

令和 3 年 6 月 29 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09528

研究課題名(和文)糖化ストレス分子メチルグリオキサールによる骨質劣化機序の解明とその改善方法の開発

研究課題名(英文)Clarification of the mechanism of bone degradation by methylglyoxal and development of methods to prevent it

研究代表者

吉村 健太郎 (Yoshimura, Kentaro)

昭和大学・歯学部・講師

研究者番号：10585699

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：メチルグリオキサール(MG)は解糖系の副産物で、終末糖化産物の前駆物質である。我々は、骨芽細胞を用いた石灰化物形成モデルにおいて、MGがコラーゲンの架橋構造の糖化変性を起こし、石灰化物の機械的強度を低下させることを見だしている。MGはタンパク質を求核攻撃することから、本研究では、強力な求電子性を持つ活性イオウ分子種(RSS)が骨芽細胞による石灰化にどのような影響を及ぼすかを解析した。RSS合成酵素の発現抑制は骨芽細胞による石灰化抑制を観察した。さらに、RSSドナーのひとつNaHSはMGによる石灰化低下を抑制した。RSSは、MGによる石灰化異常に対する治療効果が期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨の強度は骨密度と骨質に依存する。種々の要因で、骨密度あるいは骨質が低下し、骨粗鬆症を引き起こす。2型糖尿病でも骨が脆弱になり骨折リスクが高まるが、この場合は、骨密度の低下に比較し、骨質の劣化が著しい。我々は、骨質劣化の原因の一つとしてMGによる骨基質タンパク質の糖化変性を見出した。本研究は、RSSがMGの反応性を低下させることで、2型糖尿病に伴う骨粗鬆症を予防できる可能性を示すもので、今後の治療薬開発の基礎となるものである。

研究成果の概要(英文)：Methylglyoxal (MG), a by-product of glycolysis, is one of the precursors of advanced glycation end-products. We had reported that MG degrades physicochemical properties of mineralized nodules produced by osteoblasts through glycation of bridges between collagen molecules. Since MG is a nucleophilic compound, we studied the effects of reactive sulfur species having strong electrophilic properties on the degradation of mineralized nodules by MG. Suppression of the expression of RSS-producing enzyme in osteoblasts reduced their mineralization. Also, NaHS, an RSS donor, improved the osteoblastic mineralization in the presence of MG. These results suggest that RSS can prevent degradation of the bone matrix by MG.

研究分野：生化学

キーワード：最終糖化産物 骨 メチルグリオキサール 活性イオウ分子種

1. 研究開始当初の背景

糖尿病は代表的な糖代謝異常疾患である。糖尿病は種々の合併症を引き起こすことが知られている。近年、そのひとつとして骨粗鬆症が注目されている。インスリン依存性の1型糖尿病では、骨芽細胞のインスリン・シグナルが不足することにより骨形成が低下することが知られている。一方、インスリン非依存性の2型糖尿病に伴う骨粗鬆症は、骨量は減少していないにも関わらず、骨折リスクが上昇するという特徴を持つ。このことは、2型糖尿病は、骨密度ではなく、骨質の劣化をもたらすことを示唆している。骨質劣化の原因として、骨基質が糖化変性することで劣化するのではないかと考えられている。すなわち、骨基質が糖化変性するため、硬度が十分であるのに、外力に対して脆い骨ができていく可能性が挙げられている。しかし、骨質劣化の分子メカニズムが十分解明されているわけではない。そのため、骨質劣化に対する予防あるいは治療法も確立してはいない。

我々は、糖尿病で血中レベルが上昇する代謝産物に着目して、それらの骨形成に対する作用を研究してきた。これまでに、糖尿病で上昇する脂質代謝産物のケトン体が骨芽細胞による石灰化を調節することを報告した (Saito A et al., *Biochem Biophys Res Commun* 473:537-544, 2016)。解糖系の副産物であるメチルグリオキサルは、終末糖化産物の前駆物質のひとつである。メチルグリオキサールの血中レベルは糖尿病で上昇する。メチルグリオキサルは、化学的反応性が高く、求核的にタンパク質などの生体分子と反応する。我々は、骨芽細胞を用いた *in vitro* 石灰化物形成モデルを用いて、メチルグリオキサールの石灰化物形成に対する影響を調べた。メチルグリオキサルは、石灰化物の量には大きな変化をもたらさなかった。一方、メチルグリオキサル存在下に形成された石灰化物の機械的強度は著しく低下していた。具体的には、外力に応じたマトリックスの変形が元に戻りにくい性質に変化していた。ラマン分光分析により、メチルグリオキサルは、コラーゲン分子間の架橋を糖化変性していることが明らかとなった (Rodriguez R et al., *Nanomedicine* 13:2545-2553, 2017)。我々は、メチルグリオキサルが2型糖尿病に伴う骨質劣化の原因物質のひとつである可能性があると考えた。

