

# 高濃度グルコースが成熟骨芽細胞の石灰化に与える影響

日本大学大学院歯学研究科歯学専攻

清水なつ生

(指導：本吉 満教授，藤原恭子准教授)

## 要旨

目的：過度の糖負荷が骨の形成過程における基質の石灰化を抑制し，骨の脆弱性を生むことは知られているが，その詳細な機序については不明な点が多い。本研究では高濃度グルコースを加えて培養した成熟骨芽細胞の石灰化抑制メカニズムを解明することを目的とした。

方法：ラット骨肉腫由来株化細胞の ROS17/2.8 を異なるグルコース濃度を含む培地で7日間培養し，alkaline phosphatase 染色と基質の石灰化を alizarin red 染色によって確認した。同時に染色した石灰化物をギ酸で溶解し，その吸光度を測定することによって石灰化レベルを数値化した。骨芽細胞関連因子の発現は quantitative PCR で検出し，細胞の生存レベルは WST8 アッセイで評価した。ピロリン酸 (PPi)，モノリン酸 (Pi) および ATP の濃度測定は市販のキットを利用した。

結果：通常の 5.5 mM グルコースを含む培地で培養した対照群と比べ，11 mM あるいは 22 mM の高濃度グルコースを加えた実験群では石灰化の強い抑制が認められた。細胞の生存レベルは高く，またマンニトールを加えて対照群と実験群との浸透圧を同等にしても両群間の石灰化レベルは変化がなかったことから，高濃度グルコースによる石灰化の抑制は，細胞死あるいは浸透圧の上昇には起因しないことが明らかになった。RUNX2, type I collagen, osteocalcin および osteopontin の遺伝子発現は対照群と比べて実験群で高く，5日目に高濃度グ

ルコースを含む培地に交換することで、石灰化を顕著に抑制できた。石灰化を阻害するピロリン酸 (PPi) と石灰化の基質となるモノリン酸 (Pi) の濃度を測定した結果、培養上清中に含まれる細胞外 PPi は実験群で増加し、反対に細胞内・外の Pi は減少した。この時に測定された同じ濃度の PPi を 5.5 mM のグルコースを含む培地に加えたところ、石灰化は強く抑制された。さらに対照群に比べて実験群の細胞内 ATP は軽度に増加し、細胞外 ATP は減少した。

結論：高濃度のグルコースを加えて培養した ROS17/2.8 の石灰化抑制は、培養液中の PPi 濃度の増加によって生じた可能性が考えられた。

キーワード：高濃度グルコース，成熟骨芽細胞，石灰化，ピロリン酸，モノリン酸

## Abstract

**Purpose:** Excessive glucose is known to inhibit the mineralization during bone formation, leading to the bone fragility in skeletal system. However, the exact mechanism how glucose prevents the mineralization remains unclear. A purpose of this study is to define the inhibitory effect of high glucose concentration on mineralized matrix formation in mature osteoblasts.

**Methods:** A rat osteosarcoma-derived cell line ROS17/2.8 was cultured for 7 days in medium containing high glucose (11 or 22 mM), and normal glucose (5.5 mM) as a control. Mineralization was estimated by alizarin red staining and absorbance of the solution eluted from AR-stained matrix. Gene expression of osteoblast specific markers was detected by quantitative PCR. Alkaline phosphatase activity and cell viability was measured by BCIP/NBT staining and WST8 assay, respectively. In addition, concentration of pyrophosphate (PPi), monophosphate (Pi) and ATP was detected by commercial assay kits.

**Results:** High glucose clearly showed the decrease in mineralization, but ALP activity did not change between the cells in high glucose and control. Since high glucose increased cell viability and adding high mannitol in control did not inhibit mineralization, the influence of osmotic pressure was negligible in high glucose culture. High glucose also increased the expression of osteoblast specific markers, RUNX2, type

I collagen, osteocalcin and osteopontin. During 7 days culture, the change in medium containing high glucose at day 5 strongly decreased mineralization compared to those at days 1 and 3. Furthermore, high glucose not only increased extracellular PPI, which prevents the formation of calcium phosphate, but also decreased intra- and extra-cellular concentrations of Pi, which is a substrate for mineralization. When sodium pyrophosphate was added in control at the concentration equal to extracellular PPI in high glucose culture, mineralization was remarkably inhibited. Nevertheless, high glucose decreased extracellular ATP, which is a molecule required for PPI synthesis, although it slightly increased intracellular ATP.

Conclusion: These results suggested that inhibitory effect of high glucose on mineralization in ROS17/2.8 was in part due to increasing extracellular PPI.

Keywords: high glucose concentration, mature osteoblasts, mineralization, pyrophosphate, monophosphate

## 緒言

歯科矯正治療では歯牙移動装置からの外力によって、歯槽骨の改変が誘導され、歯を目的の位置に移動させることができる。この際、圧迫側の歯槽骨には破骨細胞分化の促進によって骨吸収が起こり、反対に牽引側では骨芽細胞の機能が活性化され骨の添加が起こる。このような破骨細胞と骨芽細胞による骨の改変現象は、全身の骨の成長や骨の損傷治癒過程でも生じており、血中グルコース濃度が様々な影響を与えることが知られている<sup>1)</sup>。

これまでに、高血糖が骨の脆弱性を生む報告が数多くなされている。例えば糖尿病が骨粗鬆症のリスクファクターであることは良く知られている<sup>2-5)</sup>。また、高濃度グルコースによって活性酸素が産生され、骨芽細胞の機能阻害や破骨細胞の活性化が起こり<sup>6)</sup>、骨組織中のコラーゲンに非酵素的なグリコシル化が生じることも報告されている<sup>7)</sup>。さらに、グルコースとタンパクの非酵素的な糖化反応によって生じる終末糖化産物の蓄積がインスリン様増殖因子に対する骨芽細胞の反応性を低下させ、その結果、骨形成の抑制が起きる報告もある<sup>8,9)</sup>。しかし、高濃度グルコースが骨形成を抑制する詳しいメカニズムは、未だに解明されていない。

グルコースは骨芽細胞の主なエネルギー源であり、骨組織では活発なグルコースの取り込みが観察されている<sup>10)</sup>。また、最近の研究から骨芽細胞の分化過程でグルコース代謝が大きく変化することも知られている。例えば、前骨芽細

胞の増殖には解糖系が、また骨芽細胞への分化には解糖系とミトコンドリア呼吸の両方が、そして成熟骨芽細胞へ分化すると再び解糖系が主なグルコース代謝経路となっている<sup>11,12)</sup>。一方、初代骨芽細胞を利用した研究から、骨芽細胞の成熟過程において解糖系で機能するヘキソキナーゼやピルビン酸キナーゼ、グルコース輸送体である **glucose transporter 1** の発現が上昇することが知られている<sup>13)</sup>。さらに、骨芽細胞のグルコースの取り込みによって **AMP-activated protein kinase** が活性化され、その結果、骨芽細胞分化関連転写因子の **runt-related transcription factor 2 (RUNX2)** の発現が誘導され、骨芽細胞分化が促進する<sup>14)</sup>。これらの知見は、グルコース代謝の制御が骨芽細胞の分化において重要な役割を持つことを意味している。

高濃度グルコースによる骨芽細胞分化や基質の石灰化に与える影響については、マウス前骨芽細胞様株化細胞 **MC3T3-E1** を使った培養系で研究されている。しかしながら、報告ごとに結果が異なり、一定の見解が得られていないのも事実である。例えば、11 mM から 33 mM のグルコースが **MC3T3-E1** の骨芽細胞への分化と石灰化を促進するという報告がある<sup>15-17)</sup>。一方、15.5 mM のグルコースは、**MC3T3-E1** の増殖や分化、石灰化を促進するが、25.5 mM または 35.5 mM のグルコースでは、抑制的に機能する場合もある<sup>18)</sup>。**MC3T3-E1** は **BMP-2** を含む培地で 3 から 4 週間培養することによって、石灰化能をもつ成熟骨芽細胞に分化するが、最初の 1 週間だけ高濃度グルコースを含む培地にするだけでも石

灰化は促進する。しかし、最後の 1 週間のみを高濃度グルコースにしても変化は見られない<sup>19)</sup>。すなわち、高濃度グルコースが、前骨芽細胞から骨芽細胞、さらに成熟骨芽細胞へ分化する過程で異なる影響を及ぼす可能性があり、MC3T3-E1 を利用した研究において、一定の見解が得られていない理由の 1 つであると考えられる。

