

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 12 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24500848

研究課題名(和文)新規糖尿病モデルを用いた骨代謝機構の解析と運動による改善に関する研究

研究課題名(英文) Study of the bone metabolism in diabetes and of improvement by the exercise using newly-introduced diabetes model

研究代表者

北村 敬一郎 (KITAMURA, Kei-ichiro)

金沢大学・保健学系・教授

研究者番号：80283117

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：われわれはアロキサンを投与しインスリン産生不能の高血糖状態キンギョモデルを作成し、そのウロコを骨モデルとした評価システムにより、糖尿病での易骨折性の原因をウロコの骨代謝および骨基質の状態から調べた。その結果、骨芽細胞および破骨細胞のマーカー酵素活性は正常群との差は見られず、高血糖状態は骨代謝に大きな影響を与えない事を示した。一方、ウロコの骨基質では、非酵素的に高度糖化最終産物として分子量が単一コラーゲン線維の3倍以上の過剰架橋形成コラーゲン線維が有意に増加していた。以上から糖尿病での易骨折性は高血糖下での非酵素的過剰架橋形成コラーゲン線維による柔軟性喪失が原因と示唆された。

研究成果の概要(英文)：We investigated the cause of the increased fracture rate in diabetes patients through analyses of bone metabolism and the properties of bone matrix protein by using goldfish scales as a bone model of hyperglycemia that is induced by an alloxan injection. The results showed that the marker enzyme activities in the scale osteoblasts and osteoclasts did not significantly differ between hyperglycemic and euglycemic goldfish. This suggests that hyperglycemia has minimal effect on bone metabolism. Moreover, we found that the formation of non-enzymatic cross-linked collagen, which has more than 3 times the molecular weight of a single fiber, was significantly increased in the scale-bone matrix of the hyperglycemic goldfish.

Our results suggest that the increased fracture rate in diabetes patients is mostly due to the loss of flexibility of the collagen fibers, which is mediated by the excessive formation of non-enzymatic cross-linked collagen in the bone matrix.

研究分野：病態検査学

キーワード：糖尿病 骨代謝 糖尿病状態キンギョモデル アロキサン 再生ウロコ

1. 研究開始当初の背景

2型糖尿病では骨折の増加が報告されているものの、その原因は未だ不明である。高血糖に対する骨代謝応答のメカニズムは、ほとんどが骨芽細胞株の単独細胞培養系による *in vitro* 実験であった。しかし、生体内の骨組織に対するその作用を正確に評価するためには、骨芽細胞の株細胞のような単純な系ではなく、骨芽細胞と破骨細胞(骨を壊し骨塩を吸収する細胞)および骨基質(コラーゲン等のたんぱく質)が共存する評価システムでの研究が必須である。なぜなら、実際の骨組織は、骨芽細胞の他に破骨細胞、骨基質が共存している。そして、破骨細胞の成熟・活性化にはその細胞膜上の受容体 Receptor Activator of NF- κ B (RANK) への骨芽細胞が発現するリガンド Receptor Activator of NF- κ B Ligand (RANKL) の結合が必須だからである。つまり、これまでの良いモデルシステムの欠如が2型糖尿病骨代謝の研究進展を遅らせてきたのである。

これまでに申請者は、破骨細胞と骨芽細胞がウロコ上に共存する魚類のウロコが、添加的石灰化と直接骨化によって形成される膜性骨であることに注目し、ウロコを用いて破骨及び骨芽細胞活性を評価するアッセイ系を世界に先駆け開発した。この系では単独細胞株ではわからない骨組織の細胞間相互作用を、ウロコ表面で評価できる。そして、この系を用いて骨代謝に関与するホルモンが哺乳類と同様に作用することを確認している。

