

令和元年6月14日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09240

研究課題名(和文)骨による筋組織制御機構の解明

研究課題名(英文) Regulation of muscle metabolism by bone

研究代表者

杉本 利嗣 (Sugimoto, Toshitsugu)

島根大学・学術研究院医学・看護学系・教授

研究者番号：00226458

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：閉経後2型糖尿病女性を対象とした横断研究により、血中オステオグリシン濃度が大腿骨頸部骨密度と負の相関を示し、椎体骨折リスクに關与することが明らかとなった。筋芽細胞株C2C12を用いた検討により、オステオカルシンが筋分化を促進する可能性が考えられた。Advanced glycation end products (AGEs)が筋分化を抑制し、筋芽細胞のアポトーシスを促進することが示された。高グルコース環境下ではAGEsによるアポトーシス促進作用が増強された。また、insulin like growth factor-IがAGEs、高グルコースによる負の作用を改善することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

以前の我々のin vitro研究でオステオグリシンが骨芽細胞に影響する可能性が示唆されたが、今回初めてヒトを対象とした研究により、血中オステオグリシンと骨代謝とに關連性があることが示された。さらに、AGEsは骨のみならず筋組織にも悪影響を及ぼす骨粗鬆症とサルコペニアの共通した増悪因子であることが示され、その治療標的としてIGF-1-Aktシグナルが候補となることが示された。これらの結果は筋と骨との相互關連(筋骨連關)を考えるうえで重要な結果であり、今後の臨床応用に向けたさらなる研究が期待される。

研究成果の概要(英文)：A cross sectional study showed that serum osteoglycin level was negatively associated with bone mineral density at femoral neck and positively with vertebral fracture risk in postmenopausal women with type 2 diabetes. In in vitro studies, osteocalcin might stimulate differentiation of myoblastic C2C12 cells. Advanced glycation end products (AGEs) inhibited differentiation of myoblasts and increased apoptosis in C2C12 cells. High glucose enhanced the detrimental effects of AGEs on myoblasts. Insulin-like growth factor-I rescued the negative effects of high glucose and AGEs on myoblasts.

研究分野：内分泌代謝学

キーワード：AGEs オステオグリシン IGF-1 筋芽細胞 筋骨連關 サルコペニア 骨粗鬆症 グルコース

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

超高齢社会を迎えたわが国において、健康寿命に直接影響する骨粗鬆症とサルコペニア（筋肉減少症）は医学的にも社会的にも重要な疾患である。骨粗鬆症とサルコペニアは加齢とともに増加し、同一患者に共存することが多い疾患であるが、これまでは骨と筋肉は独立して体を支える支持組織であると考えられてきた。近年の研究により、骨と筋肉から様々なホルモンが分泌されることが明らかになり、両組織は内分泌臓器として認識されるようになってきた。したがって、骨粗鬆症とサルコペニアは偶然同一患者に共存するのではなく、両者に共通の影響因子が存在することや、相互に関連し合うことによって合併している可能性（筋骨連関）が考えられる。

我々は以前に筋芽細胞から分泌されるオステオグリシン (OGN)、family with sequence similarity 5, member C (FAM5C)が骨芽細胞の分化と石灰化を制御することを報告した。しかしながら、ヒトにおける OGN、FAM5C が骨代謝に及ぼす影響については不明である。一方、骨芽細胞から特異的に分泌されるオステオカルシンに全身の糖・エネルギー代謝を制御するホルモンとしての役割があることが明らかになった。さらに、骨細胞で特異的に発現するスクレロスチンは Wnt シグナルを阻害する分泌蛋白であり、血中に分泌されることからホルモンとして作用する可能性が考えられる。Wnt シグナルは筋分化に促進的に働くと報告されているが、スクレロスチンの筋細胞に与える影響については不明である。

