

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460899

研究課題名(和文) 消化管による骨代謝制御機構の検討 - インクレチンシグナルの骨形成増強作用の解明 -

研究課題名(英文) The regulation of bone metabolism by digestive tract: A study on the mechanism of incretin-induced bone formation

研究代表者

杉本 利嗣 (Sugimoto, Toshitsugu)

島根大学・医学部・教授

研究者番号：00226458

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：未分化間葉系細胞ST2、骨芽細胞様細胞MC3T3-E1、骨細胞様細胞MLO-Y4を用いた検討で、インクレチン(gastric inhibitory polypeptide、glucagon-like peptide-1)の骨芽細胞分化や石灰化、骨細胞からのRANKL発現への直接作用は認めなかった。C57BL6マウスへのdipeptidyl peptidase-4 (DPP-4)阻害薬投与においても骨量、骨強度に有意な変化はなかった。2型糖尿病男性における解析で、血中DPP-4濃度がメタボリック症候群で上昇しており、DPP-4高値が骨吸収を介して多発椎体骨折のリスクに関連することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We demonstrated that incretin, such as gastric inhibitory polypeptide and glucagon-like peptide-1, had no effects on the differentiation and mineralization of mesenchymal stem cell-like ST2 cells and osteoblastic MC3T3-E1 cells as well as the expression of RANKL in osteocytic MLO-Y4 cells. Moreover, bone volume and bone strength were not different between C57BL mice with and without administration of a dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) inhibitor. In a clinical study, elevated serum DPP-4 levels were significantly and positively associated with the presence of metabolic syndrome in men with type 2 diabetes. In addition, increased serum DPP-4 levels were significantly associated with the risk of multiple vertebral fractures through bone resorption in the population.

研究分野：内分泌学

キーワード：インクレチン DPP-4 骨代謝 GLP-1 GIP 骨芽細胞 骨形成 骨折

様式 C-19、F-19、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

高齢者における原発性骨粗鬆症のみならず、糖尿病関連骨粗鬆症やステロイド性骨粗鬆症のように、骨形成低下が主な病態である骨粗鬆症の頻度が多い。日常診療において、唯一使用可能な骨形成促進薬はテリパラチドのみであり、骨形成にかかわる因子やその機序を解明し、骨形成促進を目的とした薬剤開発に寄与する研究は重要性を増してきている。

消化管から分泌されるインクレチンには糖代謝改善作用があり、我が国においても2009年よりインクレチンシグナル増強薬の臨床使用が可能となっている。また、インクレチンには gastric inhibitory polypeptide (GIP) と glucagon-like peptide-1 (GLP-1) の2つがあり、これまでの遺伝子改変マウスの解析ではともに骨代謝に影響する可能性が報告されている。また、dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) はインクレチンを不活化する因子であり、DPP-4 も間接的に骨代謝に影響する可能性が考えられている。しかし、GIP、GLP-1、DPP-4 の骨形成への影響や骨折リスクとの関連性については不明であった。

2. 研究の目的

- (1) GIP、GLP-1、DPP-4 の骨代謝制御メカニズムを検討する。
- (2) DPP-4 阻害薬による骨代謝への影響を検討する。

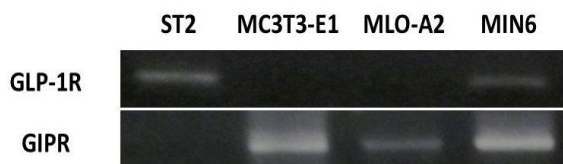
3. 研究の方法

- (1) 間葉系幹細胞、骨芽細胞、骨細胞を用いた細胞培養実験により、GIP、GLP-1 の骨形成への直接作用を検討する。(in vitro 実験)
- (2) マウスに DPP-4 阻害薬を投与し、骨組織への影響を検討する。(in vivo 実験)
- (3) 2型糖尿病患者における血中 DPP-4 濃度と骨密度、骨代謝マーカー、骨折リスクとの関連を明らかにする。(臨床研究)

4. 研究成果

- (1) 未分化間葉系細胞 ST2、骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1、骨細胞様細胞 MLO-Y4 におけるインクレチン受容体の発現

