。

### 3. 研究の方法

メチルグリオキサール(MG)による骨芽細胞分化制御メカニズムを解明し、2型糖尿病性骨粗鬆症に対するMG等の糖代謝産物を標的とした骨代謝改善の有効性を評価するために以下の項目を2年間にわたり解析した。

(1) マウス筋芽細胞株 C2C12 細胞を骨形成タンパク質(BMP)で刺激し骨芽細胞分化を誘導する培養系にMGを添加し、実験的に高MG血症を再現して骨芽細胞分化をアルカリホスファターゼ(ALP)活性染色により評価する。さらにALP、骨芽細胞分化の主要な分化マーカーである、Runx2、Osterix等の転写因子およびオステオカルシン、オステオポンチン等の骨基質タンパ

クの遺伝子発現を real time RT-PCR で解析し、MGが骨芽細胞分化に及ぼす影響を明らかにする。

(2) 2型糖尿病の骨脆弱性が骨基質タンパクの糖化による骨質劣化に起因することは報告されているが、無機成分まで含む石灰化物の組成に生じる変化は不明である。マウス骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 細胞を高MG環境下で石灰化誘導培養し、石灰化硬組織形成能を Alizarin red 染色、von Kossa 染色で評価し、硬組織の微少硬さとヤング率をナノインデンテーション法で測定し、無機成分の化学的組成をラマン分光分析法で解析する。

### 4. 研究成果

マウス筋芽細胞株 C2C12 細胞をリコンビナントヒト BMP-2 で刺激し骨芽細胞文化を誘導する系において、MGは0~2mMの濃度で、濃度依存的にALP活性を上昇させた。また、ALPの遺伝子発現も上昇させた。一方で、転写因子である Runx2、Osterix および骨基質タンパクであるオステオカルシン、オステオポンチンの遺伝子発現には変化を生じなかった。

マウス骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 細胞を高MG環境下で石灰化誘導培地を用いて培養し、石灰化物形成を誘導する系において、MGは0~0.2mMの濃度でALP活性が濃度依存的に上昇する傾向が見られたものの、有意な差は生じなかった。0.2mMの濃度でMGを添加した培養系で生じた石灰化物をナノインデンテーション法で物理的性質を測定したところ、対照と比べて硬さが増し、粘弾性が低下していた。これは形成された石灰化物が対象と比べて硬く脆い性質を示したと考えられる。以上より、MGは骨芽細胞のALP活性を低下させず、石灰化物の物性を変化させることで2型糖尿病の骨質に影響を与える可能性が示唆された。

### 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8件)

Yoshimura K. Biphasic activation of nuclear factor-kappa B in chondrocyte death induced by interleukin-1beta: The expression of inducible nitric oxide synthase and phagocyte-type NADPH oxidase through immediate and monocarboxylate transporter-1-mediated late-phase activation of nuclear factor-kappa B. *J Oral Biosci.* 58: 39-44, 2016 (査読:有)

Saito A, Yoshimura K., Miyamoto Y, Kaneko K, Chikazu D, Yamamoto M, Kamijo R. Enhanced and suppressed mineralization by acetoacetate and -hydroxybutyrate in osteoblast cultures. *Biochem Biophys*

Res Commun. 473: 537-544, 2016(査読：有)  
Suzuki H, Mochizuki A, Yoshimura K, Miyamoto Y, Kaneko K, Inoue T, Chikazu D, Takami M, Kamijo R: Bropirimine inhibits osteoclast differentiation through production of interferon-. Biochem Biophys Res Commun, 467:146-151, 2015 (査読：有)

Ono M, Suzawa T, Takami M, Yamamoto G, Hosono T, Yamada A, Suzuki D, Yoshimura K, Watahiki J, Hayashi R, Arata S, Mishima K, Nishida K, Osumi N, Maki K, Kamijo R. Localization and osteoblastic differentiation potential of neural crest-derived cells in oral tissues of adult mice. Biochem Biophys Res Commun, 464: 1209-1214, 2015 (査読：有)

Miyamoto S, Miyamoto Y, Shibata Y, Yoshimura K, Izumida E, Suzuki H, Miyazaki T, Maki K, Kamijo R: In-situ quasi-static and dynamic nanoindentation assessment of calcified nodules: Implication of glucocorticoids responsible for osteoblast calcification. Acta Biomater 12:216-226, 2015 (査読：有)

Ikumi N, Suzawa T, Yoshimura K, Kamijo R: Bone Response to Static Compressive Stress at Bone-Implant Interface: The Pilot Study of Critical Static Compressive stress. Int J Oral Maxillofac Implants, 30: 827-833, 2015(査読：有)

Funato S, Matsunaga A, Oh K, Miyamoto Y, Yoshimura K, Tanaka J, Suzuki D, Uyama R, Suzuki H, Mishima K, Nakamura M, Namiki O, Baba K, Inagaki K, Kamijo R: Effects of antibody to receptor activator of nuclear factor -B ligand on inflammation and cartilage degradation in collagen antibody-induced arthritis in mice. J Neg Results BioMed 13:18, 2014(査読：有)