我々は advanced glycation end products (AGEs)が骨芽細胞、骨細胞の機能を低下させることにより骨脆弱性を引き起こすことを報告した。さらに、我々は AGEs が筋芽細胞の分化を阻害すること、ヒトにおいて AGEs の一つであるペントシジンの血中濃度上昇が筋肉量と負の相関を示すことを明らかにし、AGEs がサルコペニアの誘導物質である可能性を報告した。一方、増殖因子である insulin-like growth factor-I (IGF-I)は古くから骨形成、骨リモデリング、筋量増加に影響する因子として知られている。加齢とともに IGF-I は低下することから、骨粗鬆症、サルコペニアなどの加齢に伴い発症する疾患の関連因子として考えられている。しかしながら、AGEs による筋細胞への悪影響に対して IGF-I が保護的に作用するか否かは不明である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、以下の3点である。

- (1) 筋組織より分泌される OGN、FAM5C の血中濃度と骨代謝、骨密度、骨折リスクとの関連性を明らかにする。
- (2) 骨由来蛋白であるオステオカルシン、スクレロスチンが筋芽細胞分化に影響するか否かを明らかにする。
- (3) AGEs が筋芽細胞の分化、アポトーシスに影響するか否かを明らかにし、IGF-I が AGEs の作用を阻害するかを検討する。

3. 研究の方法

上記の研究目的別に記載する。

- (1) 島根大学医学部附属病院内分泌代謝内科に糖尿病管理目的に受診した閉経後2型糖尿病患者を対象に、血中 OGN、FAM5C 濃度と骨代謝マーカー[骨型アルカリホスファターゼ (BAP)、オステオカルシン、尿中 NTX]、骨密度 (bone mineral density, BMD)との関連を重回帰分析により検討する。さらに、既存椎体骨折の有無を胸腰椎 X 線により評価し、椎体骨折の有無に対する血中 OGN、FAM5C 濃度との関連をロジスティック回帰分析により検討する。
- (2) マウス筋芽細胞株 C2C12 を用いて、オステオカルシン、スクレロスチンによる筋分化マーカー(MyoD、Myogenin)発現への影響を検討する。
- (3) マウス筋芽細胞株 C2C12 を用いて、AGEs、IGF-I による筋分化マーカー、アポトーシスへの影響を検討する。

4. 研究成果

上記の研究目的別に記載する。

(1) 血中 OGN、FAM5C の骨代謝マーカー、骨密度、骨折リスクとの関連性

閉経後2型糖尿病患者女性 156 人を対象とした。

患者背景は、年齢 67.5 ± 9.8 歳、body mass index (BMI) 24.1 ± 4.6 kg/m²、空腹時血糖 158.0 ± 62.5 mg/dL、HbA1c $8.5 \pm 2.3\%$ 、糖尿病罹病期間 12.7 ± 10.4 年、腰椎 BMD 0.856 ± 0.189 g/cm²、大腿骨頸部 BMD 0.625 ± 0.127 g/cm²、橈骨遠位3分の1BMD 0.517 ± 0.086 g/cm²、BAP 31.8 ± 12.4 U/L、オステオカルシン 7.3 ± 3.8 ng/mL、尿中 NTX 52.6 ± 33.0 nMBCE/mM-Cr、骨格筋指数(relative skeletal muscle mass, RSMI) 6.33 ± 1.03 kg/m²、OGN 83.8 ± 28.2 pg/mL、FAM5C 3.04 ± 2.22 ng/mL であった。OGN、FAM5C、RSMI、骨代謝マーカーは正規分布しなかったため log 変換して統計解析を行った。

OGN、FAM5C と各パラメーターとの関連性

単相関において、OGN は糖尿病罹病期間と有意な正の相関を認め ($r = 0.19, p = 0.029$)、大腿骨頸部 BMD と有意な負の相関を認めた ($r = -0.18, p = 0.029$)。FAM5C は尿中 NTX と有意な正の相関を認めた ($r = 0.18, p = 0.041$)。

年齢、糖尿病罹病期間、BMI、血清クレアチニン、HbA1cにて補正した重回帰分析において、OGNは大腿骨頸部BMDと有意な負の相関を認めたが、他の骨指標とは有意な関連を認めなかった。FAM5Cはいずれの指標とも有意な関連は認めなかった。