本研究では成熟骨芽細胞の性質をもつラット骨肉腫由来株化細胞 ROS17/2.8<sup>20,21)</sup>を使用して、高濃度グルコースが基質の石灰化を抑制するメカニズムについて検討した。

## 材料および方法

### 1. 細胞の培養

ラット骨肉腫由来株化細胞 ROS17/2.8 (理化学研究所バイオリソースセンター, つくば) は alpha modified Eagle's minimum essential medium ( $\alpha$ MEM, 富士フィルム和光純薬, 大阪) に 10% 牛胎児血清 (FBS, ニチリョー, 東京), 600 mg/L glutamine, 100 IU/mL penicillin (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) と 100 mg/mL streptomycin (Thermo Fisher Scientific) を添加した培地で、湿度 100%, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> の条件で培養した。なお、通常の 10% FBS が含まれた  $\alpha$ MEM のグルコース濃度は 5.5 mM に設定されているため<sup>22)</sup>, この培地で培養した細胞を対照群とし、終濃度が 11 mM と 22 mM になるようにグルコースを加えて培養した細胞

を実験群とした。

細胞は  $5 \times 10^4$  個/ml の密度で 96 ウェルプレートまたは 24 ウェルプレートに播種し, 1 日後に 10 mM の  $\beta$ -glycerophosphate (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) と異なるグルコース濃度を含む培地に置換し, 7 日間の培養を行い, 3 日目と 5 日目に培地交換を行った。

## 2. Alkaline phosphatase (ALP) 活性の評価

24 ウェルプレートに播種した細胞から培地を除去し, phosphate buffer saline (PBS) で洗浄後, 4%パラホルムアルデヒドで, 10 分間固定した。各ウェルを超純水で 4 回洗浄し, 0.19 mg/ml の 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate と 0.4 mg/ml の nitro blue tetrazolium chloride を含む水溶液を加え, 10 分間室温でインキュベートした後, 超純水で 1 回洗浄し, 発色したプレート面をスキャナー (LiDE400, キヤノン, 東京) で撮影した。

## 3. 石灰化の評価

基質の石灰化は alizarin red (AR) 染色と吸光度法によって調べた。24 ウェルプレートに播種した細胞から培地を除去し, PBS で洗浄後, 4%パラホルムアルデヒドによって 10 分間室温で固定した。その後, 各ウェルを超純水で 1 回洗浄し, 1% AR 水溶液で 10 分間染色した。超純水で再度洗浄した後, プレート面を

スキャナー (LiDE400) で撮影した。さらに、石灰化レベルを数値化するために、染色後の各ウェルに 5%ギ酸 500  $\mu$ l を加えて 10 分間振盪することで色素を溶出させた。そのうち 100  $\mu$ l を 96 ウェルプレートに移し、波長 425 nm の吸光度をプレートリーダー (SpectraMax ABS Plus, Molecular Devices, San Jose, CA, USA) によって計測した。バックグラウンドは 100  $\mu$ l の 5%ギ酸を使用し、測定値からバックグラウンドの吸光度を減じた数値を評価した。

#### 4. 生存レベルの評価

細胞の生存レベルを評価するために WST8 試薬 (ナカライテスク, 京都) を使用した。96 ウェルプレートに播種した細胞から培地を除去し、1/10 濃度の WST8 試薬を含む 100  $\mu$ l の培地を加え、1 時間培養し、波長 450 nm の吸光度を SpectraMax ABS Plus で計測した。バックグラウンドは 1/10 濃度の WST8 試薬を含む 100  $\mu$ l の培地を使用し、測定値からバックグラウンドの吸光度を減じた数値を生存レベルとした。

#### 5. マンニトールが石灰化に与える影響

細胞浸透圧の変化が石灰化に影響を及ぼすか調べるため、24 ウェルプレートに播種した細胞を通常培地で 5 日間培養した後に、終濃度が 11 mM あるいは 22 mM になるようにマンニトールを加えて 2 日間培養した。その後、石灰化を上

述の3にしたがって調べた。

## 6. Quantitative RT-PCR (qPCR)

RNAの抽出はRNeasy mini kit (Qiagen, Valencia, CA, USA)で、またRNAからcDNAの合成はiScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad laboratories, Hercules, CA, USA)を使用した。qPCRはSYBR Premix Ex Taq II (タカラバイオ, 草津)を使用した。骨芽細胞関連因子の検出に使用したプライマーの塩基配列を表1に示す。反応は95°C, 30秒の前処理後、95°C, 5秒と58°C, 30秒の反応サイクルを40回繰り返した。サーマルサイクラーはCFX Maestro (Bio-Rad laboratories)を使用し、測定は全て3回ずつ行った。なお、cDNAを段階希釈して得られた標準曲線から各遺伝子の相対的な発現レベルを求めた。この際、beta-2-microglobulin (B2M)の値を内因性コントロールとした。

## 7. ピロリン酸 (PPi) 濃度の測定

96ウェルプレートに播種した細胞のPPi濃度の測定は、Pyrophosphate Assay Kit (ab234040, Abcam, Cambridge, UK)を使用した。培養上清をMicrocon-10 (Merck-Millipore, Burlington, MA, USA)に移し、10,000 rpm, 4°Cで10分間遠心後、上清を回収した。得られた上清は測定バッファーで10分の1に希釈し、細胞外PPiの測定に使用した。同時に細胞を100 µlの測定バッファーに懸濁させ、

遠心後、上清を回収し、測定バッファーで 10 分の 1 に希釈したものを細胞内 PPI の測定に使用した。それぞれの上清から得られた 50  $\mu$ l の希釈液と 50  $\mu$ l の検出試薬を 96 ウェルプレートのウェル中で混合し、37°C で 30 分間のインキュベート後、波長 570 nm の吸光度を SpectraMax ABS Plus で計測した。PPI 標準液から検量線を作成し、その吸光度から細胞内・外の PPI 濃度を求めた。さらに、測定に使用しなかったウェルで培養した細胞の DNA 量を計測し、PPI 濃度を補正した。

#### 8. モノリン酸 (Pi) 濃度の測定

Pi 濃度は、ホスファ C テストワコー（富士フィルム和光純薬）によって定量した。96 ウェルプレートに播種した細胞の培養上清を回収し、遠心後、上清を蒸留水で 10 分の 1 に希釈して、細胞外 Pi 濃度の測定に使用した。同時に細胞を 20  $\mu$ l の RIPA バッファー（Thermo Fisher Scientific）で溶解し、細胞内 Pi 濃度の測定に使用した。5  $\mu$ l の上清希釈液または細胞溶解液と 400  $\mu$ l の検出試薬を 1.5 ml チューブ中で混合し、37°C で 20 分間インキュベートした。チューブを水冷後、100  $\mu$ l を 96 ウェルプレートの各ウェルに移し、波長 750 nm の吸光度を SpectraMax ABS Plus で計測した。Pi 標準液で検量線を作成し、吸光度から細胞内・外の Pi 濃度を求めた。さらに、測定に使用しなかったウェルで培養した細胞の DNA 量を計測し、Pi 濃度を補正した。

## 9. ピロリン酸ナトリウム (PPNa) が石灰化に与える影響

24 ウェルプレートに播種した細胞を 5 日間培養した後, 25, 50, 250  $\mu\text{M}$  の PPNa (富士フィルム和光純薬) を含んだ培地と交換し, 2 日間培養した。その後, 上述の 3 に従って石灰化を評価した。

## 10. ATP 濃度の測定

細胞内 ATP 濃度は Intracellular ATP 測定キット Ver.2 IC2-100 (東洋ビーネット, 東京) によって定量した。96 ウェルプレートに播種した細胞を PBS で 1 回洗浄し, 100  $\mu\text{l}$  の ATP 抽出バッファーをウェルに加えて, 5 分間ゆっくり振盪した。その後, 20  $\mu\text{l}$  の抽出バッファーを回収し, 200  $\mu\text{l}$  の ATP 発光試薬と反応後, ルミノメーター (Lu-Mini, Vitl Life Science Solutions, Ashland, VA, USA) で発光量を計測した。さらに, 細胞外 ATP 濃度の定量は Extracellular ATP 測定キット EX2-100 (東洋ビーネット) を利用した。96 ウェルプレートに播種した細胞から回収した 100  $\mu\text{l}$  の培養上清と 100  $\mu\text{l}$  の ATP 発光試薬を反応させた後, Lu-Mini で発光量を計測した。最終的に細胞内・外の ATP 濃度は, ATP 標準液の発光量から得られた検量線をもとに算出した。さらに, 測定に使用しなかったウェルで培養した細胞の DNA 量を計測し, ATP 濃度を補正した。

