

長寿医療研究開発費 2024年度 総括研究報告

培養骨芽細胞を用いた骨代謝（骨リモデリング）制御機構の解明およびフレイルの病態解明に資する高齢者糖尿病コホートの構築（24-1）

主任研究者 徳田 治彦 国立長寿医療研究センター 代謝・内分泌研究部（部長）

研究要旨

本研究は、①培養骨芽細胞を用いた骨リモデリング制御機構の解明、②フレイルの病態解明に資する高齢者糖尿病のコホートの構築、という当研究部が遂行する2つの研究により構成される。今年度はそれぞれ以下の知見を得た。

- ① 骨芽細胞様 MC3T3-E1 細胞を用いて、骨芽細胞に隣接するマクロファージ(osteal macrophage ; o-Mφ)より分泌される oncostatin M が、BMP-4 刺激に対する osteoprotegerin 産生を抑制すること、BMP-4 刺激に対する SMAD1/5/9 および p38 MAP kinase のリン酸化に何ら影響しないこと、および BMP-4 刺激に対する p70 S6 kinase のリン酸化を著明に抑制することを明らかとした。以上より骨芽細胞において、oncostatin M は BMP-4 刺激に対する p70 S6 kinase の活性化を抑制的に制御することにより、osteoprotegerin 産生を阻害すると考えられた。一方、三量体型 G 蛋白質の $\beta\gamma$ サブユニット($G\beta\gamma$)の阻害剤である gallein が、プロスタグランジン(PG)F2 α 刺激および PGD2 刺激に対する osteoprotegerin 産生を増強すること、PGF2 α 刺激および PGD2 刺激に対するインターロイキン(IL)-6 産生を増強すること、gallein と構造的に類似するが $\beta\gamma$ サブユニット結合能を有しない fluorescein は、PGF2 α 刺激および PGD2 刺激に対する osteoprotegerin 産生および IL-6 産生に何ら影響しないこと、gallein は、PGF2 α 刺激および PGD2 刺激により惹起される p44/p42 mitogen-activated protein (MAP) kinase、p38 MAP kinase および stress-activating protein kinase/c-Jun N-terminal kinase (SAPK/JNK) のリン酸化に影響しなかった。以上より骨芽細胞において、gallein は PGF2 α 刺激および PGD2 刺激に対する osteoprotegerin および IL-6 産生を増進し、その作用点は MAP kinase の下流であると考えられた。
- ② 当院代謝内科に通院する糖尿病患者の基本的な臨床データにくわえて、フレイル・サルコペニア・食事や栄養に関連する情報を追加するために、身体機能評価と栄養学的な評価を行う体制づくりを進め、これらのデータの収集を開始した。

主任研究者

徳田 治彦 国立長寿医療研究センター 代謝・内分泌研究部（部長）

分担研究者

大村 卓也 国立長寿医療研究センター 代謝・内分泌研究部（副部長）

櫻井 孝 国立長寿医療研究センター 予防科学研究部（研究所長）

杉本 大貴 国立長寿医療研究センター 予防科学研究部（主任研究員）

内田 一彰 国立長寿医療研究センター 予防科学研究部（研究員）

中村 純也 国立長寿医療研究センター 歯科口腔外科部（歯科医師）

川嶋 修司 国立長寿医療研究センター 代謝内科部（長寿検診室長）

A. 研究目的

本研究は、①培養骨芽細胞を用いた骨リモデリング制御機構の解明、②フレイルの病態解明に資する高齢者糖尿病のコホートの構築、という当研究部が遂行する2つの研究により構成される。