Akiyama T, Miyamoto Y, Yoshimura K, Yamada A, Takami M, Suzawa T, Hoshino M, Imamura T, Akiyama C, Yasuhara R, Mishima K, Maruyama T, Kohda C, Tanaka K, Potempa J, Yasuda H, Baba K, Kamijo R. Porphyromonas gingivalis-derived lysine gingipain enhances osteoclast differentiation induced by tumor necrosis factor- and interleukin-1 but suppresses that by interleukin-17A. Importance of proteolytic degradation of osteoprotegerin by lysine gingipain. J Biol Chem 289:15621-15630, 2014 (査読：有)

[学会発表](計 12 件)

金子児太郎、宮本洋一、吉村健太郎、近津

大地、赤池孝章、上條竜太郎：一酸化窒素の新規代謝産物 8-nitro-cGMP による骨代謝調節。昭和大学歯学部文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業 平成 27 年度シンポジウム。東京、2016 年 3 月 12 日

鈴木大、宮本洋一、山田篤、須澤徹夫、吉村健太郎、宇山理紗、山本松男、上條竜太郎：microRNA による骨軟骨形成に関与する遺伝子発現制御の解析。昭和大学歯学部文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業 平成 27 年度シンポジウム。東京、2016 年 3 月 12 日

Funato S, Yasuhara R, Miyamoto Y, Yoshimura K, Mishima K, Baba K, Kamijo R. Phagocyte-type NADPH oxidase-derived reactive oxygen species is crucial for activation of hyaluronidase and degradation of extracellular matrix in chondrocytes stimulated by interleukin-1 $\beta$ . 2015 Cell biology ASCB Annual Meeting. San Diego, California, USA. 2015 年 12 月 12 日 -15 日

船登咲映、安原理佳、宮本洋一、吉村健太郎、美島健二、馬場一美、上條竜太郎。炎症性軟骨基質減少の分子メカニズムの解明。第 62 回昭和大学学士会総会。東京。2015 年 11 月 28 日

Funato S, Yasuhara R, Miyamoto Y, Yoshimura K, Mishima K, Baba K. Interleukin-1 $\beta$  induces activation of hyaluronidase and degradation of extracellular matrix in murine chondrocytes in a phagocyte-type NADPH oxidase-derived reactive oxygen species-dependent manner. 第 63 回国際歯科研究学会日本部会総会・学術大会 (JADR 2015)。福岡。2015 年 10 月 30 日-31 日

井汲憲治、須澤徹夫、吉村健太郎、上條竜太郎。骨/インプラント界面の静的圧縮応力に対する骨の反応-静的圧縮の限界応力に関する研究。第 57 回歯科基礎医学会学術大会・総会。新潟。2015 年 9 月 11 日-13 日

Hoshino M, Miyamoto Y, Yoshimura K, Suzuki D, Akaike T, Mishima K, Baba K, Kamijo R. 8-nitro-guanosine-cyclic monophosphate mediates elongation of the growth plate cartilage in mice. The 2014 ASCB/IFCB Meeting. Philadelphia, PA, USA. 2014 年 12 月 6 日-11 日

Hoshino M, Kaneko K, Miyamoto Y, Yoshimura K, Suzuki D, Akaike T, Chikazu D, Baba K, Kamijo R. Endogenously produced persulfides enhance bone elongation. Japanese Association for Dental Research 62th Annual Meeting. 大阪。2014 年 12 月 4 日-5 日

星野真理江、宮本洋一、吉村健太郎、田中準一、美島健二、馬場一美、上條竜太郎。8-nitro-cGMP はマウス成長版の伸長を促進する内因性シグナル分子である。第 56 回歯

科基礎医学会学術大会・総会・福岡・2014年  
9月25日-27日

齋藤彰大、吉村健太郎、宮本洋一、山本松  
男、上條竜太郎・ケトン体は骨芽細胞機能を  
調節する。第32回日本骨代謝学会。大阪。  
2014年7月24日-26日

11 宮本尚、宮本洋一、吉村健太郎、榎宏太  
郎、上條竜太郎・グルココルチコイド系ステ  
ロイドは骨芽細胞によるアパタイト含有石  
灰化物形成とその硬さを向上させる。第32  
回日本骨代謝学会。大阪。2014年7月24日  
-26日

12 Saito A, Yoshimura K, Miyamoto Y,  
Yamamoto M, Kamijo R. Modulation of  
osteoblast functions by Ketone bodies.  
92nd General Session & Exhibition of IADR.  
Cape Town, South Africa, 2014年6月25日  
-28日

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

吉村 健太郎 (Yoshimura, Kentaro)

昭和大学 歯学部口腔生化学講座 助教

研究者番号：10585699

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：