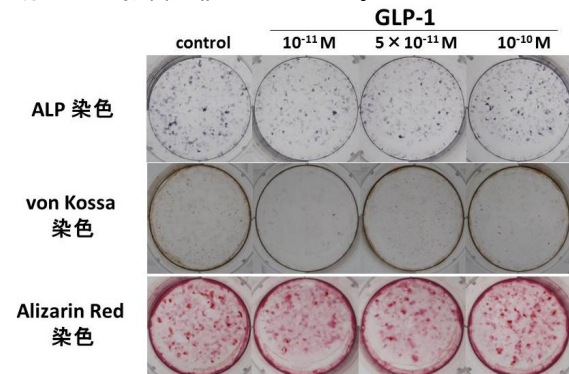
各細胞培養を行い、コンフルエントになった状態で RNA を採取し、RT-PCR により GIP、GLP-1 受容体発現の検討を行った。ST2 では GLP-1 受容体の発現を認め、MC3T3-E1 と MLO-Y4 では GIP 受容体の発現を認めた。PCR 産物を精製し、cDNA シークエンスを行い、各受容体の発現を確認した。MIN6 は膵β細胞。



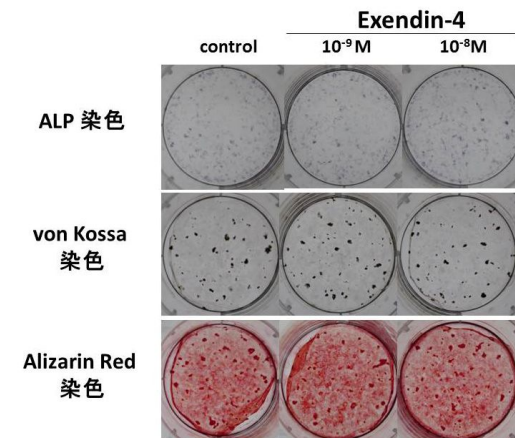
本実験により、以降の実験は ST2 細胞で GLP-1 の影響を、MC3T3-E1 細胞と MLO-Y4 細胞では GIP の影響を検討することとした。

- (2) GLP-1 の未分化間葉系細胞 ST2 の分化、石灰化への影響を検討する。

細胞がコンフルエントになった後、最終濃度 10^{-11} ~ 10^{-10} M の GLP-1 をメディウムに添加し、10 日目に ALP 染色、21 日目に石灰化染色 (von Kossa 染色、Alizarin Red 染色) を行い、骨芽細胞への分化、石灰化への影響を検討した。GLP-1 はいずれの濃度においても明らかな影響は認めなかった。

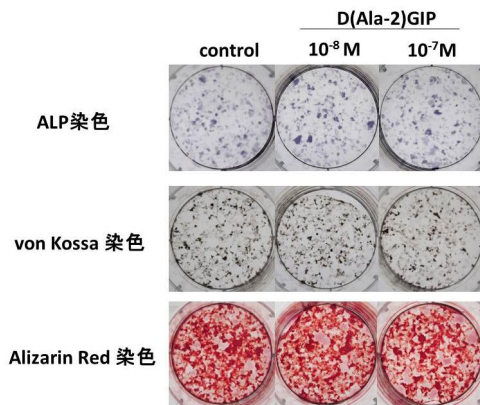
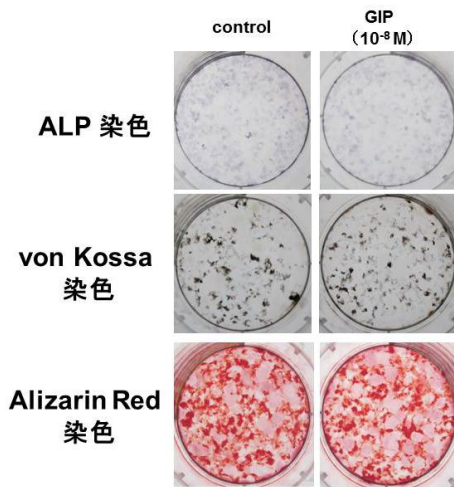


さらに、GLP-1 の長時間作用型である Exendin-4 による影響も検討を行ったが、Exendin-4 も骨芽細胞分化、石灰化への明らかな影響は認めなかった。



- (3) GIP の骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 の分化、石灰化への影響を検討する。

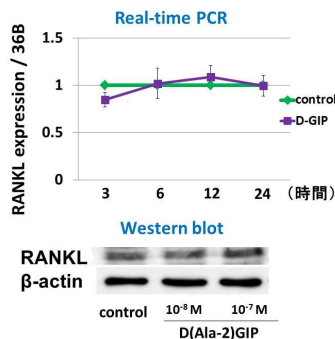
細胞がコンフルエントになった後、GIP あるいは長時間作用型 GIP である D(Ala-2)GIP を最終濃度 10^{-8} ~ 10^{-7} M で添加し、ALP 染色、石灰化染色を行い、分化、石灰化への影響を検討した。GIP、D(Ala-2)GIP ともに MC3T3-E1 の骨芽細胞分化、石灰化への明らかな影響は認めなかった。