- ① 骨代謝は骨吸収を担う破骨細胞と骨形成を担う骨芽細胞により活発に営まれ、骨は絶えずリモデリングされ、その強度が維持されているため、骨リモデリングの破綻は骨粗鬆症および骨折治癒の遅延の原因と考えられている。これら二つの機能細胞は、サイトカインをはじめとする種々の生理活性物質により巧緻に制御される。近年、骨表面の骨芽細胞に隣接して存在するマクロファージ(osteal macrophage; o-M ϕ)により産生される oncostatin M が骨損傷動物モデルにおいて、その治癒を促進することが報告され、o-M ϕ が骨リモデリングの制御に重要な役割を果たしていると考えられている。私共は、骨芽細胞培養系を用いて種々の骨代謝調節因子による骨芽細胞の機能の制御機構について検討し、数々の知見を報告してきたが、先行研究において oncostatin M が transforming growth factor(TGF)- β 刺激による macrophage colony-stimulating factor((M-CSF)産生を抑制的に制御することなど、重要な知見を明らかにしている。さらに最近、三量体型 GTP 結合タンパク質の $\beta\gamma$ サブユニットの活性化が、骨芽細胞の機能を調節していることを見出した。本研究では、新生仔マウス頭蓋冠より分離株化された骨芽細胞様 MC3T3-E1 細胞など培養骨芽細胞を用いて、M ϕ により産生される oncostatin M 等の骨芽細胞における分子作用機序および $\beta\gamma$ サブユニット活性化の機能的役割の詳細を解析することにより、骨リモデリング制御機構を解明することをその目的とする。
- ② 糖尿病治療の進歩により、高齢糖尿病患者の生命予後は延長し、糖尿病を有さない成人との寿命の差は解消しつつある。したがって、今後の糖尿病治療の目標は、生命予後の改善から健康寿命の延伸や QOL の向上にシフトする。また、糖尿病および不良な血糖管理は、老化を加速させるという一面を持つ。こうした背景を受け、高齢糖尿病患者におけるフレイルの発症・重症化予防対策の重要性が増加している。しかしながら、フレイル対策につながる糖尿病の治療・管理法は未だ確立しておらず、前提とな

るべき糖尿病とフレイルの関連を検討した縦断研究に基づくエビデンスが不足している。

さらに、糖尿病の治療目標のゴールデン・スタンダードである HbA1c は、1～2 カ月前の血糖状況を反映するものであり、日々の血糖推移を反映するものでない。今後、高齢患者の健康寿命の延伸を目指す方策の一つとして Continuous Glucose Monitoring (CGM) の高齢者での活用が重要になると考えられるが、高齢患者における CGM の活用およびそのエビデンスは未だ十分ではない。

本研究では、高齢者糖尿病のコホートを構築し、高齢糖尿病患者におけるフレイルの発症進展に関連する原因を探索する。さらに、食事や CGM 指標に着目し、身体機能と認知機能の維持に資する至適な血糖管理目標および治療法の開発を目指す。

B. 研究方法

培養骨芽細胞を用いた骨リモデリング制御機構の解明

新生仔マウス頭蓋冠より分離・株化された骨芽細胞様 MC3T3-E1 細胞を培養し、oncostatin M、 $G\beta\gamma$ サブユニットの阻害剤である gallein あるいは gallein 類似化合物であるが $G\beta\gamma$ サブユニットへの結合能を有しない fluorescein を作用させた後に、bone morphogenic protein-4 (BMP-4)、prostaglandin (PG) $F2\alpha$ あるいは PGD2 で刺激した。刺激後の osteoprotegerin (OPG) および interleukin-6 (IL-6) 遊離は、培養上清中の OPG および IL-6 濃度を ELISA にて測定し検討した。OPG および IL-6 の mRNA 発現レベルは、RT-PCR 法にて検討した。細胞質画分中の SMAD1/5/9、p44/p42 mitogen-activated protein (MAP) kinase、p38 MAP kinase、stress-activating protein kinase/c-Jun *N* terminal kinase (SAPK/JNK) および p70 S6 kinase のリン酸化は Western blot 法にて検討した。

(倫理面への配慮)

臨床研究の実施に当たっては、「ヘルシンキ宣言」および「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」を遵守した。本研究は、国立長寿医療研究センター倫理・利益相反委員会において「高齢者糖尿病のエビデンス構築に向けた探索的観察研究 (1724)」として承認された。

C. 研究結果

培養骨芽細胞を用いた骨リモデリング制御機構の解明

骨芽細胞様 MC3T3-E1 細胞を用いて以下の事項を明らかにした。

- (1) Oncostatin M による bone morphogenic protein-4 (BMP-4) 刺激に対する

osteoprotegerin の産生抑制作用

- ・ Oncostatin M は BMP-4 刺激に対する osteoprotegerin 産生を抑制した。
- ・ Oncostatin M は BMP-4 刺激に対する SMAD1/5/9 および p38 MAP kinase のリン酸化に何ら影響しなかった。
- ・ Oncostatin M は BMP-4 刺激に対する p70 S6 kinase のリン酸化を著明に抑制した。