## 1 1 . 統計解析

サンプル間の有意差検定は one-way ANOVA と Turkey 検定で行なった。全ての統計解析は、統計解析ソフト JMP バージョン 11.2 (SAS Institute, Cary, NC, USA) を使用した。データは、全て 3 回あるいはそれ以上の実験の平均値  $\pm$  standard deviation (SD) で表し、 $p$  値 0.05 以下を統計学的有意とした。

## 結果

### 1 . 高濃度グルコースが ALP 活性と石灰化に与える影響

通常の 10% FBS が含まれた  $\alpha$ MEM のグルコース濃度は 5.5 mM であり、この値は正常なヒトの空腹時血糖にほぼ等しい<sup>23)</sup>。一方、糖尿病患者では血糖値 6.9 mM~20 mM 以上にまで上昇することから<sup>24,25)</sup>、今回は 11 mM と 22 mM を高濃度グルコースとした。異なる濃度のグルコースを含む培地で ROS17/2.8 を培養し、7 日目に ALP 活性と基質の石灰化を調べた。その結果、いずれのグルコース濃度でも ALP 活性の変化は見られなかったが、5.5 mM グルコースで培養した細胞 (対照群) と比較して、高濃度グルコースを加えて培養した細胞では、石灰化の抑制が認められた。AR 染色後の基質を 5%ギ酸で溶解し、染色レベルを数値化した結果、この石灰化抑制は、対照群を 1 とした場合、11 mM グルコース添加群で  $0.53 \pm 0.15$  ( $p < 0.01$ )、また 22 mM グルコース添加群では  $0.13 \pm 0.01$  ( $p < 0.01$ ) となった (図 1 A)。

高濃度グルコースによる石灰化の抑制が，細胞浸透圧の上昇によって生じた可能性も否定できない。そこで，対照群に 5.5 mM と 16.5 mM のマンニトールを加え，浸透圧を 11 mM と 22 mM グルコース添加群と同等にし，7 日間の培養を行った。AR 染色の結果，マンニトール添加群の石灰化抑制は認められなかった（図 1 B）。

## 2. 高濃度グルコースが細胞の生存レベルと骨芽細胞関連因子の遺伝子発現に与える影響

高濃度グルコースによる石灰化抑制が，細胞の生存レベルの低下によって生じたものかを明らかにするため，WST8 アッセイを行った。その結果，生存レベルは対照群と比較して 11 mM と 22 mM グルコース添加群で増加を示し，対照群を 1 とした場合，11 mM グルコース添加群で  $1.48 \pm 0.06$  ( $p < 0.01$ )，22 mM グルコース添加群では  $1.88 \pm 0.04$  ( $p < 0.01$ ) となった（図 2）。

高濃度グルコースが骨芽細胞関連因子の遺伝子発現に及ぼす影響について検討した。図 3 に示すように高濃度グルコース添加によって RUNX2, type I collagen (COL1A1)，osteocalcin (OCN) の発現は顕著な増加を示した。RUNX2 の発現は対照群を 1 とした場合，11 mM グルコース添加群で  $2.14 \pm 0.09$  ( $p < 0.01$ )，22 mM グルコース添加群では  $2.38 \pm 0.12$  ( $p < 0.01$ )，COL1A1 は 11 mM グルコース添加群で  $1.91 \pm 0.13$  ( $p < 0.01$ )，22 mM グルコース添加群では  $13.4 \pm 0.38$

( $p < 0.01$ ) となった。また、OCN の発現は対照群を 1 とした場合、11 mM のグルコース添加群で  $2.38 \pm 0.73$  ( $p < 0.01$ ) , 22 mM のグルコース添加群では  $2.97 \pm 0.36$  ( $p < 0.01$ ) という値を示した。一方、osteopontin (OPN) の発現は対照群を 1 とした場合、11 mM グルコース添加群で  $1.20 \pm 0.06$  ( $p < 0.01$ ) を示したが、22 mM グルコース添加群では有意な差は認められなかった (図 3)。

### 3. 高濃度グルコースを加えるタイミングが石灰化抑制に与える影響

7 日間の培養期間中、どのタイミングで高濃度グルコースを加えると石灰化が抑制されるか検討した。細胞播種後、表 2 のスケジュールに従って 1, 3, 5 日に異なる濃度のグルコースを含む培地に交換し、7 日間の培養を行った。グルコース濃度は通常濃度である 5.5 mM から高濃度の 22 mM へ変化させ、培地交換の日時の違いから表 2 に示す 8 つの実験群 (#1~#8) に分けた。その結果、図 4 に示すように 5.5 mM のグルコースで 7 日間培養した対照群の #1 と比較して、5 日目, 3 と 5 日目, 1, 3, 5 日目, および 1 と 5 日目に 22 mM グルコースを含む培地に交換した実験群 (#2, #3, #4 および #8) の石灰化が強く抑制された。数値的には、#1 を 1 とした場合、#2 は  $0.24 \pm 0.01$  ( $p < 0.01$ ) , #3 は  $0.09 \pm 0.003$  ( $p < 0.01$ ) , #4 は  $0.12 \pm 0.003$  ( $p < 0.01$ ) , #8 は  $0.25 \pm 0.004$  ( $p < 0.01$ ) となり、それぞれの群で減少が見られた。また、1 と 3 日目, および 3 日目に 22 mM グルコースを含む培地に交換した実験群 (#6 と #7) でも石灰化の抑制が認

められた。数値的には#1を1とした場合、#6は $0.56 \pm 0.01$  ( $p < 0.01$ )、#7は $0.58 \pm 0.01$  ( $p < 0.01$ )であった。これらの結果から、5日目に高濃度グルコースを含む培地に交換すれば、1日目と3日目のグルコース濃度の違いに関係なく、石灰化の抑制が起きることが示された。しかし、5日目に通常濃度のグルコースに交換した場合は、1と3日目あるいは3日目の培地に高濃度グルコースが含まれていれば石灰化は抑制されたが、#2、#3、#4、および#8に比べると軽度であった。

#### 4. 高濃度グルコースによる PPI と Pi の濃度変化

骨芽細胞が産生する PPI は基質内でリン酸カルシウムの形成を阻害し、石灰化を抑制する<sup>24)</sup>。そこで、高濃度グルコースを含む培地で7日間培養した ROS17/2.8 が産生する PPI と、PPI の分解によって生じる Pi の濃度変化について検討した。

細胞内 PPI 濃度は、対照群が  $22.9 \pm 2.1$  nmol/ $\mu$ gDNA、11 mM グルコース添加群で  $20.9 \pm 0.9$  nmol/ $\mu$ gDNA、22 mM グルコース添加群では  $18.4 \pm 2.1$  nmol/ $\mu$ gDNA であった。対照群を1として比較した場合、11 mM グルコース添加群では有意差はなかったが、22 mM グルコース添加群では  $0.80 \pm 0.09$  ( $p < 0.05$ ) となり、減少が認められた。逆に細胞外 PPI は、対照群が  $16.2 \pm 0.5$  nmol/ $\mu$ gDNA、11 mM グルコース添加群で  $20.7 \pm 0.4$  nmol/ $\mu$ gDNA、22 mM グルコース添加群では 26.7

$\pm 1.1 \text{ nmol}/\mu\text{gDNA}$  と増加し、対照群を 1 とした場合、11 mM グルコース添加群で  $1.27 \pm 0.03$  ( $p < 0.01$ )、22 mM グルコース添加群では  $1.65 \pm 0.06$  ( $p < 0.01$ ) という値を示した (図 5A)。

一方、Pi の濃度は細胞内・外ともに高濃度グルコース添加群で減少した。対照群の細胞内 Pi は  $0.74 \pm 0.02 \mu\text{mol}/\mu\text{gDNA}$ 、11 mM グルコース添加群で  $0.53 \pm 0.01 \mu\text{mol}/\mu\text{gDNA}$ 、22 mM グルコース添加群では  $0.23 \pm 0.01 \mu\text{mol}/\mu\text{gDNA}$  となり、対照群を 1 として比較した場合、11 mM グルコース添加群で  $0.73 \pm 0.02$  ( $p < 0.01$ )、22 mM グルコース添加群では  $0.31 \pm 0.01$  ( $p < 0.01$ ) となった。また、細胞外 Pi 濃度については対照群が  $0.52 \pm 0.02 \mu\text{mol}/\mu\text{gDNA}$ 、11 mM グルコース添加群で  $0.42 \pm 0.01 \mu\text{mol}/\mu\text{gDNA}$ 、22 mM グルコース添加群では  $0.27 \pm 0.01 \mu\text{mol}/\mu\text{gDNA}$  となり、対照群を 1 として比較した場合、11 mM グルコース添加群で  $0.83 \pm 0.03$  ( $p < 0.01$ )、22 mM グルコース添加群では  $0.52 \pm 0.03$  ( $p < 0.01$ ) という値を示した (図 5B)。

