

論文の内容の要旨

氏名：酒井 真 悠

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：終末糖化産物は骨芽細胞の骨形成を低下させ、ERK1/2 のリン酸化を抑制する

終末糖化産物（advanced glycation end products: AGEs）は、タンパクと還元糖の非酵素的反応であるメイラード反応によって生成される。近年、糖尿病などの高血糖状態の体内で生成された AGEs が、糖尿病性合併症の発症と骨の脆弱性を促進すると報告されている。AGEs は、すべての組織および体液で生成され、生体内で蓄積する。生体内で起こる AGEs のメイラード反応は、生体外で生じるメイラード反応よりも低い温度で反応が進み、また、それは数週間にわたって起こる。

1 型糖尿病は 2 型糖尿病と比較して骨密度が低く、股関節骨折のリスクは高い。一方で、2 型糖尿病は、骨密度は正常であるにもかかわらず、股関節骨折のリスクが上昇することが示されている。さらに、糖尿病に関連した AGEs の蓄積は、骨の脆弱性と骨リモデリングに影響を与えることが臨床研究によって報告されている。しかし、AGEs が *in vitro* において骨芽細胞の骨形成に及ぼすメカニズムの詳細は不明な点が多い。

骨リモデリングは、骨芽細胞による骨形成と破骨細胞による骨吸収が動的平衡を保つことによって維持されている。骨芽細胞は、細胞分化を促進させる様々な転写因子や石灰化に関与する細胞外マトリックスタンパク（extracellular matrix proteins: ECMPs）を産生することで骨形成を調節している。そこで本研究は、AGEs に着目し、AGEs が骨芽細胞の骨形成に及ぼす影響を細胞生物学的に検討した。

マウス骨芽細胞様細胞として、MC3T3-E1 細胞を 2×10^4 cells/cm² の密度で 96 または 6-well プレートに播種し、10% ウシ胎児血清（FBS）、1% ペニシリン/ストレプトマイシン/アンホテリン B を添加した alpha modified Eagle's medium (α -MEM) を培地として、37°C、5%CO₂ 存在下で最大 21 日間培養した。AGEs は、岡崎らの方法を基に、10 g ウシ血清アルブミン（50 mg/mL）と 1.8 g DL-グリセルアルデヒド（0.1 M）に、0.4 g ジエチレントリアミンペンタメトリック酸（5 mM）を含む 200 mL リン酸緩衝生理食塩水（0.2 M, PBS: pH 7.4）を加えて滅菌条件下で調製した後、37°C、回転数 250 rpm に設定し、7 日間振盪させ作製した。なお、溶液中の低分子量反応物およびアルデヒドを PD-10 カラムで除去した。はじめにコントロール群（0 μ g/mL）と AGEs 刺激群（50, 100 および 200 μ g/mL）で 1, 3, 5, 7, 10 および 14 日間培養を行い、AGEs が骨芽細胞の細胞増殖に及ぼす影響を調べ、次にコントロール群と AGEs 刺激群（100 μ g/mL）で 3, 7 および 14 日目にそれぞれの細胞をサンプルとして回収し、骨芽細胞分化関連転写因子である runt-related transcription factor 2（Runx2）と osterix、石灰化に関与する ECMPs である type I collagen（ColI）および osteocalcin（OCN）の遺伝子発現を real-time PCR でタンパク発現を Western blotting を用いて調べた。ALP の活性は ALP 染色法で調べ、細胞外マトリックス（ECM）のカルシウム量はカルシウム E テストキットを用いて測定した。さらに、AGEs が骨芽細胞の細胞内シグナル因子 extracellular signal-regulated kinases（ERK）1/2 のリン酸化に及ぼす影響を Western blotting を用いて調べた。

MC3T3-E1 細胞の細胞増殖は、200 μ g/mL AGEs 刺激群で培養 5, 7 および 10 日目においてコントロール群と比較して有意な細胞数の減少が認められたが、50 および 100 μ g/mL AGEs 刺激群ではその影響は認められなかった。細胞増殖に影響が認められなかった 100 μ g/mL AGEs 刺激群を以後用いた。次に、AGEs 刺激が骨芽細胞の分化および石灰化に及ぼす影響を検討した。骨芽細胞分化の調節において主要な転写因子である Runx2 とその下流の転写因子 osterix は、骨芽細胞の骨形成において重要な役割を担っている。石灰化は、骨芽細胞由来の細胞膜近くの基質小胞内でヒドロキシアパタイト（HA）の結晶核が形成されることで開始する。HA 結晶は基質小胞を破って成長し、やがて HA の沈着が生じる。さらに OCN は骨芽細胞分化後期の石灰化開始後に産生される ECMPs である。そこで、コントロール群と AGEs 刺激群が骨芽細胞の Runx2, osterix, ColI および OCN の発現に及ぼす影響を調べた。その結果、AGEs 刺激は、培養 3 日目の Runx2, 培養 7 および 14 日目の osterix ならびに培養 3, 7 および 14 日目の OCN の遺伝子発現を有意に減少させた。また、AGEs 刺激は培養 3 日目の Runx2 および I 型コラーゲン分子、培養 7 日目の osterix ならびに培養 14 日目の OCN のタンパク発現で有意

に減少させた。一方、ColI の遺伝子発現および高分子量の I 型コラーゲン分子の前駆体である I 型プロコラーゲンのタンパク発現は、AGEs 刺激の影響が認められなかった。これらの結果より、AGEs は MC3T3-E1 細胞の分化を調節する転写因子および石灰化に関与する ECMPs の発現を抑制することが示唆された。ALP はアルカリ性下で有機リン酸エステル化合物を基質としてリン酸を遊離する酵素である。骨芽細胞では、ALP が局所のリン酸濃度を上昇させるだけでなく、HA の成長を抑制するピロリン酸を分解することから、結果的に骨芽細胞の石灰化促進に関与すると考えられている。そこで、AGEs 刺激が ALP 活性に及ぼす影響を ALP 染色で調べた。その結果、ALP 染色は、すべての培養日数において AGEs 刺激群は、コントロール群と比較して染色性の著しい低下が認められた。次に、骨芽細胞の石灰化に及ぼす AGEs の影響を調べた。培養 14 および 21 日目の ECM 中のカルシウム量は、AGEs 刺激群でコントロール群と比較して有意な減少が認められた。以上の結果より、AGEs 刺激は骨芽細胞の石灰化を抑制することが示された。

AGEs が ligand として MC3T3-E1 細胞に作用していることを確認するために、AGEs が細胞内シグナル因子 ERK1/2 のリン酸化に及ぼす影響を調べた。AGEs 刺激 5 分後、コントロール群と比較し、ERK1/2 のリン酸化が抑制された。この結果から、AGEs は MC3T3-E1 細胞に発現する受容体を介して直接作用していることが明らかになった。

以上の結果から、AGEs が骨芽細胞の分化調節因子と ECMPs 発現を抑制することで、骨形成を抑制する可能性が示唆された。