2. 研究の目的

- (1) アロキサンの腹腔内投与により作製した高血糖キンギョの血糖値、インスリン分泌能および膵臓の形態学的な解析から、インスリン分泌が低下した糖尿病状態を確認する。
- (2) 魚類インスリン抗体を用いて、膵ラ氏島でのインスリン産生低下状況を確認する。
- (3) 高血糖状態キンギョの再生ウロコの骨形成および骨吸収マーカー酵素活性を調べ、違いがあれば遺伝子発現も解析し、高血糖における骨代謝の解明を目指す。
- (4) 糖尿病状態キンギョの再生ウロコのコラーゲン糖化率と血糖値の関係を明らかにする。
- (5) 糖尿病状態キンギョの運動量と再生ウロコの骨代謝の改善や再生ウロコのコラーゲン糖化防止の関連を明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) 腹腔内へアロキサンを投与し、高血糖キンギョモデル作製した。
- (2) インスリン抗体により膵(ブロックマンボディー)ラ氏島細胞切片を免疫染色した。
- (3) 免疫染色からアロキサン投与量と膵(ブロックマンボディー)ラ氏島細胞におけるインスリン産生量の関係を確認し、最適

投与量を決定した。

- (4) 30日間高血糖状態にしたキンギョの再生ウロコの骨芽細胞および破骨細胞のマーカー酵素活性を測定し、正常血糖キンギョ群と比較からの骨代謝測定への高血糖の影響を検討した。
- (5) 骨基質タンパクの代表であるI型コラーゲンの糖化を SDS-PAGE を用いた分子量変化から検討した。

4. 研究成果

- (1) キンギョの腹腔内へアロキサンを500mg/kg-体重投与するとほとんど全ての膵島で著しくインスリン産生が著名に低下することを確認した。
- (2) 30日間高血糖状態にしたキンギョの再生ウロコの骨芽細胞および破骨細胞のマーカー酵素活性値は正常群との間に有意差は見られず、高血糖は骨代謝に有意の差を与えない事が示唆された。
- (3) 高血糖状態キンギョの骨基質I型コラーゲンへの非酵素的糖化はわずか21日間でコラーゲンアルファ鎖の分子量増加が確認され、コラーゲンへの糖化が増加する傾向が見られた。
- (4) *in vitro* 実験でのI型コラーゲンへのグリセルアルデヒド(高血糖で見られるグルコースの代謝産物)添加では顕著なコラーゲン繊維間の非酵素的架橋形成産物の増加を確認した。

以上から、糖尿病での骨折は高血糖による骨代謝そのものより、骨基質コラーゲンの変性による骨質の変化(コラーゲン線維間の架橋増加による柔軟性低下)が寄与していることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計13件)

Suzuki, N., Somei, M., Seki, A., Sekiguchi, T., Tabuchi, Y., Mishima, H., Kase, Y., Kaminishi, A., Yachiguchi, K., Kitamura, K., Oshima, Y., Hayakawa, K., Yano, S. and Hattori, A.: Novel tryptophan derivatives as potentially effective therapeutic drugs to treat bone diseases. *Am. J. Life Sci.* 査読有, in press. DOI: 10.11648

Ogai K, Matsumoto M, Minematsu H, Kitamura K, Kobayashi M, Sugama J and Sanada H: Development of an improved method for quantitative analysis of skin blotting: Increasing reliability and applicability for skin assessment. *International Journal of Cosmetic Science* 査読有, in press. DOI: 10.1111/ics.12217.

Suzuki, N., Ogiso, S., Yachiguchi, K., Kawabe, K., Makino, F., Toriba, A., Kiyomoto, M., Sekiguchi, T., Tabuchi, Y., Kondo, T., Kitamura, K., Hong, C., Srivastav, A.K., Oshima, Y., Hattori,

A., Hayakawa, K. Monohydroxylated polycyclic aromatic hydrocarbon influences spicule formation in the early development of sea urchins (*Hemicentrotus pulcherrimus*). *Comp. Biochem. Physiol. C*, 査読有, 171, 2015, 55-60. DOI: 10.1016/j.cbpc.2015.02.004.