## 5. PPNa が石灰化に与える影響

DNA 量で補正前の PPi 濃度は対照群が  $72.9 \pm 2.2 \mu\text{M}$ 、11 mM グルコース添加群で  $127.8 \pm 2.6 \mu\text{M}$ 、また 22 mM グルコース添加群では  $245.7 \pm 9.6 \mu\text{M}$  であったことから、通常の 5.5 mM グルコースを含む培地で培養した対照群に 25  $\mu\text{M}$ 、50  $\mu\text{M}$ 、250  $\mu\text{M}$  の PPNa を添加し、PPNa から解離した PPi が石灰化に如何なる影

響を及ぼすか検討した。細胞播種後 5 日目に PPNa を投与し，7 日目に AR 染色を行った結果，PPNa による石灰化の抑制がみられた。数値的には PPNa 非添加群（0  $\mu\text{M}$ ）の吸光度を 1 として比較した場合，25  $\mu\text{M}$  の PPNa 添加群で  $0.83 \pm 0.01$  ( $p < 0.01$ )，50  $\mu\text{M}$  の PPNa 添加群で  $0.57 \pm 0.01$  ( $p < 0.01$ )，250  $\mu\text{M}$  の PPNa 添加群では  $0.08 \pm 0.01$  ( $p < 0.01$ ) となった（図 6）。

## 6. 高濃度グルコースが ATP 産生に与える影響

生体内の PPI は主に ATP の分解によって合成されるため<sup>25,26</sup>，高濃度グルコースが細胞内・外の ATP 濃度にどのような影響を及ぼすか調べた。その結果，対照群の細胞内 ATP 濃度は  $73.6 \pm 3.9$  pmol/ $\mu\text{gDNA}$ ，11 mM グルコース添加群で  $102.5 \pm 29.9$  pmol/ $\mu\text{gDNA}$ ，22 mM グルコース添加群では  $112.3 \pm 13.6$  pmol/ $\mu\text{gDNA}$  となり，対照群を 1 として比較した場合，11 mM グルコース添加群では有意差は見られなかったが，22 mM グルコース添加群で  $1.53 \pm 0.18$  ( $p < 0.05$ ) となり，有意な増加がみられた（図 7A）。一方，細胞外 ATP 濃度については，対照群が  $56.8 \pm 28.2$  pmol/ $\mu\text{gDNA}$ ，11 mM グルコース添加群で  $21.2 \pm 14.2$  pmol/ $\mu\text{gDNA}$ ，22 mM グルコース添加群では  $13.6 \pm 5.6$  pmol/ $\mu\text{gDNA}$  と減少を示し，対照群を 1 として比較した場合，11 mM グルコース添加群で  $0.74 \pm 0.01$  ( $p < 0.01$ ) 22 mM グルコース添加では  $0.53 \pm 0.03$  ( $p < 0.01$ ) という値を示した（図 7B）。

## 考察

成熟骨芽細胞である ROS17/2.8 の石灰化は、11 mM および 22 mM の高濃度グルコースで培養することによって強く抑制されることが明らかになった。この現象は、高濃度グルコースによって生じる浸透圧の変化や細胞死によるものでなかったことから、過度の糖負荷が骨に脆弱性を与える原因として成熟骨芽細胞の石灰化抑制が深く関わっていると考えられる。一方、高濃度グルコースは ROS17/2.8 における骨芽細胞関連因子の RUNX2, COL1A1, OCN の遺伝子発現を増加させた。COL1A1 や OCN はリン酸カルシウム沈着の足場となる基質の形成に必要なタンパクであり石灰化を促進する<sup>26)</sup>。しかし、今回、明らかにした高濃度グルコースの石灰化抑制作用は、基質の形成よりも細胞外 P*Pi* 濃度の増加が大きく影響していると思われる。また、高濃度グルコースによって軽度発現が促進した OPN は、動脈硬化症における血管内皮へのカルシウム塩の沈着を阻害する働きをもつことが知られている<sup>27)</sup>。したがって高濃度グルコースによって OPN や matrix Gla protein<sup>28)</sup>などの石灰化抑制タンパクが増加した可能性も否定できない。さらに、高濃度グルコースによって発現が増加した RUNX2 は、骨芽細胞における基質タンパクの発現に必要な転写因子である<sup>29)</sup>。実際に、COL1A1 や OCN の遺伝子プロモーター領域に RUNX2 の結合配列が存在することが知られており<sup>30,31)</sup>、高濃度グルコースによって発現が増加した RUNX2 が

間接的に COL1A や OCN の発現を促進させた可能性も考えられ、高濃度グルコースと骨芽細胞関連因子との関係について今後検討する必要がある。

ROS17/2.8 の培養系に高濃度グルコースを加えるタイミングの違いが、石灰化抑制にどのような影響を及ぼすかを調べた。その結果、石灰化を強く抑制するには培養期間 7 日のうち 5 日目にグルコースが高濃度である必要があること、また 5 日目にグルコース濃度が通常濃度であれば、それ以前に高濃度グルコースを加えても石灰化の抑制は軽度であることが確認できた。グルコースによる骨芽細胞の石灰化のタイミングを調べた研究は MC3T3-E1 を使用した報告以外に見当たらない<sup>19)</sup>。MC3T3-E1 では、培養初期に高濃度グルコースに保たれていれば石灰化は促進するが、培養後期ではグルコースを加えるタイミング変えても石灰化の促進効果は認められない<sup>19)</sup>。一方、MC3T3-E1 の 12 日間の培養系にリン酸カルシウムと親和性をもつ合成ペプチド (VYKHLNQISQSY) を加えた場合、6 日以前に添加するよりも、全期間あるいは 7 日目以降に添加することで強い石灰化の抑制効果が認められている<sup>32)</sup>。ROS17/2.8 と MC3T3-E1 はそもそも細胞特性が大きく異なり、両者を比較することはできないが、一般的に骨芽細胞から最終分化を遂げた成熟骨芽細胞は、細胞増殖が終了してから石灰化基質を産生する<sup>33)</sup>。したがって、高濃度グルコースをはじめとする石灰化抑制因子は石灰化基質を産生する培養後期に作用させた方が、強い効果が維持できると考える。

成熟骨芽細胞による石灰化は、その成熟過程で細胞外に分泌した基質小胞中にカルシウムイオンや細胞外 Pi が取り込まれ、リン酸カルシウム結晶が形成されることで始まる<sup>34)</sup>。結晶形成に必要な Pi は、ALP が細胞内・外の PPi を分解することで供給され、リン酸カルシウムの結晶形成を促進する<sup>35,36)</sup>。今回、高濃度グルコースによる ALP 活性の低下は明らかにできなかったが、高濃度グルコースによって細胞外 PPi が増加したこと、また 5.5 mM グルコースを加えた培養系へ PPNa を加えると石灰化が顕著に抑制されたことから、細胞外 PPi 濃度の上昇が高濃度のグルコースによる石灰化抑制の直接的な原因の一つであることが強く示唆された。細胞外 PPi は主に細胞内・外の ATP が分解されることによって供給される<sup>35,36)</sup>。しかし、22 mM グルコースは細胞内 ATP を軽度に増加させたが、11 mM グルコースでは対照群と比較して有意な差は認められなかった。11 mM と 22 mM グルコースは細胞内 ATP を減少させたことから考えると、ATP 以外の因子が細胞外 PPi 濃度を増加させた可能性がある。実際に高濃度グルコースの培養系で ROS17/2.8 が合成する細胞内・外 ATP 濃度の計測値は、20~100 pmol/ $\mu$ gDNA と非常に低く、細胞内・外 PPi の計測値 (10~20 nmol/ $\mu$ gDNA) から考えると ATP が PPi の直接的な供給源となることは極めて少ない。今後は、脂肪酸など PPi の供給源について検討する必要がある。