(4)GIP の骨細胞様細胞 MLO-Y4 の RANKL 発現への影響を検討する。

細胞がコンフルエントになった後、D(Ala-2)GIP を最終濃度 10⁻⁸ ~ 10⁻⁷M で添加し、3 ~ 24 時間で RNA を採取、48 時間で蛋白を採取し、RANKL mRNA と蛋白の発現への影響を検討した。D(Ala-2)GIP による RANKL 発現への明らかな影響は認めなかった。

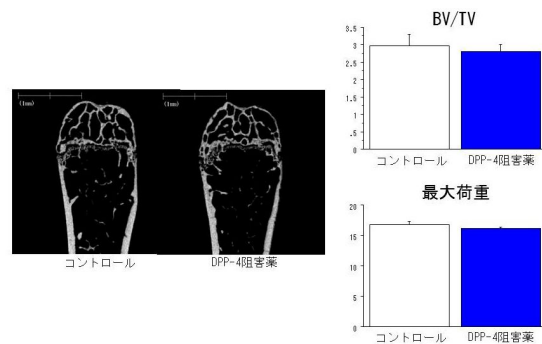
さらに、D(Ala-2)GIP の細胞内 cAMP に与える影響も検討したが、D(Ala-2)GIP は cAMP 産生にも影響を認めなかった。



したがって、我々の in vitro の検討では ST2 に GLP-1 受容体、MC3T3-E1 と MLO-Y4 には GIP 受容体を認めたものの、GLP-1 と GIP の骨芽細胞分化、石灰化、RANKL 発現への影響は認められなかった。以上の結果より、GIP や GLP-1 は骨芽細胞や骨細胞に直接影響することにより骨形成や骨代謝回転を制御することは否定的と考えられた。

(5)DPP-4 阻害薬によるマウス骨組織への影響を検討する。

C57BL6 マウスに DPP-4 阻害薬 alogliptin 0.03% w/w を 16 週間経口投与し、大腿骨を採取し、マイクロ CT、3 点曲げによる骨強度試験を行った。DPP-4 阻害薬による骨量、骨強度への明らかな変化は認めなかった。したがって、16 週間の DPP-4 阻害薬投与によるマウス骨への影響は認めなかった。



(6)2型糖尿病における血中 DPP-4 濃度と骨密度、骨代謝マーカー、骨折リスクとの関連性を検討する。

当院へ通院・入院し、研究に同意した 2 型糖尿病男性 204 人を対象とし、糖尿病指標、脂質代謝指標、骨代謝マーカーなどの評価に加えて、腹部単純 CT による臍レベルの内臓脂肪・皮下脂肪面積を測定し、DXA 法により骨密度（腰椎、大腿骨頸部、橈骨遠位端）X 線により胸腰椎椎体骨折の有無を確認し、統計解析を行った。本研究は当院医の倫理委員会に承認を得た（通知番号第 1220 号）。

まず初めに、血中 DPP-4 濃度がどの因子と関連するかを単回帰、重回帰分析により検討した。年齢、糖尿病罹病期間、BMI、ALT、血清クレアチニンで補正した重回帰分析において、血中 DPP-4 濃度は内臓脂肪面積と有意な正の相関を認めた ($\beta=0.25$, $p=0.043$)。一方、皮下脂肪との関連性は認めなかったことから、血中 DPP-4 濃度は内臓脂肪量と特異的に関連することが示唆された。さらに、メタボリックシンドロームの有無と血中 DPP-4 濃度との関連性をロジスティック回帰分析により検討したところ、血中 DPP-4 濃度が 1SD 上昇する毎にメタボリックシンドロームのリスクが 1.77 倍上昇することを認めた。