Yachiguchi, K., Sekiguchi, T., Nakano, M., Hattori, A., Yamamoto, M., Kitamura, K., Maeda, M., Tabuchi, Y., Kondo, T., Kamauchi, H., Nakabayashi, H., Srivastav, A.K., Hayakawa, K., Sakamoto, T. and Suzuki, N.: Effect of inorganic mercury and methylmercury on osteoclasts and osteoblasts in the scales of the marine teleost as a model system of bone. *Zool. Sci.*, 査読有, 31, 2014, 330-337, DOI: 10.2108/zs130265

Kitamura, K., Takeuchi, R., Ogai, K., Xin, Z., Chen, W., Nemoto, T., Development of a novel pulse wave velocity measurement system: Using dual piezoelectric elements. *Medical Engineering and Physics*, 査読有, 36, 2014, 927-932. DOI: 10.1016/j.medengphy.2014.02.024.

Yachiguchi, K., Matsumoto, N., Haga, Y., Suzuki, M., Matsumura, C., Tsurukawa, M., Okuno, T., Nakano, T., Kawabe, K., Kitamura, K., Toriba, A., Hayakawa, K., Chowdhury, V.S., Endo, M., Chiba, A., Sekiguchi, T., Nakano, M., Tabuchi, Y., Kondo, T., Wada, S., Mishima, H., Hattori, A. and Suzuki, N.: Polychlorinated biphenyl (118) activates osteoclasts and induces bone resorption in goldfish. *Environ Sci Pollut Res Int.* 査読有, 21, 2014, 6365-6372. DOI: 10.1007/s11356-012-1347-5.

Tabuchi, Y., Sugahara, Y., Ikegame, M., Suzuki, N., Kitamura, K. and Kond, T.: Genes responsive to low-intensity pulsed ultrasound in MC3T3E1 preosteoblast cells. *Int. J. Mol. Sci.* 査読有, 14, 2013, 22721-22740. DOI: 10.3390/ijms141122721

Kitamura, K., Takahira, K., Inari, M., Satoh, Y., Hayakawa, K., Tabuchi, Y., Ohgai, K., Nishiuchi, T., Kondo, T., Mikuni-Takagi, Y., Chen, X., Hattori, A. and Suzuki, N.: Zebrafish scales respond differently to in vitro dynamic and static acceleration: analysis of interaction between osteoblasts and osteoclasts. *Comp. Biochem. Physiol. A*, 査読有, 166, 2013, 74-80. DOI: 10.1016/j.cbpa.2013.04.023.

Nakashima, H., Yoshihara, A. and Kitamura, K.: Favorable and unfavorable amino acid residues in water-soluble and transmembrane proteins. *J. Biomed. Sci. Eng.* 査読有, 6, 2013, 36-44. DOI: 10.4236/jbise.2013.61006.

Yano, S., Kitamura, K., Satoh, Y., Nakano, M., Hattori, A., Sekiguchi, T., Ikegami, M., Nakashima, H., Omori, K., Hayakawa, K., Chiba, A., Sasayama, Y., Ejiri, S., Mikuni-Takagi, Y., Mishima, H., Funahashi, H., Sakamoto, T. and Suzuki, N.: Static and dynamic hypergravity responses of osteoblasts and 2 osteoclasts in medaka scales. *Zool. Sci.*, 査読有, 30, 2013, 217-223. DOI: 10.2108/zsj.30.217.

Kitamura, K., Satoh, Y., Inari, M., Takahira, K., Okesaku, W., Endo, M., Yano, S., Yamamoto, T., Kaminishi, A., Akatsuka, R., Hattori, A. and Suzuki, N. Osteoblasts and osteoclasts in regenerating goldfish scales respond to mechanical loading: Analysis of osteoblastic and osteoclastic marker mRNA expression. *Biol. Sci. Space*, 査読有, 26, 2012, 42-46 DOI: 10.2187/bss.26.42

Kakikawa, M., Yamamoto, T., Chowdhury, V.S., Satoh, Y., Kitamura, K., Sekiguchi, T., Funahashi, H., Omori, K., Endo, M., Yana, S., Yamada, S., Hayakawa, K., Chiba, A., Srivastav, A.K., Ijiri, K., Seki, A., Hattori, A. and Suzuki, N. Determination of Calcium Sensing Receptor in the Scales of Goldfish and Induction of Its mRNA Expression by Acceleration Loading. *Biol. Sci. Space* 査読有, 26(2012), 26-31. DOI: 10.2187/bss.26.26.