メチルグリオキサルは、分子内にカルボニル基を2つ持つアルデヒドで、求核的にタンパク質などの分子を攻撃する。我々は、求電子的な性質を有する分子は、メチルグリオキサルと骨基質タンパク質との反応を阻害すると考えた。そのことから、複数のイオウ原子が繋がり、強い求電子的性質を持つ活性イオウ分子種にメチルグリオキサルによる骨基質劣化予防効果があると考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、糖尿病で血中濃度が増加するメチルグリオキサルによる石灰化異常および骨基質劣化作用に対する活性イオウ分子種の効果を検討することであった。これにより、2型糖尿病患者の骨質改善の新規治療法開発の基盤を確立することを目指すこととした。

3. 研究の方法

我々はまず骨芽細胞の石灰化能に対する活性イオウ分子種の作用を解析した。実験には NaHS、Na₂S₂、Na₂S₃、Na₂S₄ の4種類の活性イオウ分子種を用いた。骨芽細胞のアルカリホスファターゼ活性を測定するとともに、石灰化物形成をアリザリンレッド染色で評価した。さらに、骨芽細胞における活性イオウ分子種の代謝を解析するために、活性イオウ分子種の代謝酵素であるシステイン tRNA 合成酵素 (Cars2) に着目し、その発現を siRNA で抑制した。次に、活性イオウ分子種生成の原料のひとつである、硫化水素 (H₂S) および Cars2 の基質であるシステインの細胞内取り込み形態であるシスチンを骨芽細胞の培養系に添加し、メチルグリオキサルによる石灰化に対する効果がどのように変化するかを観察した。

4. 研究成果

NaHS、Na₂S₂、Na₂S₃、Na₂S₄ は、骨芽細胞のあるカリホスファターゼ活性の上昇を抑制した。その中でも、イオウ原子数の多い Na₂S₄ の活性が最も大きかった。また、メチルグリオキサルによって増加する石灰化物の形成は Na₂S₂ によって抑制された。このことから活性イオウ分子種は、含有するイオウ原子の数によって骨芽細胞の石灰化に対して異なる作用を示す可能性が考えられた。

活性イオウ分子種産生酵素 Cars2 の siRNA を骨芽細胞に導入したところ、あるカリホスファターゼの発現および活性が低下し、石灰化物の形成も抑制された。以上の結果から、細胞内