次に、血中 DPP-4 濃度と骨代謝との関連性を重回帰分析、ロジスティック回帰分析により検討した。年齢、罹病期間、BMI、血清アルブミン、血清クレアチニン、ALT、CRP、HbA1c で補正した重回帰分析により、血中 DPP-4 濃度は骨型アルカリホスファターゼ、オステオカルシン、低カルボキシル化オステオカルシン、TRACP5b と有意な正の相関を認めたが(各 $\beta=0.25$, $p<0.001$, $\beta=0.17$, $p=0.030$, $\beta=0.21$, $p=0.007$, $\beta=0.30$, $p=0.002$)、骨密度との関連性は認めなかった。次に、上記交絡因子にて補正したロジスティック回帰分析にて血中 DPP-4 濃度と椎体骨折、多発椎体骨折の有無との関連性を検討したところ、血中 DPP-4 濃度が 1SD 上昇する毎に多発椎体骨折のリスクが 1.61 倍に上昇することが認められた ($p=0.030$)。この関連性は各部位骨密度、骨形成マーカーにて追加補正しても有意であったが、骨吸収マーカーである TRACP5b で補正すると有意差は消失した。したがって、血中 DPP-4 濃度高値は骨吸収を介して骨折リスクを上昇させる可能性が示唆された。

(7) 研究結果のまとめ

培養細胞を用いた *in vitro* の検討では、インクレチンによる骨芽細胞系細胞への直接の影響は認められず、さらにマウスへの DPP-4 阻害薬経口投与においても 16 週間の投与では骨量や骨強度への明らかな変化は認めなかった。これらのことはインクレチンやインクレチン作用を高める DPP-4 阻害薬は骨代謝には影響しないことが示唆された。一方、2 型糖尿病患者を対象とした臨床研究では血中 DPP-4 濃度が上昇することは骨吸収亢進を介して骨折リスクを上昇する可能性が示唆された。

本検討ではインクレチンの破骨細胞への影響は検討できておらず、また糖尿病モデルマウスへの DPP-4 阻害薬の影響も検討できていないためさらなる検討が必須であるが、ヒトにおいては糖尿病状態で血中 DPP-4 がメタボリックシンドローム、骨脆弱性に重要であ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 4 件)

- 1) Sayuri Tanaka, Ippei Kanazawa, Masakazu Notsu, Toshitsugu Sugimoto. Visceral fat obesity increases serum DPP-4 levels in men with type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Research and Clinical Practice*, in press. 査読有
- 2) Masakazu Notsu, Ippei Kanazawa, Sayuri Tanaka, Toru Yamaguchi, Toshitsugu Sugimoto. Serum dipeptidyl peptidase-4 is associated with multiple vertebral fractures in type 2 diabetes mellitus.

Clinical Endocrinology, 2016; 84(3): 332-7. 査読有

- 3) 野津雅和、金沢一平、田中小百合、杉本利嗣: 2 型糖尿病男性において血中 DPP-4 濃度高値は多発椎体骨折の危険因子である. *Osteoporosis Japan* 23(1): 46-50, 2015、査読無
- 4) 野津雅和、金沢一平、田中小百合、杉本利嗣: 消化管ホルモン GIP と GIP 不活性化物質 DPP-4 は生活習慣病に伴う骨粗鬆症の関連因子となりうるか? *Osteoporosis Japan* 22(4): 672-7, 2014、査読無

[学会発表](計 4 件)

- 1) Sayuri Tanaka, Ippei Kanazawa, Masakazu Notsu, Toshitsugu Sugimoto. Visceral fat obesity and metabolic syndrome increase serum DPP-4 levels in type 2 diabetes mellitus. 51th Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes, Sweden (Stockholm), September 14-18, 2015
- 2) 野津雅和、金沢一平、田中小百合、杉本利嗣: 血中 DPP-4 濃度高値は多発椎体骨折リスクと関連する. 第 58 回日本糖尿病学会年次学術集会、山口(下関市) 海峡メッセ下関、2015 年 5 月 21-24 日
- 3) 田中小百合、金沢一平、野津雅和、杉本利嗣: 2 型糖尿病における血清 DPP-4 濃度と CT 診断による内臓脂肪型肥満との関連性の検討. 第 58 回日本糖尿病学会年次学術集会、山口(下関市) 海峡メッセ下関、2015 年 5 月 21-24 日
- 4) 野津雅和、金沢一平、田中小百合、杉本利嗣: 2 型糖尿病男性において血中 DPP-4 濃度高値は多発椎体骨折の危険因子である. 第 16 回日本骨粗鬆症学会、東京(新宿区) 京王プラザホテル、2014 年 10 月 23-25 日

[図書](計 0 件)

[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) 研究代表者

杉本 利嗣 (SUGIMOTO, Toshitsugu)
島根大学・医学部・教授
研究者番号: 00226458

(2) 研究分担者

金沢 一平 (KANAZAWA, Ippei)
島根大学・医学部・助教
研究者番号: 50452553