## 結論

高濃度グルコースによる ROS17/2.8 の石灰化抑制メカニズムを検討し、以下の結論を得た。

1. 11 mM と 22 mM の高濃度グルコースは ROS17/2.8 の石灰化を抑制した。
2. 高濃度グルコースは細胞の生存レベルと骨芽細胞関連因子の RUNX2, COL1A1, OCN および OPN の遺伝子発現を増加させた。
3. 7 日間の培養期間中、5 日目に高濃度グルコースにすることで、石灰化を抑制した。
4. 高濃度グルコースは細胞外 PPi 濃度の上昇と、細胞内・外 Pi の濃度の低下を誘導した。
5. PPNa は 5.5 mM グルコースで培養した細胞の石灰化を抑制した。
6. 高濃度グルコースは細胞内 ATP の濃度を軽度に増加させ、細胞外 ATP を減少させた。

以上のことから、高濃度グルコースを加えて培養した ROS17/2.8 にみられた石灰化の抑制は、細胞外 PPi 濃度の上昇に起因することが示唆された。

## 謝辞

本研究遂行にあたり，格別たるご指導とご鞭撻を賜りました本吉満教授，藤原恭子准教授ならびに日本大学歯学部歯科矯正学講座，解剖学第 I 講座の皆様に深く感謝致します。

本論文に関して，開示すべき利益相反はありません。

## 参考文献

- 1) Napoli N, Chandran M, Pierroz DD, Abrahamsen B, Schwartz AV, S.L. Ferrari SL (2017) Mechanisms of diabetes mellitus-induced bone fragility. *Nat Rev Endocrinol* 13, 208-219.
- 2) Christodoulou C, Cooper C (2003) What is osteoporosis? *Postgrad Med J* 79, 133-138.
- 3) Janghorbani M, Van Dam RM, Willett WC, Hu FB (2007) Systematic review of type 1 and type 2 diabetes mellitus and risk of fracture. *Am J Epidemiol* 166, 495-505.
- 4) Vestergaard P (2007) Discrepancies in bone mineral density and fracture risk in patients with type 1 and type 2 diabetes--a meta-analysis. *Osteoporos Int* 18, 427-444.
- 5) Hamann C, Kirschner S, Günther KP, Hofbauer LC (2012) Bone, sweet bone--

- osteoporotic fractures in diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol* 8, 297-305.
- 6) Manolagas SC (2010) From estrogen-centric to aging and oxidative stress: a revised perspective of the pathogenesis of osteoporosis. *Endocr Rev* 31, 266-300.
- 7) Saito M, Fujii K, Mori Y, Marumo K (2006) Role of collagen enzymatic and glycation induced cross-links as a determinant of bone quality in spontaneously diabetic WBN/Kob rats. *Osteoporos Int* 17, 1514-1523.
- 8) Terada M, Inaba M, Yano Y, Hasuma T, Nishizawa Y, Morii H, Otani S (1998) Growth-inhibitory effect of a high glucose concentration on osteoblast-like cells. *Bone* 22, 17-23.
- 9) McCarthy AD, Etcheverry SB, Cortizo AM (2001) Effect of advanced glycation endproducts on the secretion of insulin-like growth factor-I and its binding proteins: role in osteoblast development. *Acta Diabetol* 38, 113-122.
- 10) Zoch ML, Abou DS, Clemens TL, Thorek DLJ, Riddle RC (2016) *In vivo* radiometric analysis of glucose uptake and distribution in mouse bone. *Bone Res* 4, 16004.
- 11) Guntur AR, Le PT, Farber CR, Rosen CJ (2014) Bioenergetics during calvarial osteoblast differentiation reflect strain differences in bone mass. *Endocrinology* 155, 1589-1595.
- 12) Shum LC, White NS, Mills BN, De Mesy Bentley KL, Eliseev RA (2016) Energy

- metabolism in mesenchymal stem cells during osteogenic differentiation. *Stem Cells Dev* 25, 114-122.
- 13) Yang J, Ueharu H, Mishina Y (2020) Energy metabolism: A newly emerging target of BMP signaling in bone homeostasis. *Bone* 138, 115467.
- 14) Wei J, Shimazu J, Makinistoglu MP, Maurizi A, Kajimura D, Zong H, Takarada T, Lezaki T, Pessin JE, Hinoi E, Karsenty G (2015) Glucose uptake and Runx2 synergize to orchestrate osteoblast differentiation and bone formation. *Cell* 161, 1576-1591.
- 15) Liu J, Yang J (2016) Uncarboxylated osteocalcin inhibits high glucose-induced ROS production and stimulates osteoblastic differentiation by preventing the activation of PI3K/Akt in MC3T3-E1 cells. *Int J Mol Med* 37, 173-181.
- 16) Dong K, Hao P, Xu S, Liu S, Zhou W, Yue X, Rausch-Fan X, Liu Z (2017) Alpha-lipoic acid alleviates high-glucose suppressed osteogenic differentiation of MC3T3-E1 cells via antioxidant effect and PI3K/Akt signaling pathway, *Cell Physiol Biochem* 42, 1897-1906.
- 17) Wang R, Gao D, Zhou Y, Chen L, Luo B, Yu Y, Li H, Hu J, Huang Q, He M, Peng W, Luo D (2017) High glucose impaired estrogen receptor alpha signaling via  $\beta$ -catenin in osteoblastic MC3T3-E1. *J Steroid Biochem Mol Biol* 174, 276-283.
- 18) Liu Z, Jiang H, Dong K, Liu S, Zhou W, Zhang J, Meng L, Rausch-Fan X, Xu X

- (2015) Different concentrations of glucose regulate proliferation and osteogenic differentiation of osteoblasts via the PI3 kinase/Akt pathway. *Implant Dent* 24, 83-91.
- 19) Takeno A, Kanazawa I, Tanaka K, Notsu M, Kanasaki K, Oono T, Ogawa Y, Sugimoto T (2020) High glucose promotes mineralization via bone morphogenetic protein 4-Smad signals in early stage of osteoblast differentiation. *Diabetol Int* 12, 171-180.
- 20) Manolagas SC, Spiess YH, Burton DW, Deftos LJ (1983) Mechanism of action of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>-induced stimulation of alkaline phosphatase in cultured osteoblast-like cells. *Mol Cell Endocrinol* 33, 27-36.
- 21) Lohmann CH, Schwartz Z, Liu Y, Li Z, Simon BJ, Sylvia VL, Dean DD, Bonewald LF, Donahue HJ, Boyan BD (2003) Pulsed electromagnetic fields affect phenotype and connexin 43 protein expression in MLO-Y4 osteocyte-like cells and ROS 17/2.8 osteoblast-like cells. *J Orthop Res* 21, 326-334.
- 22) 富士フイルム和光純薬株式会社, MEM $\alpha$  (L-グルタミン、フェノールレッド含有) 組成表.  
[https://labchemwako.fujifilm.com/jp/product\\_data/docs/00063419\\_doc01.pdf](https://labchemwako.fujifilm.com/jp/product_data/docs/00063419_doc01.pdf) (2023年1月5日アクセス)
- 23) 日本糖尿病学会 (2019) 糖尿病診療ガイドライン2019, 南江堂, 東京, 5-

- 19.
- 24) Havlin CE, Cryer PE (1987) Nocturnal hypoglycemia does not commonly result in major morning hyperglycemia in patients with diabetes mellitus. *Diabetes Care* 10, 141-147.
- 25) Bonucci E (2012) Bone mineralization. *Frontiers in Bioscience* 17, 100-128.
- 26) Ando K, Nishimura R, Tsujino D, Seo C, Utsunomiya K (2013) 24-hour glycemic variations in drug-naïve patients with type 2 diabetes: a continuous glucose monitoring (CGM)-based study. *PLoS One* 8, e71102.
- 27) Speer MY, McKee MD, Guldberg RE, Liaw L, Yang HY, Tung E, Karsenty G, Giachelli CM (2002) Inactivation of the osteopontin gene enhances vascular calcification of matrix Gla protein-deficient mice: evidence for osteopontin as an inducible inhibitor of vascular calcification in vivo. *J. Exp. Med.* 196, 1047-1055.
- 28) Luo G, Ducy P, McKeet MD, Pinero GJ, Loyer E, Behringer RR, Karsenty G (1997) Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. *Nature* 386, 78-81.
- 29) Komori T (2002) Runx2, a multifunctional transcription factor in skeletal development. *J Cell Biochem* 87, 1-8.
- 30) Harada H, Tagashira S, Fujiwara M, Ogawa S, Katsumata T, Yamaguchi A, Komori T, Nakatsuka M (1999) Cbfa1 isoforms exert functional differences in osteoblast