以上より骨芽細胞において、oncostatin M は BMP-4 刺激に対する p70 S6 kinase の活性化を抑制的に制御し、結果として osteoprotegerin 産生を阻害すると考えられた。

(2) Gallein による prostaglandin (PG)F2 α 刺激に対する osteoprotegerin および IL-6 産生の増進作用

- ・ Gallein は、PGF2 α 刺激に対する osteoprotegerin 産生を増強した。
- ・ Gallein は、PGF2 α 刺激に対する IL-6 産生を増強した。
- ・ Gallein と構造的に類似するが β γ サブユニット結合能を有しない fluorescein は、PGF2 α 刺激に対する osteoprotegerin 産生および IL-6 産生に何ら影響しなかった。
- ・ Gallein は、PGF2 α 刺激により惹起される p44/p42 MAP kinase、p38 MAP kinase および stress-activating protein kinase/c-Jun N-terminal kinase (SAPK/JNK) のリン酸化に影響しなかった。

以上より骨芽細胞において、gallein は PGF2 α 刺激に対する osteoprotegerin および IL-6 産生を増進し、その作用点は MAP kinase の下流であると考えられた。

(3) Gallein による PGD2 刺激に対する osteoprotegerin および IL-6 産生の増進作用

- ・ Gallein は、PGD2 刺激に対する osteoprotegerin 産生を増強した。
- ・ Gallein は、PGD2 刺激に対する IL-6 産生を増強した。
- ・ Fluorescein は、PGD2 刺激に対する osteoprotegerin 産生および IL-6 産生に何ら影響しなかった。
- ・ Gallein は、PGD2 刺激により惹起される p44/p42 MAP kinase、p38 MAP kinase および stress-activating protein kinase/c-Jun N-terminal kinase (SAPK/JNK) のリン酸化に影響しなかった。

以上より骨芽細胞において、gallein は PGD2 刺激に対する osteoprotegerin および IL-6 産生を増進し、その作用点は MAP kinase の下流であると考えられた。

D. 考察と結論

既に私どもは、骨芽細胞において oncostatin M が TGF- β 、TNF- α 、bFGF の各刺激により惹起される M-CSF 産生を抑制すること、これらの機序は各刺激に特異的である

ことを明らかとしている。さらに今回、BMP-4 刺激による osteoprotegerin 産生に対する oncostatin M の作用を検討し、oncostatin M が p70 S6 kinase の抑制的制御を介して OPG 産生を抑制することを明らかとした。BMP-4 は骨形成において中心的役割を果たしているサイトカインとして知られており、骨芽細胞より分泌される osteoprotegerin は receptor-activator of NF- κ B ligand (RANKL) のデコイ受容体として、破骨細胞形成・活性化を抑制的に制御することが知られている。従って今回の知見は、oncostatin M の骨代謝制御における重要性をさらに強化する知見であるといえる。一方、新たに PGF2 α 刺激および PGD2 刺激による osteoprotegerin 産生および IL-6 産生に対する gallein の作用を検討し、gallein は PGF2 α 刺激および PGD2 に対する osteoprotegerin および IL-6 産生を増進し、その作用点は MAP kinase の下流であることを示した。gallein は動物実験において心不全の進行抑制効果や炎症性浮腫の改善効果が報告されている。骨芽細胞において、PGF2 α および PGD2 はそれぞれ FP 受容体および DP 受容体という固有の受容体を介して作用することが知られている。今回の研究成果は、gallein による三量体型 GTP 結合タンパク質の $\beta\gamma$ サブユニット制御という、新しい骨代謝制御の方略を示唆する、興味深い知見と考える。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sugimoto T, Sakurai T, Uchida K, Kuroda Y, Tokuda H, Omura T, Noguchi T, Komatsu A, Nakagawa T, Fujita K, Matsumoto N, Ono R, Crane P, Saito T. Impact of type 2 diabetes mellitus and glycated hemoglobin levels within the recommended target range on mortality in older people with cognitive impairment receiving care at a memory clinic: NCGG-STORIES. Diabetes Care. 2024;47:864-872.
- 2) Hioki T, Tachi J, Matsushima-Nishiwaki R, Iida H, Kozawa O, Tokuda H. Oncostatin M suppresses bone morphogenetic protein-4-induced osteoprotegerin synthesis in MC3T3-E1 osteoblast-like cells: p70 S6 kinase attenuation. Cell Biochem. Funct. 2024, 42:e4068.
- 3) Kuroyanagi G, Hioki T, Matsushima-Nishiwaki R, Kozawa O, Tokuda H. Gallein increases the fibroblast growth factor 2-elicited osteoprotegerin synthesis in osteoblasts. Biochim. Biophys. Acta. Gen.

