

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 11 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861176

研究課題名(和文)糖化ストレスが骨折治癒遅延に及ぼす影響の検証と糖尿病における新しい骨折治療の開発

研究課題名(英文) Investigation of the effect of glycative stress on bone repair and development of new method of osteogenesis in diabetic patients

研究代表者

松原 秀憲 (Matsubara, Hidenori)

金沢大学・医学系・助教

研究者番号：10507057

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：糖尿病マウスでは、非糖尿病マウスと比較して血中・大腿骨中にはメチルグリオキサル由来のAGEが有意に増加しており、骨修復能も低下している。またMG自体は骨芽細胞への分化・増殖を抑制しているということが判明した。したがって、糖尿病ではメチルグリオキサールの直接作用により骨芽細胞の分化・増殖が抑制され骨形成が遅れるものと推察でき、今後はMG解毒酵素の活性化やMG消去薬の投与などにより骨修復能の改善が期待される。

研究成果の概要(英文)：In diabetic mice, the amount of AGEs in the serum and the femur significantly increased. In particular, methylglyoxal (MG)-derived AGEs were often found in the femur. Furthermore, MG plays a role in inhibiting the differentiation and proliferation of bone cells. In conclusions, MG was increased in diabetes mouse and acted directly to inhibit differentiation and proliferation of osteoblast resulting in delayed bone formation in diabetes. Therefore, activation of MG detoxification enzyme and administration of an MG scavenger is expected to improve bone repair.

研究分野：整形外科

キーワード：メチルグリオキサル 糖化ストレス 骨修復能

1. 研究開始当初の背景

日本では、昨今、早期退院、早期社会復帰が求められている。また現在、人類史に例をみないスピードで高齢化が進んでおり、今後もますます進むことが予測される。そのため高齢者においても QOL の維持、向上がますます求められる事になると考えられ、整形外科領域においては高齢者で多い骨折などの疾患を、いかに合併症を少なく治癒させ、元の生活に早く戻すことができるのかが求められることになる。

近年、食生活の欧米化など様々な原因により生活習慣病患者が増加の一途をたどっている。その中でも糖尿病患者は、その予備群を含めると日本で約 2000 万人いると言われている。特に糖尿病患者では骨折後の癒合不全、偽関節形成のリスクが非常に高いことが知られている。日本人の約 6 人に 1 人は糖尿病予備軍であり、骨折後の骨癒合不全、偽関節形成リスクが非常に高いということである。

糖尿病を誘発した実験動物においても同様な骨折治癒遅延が観察され、インスリン投与などの血糖コントロールによる糖尿病状態改善によってその回復が正常に近いレベルにまで戻る。つまり、糖尿病における慢性的高血糖あるいはインスリンの作用不足が骨折治癒過程に悪影響を与えていると考えられる。持続する高血糖は生体に“糖化ストレス”を生じさせる。元来、生体はグルコースをはじめとする糖質を消費し、エネルギー源である ATP を産生することで生命活動を維持している。しかし同時に生体内の糖質はさまざまなタンパク質・脂質・核酸と非酵素的に反応することで後期糖化反応生成物 (advanced glycation end-products, AGE) を形成してしまう。このような糖化ストレスは、老化促進にも

繋がり、最近では加齢関連疾患・代謝疾患・動脈硬化・神経変性疾患・がんなどのあらゆる病態の形成に深く関わることが知られている。しかしながら、糖尿病の本体ともいえる慢性高血糖による“糖化ストレス”が骨折のどのステージのどのような細胞に作用しているかについては、これまで研究されておらず、未だ不明である。

近年、骨粗鬆症の分野において、糖化ストレスが骨構造に悪影響を及ぼすことが次々と報告されており、骨代謝と糖化ストレスは非常に注目を浴びており骨粗鬆症分野ではトピックスでもある。しかしながら骨折治癒、骨再生において糖化ストレスに注目した研究はこれまでにない。

そこで今回糖化ストレスと骨折治癒の関係を明らかにする研究を立案するに至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、糖尿病における骨折治癒遅延と糖化ストレスの関係を検証することである。

糖化ストレス由来の糖化反応により最終的には AGE が形成されるが、その前駆体であり化学反応性が高い -ジカルボニル化合物のメチルグリオキサール(MG)はそれ自体の細胞毒性が強く細胞・組織障害的に働くと言われている。

したがって、本研究では糖化ストレスの中でも MG に着目して、つまり MG 産生亢進が骨修復能に与える影響を検証した。

3. 研究の方法

In vivo:

実験動物としてはオスのマウス (C57BL/6J) 週齢 7 週を使用する。

糖尿病群においては、少量ストレプトゾトシン (STZ) 5 日間腹腔内投与することにより糖尿病を誘発した。非糖尿病群には、同じ条件でクエン酸緩衝液のみを腹腔内投与した。体重・随時血糖・HbA1c の測定を行い、糖尿病・非糖尿病状態になっていることを確認した。