- differentiation. *J Biol Chem* 274, 6972-6978.
- 31) Kern B, Shen J, Starbuck M, Karsenty G (2001) Cbfa1 contributes to the osteoblast-specific expression of type I collagen genes. *J Biol Chem* 276, 7101-7107.
- 32) Ramaswamy J, Nam HK, Ramaraju H, Hatch NE, Kohn DH (2015) Inhibition of osteoblast mineralization by phosphorylated phage-derived apatite-specific peptide. *Biomaterials*, 73, 120-130.
- 33) Rutkovskiy A, Stensløykken KO, Vaage IJ (2016) Osteoblast differentiation at a glance. *Med Sci Monit Basic Res* 22, 95-106.
- 34) Boonrunsimana S, Gentlemana E, Carzanigad R, Evansa ND, McComba DW, Portera AE, Stevensa MM (2012) The role of intracellular calcium phosphate in osteoblast-mediated bone apatite formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 109, 14170-14175.
- 35) Terkeltaub R, Rosenbach M, Fong F, Goding J (1994) Causal link between nucleotide pyrophosphohydrolase overactivity and increased intracellular inorganic pyrophosphate generation demonstrated by transfection of cultured fibroblasts and osteoblasts with plasma cell membrane glycoprotein-1. Relevance to calcium pyrophosphate dihydrate deposition disease. *Arthritis Rheum* 37, 934-941.
- 36) Orriss IR, Arnett TR, Russell RGG (2016) Pyrophosphate: a key inhibitor of mineralisation. *Curr Opin Pharmacol* 28, 57-68.



表 1 qPCR に使用したプライマー

遺伝子	塩基配列 (5' - 3')
RUNX2 forward	CAAGTGGCCAGGTTCAACGA
RUNX2 reverse	TGTGAAGACCGTTATGGTCAAAGTG
COL1A1 forward	CAGATTGAGAACATCCGCAGC
COL1A1 reverse	CGGAACCTTCGCTTCCATACTC
OPN forward	GATGAACAGTATCCCGATGCC
OPN reverse	CCCTCTGCTTATACTCCTTGGAC
OCN forward	GACAAGTCCCACACAGCAACT
OCN reverse	GGACATGAAGGCTTTGTCAGA
B2M forward	CGAGACCGATGTATATGCTTGC
B2M reverse	GTCCAGATGATTCAGAGCTCCA

COL1A1: type I collagen, OCN: osteocalcin, OPN: osteopontin, B2M: beta-2-macroglobulin

表 2 培地交換のスケジュール

日*	グルコース濃度 (mM)							
	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8
1	5.5	5.5	5.5	22	22	22	5.5	22
3	5.5	5.5	22	22	5.5	22	22	5.5
5	5.5	22	22	22	5.5	5.5	5.5	22

\*ROS17/2.8 の播種後, 1, 3, 5 日目に 5.5 mM あるいは 22 mM のグルコースを含む培地に交換した。#1 はすべての期間 5.5 mM グルコースを含む培地で培養した細胞 (対照群), また#2~#8 は異なるタイミングで 5.5 mM グルコースあるいは 22 mM グルコースを含む培地に交換して培養した細胞 (実験群) を示す。

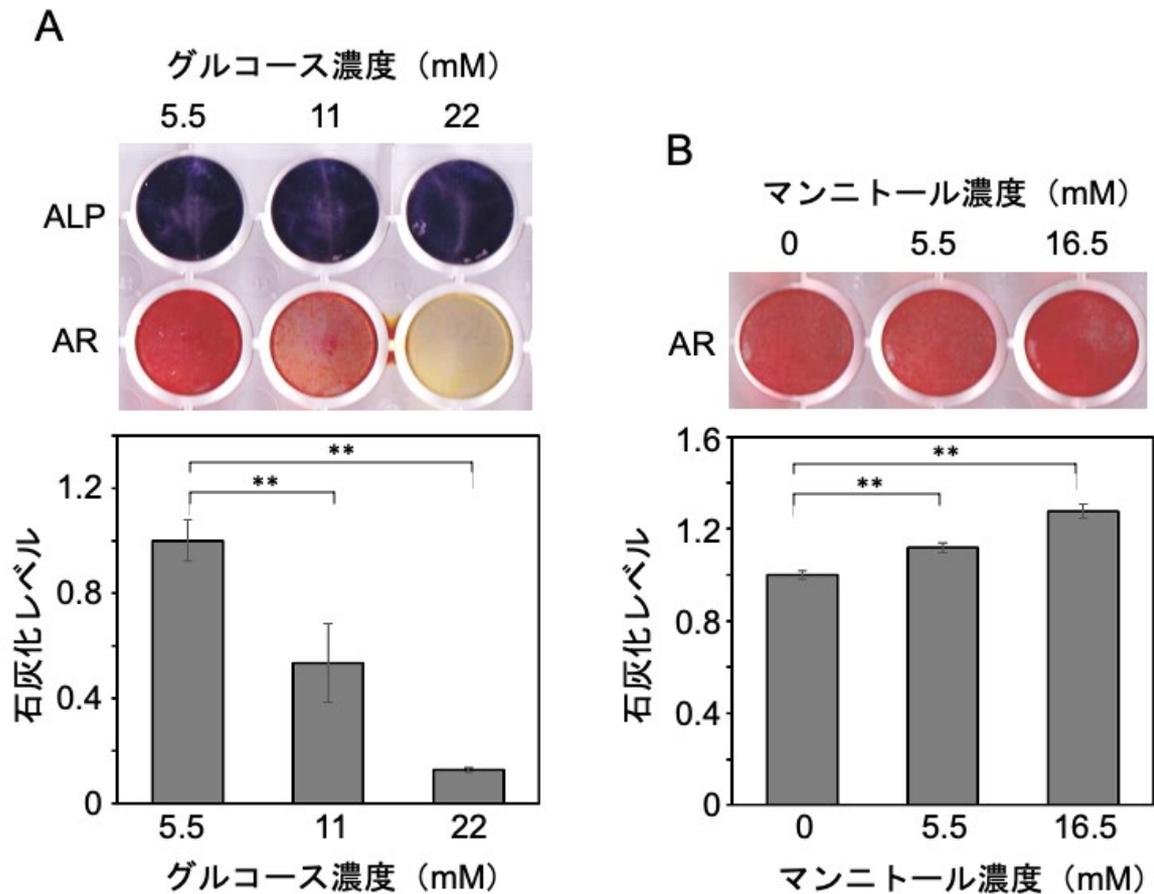


図1 高濃度グルコースが石灰化に与える影響

(A) ROS17/2.8を7日間培養し、5.5 mMグルコースを加えた群（対照群）と、11 mMあるいは22 mMグルコースを加えた群（実験群）との間のALP活性と石灰化の違いについて調べた。ALP染色とAR染色を写真（上）で、またAR染色後の溶解液の吸光度から得られた石灰化レベルをグラフ（下）で示す。(B) 対照群の浸透圧を実験群と同じになるよう、対照群に5.5 mMと16.5 mMのマンニトールをそれぞれ加えて培養し、石灰化の違いを調べた。AR染色の写真（上）と、AR染色後の基質溶解液の吸光度から得られた石灰化レベルをグラフ（下）で示す。なお、(A) と (B) の吸光度から得られた石灰化レベルは対照群とマンニトール非添加のものをそれぞれ1とした場合の割合で表した。計測値は、4回の測定結果の平均値  $\pm$  SDで示す。\*\*  $p < 0.01$