Omori, K., Wada, S., Maruyama, Y., Hattori, A., Kitamura, K., et al. Prostaglandin E2 increases both osteoblastic and osteoclastic activity in the scales and participates in calcium metabolism in goldfish. *Zool. Sci.* 査読有, 29(2012), 499-504, DOI: 10.2108/zsj.29.499.

【学会発表】(計9件)

北村敬一郎、根本 鉄、鈴木信雄、矢野幸子、田淵 圭章、服部淳彦。骨にいい運動とは？日本動物学会中部支部大会、コンサールのと 石川県鳳珠郡能登町、(2014.11.22-24)

桶作若菜、安藤 忠、南 敬生、山岸貴文、服部淳彦、鈴木信雄、北村敬一郎：高血糖状態におけるウロココラーゲン繊維への糖化と異常架橋の解析。日本動物学

会中部支部大会, コンセールのと 石川県鳳珠郡能登町 (2014.11.22-24)

Huang M, Tamura T, Chen W, Kitamura K, Nemoto T and Kanaya S. Characterization of Ultradian and Circadian Rhythms of Core Temperature Based on Wavelet Analysis. 36th Annual International IEEE EMBS Conference 2014, Aug 26-30, Chicago, Illinois, USA.

Ikegame M, Hattori A, Tabuchi Y, Kitamura K, Yamamoto T, Nakano M, Yanao S, Yamamoto T, Suzuki N. Response of osteoclasts and receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand expression in the regenerating scales of goldfish under microgravity. International Symposium on Mechanobiology (ISMB) 2014, May 20-23, Junko Fukutake Hall, Okayama, Japan. (招待講演)

Huang M, Tamura T, Chen W, Kitamura K, Nemoto T and Kanaya S. Geometrical Improvement of a Noninvasive Core Temperature Thermometer based on Numeric Modeling and Experiment Validation. International Conference on Biomedical Electronics and Devices 2014, Mar 3-6, Loire Valley, France. 北村敬一郎、安藤 忠、桶作若菜、遠藤雅人、服部淳彦、鈴木信雄: キンギョを用いた糖尿病様モデルのインスリン産生能の解析. 第38回日本比較内分泌学会大会, 宮崎市民プラザ 宮崎県宮崎市 (2013.10.24~26)

Tabuchi Y, Sugahara Y, Ikegame M, Suzuki N, Kitamura K, Kondo T. IDENTIFICATION OF GENES RESPONSIVE TO LOW-INTENSITY PULSED ULTRASOUND IN MOUSE PREOSTEOBLAST CELLS. International Conference on Biomedical Ultrasound 2013, Oct. 22-23, Taipei, Taiwan.

Huang M, Chen W, Kitamura K, Nemoto T, Tamura T. Improvement of the dual-heat-flux method for deep body temperature measurement based on a finite element model. 35th Annual International Conference of the IEEE, 2013, Jul. 3-7, Osaka International Convention Center, (Osaka, Japan).

北村敬一郎、安藤 忠、室石洋子、河村常作、小田恵夫、服部淳彦、鈴木信雄: 糖尿病状態キンギョのモデルの作製. 第37回日本比較内分泌学会大会, 福井大学文京キャンパス 福井県福井市(2012.11.29~12.01)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

<http://ridb.kanazawa-u.ac.jp/public/detail.php?kaken=80283117>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北村 敬一郎 (KITAMURA, Kei-ichiro)
金沢大学・保健学系・教授
研究者番号: 80283117

(2) 研究分担者

鈴木 信雄 (SUZUKI, Nobuo)
金沢大学・環日本海域環境研究センター
一・准教授

研究者番号: 60242476

小萱 康德 (KOGAYA, Yasutoku)
朝日大学・歯学部・准教授
研究者番号: 30076046