Subj. 2024;1868:130635.

- 4) Sugimoto T, Saji N, Omura T, Tokuda H, Miura H, Kawashima S, Ando T, Nakamura A, Uchida K, Matsumoto N, Fujita K, Kuroda Y, Crane PK, Sakurai T. Cross-sectional association of continuous glucose monitoring-derived metrics with cerebral small vessel disease in older adults with type 2 diabetes. *Diabetes Obes. Metab.* 2024;26(8):3318–3327.
- 5) Kuroyanagi G, Hioki T, Matsushima-Nishiwaki R, Omura T, Kozawa O, Tokuda H. Gallein increases prostaglandin F2 α -induced osteoprotegerin and IL-6 secretion in osteoblasts. *Biomed. Rep.* 2024;21:147.
- 6) Sugimoto T, Araki A, Fujita H, Fujita K, Honda K, Inagaki N, Ishida T, Kato J, Kishi M, Kishino Y, Kobayashi K, Kouyama K, Kuroda Y, Kuwahata S, Matsumoto N, Murakami T, Noma H, Ogino J, Ogura M, Ohishi M, Shimada H, Sugimoto K, Kakenaka T, Tamura Y, Tokuda H, Uchida K, Umegaki H, Sakurai T. Multidomain intervention trial for preventing cognitive decline among older adults with type 2 diabetes: J-MIND-Diabetes. *J. Prev. Alz. Dis.* doi.org/10.14283/jpad.2024.117. Published online.
- 7) Tanaka K, Okazaki H, Omura T, Kamihara T, Tokuda H. The potential role of ChatGPT in enhancing diabetes management for older patients. *Geriatr. Gerontol. Int.* 2024;24(8):816–817.
- 8) Omura T, Inami A, Kamihara T, Tsuboi Y, Kawashima S, Tanaka K, Sugimoto T, Sakurai T, Tokuda H. Identification of atypical hypoglycemia via continuous glucose monitoring in a patient presenting with hot flashes. *J Gen Fam Med.* doi: 10.1002/jgf2.718. Published online.
- 9) Hioki T, Kuroyanagi G, Matsushima-Nishiwaki R, Omura T, Kozawa O, Tokuda H. Gallein but not fluorescein enhances the PGD2-stimulated synthesis of osteoprotegerin and interleukin-6 in osteoblasts. *Prostaglandins Leukot Essent. Fatty Acids.* 2024;203:102639.
- 10) Ono T, Watanabe N, Hayakawa K, Kainuma S, Yamada H, Waseda Y, Kanda Y, Fukuoka M, Tokuda H, Murakami H, Kuroyanagi G. Comparative outcomes of cemented versus cementless stems in bipolar hemiarthroplasty for femoral neck fractures. *Medicine.* 2024;103(41):e39946. Li
- 11) J, Nakagawa T, Kojima M, Nishikimi A, Tokuda H, Nishimura K, Umezawa J, Tanaka S, Inoue M, Ohmagari N, Yamaguchi K, Takeda K, Yamamoto S, Konishi M, Miyo K, Mizoue T. Underlying medical conditions and anti-SARS-CoV-2 spike IgG antibody titers after two doses of BNT162b2 vaccination: A cross-sectional study. *PLoS One.* 2023;18(4):e0283658.