STZ 投与 3 週経過してから、左大腿骨遠位部に 0.9 mm ドリルを用いて骨欠損を作成した。その後、0, 3, 7, 10, 14 日目に CT 撮影を行い、骨欠損部の修復過程を非糖尿病対照マウスと比較検討した。

骨欠損作成後 14 日目に、血清・大腿骨を採取して、血清・大腿骨中に含まれる

AGEs の測定を行った。測定項目は、MG-H1, CML とした。

In vitro:

骨分化誘導を行ったマウス間葉系間質細胞 (ST2 細胞) の培地中に MG (0 ~ 400 μM) を添加し、細胞増殖, LDH アッセイと骨分化効果判定を行った。骨分化効果判定は 7 日目に ALP 染色, 28 日目に Alizarin Red 染色で行った。

4. 研究成果

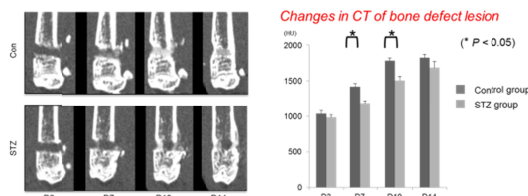
In vivo

(1) 糖尿病群では、随時血糖・HbA1c が有意に上昇していることを確認した。

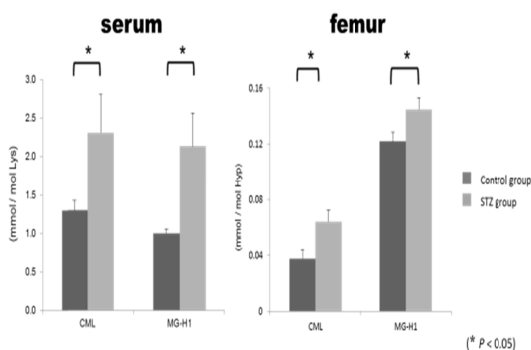
	Control	STZ	
Body weight (g)	27 ± 0.3	23 ± 0.3	*
Blood glucose (mg/dl)	140 ± 3.8	493 ± 14.1	*
HbA1c (NGSP, %)	4.0 ± 0.05	8.0 ± 0.16	*

(Data are expressed as mean ± SEM) (* P < 0.05)

(2) 糖尿病群では、非糖尿病群と比較して骨欠損部の修復は有意に遅れていた。

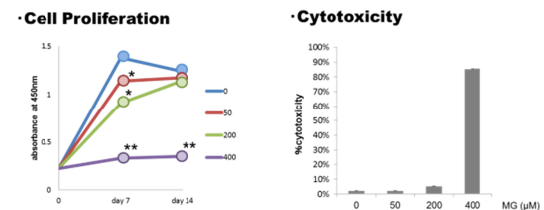
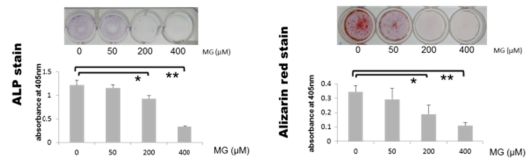


(3) 糖尿病群では、非糖尿病群と比較して血清中・大腿骨中の MG 由来 AGEs 量は有意に上昇しており、特に大腿骨中には MG 由来の AGE が多い。



In vitro:

培養 ST2 細胞の増殖や骨細胞分化は MG 濃度依存的に低下し、特に 200 μM 以上で有意に抑制された (p < 0.05)。また細胞傷害マーカーである培地中 LDH 濃度も有意に上昇していた (p < 0.05)。



以上の結果より、

1) 糖尿病マウスでは血清中・大腿骨中の MG 由来 AGEs 量は有意に上昇しており、特に大腿骨中には MG 由来の AGE が多いことが分かった。

2) MG には、骨細胞への分化・増殖を抑制する作用があるということが分かった。

したがって、糖尿病では、MG の直接作用により骨芽細胞の分化・増殖が抑制され骨形成が遅れるものと推察できた。今後は MG 解毒酵素の活性化や MG 消去薬の投与などにより骨修復能の改善が期待される。

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)

[学会発表](計 2 件)

相川敬男 松原秀憲 吉田泰久 山本靖彦 土屋弘行・糖尿病ではメチルグリオキサール産生による糖化ストレスの亢進によって骨修復能が低下する。日本整形外科学会基礎学術集会。2015 年 10 月 22 日。富山。

Takao Aikawa, Hidenori Matsubara, Yasuhisa Yoshida, Shogo Shimbashi, Shuhei Ugaji, Yasuhiko Yamamoto, Hiroyuki Tsuchiya. Bone repair is impaired in diabetes via an increased formation of methylglyoxal. Annual Meeting of the American Academy of Orthopaedic Surgeons. March 1 2016. USA.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松原 秀憲 (MATSUBARA, Hidenori)

金沢大学・医学系・助教

研究者番号: 10507057

(2) 研究分担者

該当なし

(3)連携研究者
該当なし