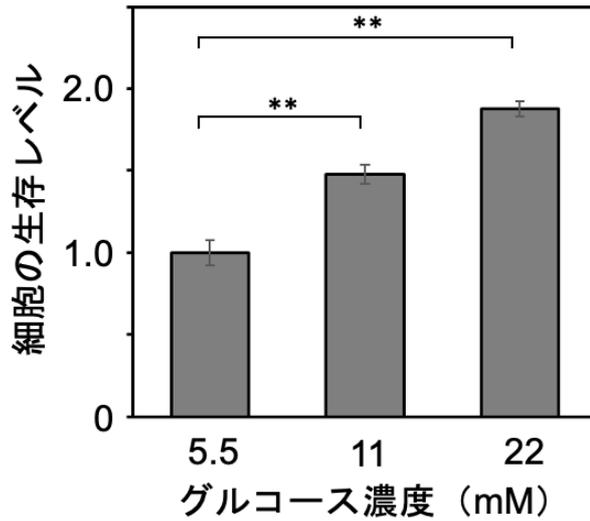
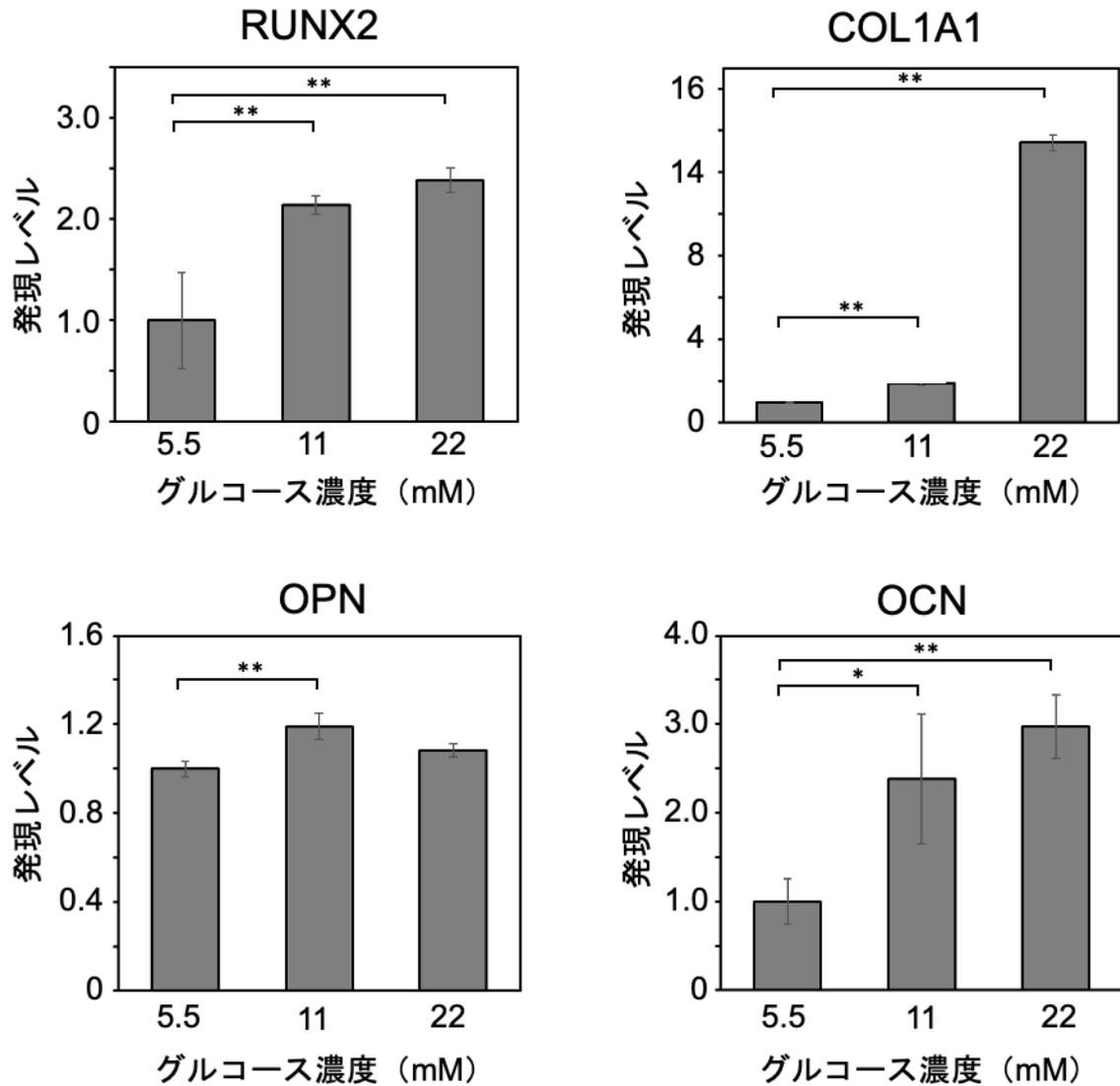
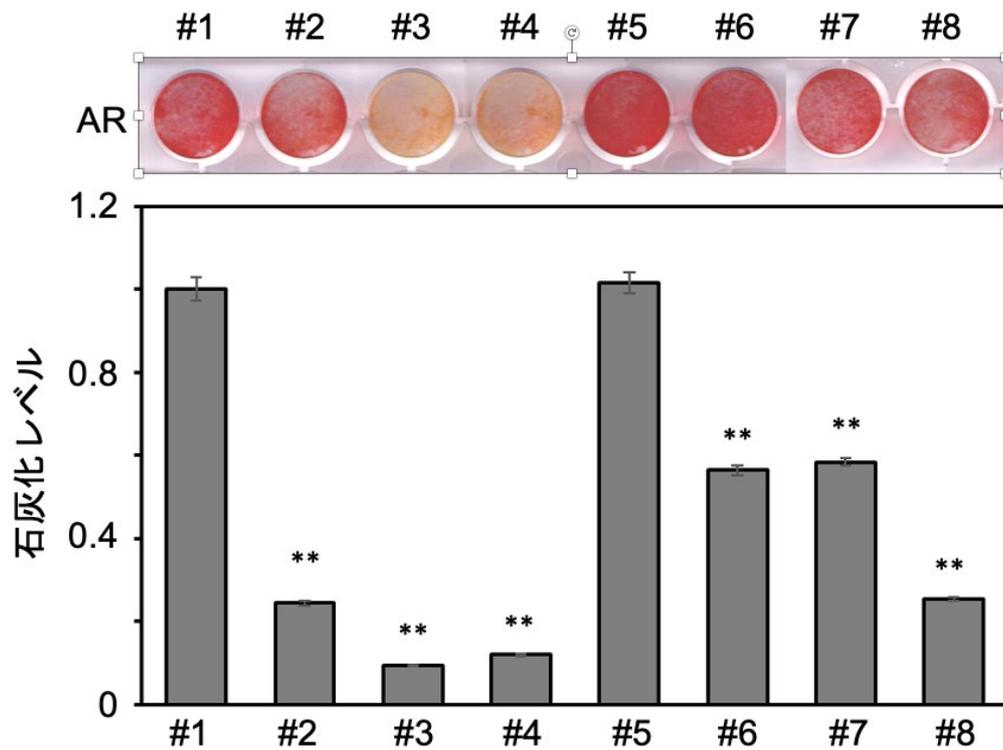


図2 高濃度グルコースが細胞の生存レベルに与える影響

ROS17/2.8 を 7 日間培養し、細胞の生存レベルを調べた。11 mM と 22 mM グルコースで培養した細胞の生存レベルは、5.5 mM グルコースを加えた細胞の生存レベルを 1 とした場合の割合で表した。計測値は 4 回の測定結果の平均値  $\pm$  SD で示す。\*\*  $p < 0.01$



**図3** 高濃度グルコースが骨芽細胞関連因子の遺伝子発現に与える影響  
 ROS17/2.8 を 7 日間培養し、骨芽細胞関連因子である RUNX2, COL1A1, OPN, OCN の遺伝子発現について調べた。11 mM と 22 mM グルコースを加えて培養した細胞のそれぞれの遺伝子発現レベルは、5.5 mM グルコースで培養した細胞の発現レベルを 1 とした場合の割合で表した。計測値は 3 回の測定結果の平均値 ± SD で示す。すべての測定値は B2M の発現量で補正した。\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$



**図4** 高濃度グルコースを加えるタイミングの違いが石灰化に及ぼす影響  
 表2のスケジールに従って通常濃度の5.5 mMグルコースを含む培地から22 mMの高濃度グルコースを含む培地に交換してROS17/2.8の石灰化に及ぼす影響を調べた。AR染色の写真（上）とAR染色後の基質溶解液の吸光度から得られた石灰化レベルをグラフ（下）で示す。それぞれの石灰化レベルは#1の吸光度を1とした場合の割合で表した。計測値は、4回の測定結果の平均値 ± SDで示す。  
 \*\*  $p < 0.01$

