

## 論文審査の結果の要旨

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

審査委員：（主査） 教授 篠田 雅路

（副査） 教授 植田 耕一郎

教授 磯川 桂太郎

教授 鈴木 直人

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（MC3T3-E1 細胞）を  $2 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> の密度で 96 または 6-well プレートに播種し、血清および抗生物質を含む細胞培養培地最大 21 日間培養した。AGEs は、岡崎らの方法を基に作製した。細胞増殖の結果より AGEs の濃度は 100 µg/mL に設定した。条件をコントロール群と AGEs 刺激群と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 (Col I) 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) のカルシウム沈着量はカルシウム 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、以下の結論が得られた。

1. AGEs は、Runx2、osterix および OCN の遺伝子発現およびタンパク発現を有意に減少させた。
2. AGEs は、Col I の遺伝子発現には影響を及ぼさなかった一方で、mature Col I のタンパク発現を有意に減少させた。
3. AGEs は、ALP 活性および ECM のカルシウム沈着量を減少させた。
4. AGEs は、ERK1/2 のリン酸化を抑制した。

以上のように、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。

これらの結果は AGEs が骨芽細胞の骨形成能に及ぼす影響を細胞生物学的観点から、そのメカニズムの一因を明らかにしたものである。

よって本論文は、博士（歯学）の学位を授与されるに値するものと認められる。

以上

令和3年3月10日