OGN、FAM5Cと椎体骨折の有無との関連性

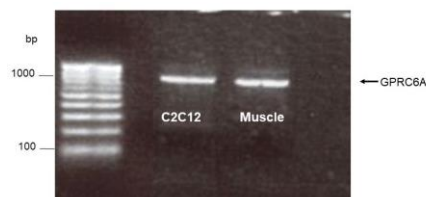
椎体骨折あり群 (n = 57) となし群 (n = 99) の比較 t 検定において、あり群において OGN は有意に高値を示した (100.2 ± 84.7 pg/mL v.s. 74.4 ± 31.7 pg/mL, $p = 0.013$)。一方、FAM5Cには有意な差は認めなかった。

年齢、糖尿病罹病期間、BMI、血清クレアチニン、HbA1cにて補正したロジスティック回帰分析において、OGNが1SD上昇する毎に椎体骨折のリスクは1.84倍に上昇することが示された (odds ratio 1.84, 95%CI 1.03-3.29, $p = 0.039$)。一方、FAM5Cと椎体骨折との間には有意な関連は認めなかった (odds ratio 0.79, 95%CI 0.48-1.30, $p = 0.359$)。

以上の結果より、血中 OGN 濃度は大腿骨頸部 BMD と負の相関を認め、椎体骨折と有意な正の相関を認めた。したがって、血中 OGN の上昇が骨密度低下、椎体骨折リスクと関連することが明らかとなった。本研究は横断解析であり、OGNが骨密度減少、骨折リスク上昇に働くのか、あるいはこれらに対して保護的に働くために上昇しているのかについては明らかではないが、OGNが筋骨連関において重要な役割を担っている可能性が示唆された。

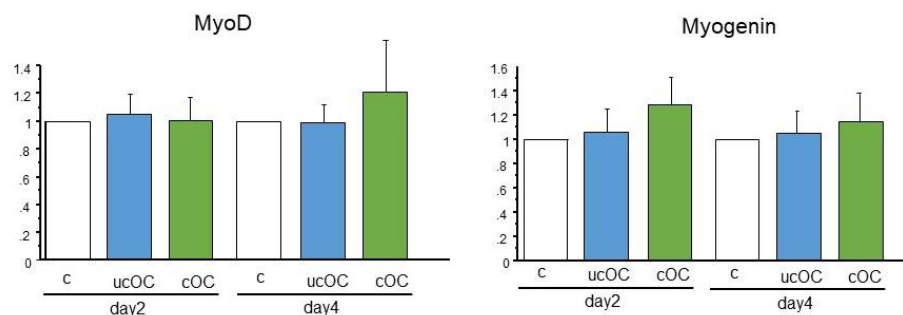
(2) ① 筋芽細胞株 C2C12 におけるオステオカルシンの影響

オステオカルシンの受容体として報告されている G protein-coupled receptor family C group 6 member A (GPCR6A)がC2C12に発現するか否かをRT-PCRにて検討した。C2C12、マウス筋組織のいずれにおいてもGPCR6Aの発現が認められた(右図)。



次に、C2C12細胞を10%ウシ血清含有DMEMで培養し、80%コンフルエントになった後、培養液に2%ウマ血清を添加することにより筋管細胞へ分化させた。その際に100 ng/mLの非カルボキシル化オステオカルシン(ucOC)あるいはカルボキシル化オステオカルシン(cOC)を添加し、筋分化への影響を検討した。

ucOCあるいはcOCを添加後、2、4日目にmRNAを採取し、MyoD、Myogeninの発現をreal-time PCRで検討した。cOC添加によりMyoD、Myogeninの発現はわずかに上昇傾向を認めたが有意な変化ではなかった (n = 10) (下図)。筋分化因子であるMyf5、Myf6への影響も検討したが明らかな影響は認めなかった (データ非表示)。



