

令和元年6月17日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10896

研究課題名(和文)糖化ストレスによる骨治癒遅延メカニズムの解明と新規治療薬の開発

研究課題名(英文) Revealing mechanism of delayed bone union by glycation stress and development new drug

研究代表者

松原 秀憲 (Hidenori, Matsubara)

金沢大学・医学系・助教

研究者番号：10507057

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)：糖尿病マウスにPyrを経口投与(2 mg/ml)した群(DM+Pyr)と非投与群(DM)、対照のPyr投与群(CNT+Pyr)で実験を行った。左大腿骨遠位部に0.9 mmのドリルを用いて骨欠損を作成し、骨欠損部の修復過程を3,7,10,14日目にCT撮影で評価した。DM+Pyr群でCT値は修復過程早期の3,7日目でDM群よりも優位に上昇していた。

MC3T3細胞を用いてAGEsの一種であるメチルグリオキサル(MGO)(1mM)含有の培地にPyr(,3mM)を添加し、ALP assayを行い、評価を行った。MGOによるMC3T3細胞のALP活性の低下はPyr(3mM)で改善が見られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Pyrを投与することで、高血糖状態であるDMマウスの血糖コントロールを行わずに、骨癒合遅延の改善をすることができた。これを実臨床に置き換えると、糖尿病が起す耐糖能異常を全く無視した状態で手術を行い、骨癒合を得られた状態と考える。このメリットは、骨折手術において、血糖コントロールのために延期していた手術を早期に行えることや糖毒性により血糖コントロールが困難な患者の偽関節を予防できることにある。本研究は、今後の糖化ストレスによる骨修復障害の治療の基礎となり、Pyrは糖尿病患者における偽関節や骨癒合遅延といったBone problemを改善する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Advanced glycation end-products (AGE) are implicated in diabetic complications. Pyridoxamine (PM) is one of the natural forms of vitamin B6 and is known to inhibit reactive carbonyl intermediates in AGE formation. In this study, we examined whether Methylglyoxal (MGO) was a cause of disturbed bone healing in diabetes and the bone problem was improved by PM treatment. We found that MGO could cause impaired osteoblastic differentiation and delayed bone repair in diabetes. For it, we employed PM in this study. PM treatment did not show any significant effects on blood glucose control. However, the delayed bone healing in diabetes was significantly improved by PM treatment from an early repair stage of day 7. In vitro cellular assays, MGO could inhibit the osteoblastic differentiation of MC3T3 cells. By adding PM, the ALP activity of ST2 cells was not substantially improved at 0.3 mM, but it was not complete at 1 mM, but it was improved.

研究分野：整形外科

キーワード：骨癒合遅延 AGE ピリドキサミン 糖尿病

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、糖尿病合併症に対するピロキサミン(Pyr)の有効性が報告されている。PyrはMGOを捕捉除去することが報告されており、糖尿病合併症である糖尿病性腎症や網膜症に対する治療への有効性が報告されている。

2. 研究の目的

本研究では、in vivoにおいては、糖尿病マウスを用いたPyrの骨修復能の改善効果について検討を行い、in vitroでは、MGOによる骨芽細胞の分化阻害への改善効果について検証を行った。

3. 研究の方法

In vivo; 7週齢C57BL/6J雄性マウスに少量ストレプトゾトシンを5日間腹腔内に連続投与し、糖尿病を誘発した。糖尿病マウスにPyr (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan)を経口投与(2 mg/ml)した群(DM+Pyr)と非投与群(DM)、さらに非糖尿病対照群(CNT)と対照のPyr投与群(CNT+Pyr)の計4群(各9匹)で実験を行った。11週時に糖尿病状態を評価し、12週齢時に左大腿骨遠位部に0.9 mmのドリルを用いて骨欠損孔を作成した。その後、骨欠損孔の修復過程を3,7,10,14日目までCT撮影(Latheta LCT-200; Hitachi Aloka Medical, Tokyo, Japan)を行い、骨孔のCT値を評価した(AzeWin; AZE, Ltd., Tokyo, Japan)。さらにday7での、大腿骨を摘出し、各群でHE染色を用い、組織学的に観察評価を行った。

In vitro; 骨分化誘導を行ったマウス骨芽細胞様細胞(MC3T3細胞)(Riken cell Bank, Tsukuba, Japan)の培地中にMG (Sigma-Aldrich; Merck KGaA, Darmstadt, Germany) (1mM)とPyr (0.3- 3 mM)を添加し、骨分化効果判定を行った。骨分化効果判定は14日目にALP assay kit (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan)を用いて評価を行った。

統計処理は、SPSS 23.0 software (SPSS INC., Chicago, L)を用い、一元配置分散分析を行い、危険率5%未満を有意とした。

4. 研究成果

In vivo; CNT群、CNT+Pyr群と比し、DM群とDM+Pyr群は、体重、随時血糖、HbA1cで有意差を生じ、糖尿病状態となっていることが確認された。DM群とDM+Pyr群では糖尿病状態に有意差を認めなかった(p= 0.86)。骨欠損部でのCT値はCNT群に比べ、DM群では、観察中のすべての時点で有意に低下していた。CNT群とCNT+Pyr群の間でCT値に差はなかった。一方、DM+Pyr群は、DM群とは修復過程早期の3,7日目でDM群よりも特に優位に上昇していた(p<0.01)。また、DM群とDM+Pyr群間のHbA1cとday7でのCT値で相関図を作成とすると、DM群でみられた負の相関がDM+Pyr群では緩和されている。組織学的には、DM群ではCNT群、CNT+Pyr群に比べて、骨孔は閉鎖しておらず、修復段階にあった。それに対して、DM+Pyr群では骨孔は塞がっており、骨修復状態はCNT群とほぼ変わらない状態まで回復していた。

In vitro; 細胞培養系で検証すると、培養MC3T3細胞はMG処置でALP活性は有意に抑制していた(p<0.05)。そこに、Pyr 3.0 mM添加することでALP活性は分化誘導のみの状態まで回復していた(p<0.05)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 4 件)

宇賀治修平, 松原秀憲, 濱田知, 土屋弘行

糖尿病による骨修復能障害はピロキサミン投与により改善される

第132回中部日本整形外科学会・学術集会(三重) 4月5-6日, 2019

宇賀治修平, 松原秀憲, 相川敬男, 吉田泰久, 土屋弘行

ピリドキサミン投与は糖尿病によるマウス骨癒合遅延を改善する

第 33 回日本整形外科学術基礎学術集会（奈良） 10 月 11 - 12 日, 2018

Ugaji S, Matsubara H, Aikawa T, Yoshida Y, Munesue S, Harashima A, Yamamoto Y,
Tsuchiya H

Delayed bone repair in diabetes is improved by the treatment of pyridoxamine
Annual Meeting of the American Academy of Orthopaedic Surgeons (AAOS) (New Orleans,
USA) 3 月 6 日 - 10 日, 2018

宇賀治修平, 松原秀憲, 相川敬男, 吉田泰久, 土屋弘行

糖尿病による骨修復能障害はピリドキサミン投与により改善される

第 32 回日本整形外科学術基礎学術集会（沖縄） 10 月 26 - 27 日, 2017

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
なし
6 . 研究組織

(1)研究分担者
研究分担者氏名：
ローマ字氏名：
所属研究機関名：

(2)研究協力者
研究分担者氏名：山本靖彦
ローマ字氏名：YASUHIKO YAMAMOTO
所属研究機関名：金沢大学医薬保健研究域 医学系

部局名：血管分子生物学
職名：教授
研究者番号(8桁): 20313637

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。