イオウ代謝は骨芽細胞における石灰化機能の発現において重要な役割を担っていることが示唆された。

高濃度 (0.5 mmol/L) のメチルグリオキサールは骨芽細胞の石灰化を抑制した。ここに、硫化水素 (H_2S) を 0.2~0.5 mmol/L、シスチンを 0.05~0.1 mmol/L の濃度で骨芽細胞培養系に添加したところ、メチルグリオキサールによる石灰化の低下が回復した。このことから、活性イオウ分子種の原料である H_2S やシスチンなどのイオウ化合物は骨芽細胞の石灰化異常を回復する治療薬となる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Takimoto R, Suzawa T, Yamada A, Sasa K, Miyamoto Y, Yoshimura K, Sasama Y, Tanaka M, Kinoshita M, Ikezaki K, Ichikawa M, Yamamoto M, Shiota T, Kamiyo R	4. 巻 162
2. 論文標題 Zoledronate promotes inflammatory cytokine expression in human CD14-positive monocytes among peripheral mononuclear cells in the presence of T cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Immunolgy	6. 最初と最後の頁 306-313
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/imm.13283	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Izumida E, Suzawa T, Miyamoto Y, Yamada A, Otsu M, Saito T, Yamaguchi T, Nishimura K, Ohtaka M, Nakanishi M, Yoshimura K, Sasa K, Takimoto R, Uyama R, Shiota T, Maki K, Kamiyo R	4. 巻 99
2. 論文標題 Functional analysis of PTH1R variants found in primary failure of eruption.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Dental Research	6. 最初と最後の頁 429-436
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/0022034520901731	査読の有無 有
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 -
1. 著者名 Matsumoto Akifumi, Takami Masamichi, Urano Eri, Nakamachi Tomoya, Yoshimura Kentaro, Yamada Atsushi, Suzawa Tetsuo, Miyamoto Yoichi, Baba Kazuyoshi, Kamiyo Ryutaro	4. 巻 62
2. 論文標題 Lipopolysaccharide (LPS) inhibits ectopic bone formation induced by bone morphogenetic protein-2 and TGF- β 1 through IL-1 production	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Oral Biosciences	6. 最初と最後の頁 44 ~ 51
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.job.2020.01.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sugisaki Risa, Miyamoto Yoichi, Yoshimura Kentaro, Sasa Kiyohito, Kaneko Kotaro, Tanaka Motohiro, Itose Masakatsu, Inoue Sakie, Baba Kazuyoshi, Shiota Tatsuo, Chikazu Daichi, Kamiyo Ryutaro	4. 巻 132
2. 論文標題 Possible involvement of elastase in enhanced osteoclast differentiation by neutrophils through degradation of osteoprotegerin	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bone	6. 最初と最後の頁 115216 ~ 115216
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bone.2019.115216	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Imai Hiroko, Yoshimura Kentaro, Miyamoto Yoichi, Sasa Kiyohito, Sugano Marika, Chatani Masahiro, Takami Masamichi, Yamamoto Matsuo, Kamijo Ryutarou	4. 巻 9
2. 論文標題 Roles of monocarboxylate transporter subtypes in promotion and suppression of osteoclast differentiation and survival on bone	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 15608-15608
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-52128-2	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Nagayama K, Miyamoto Y, Kaneko K, Yoshimura K, Sasa K, Akaike T, Fujii S, Izumida E, Uyama R, Chikazu D, Maki K, Kamijo R.	4. 巻 55
2. 論文標題 Production of 8-nitro-cGMP in osteocytic cells and its upregulation by parathyroid hormone and prostaglandin E2.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 In Vitro Cell Dev Biol Anim.	6. 最初と最後の頁 45-51
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11626-018-0304-0.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kato T, Yamada A, Sasa K, Yoshimura K, Morimura N, Ogata H, Sakashita A, Kamijo R.	4. 巻 104
2. 論文標題 Nephronectin expression is inhibited by inorganic phosphate in osteoblasts.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Calcif Tissue Int	6. 最初と最後の頁 201-206
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00223-018-0484-3.	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Sasa K, Yoshimura K, Yamada A, Suzuki D, Miyamoto Y, Imai H, Nagayama K, Maki K, Yamamoto M, Kamijo R.	4. 巻 8
2. 論文標題 Monocarboxylate transporter-1 promotes osteoblast differentiation via suppression of p53, a negative regulator of osteoblast differentiation.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Sci. Rep.	6. 最初と最後の頁 10579