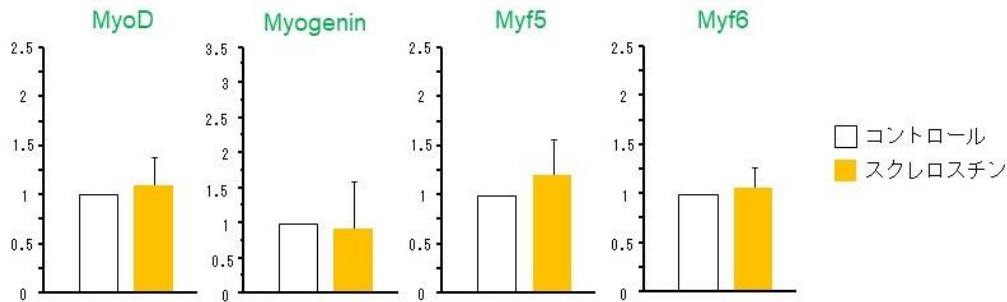
これまでに、筋組織においてオステオカルシンはインスリン作用を増強することによりグルコース取り込みを促進すると報告されており、我々はインスリンと共通の細胞内シグナルをもつIGF-Iに着目し検討を追加した。

IGF-Iの有無によりucOCあるいはcOCの筋分化マーカー、Aktリン酸化に与える影響をreal-time PCR、ウェスタンブロット法により検討した。IGF-Iは有意に筋分化マーカーの発現を増強し、Aktリン酸化を促進したが、ucOCあるいはcOCはIGF-Iの筋分化、Aktリン酸化の作用を増強する結果は得られなかった (データ非表示)。

これらのことから、筋芽細胞株C2C12にはオステオカルシン受容体が発現しており、cOCが筋分化を促進する可能性が示唆されたが、MyoD、Myogenin発現への影響は1.2倍程度でありそれほど強い分化誘導因子ではないと考えられた。また、オステオカルシンはIGF-Iシグナルに明らかな影響はない可能性が考えられた。

② 筋芽細胞株 C2C12 におけるスクレロスチンの影響

C2C12細胞を10%ウシ血清含有DMEMで培養し、80%コンフルエントになった後、培養液に2%ウマ血清を添加することにより筋管細胞へ分化させた。その際に100 ng/mLスクレロスチンを添加し、4日目にmRNAを採取し筋分化マーカーへの影響を検討した。しかしながら、スクレロスチン添加による明らかな筋分化への影響は認めなかった (n = 4) (下図)

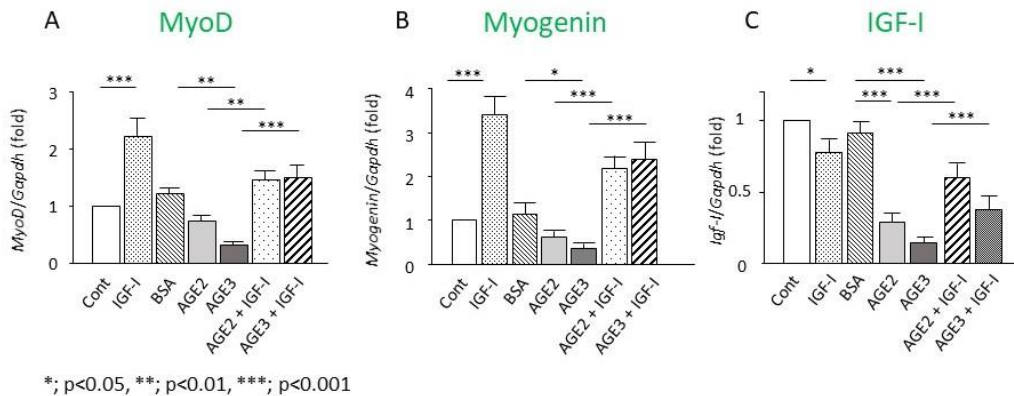


(3) 筋細胞株 C2C12 における AGEs、IGF-I の影響

C2C12 細胞を 10% ウシ血清含有 DMEM で培養し、80% コンフルエントになった後、培養液に 2% ウマ血清を添加することにより筋管細胞へ分化させた。その際に 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ AGE2 あるいは AGE3、100 ng/mL IGF-I を添加し、24 時間後に mRNA を採取し筋分化マーカーへの影響を検討した。既報に従い、AGE2 は glyceraldehyde、AGE3 は glycolaldehyde を用いて作成した。