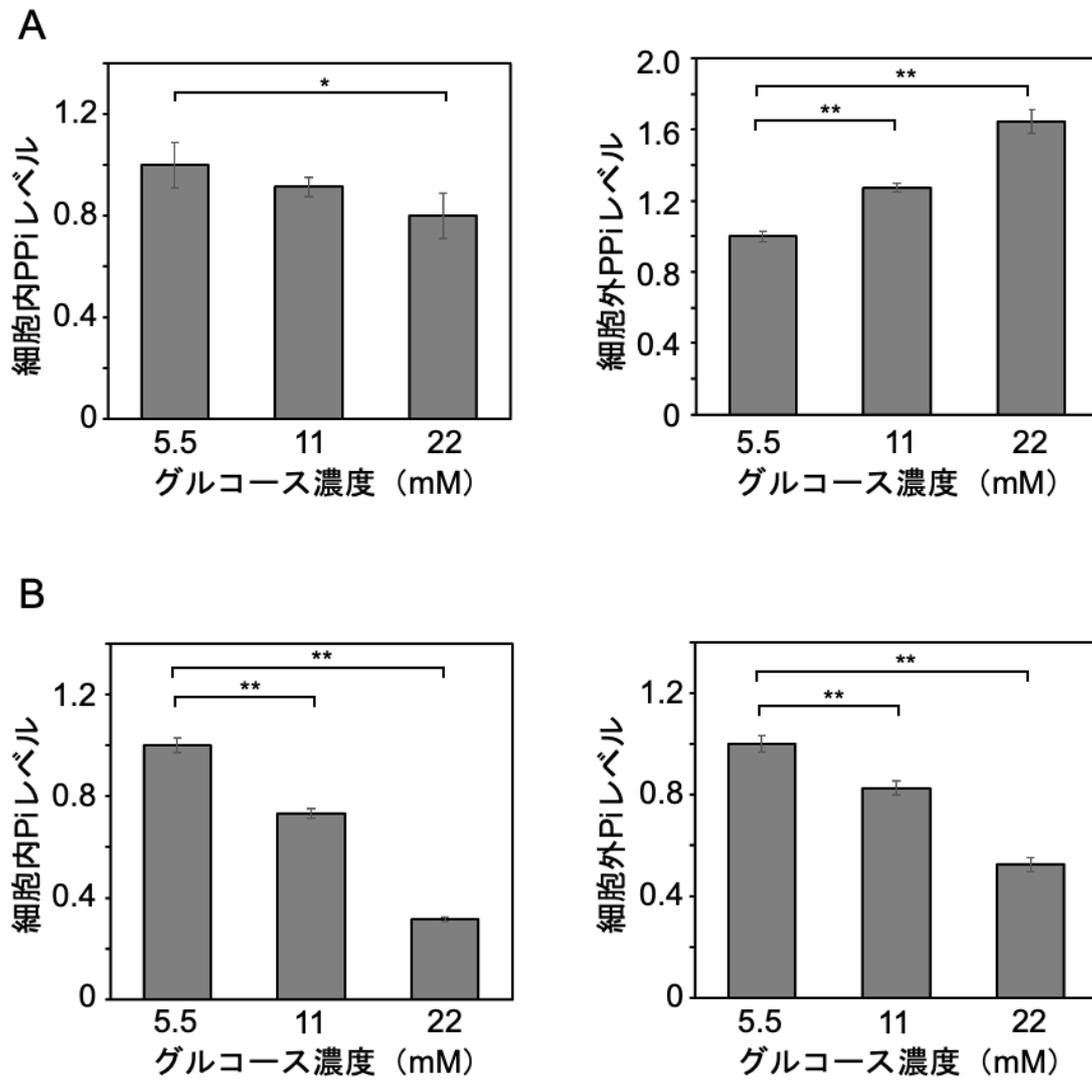


図5 グルコース濃度の違いがPPiとPiレベルに与える影響

ROS17/2.8 を 7 日間培養し、PPi と Pi レベルの違いを調べた。(A) 細胞内・外の PPi レベルと、(B) 細胞内・外の Pi レベルの変化を示す。11 mM と 22 mM グルコースを加えて培養した細胞の PPi と Pi レベルは、5.5 mM グルコースで培養した細胞の PPi と Pi 濃度をそれぞれ 1 とした場合の割合で表した。計測値は 3 回の測定の前平均値  $\pm$  SD で示す。\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$

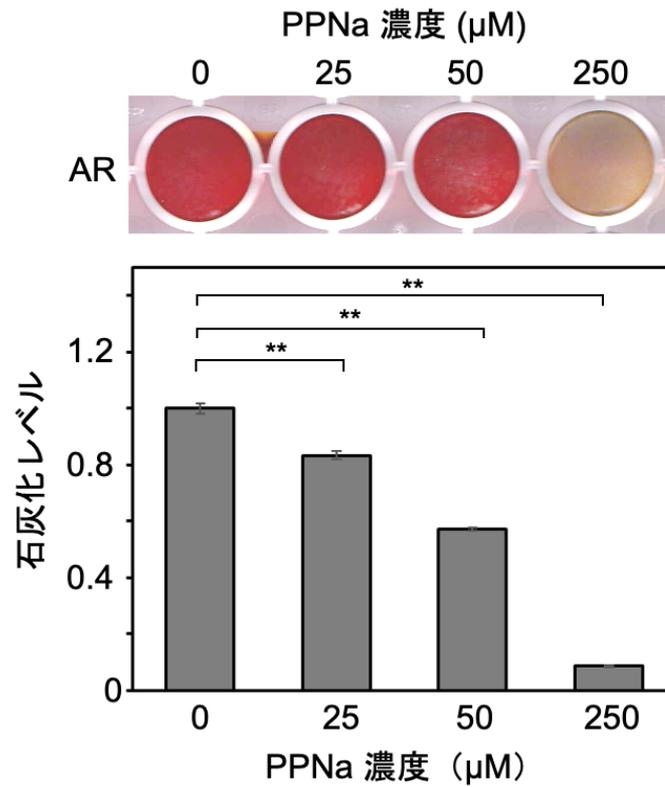


図6 PPNaが石灰化に与える影響

5.5 mM グルコースを含む培地で ROS17/2.8 を培養し、5 日目に 25, 50, 250 mM の PPNa を加えて、石灰化に与える影響について調べた。培養 7 日目の AR 染色の写真（上）と AR 染色後の溶解液の吸光度から得られたグラフを示す（下）。グラフは PPNa 非添加の細胞から得られた吸光度を 1 とした場合の割合で表した。計測値は 4 回の測定結果の平均値  $\pm$  SD で示す。\*\*  $p < 0.01$

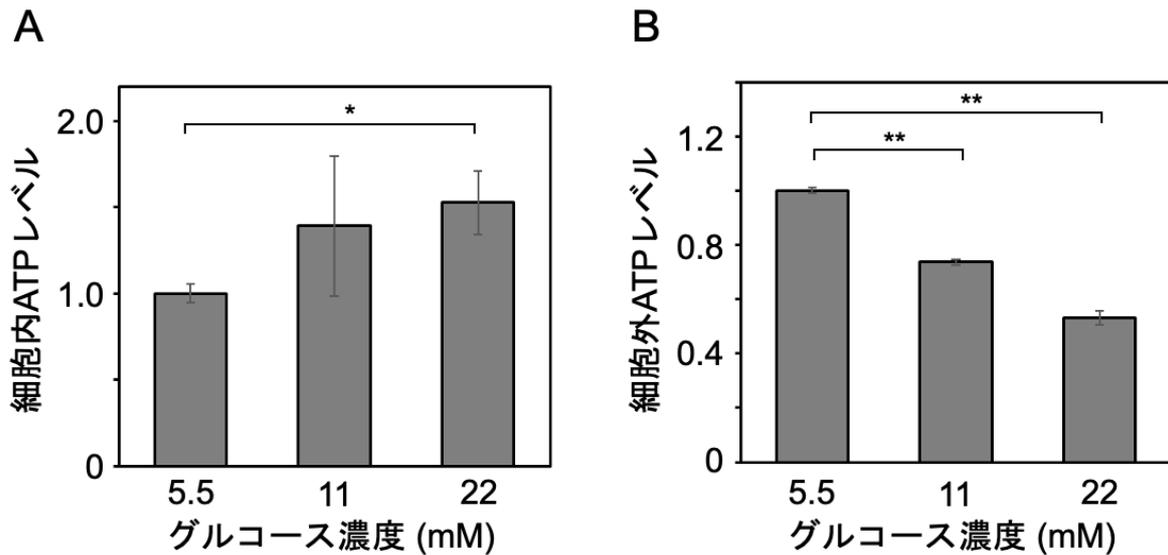


図7 グルコース濃度の違いがATPレベルに与える影響

ROS17/2.8を7日間培養し、細胞内 (A) と細胞外 (B) のATPレベルを調べた。11 mMと22 mMグルコースを加えて培養した細胞のATPレベルは、5.5 mMグルコースを加えて培養した細胞から得られたATP濃度を1とした場合の割合で表した。計測値は3回の測定結果の平均値  $\pm$  SDで示す。\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$