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-28605-5.	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Manome Y, Suzuki D, Mochizuki A, Saito E, Sasa K, Yoshimura K, Inoue T, Takami M, Inagaki K, Funatsu T, Kamijo R.	4. 巻 9
2. 論文標題 The inhibition of malignant melanoma cell invasion of bone by the TLR7 agonist R848 is dependent upon pro-inflammatory cytokines produced by bone marrow macrophages.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncotarget,	6. 最初と最後の頁 29934- 29943
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.25711.	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Kaneko K, Miyamoto Y, Tsukuura R, Sasa K, Akaike T, Fujii S, Yoshimura K, Nagayama K, Hoshino M, Inoue K, Maki K, Baba K, Chikazu D, Kamijo R	4. 巻 72
2. 論文標題 8-Nitro-cGMP is a promoter of osteoclast differentiation induced by RANKL.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nitric Oxide	6. 最初と最後の頁 46-51
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.niox.2017.11.006.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計14件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Sasama Y, Yoshimura K, Miyamoto Y, Sasa K, Akaike T, Morita M, Matsunaga T, Shiota T, Kamijo R
2. 発表標題 Respiration using hydrogen sulfide promotes chondrocyte proliferation and bone growth.
3. 学会等名 第67回JADR総会・学術大会 / (第4回IADR APR (Asia Pacific Region) 学術大会 (国際学会))
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Oshio A, Miyamoto Y, Sasa K, Yamada A, Yoshimura K, Kamijo R
2. 発表標題 Gelated ozone suppresses osteoclast differentiation and periodontal bone loss.
3. 学会等名 第67回JADR総会・学術大会 / (第4回IADR APR (Asia Pacific Region) 学術大会 (国際学会))
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉村健太郎、宮本洋一、笹清人、山田篤、茶谷昌宏、高見正道、上條竜太郎
2. 発表標題 歯周病性骨破壊に対するオゾンジェルの効果
3. 学会等名 第2回 オゾン医療・審美学会総会・学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 笹清人、吉村健太郎、今井裕子、山本松男、上條竜太郎
2. 発表標題 モノカルボン酸輸送担体は骨形成と骨吸収の両者を調節する
3. 学会等名 第56回日本口腔組織培養学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 笹清人、吉村健太郎、今井裕子、山本松男、上條竜太郎
2. 発表標題 モノカルボン酸トランスポーター（MCT）は新規骨代謝調節因子である
3. 学会等名 第37回日本ヒト細胞学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takimoto R, Tanaka M, Sasa K, Yamada A, Miyamoto Y, Suzawa T, Yoshimura K, Kamiyo R
2. 発表標題 Zoledronate inhibits differentiation of human CD14+ monocytes into osteoclasts induced by RANKL through upregulation of IRF8 expression.
3. 学会等名 第61回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 瀧本玲子, 田中元博, 笹 清人, 山田 篤, 宮本洋一, 須澤徹夫, 吉村健太郎, 代田達夫, 上條竜太郎
2. 発表標題 ゾレドロン酸は末梢血単球の破骨細胞分化を抑制する.
3. 学会等名 第19回東京骨関節フォーラム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 今井 裕子, 吉村 健太郎, 宮本 洋一, 茶谷 昌宏, 高見 正道, 上條 竜太郎, 山本 松男
2. 発表標題 破骨細胞におけるモノカルボン酸トランスポーター(MCT)の役割について
3. 学会等名 第65回 昭和大学学士会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 今井裕子、吉村健太郎、宮本洋一、茶谷昌宏、高見正道、上條竜太郎、山本松男
2. 発表標題 破骨細胞におけるモノカルボン酸トランスポーター（MCT）の役割について．
3. 学会等名 第65回昭和大学学士会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 S.UEDA, K.YOSHIMURA, R.KAMIJO
2. 発表標題 Sucrose suppressed osteoclast differentiation.
3. 学会等名 The 66th Annual Meeting of Japanese Association for Dental Redearch. (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 HIROKO IMAI, KENTARO YOSHIMURA, YOICHI MIYAMOTO, MASAHIRO CHATANI, MASAMICHI TAKAMI, RYUTARO KAMIJO, MATSUO YAMAMOTO
2. 発表標題 -Cyano-4-hydroxycinnamic acid suppresses bone resorption.
3. 学会等名 American Academy of Periodontology 104th Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 今井裕子, 吉村健太郎, 宮本洋一, 茶谷昌宏, 高見正道, 山本松男, 上條竜太郎
2. 発表標題 モノカルボン酸トランスポーター阻害剤 -Cyano-4- hydroxycinnamic acidは破骨細胞の骨吸収を抑制する.
3. 学会等名 第60回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉村健太郎, 笹 清人, 今井裕子, 宮本洋一, 山本松男, 上條竜太郎
2. 発表標題 モノカルボン酸トランスポーターを介した骨代謝調節.
3. 学会等名 第18回東京骨関節フォーラム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 今井裕子, 吉村健太郎, 宮本洋一, 山田篤, 笹清人, 茶谷昌宏, 高見正道, 山本松男, 上條竜太郎
2. 発表標題 -cyano-4-hydroxycinnamic acid は破骨細胞の骨吸収を抑制する
3. 学会等名 第4回日本骨免疫学会
4. 発表年 2018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
---------	---------