IGF-I はコントロールに比較して有意に MyoD、Myogenin の発現を増強した (図 1A-B)。一方、AGE3 は非糖化アルブミン(BSA)に比較して有意に MyoD、Myogenin の発現を抑制した。IGF-I は AGE2 あるいは AGE3 との同時添加において、AGE2 あるいは AGE3 単独よりも有意な MyoD、Myogenin 発現増加効果を示した。IGF-I、AGE2、AGE3 はいずれも有意に内因性 IGF-I の I 発現を抑制した (図 1C)。一方、IGF-I は AGE2 あるいは AGE3 との同時添加においては、内因性 IGF-I 発現を有意に上昇した。

図1



AGE2、AGE3、IGF-I の筋分化マーカーの蛋白発現レベルと Akt シグナルに与える影響をウェスタンブロット法にて検討した。

IGF-I はコントロールに比較して MyoD、Myogenin の発現を有意に増強した (図 2A-C)。一方、AGE2、AGE3 は BSA に比較して MyoD、Myogenin の発現を抑制した。IGF-I は AGE2 あるいは AGE3 との同時添加において、AGE2 あるいは AGE3 単独よりも有意な MyoD、Myogenin 発現増加効果を示した。さらに、IGF-I は total Akt、phospho Akt、phospho/total Akt 比いずれも有意に上昇した (図 2A, 2D-F)。一方、AGE2 あるいは AGE3 は IGF-I による phospho Akt、total Akt のいずれも有意に抑制した (図 2A, 2D-E)。

これらのことから、IGF-I は筋芽細胞分化を促進する一方、AGEs は阻害することが示唆された。さらに、IGF-I は AGEs による筋分化抑制作用を改善することが示された。さらに、これらの作用には Akt シグナルが関与する可能性が示唆された。

これまでに高グルコースが AGEs の受容体である receptor for AGEs (RAGE) の発現を増強すると報告されているが、筋芽細胞においても同様かは明らかでない。そこで、高グルコース、AGEs、IGF-I が RAGE 発現に与える影響を real-time PCR にて検討した。

高グルコース(22 mM)は有意に RAGE 発現を増強した (図 3A)。AGE3 は RAGE 発現を抑制する傾向を認めたが有意な変化ではなかった。IGF-I は有意に RAGE 発現を抑制した (図 3B)。

前述の検討により、高グルコースが AGEs 作用を増強し、IGF-I が AGEs 作用を阻害する可能性が示唆されたため、高グルコース+AGE3 の筋分化に与える影響を検討した。

高グルコース単独では筋分化マーカーである MyoD、Myogenin の発現に有意な変化を与えなかった (図 4A-B)。AGE3 は高グルコースの有無に関わらず MyoD、Myogenin 発現を有意に抑制したが、高グルコースの同時添加が AGE3 作用を増強することはなかった。一方、IGF-I は高グルコース+AGE3 の MyoD、Myogenin 発現抑制を有意に改善した。

図2

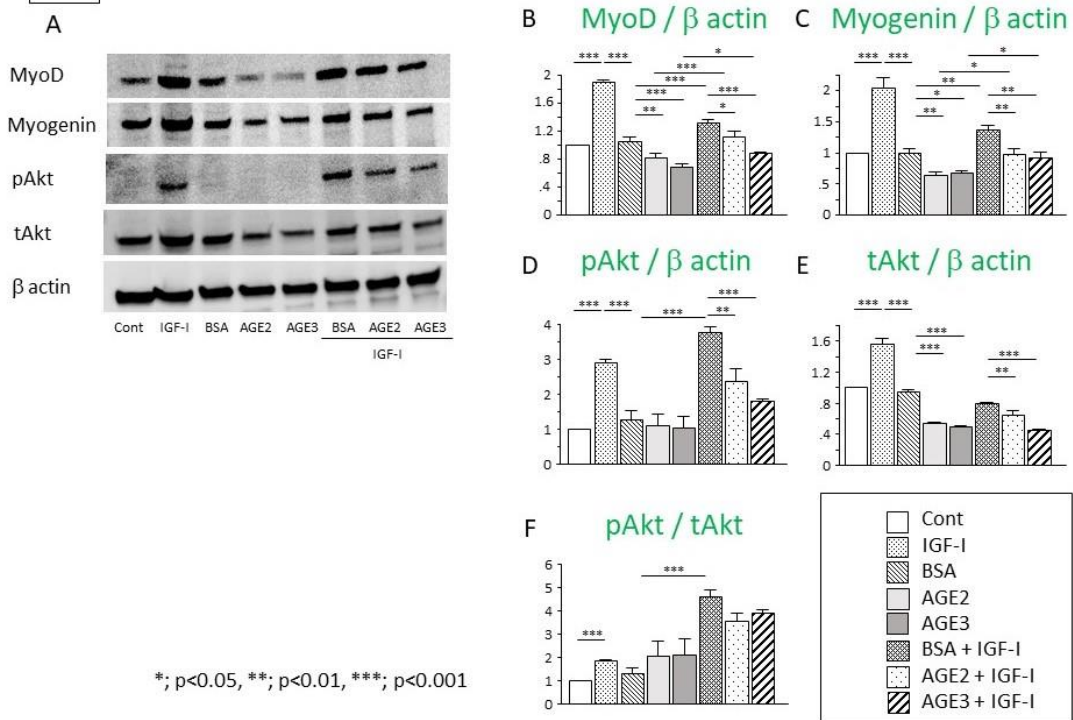


図3

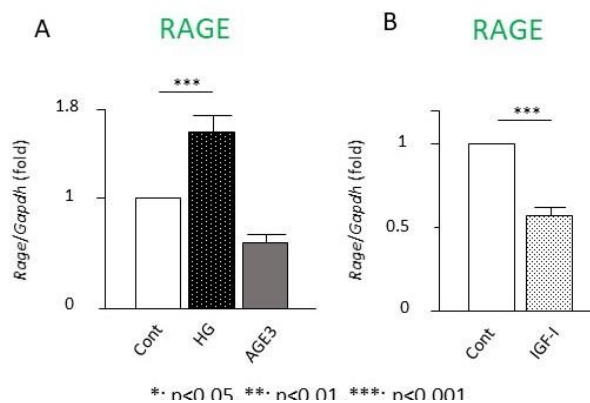
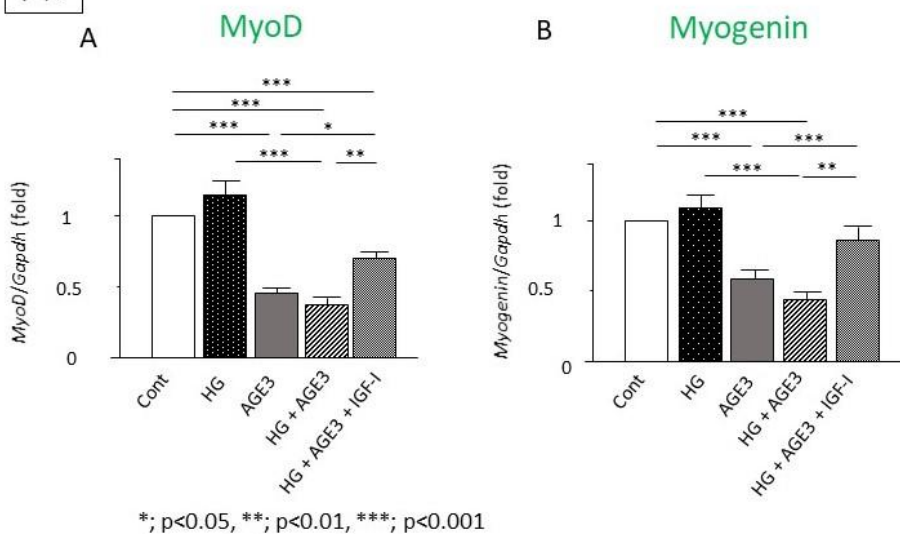


図4



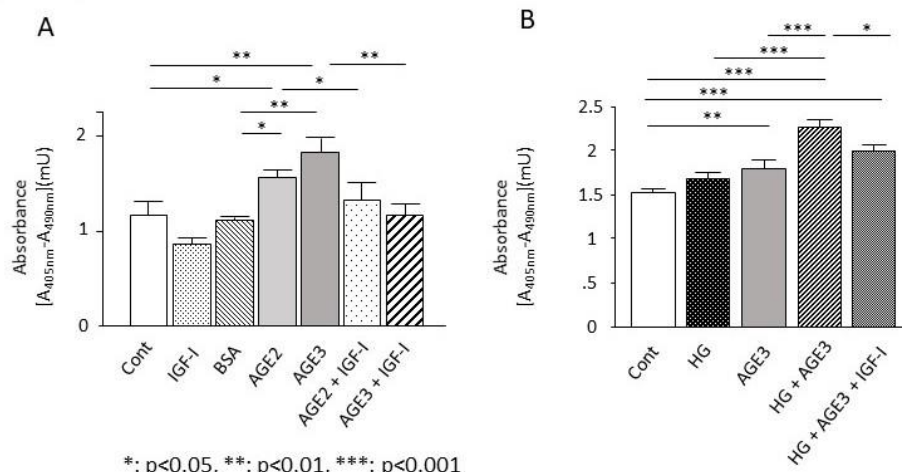
AGEs、IGF-Iのアポトーシスに与える影響をELISA kitを用いて検討した。AGE2、AGE3は有意にアポトーシスを増強し、IGF-Iの投与はAGE2、AGE3のアポトーシス作用を阻害した(図5A)。次に、高グルコースがAGE3によるアポトーシス促進作用を増強するか否かを検討した。高グルコース単独ではアポトーシスに有意な影響はなかったが、高グルコース+AGE3は高グ

ルコース単独、AGE3 単独よりもアポトーシスを促進した (図 5B)。このことから、高グルコースは AGE3 のアポトーシス作用を増強することが示された。さらに、IGF-I は高グルコース + AGE3 によるアポトーシス誘導を有意に抑制した。

以上の結果より、AGEs は筋分化を抑制し、アポトーシスを促進することにより筋細胞機能を阻害し、さらに高グルコースは RAGE 発現を上昇することにより AGEs の負の作用を増強することが示唆された。IGF-I が AGEs、高グルコースによる影響を改善することが示され、これらの機序に Akt シグナルが関与している可能性が示唆された。

したがって、高血糖、高 AGEs 血症はサルコペニアのリスク因子であり、IGF-I-Akt シグナルの活性化が治療標的として有用である可能性が明らかとなった。

図5



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 2 件)

1. Naoko Adachi, Ippei Kanazawa, Ken-ichiro Tanaka, Ayumu Takeno, Masakazu Notsu, Sayuri Tanaka, Toshitsugu Sugimoto. Insulin-like growth factor-I protects against the detrimental effects of advanced glycation end products and high glucose in myoblastic C2C12 cells. *Calcified Tissue International* 105: 89-96, 2019
2. Ken-ichiro Tanaka, Ippei Kanazawa, Hiroshi Kaji, Toshitsugu Sugimoto. Association of osteoglycin and FAM5C with bone turnover markers, bone mineral density, and vertebral fractures in postmenopausal women with type 2 diabetes mellitus. *Bone* 95: 5-10, 2017

〔学会発表〕 (計 2 件)

1. 足立奈緒子、金沢一平、田中賢一郎、竹野歩、野津雅和、田中小百合、杉本利嗣 : Insulin-like growth factor-I は終末糖化産物 AGEs によるアポトーシス促進、筋芽細胞分化抑制を改善する。第 62 回日本糖尿病学会年次集会、2019 年
2. Ippei Kanazawa, Adachi Naoko, Ken-ichiro Tanaka, Ayumu Takeno, Notsu Masakazu, Sayuri Tanaka, Toshitsugu Sugimoto: Insulin-like growth factor-I protects against the detrimental effects of advanced glycation end products and high glucose in myoblastic C2C12 cells. *American Diabetes Association 79th Scientific Sessions*, 2019

〔産業財産権〕

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名 : 金沢 一平

ローマ字氏名 : (KANAZAWA, IPPEI)

所属研究機関名 : 島根大学

部局名 : 医学部

職名 : 講師

研究者番号 (8 桁) : 50452553

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。