- 12) Kamihara T, Tanaka K, Omura T, Kaneko S, Hirashiki A, Kokubo M, Shimizu A. Exploratory bibliometric analysis and text mining to reveal research trends in cardiac aging. *Aging Med.* 2024;7:301-311.
- 13) Kamihara T, Omura T. Does atrial fibrillation occur exclusively in the elderly? *Clin. Case Rep.* 2024;12(7):e9175.
- 14) Kamihara T, Kawano R, Kinoshita T, Omura T, Kaneko S, Hirashiki A, Kokubo M, Shimizu A. Differences in iron kinetics during cardiac load between patients with atrial fibrillation and those with sinus rhythm. *Cardiology.* 2024, doi: 10.1159/000540095. Online ahead of print.
- 15) 大村朋美, 大村卓也, 上原敬尋, 前田恵子, 葛谷雅文. サルコペニア・フレイルと Continuous Glucose Monitoring. *BIO Clinica.* 2024;39:56-57.
- 16) Tokuda H, Hori T, Onuma T, Enomoto Y, Doi T, Matsushima-Nishiwaki R, Yamaguchi S, Tanabe K, Omura T, Ogura S, Iwama T, Iida H, Kozawa O. Serotonin reuptake inhibitor suppresses the activation of human platelets by a combination of thrombopoietin and collagen through inhibition of Rac and Rho/Rho-kinase. *Biomed Res.* 2024. 45(6):231-241.
- 17) Osuka Y, Kojima N, Daimaru K, Ono R, Sugie M, Omura T, Motokawa K, Ueda T, Maruo K, Aoyama T, Inoue S, Sasai H. Effects of Radio-Taiso on health-related quality of life in older adults with frailty: a randomized. *J Epidemiol.* 34(10):467-476.
- 18) Kamihara T, Kinoshita T, Kawano R, Tanaka S, Omura T, Tanaka K, Hirashiki A, Kokubo M, Arai H, Shimizu A. Unraveling the molecular dissociation between aging and atherosclerosis: A bioinformatics approach. *Geriatr Gerontol Int.* 25(1)108-115.
- 19) Matsushima-Nishiwaki R, Honda Y, Tokuda H, Kozawa O. Gallein, G protein $\beta \gamma$ subunits inhibitor, suppresses the TGF- α -induced migration of hepatocellular carcinoma cells via inhibition of the c-Jun N-terminal kinase. *Biochem Cell Biol.* 2025;103:1-9.

2. 学会発表

- 1) 中村純也, 杉本大貴, 大村卓也, 内田一彰, 村上正治, 釘宮嘉浩, 中野有生, 佐藤穂香, 永井彩絵, 川嶋修司, 三浦久幸, 徳田治彦, 櫻井孝. 高齢2型糖尿病患者における口腔保健行動と血糖コントロールの関連性の検討. 第67回日本糖尿病学会年次学術集会. 品川. 2024年5月15日.
- 2) 大村卓也, 杉本大貴, 川嶋修司, 三浦久幸, 徳田治彦, 櫻井孝. Time in Rangeを高める血糖管理は認知機能の維持に寄与する. 第67回日本糖尿病学会年次

学術集会. 東京. 2024 年 5 月 17 日.

- 3) 大村卓也, 堀貴光, 櫻井孝, 小澤修, 徳田治彦. 2 型糖尿病におけるアミロイド β タンパク質のトロンビン受容体刺激による血小板活性化への影響と脳委縮との関係. 第 66 回日本老年医学会学術集会. 名古屋. 2024 年 6 月 13 日.
- 4) Takuya Omura, Taiki Sugimoto, Akemi Inami, Kazuaki Uchida, Takashi Sakurai, Haruhiko Tokuda. Analysis of Japanese diabetes management approaches and muscle/bone indices. 10th Asian Conference for Frailty and Sarcopenia. Bangkok. 2024.10.10.
- 5) 大村卓也, 井波明美, 川嶋修司, 上原敬尋, 杉本大貴, 櫻井孝, 徳田治彦. 持続グルコースモニターにより低血糖を認めホットフラッシュの原因と特定し得た高齢糖尿病患者の一例. 第 35 回日本老年医学会東海地方会. 名古屋. 2024 年 10 月 19 日.
- 6) 藤晓芙, 大村卓也, 川嶋修治, 横井克典, 徳田治彦. 免疫ブログリン製剤投与後に一過性の高血糖・抗 GAD 抗体陽性を呈した 2 型糖尿病の 1 例. 第 255 回東海地方会. 名古屋. 2025 年 2 月 16 日.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし