

Original article

## Effect of glycated human serum albumin on BMP2-induced osteoblastogenesis in C2C12 cells

Rina Yamamoto<sup>1)</sup>, Wakako Takabe<sup>1,2)</sup>, Masayuki Yagi<sup>2)</sup>, Yoshikazu Yonei<sup>1)</sup>

1) Anti-Aging Medical Research Center and Glycation Stress Research Center, Graduate School of Life and Medical Sciences, Doshisha University, Kyoto, Japan

2) Department of Materials and Life Science, Faculty of Science and Technology, Shizuoka Institute of Science and Technology, Shizuoka, Japan

Glycative Stress Research 2020; 7 (2): 142-151

(c) Society for Glycative Stress Research

(原著論文：日本語翻訳版)

## Effect of glycated human serum albumin on BMP2-induced osteoblastogenesis in C2C12 cells

山本理奈<sup>1)</sup>、高部稚子<sup>1,2)</sup>、八木雅之<sup>1)</sup>、米井嘉一<sup>1)</sup>

1) 同志社大学大学院生命医科学研究科アンチエイジングリサーチセンター／糖化ストレス研究センター

2) 静岡理工科大学理工学部物質生命科学科

### 抄録

**【目的】** 成熟した骨組織を除去する破骨細胞と新しい骨組織を形成する骨芽細胞による骨リモデリングは、骨量と骨質の維持に重要である。骨の恒常性が崩れると、骨折のリスクの上昇や、骨粗鬆症の発症に繋がる。糖化最終生成物である AGEs (advanced glycation end products) は糖尿病の合併症に関与し、糖尿病患者は健常者と比較して骨粗鬆症の罹患率が高い。本研究では糖化ストレスが骨芽細胞分化(骨芽細胞形成)に及ぼす影響について検証することを目的とした。

**【方法】** マウス筋芽細胞である C2C12 に骨形成因子である bone morphogenetic protein 2 (BMP2) を添加することで骨芽細胞へ分化させた。AGEs による骨芽細胞分化への影響は、細胞にヒト血清アルブミン (HSA) と glyceraldehyde (glycer) を反応させて生成した AGEs (HSA - glycer) と BMP2 を共添加し、骨芽細胞分化マーカーである alkaline phosphatase (ALP)、osteocalcin (OC) 発現レベルを定量的リアルタイム PCR を用いて評価することで行った。さらに骨芽細胞分化必須転写因子である runt related transcription factor 2 (Runx2) 及び osterix の発現への AGEs による影響についても評価した。また BMP2 シグナル伝達経路の調節に関する Smad 経路への影響については、Smad 1/5/9 のリン酸化をウエスタンブロット法を用いて検証した。最後に

連絡先：准教授 高部稚子  
静岡理工科大学理工学部物質生命科学科  
〒437-8555 静岡県袋井市豊沢 2200-2  
TEL: 0538-45-0164 e-mail: takabe.wakako@sist.ac.jp  
共著者：山本理奈 rina.12210210@gmail.com;  
八木雅之 myagi@mail.doshisha.ac.jp;  
米井嘉一 yyonei@mail.doshisha.ac.jp

Glycative Stress Research 2020; 7 (2): 142-151  
本論文を引用する際はこちらを引用してください。  
(c) Society for Glycative Stress Research

骨代謝回転に対する AGE の影響を評価については、骨代謝回転の主要な指標である osteoprotegerin (OPG) と receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand (RANKL) の発現量の比率をもって評価した。

**【結果】** HSA-glycer は BMP2 による ALP 及び OC の発現誘導を阻害した。また HSA-glycer により転写因子の発現と Smad 1/5/9 のリン酸化が部分的に抑制された。HSA-glycer による RANKL/OPG 比の減少から、AGEs が骨代謝回転の低下をもたらす可能性が示唆された。

**【結論】** 本研究結果より AGEs は Smad 経路を介して BMP2 誘発性骨芽細胞形成を阻害する可能性が示唆された。

**KEY WORDS:** 糖化ストレス、advanced glycation end products (AGEs)、bone morphogenetic protein 2 (BMP2)、骨芽細胞形成、骨粗鬆症、骨代謝回転

## はじめに

骨粗鬆症とは、骨量の減少と骨質の低下を特徴とする疾患をいう<sup>1)</sup>。日本では 2015 年に 1,200 万人以上が骨粗鬆症に罹患しており<sup>2)</sup>、患者は QOL 低下に繋がる骨折のリスクに直面している。骨粗鬆症は全世界の人々に影響を与える可能性があるが、50 歳以上の人々、特に閉経後の女性において最も罹患率が高い<sup>3,4)</sup>。年齢以外に、Schwartz らの研究より、II 型糖尿病の高齢女性は非糖尿病女性よりも骨折率が高いことが示されている<sup>5,6)</sup>。骨強度において、骨量(または骨密度、BMD)と骨質の両方が重要であるが、メタ解析では II 型糖尿病患者は健常者と比較して BMD が正常または高いことが報告されている<sup>7)</sup>。これらのことから骨質の低下に対する糖尿病の寄与を明らかにするために多くの研究が行われてきた。

糖尿病は血中グルコース濃度が慢性的に高い症状をいう。過剰な血糖は非酵素的に蛋白質と反応し、糖化最終生成物 (AGEs) を生成する。AGEs の蓄積は骨粗鬆症を含む<sup>14)</sup> 複数の疾患に関与していることが報告されている<sup>8-13)</sup>。最近では、Takeuchi らがフルクトースより合成される glycerinaldehyde はグルコースより毒性の高い AGEs を形成することを報告している<sup>15)</sup>。骨組織の骨質の維持において主要な蛋白質である I 型コラーゲンは、転写後修飾として酵素的架橋構造を形成する<sup>16)</sup>。一方、骨粗鬆症や糖尿病の患者では、AGEs により不要な骨コラーゲンの架橋構造を形成し、骨の弾力性が失われる<sup>17)</sup>。また、Shiraki らにより、蛍光性架橋型 AGEs であるペンシジンは、骨粗鬆症における脊椎骨折の発生率の独立した危険因子であることが報告されている<sup>18)</sup>。これらのデータは AGEs の蓄積が骨質の低下に関与している可能性を示唆している。

骨リモデリングは、骨の恒常性の維持にも重要である。成熟した骨組織が破骨細胞によって除去された後、新しい骨組織は骨芽細胞によって形成され、毎年骨組織の約 10% が新しい組織へと生まれ変わる<sup>19)</sup>。このような破骨細胞と骨芽細胞の働きのバランスの乱れは、骨量の大幅

な減少と骨質の低下をもたらす。我々の以前の研究では、RAW264.7 細胞においてヒト血清アルブミン (HSA) と glycerinaldehyde から生成された AGEs が、receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL) によって誘導される破骨細胞分化 (破骨細胞形成) を阻害することを示した<sup>20)</sup>。骨吸収以外にも、成熟破骨細胞は、transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ) や bone morphogenetic protein 2 (BMP2) などの骨芽細胞分化 (骨芽細胞形成) を調節するサイトカインを分泌する<sup>21)</sup>。これらの結果から、我々は AGEs は破骨細胞形成阻害だけでなく骨芽細胞形成にも影響を与えることで、結果、骨リモデリングの遅延及び骨質の低下に関与している可能性を考えた。

BMP は、TGF- $\beta$  ファミリーサイトカインに属し、特に BMP2 は骨芽細胞形成においてよく知られている<sup>22)</sup>。BMP は、Smad 依存性または非依存性シグナル経路の両方を介して骨芽細胞形成を誘導する<sup>23)</sup>。Smad 依存経路では、分泌された BMP2 が II 型受容体に結合すると、活性化した II 型受容体キナーゼによって I 型受容体がリン酸化され、その後、シグナルは Smad 蛋白質へ伝達される。リン酸化された Smad 1/5/8 は、アルカリホスファターゼ (ALP) やオステオカルシン (OC) などの骨芽細胞特異的蛋白質、および Runx2、osterix、Dlx5 などの骨形成転写因子の発現を調節する<sup>24-26)</sup>。

いくつかの研究より、AGEs が酸化ストレスを介して骨芽細胞の細胞死を誘導することが報告されており<sup>27-29)</sup>、McCarthy らの研究では、2 つの異なる骨芽細胞様細胞において、ウシ血清アルブミン (BSA) とグルコース (AGE-BSA) から生成された AGEs を数日間添加することにより細胞増殖と ALP 活性が阻害されたことを報告している<sup>30)</sup>。しかし細胞死誘導のない条件下での AGEs による骨芽細胞形成への影響に関する報告は少ない。本研究では、細胞毒性を示さない AGEs が BMP2 誘発性骨芽細胞形成に及ぼす影響について検証を行った。

## 材料・方法

### 材料

ヒト/ラット/マウスのリコンビナント蛋白質であるBMP2は、R&D systems (Minneapolis, MN, USA) から入手した。ヒト血清アルブミン (HSA) は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) から購入した。上記以外は Wako (Osaka, Japan) より入手した。

### 細胞培養

マウス筋芽細胞であるC2C12細胞は、American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA) から購入した。細胞は10%ウシ胎児血清 (Sigma-Aldrich) と抗生物質 (Wako) を含む高グルコース (DMEM, Wako) を含む Dulbecco's Modified Eagle 培地で、37°C で5% CO<sub>2</sub> の条件下で培養した。

### 糖化蛋白の調製

糖化蛋白は、ヒト血清アルブミン (HSA) と glycerinaldehyde により調製した。50 mmol/L リン酸緩衝液 (PB, pH 7.4) 中の HSA (8 mg/mL) および 33 mmol/L glycerinaldehyde を 60°C で40時間インキュベートした。またコントロールとして glycerinaldehyde を添加せず 60°C で40時間インキュベートした加熱 HSA も作成した。反応後、未反応の糖化物を除去するために、遠心フィルター (10K, Merck Millipore Burlington, MS, USA) を使用して限外濾過し、蒸留水を使用して3回洗浄した。

### 細胞生存率の決定

細胞生存率を測定するため、Cell Counting Kit-8 (Dojindo, Kumamoto, Japan) を用いて WST-8 assay を行った。データは水処理または溶媒処理による細胞生存率を示す。

### RNA 抽出および定量的リアルタイムPCR解析

24 well プレートに C2C12 を  $4 \times 10^3$ /well で播種した。24時間後、設定濃度と時間において、細胞を BMP2、糖化 HSA で刺激した。次に細胞を PBS で1回洗浄した後、400  $\mu$ L の ISOGEN II (Nippon Gene, Tokyo, Japan) を用いて RNA を抽出した。RNA 量は Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA) により測定した。逆転写は Applied Biosystems 2720 Thermal cycler (Thermo Fisher Scientific, MA) を使用し、PrimeScript™ RT Master Mix (Takara Bio Inc., Shiga, Japan) に 500 ng の RNA を加えて行った。定量的リアルタイムPCR (qPCR) は、Thunderbird™ SYBR qPCR mix (Toyobo Co., Osaka, Japan) 及び遺伝子特異的プライマー (Thermo Fisher Scientific) を用いて行った。使用したプライマーは以下の通りである：Alkaline phosphatase (ALP), 5'-GAT CAT TCC CAC GTT TTC AC -3' (forward), 5'-TGC GGG CTT GTG GGA CCT GC -3' (reverse); Osteocalcin (OC), 5'- CCT CTC GAC CCG ACT GCA

GAT C -3' (forward), 5'- AGC TGC AAG CTC TCT GTA ACC ATG AC -3' (reverse); Osterix, 5'- CGT CCT CTC TGC TTG AGG AA -3' (forward), 5'- GGG CTG AAA GGT CAG CGT AT -3' (reverse); Runx2, 5'- CAG TCC CAA CTT CCT GTG CT -3' (forward), 5'- CCC ATC TGG TAC CTC TCC GA -3' (reverse); GAPDH, 5'- TGA AGG TCG GTG TGA ACG GAT TGG C -3' (forward), 5'- CAT GTA GGC CAT GAG GTC CAC CAC -3' (reverse); Receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand (RANKL), 5'- AGC CAT TTG CAC ACC TCA CC -3' (forward), 5'- AAG CAA ATG ATT GGC GTA CAG G -3' (reverse); Osteoprotegerin (OPG), 5'- AGT GTG AGG AAG GGC GTT AC -3' (forward), 5'- AAT GTG CTG CAG TTC GTG TG -3' (reverse).

### ALP 染色

12 well プレートに C2C12 を  $8 \times 10^3$ /well で播種した。24時間後、400 ng/mL BMP2 および糖化 HSA を添加し、さらに72時間インキュベートした。ALP 活性の測定には、Alkaline Phosphatase Staining Kit (Cosmo Bio Ltd. Tokyo, Japan) を用いた。刺激後、細胞を PBS で3回洗浄した後、10%ホルムアルデヒドで室温にて10分間固定した。蒸留水で洗浄した後、細胞を ALP 活性溶液とともに 37°C で20分間インキュベートした。細胞の染色画像は、位相差顕微鏡 (CKX41, OLYMPUS corp. Tokyo, Japan) で観察し、cellSense software (OLYMPUS corp.) を搭載した digital camera (DP21, OLYMPUS corp.) で撮影した。

### ウエスタンブロット解析

12 well プレートに C2C12 を  $5 \times 10^4$ /well で播種し、24時間インキュベートした。次に、400 ng/mL BMP2、糖化 HSA または加熱 HSA を添加し、任意の時間刺激を行った。蛋白質は、50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.4)、150 mmol/L NaCl、0.1% SDS、1% Triton X-100 を含む RIPA buffer にプロテアーゼ阻害剤 (Wako) 及びホスファターゼ阻害剤 (Roche Applied Science, Penzberg, Germany) を用いて抽出した。細胞溶解物はドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) (8% polyacrylamide) で電気泳動した後、抽出した蛋白質を polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜に転写し、TBS-T の5%スキムミルク溶液でブロッキングした。次に、膜を各一次抗体でプロットした。Runx2、phospho-Smad 1/5/9、および Smad 1 抗体は cell signaling technology (Danvers, MA, USA) から、anti-GAPDH は Abcam (Cambridge, UK)、anti- $\beta$ -actin は Sigma-Aldrich から購入した。一次抗体に対応した二次抗体 (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) を用いた後、chemiluminescence horseradish peroxidase (HRP) により検出した。各実験のデータは3回行って同じ傾向であったもののうち、1つを示した。Image J を使用して、蛋白質のバンド強度を測定し、蛋白質の発現量を評価した。



## 統計処理

Tukey-Kramerによる多重比較検定により統計解析を行った。誤差は、0.05未満のp値で有意であるとした。

## 結果

### C2C12細胞におけるBMP2の刺激時間および刺激濃度依存的な骨芽細胞形成への誘導

はじめにC2C12細胞の骨芽細胞への分化条件を検証した。細胞に400 ng/mL BMP2を任意の時間刺激を与え、qPCRを行った (Fig. 1-a)。骨芽細胞分化の初期マーカーである alkaline phosphatase (ALP) と成熟骨芽細胞マーカーである osteocalcin (OC) の mRNA 発現量は、時間依存的に誘導された。次に C2C12 細胞を設定した BMP2 濃度において刺激を与え、72 時間インキュベートした後、qPCRを行った。ALP及びOCの mRNA 発現量は、濃度依存的に誘導された (Fig. 1-b)。特に300 ng/mL以上の濃度では、BMP2はこれらの mRNA 発現量を大幅に誘導した。さらに C2C12 細胞に対する BMP2 添加による ALP 活性への影響を検証するために、ALP 染色を行った。Fig. 1-cに示すように、ALP 活性は400 ng/mL BMP2によって刺激後72時間でALP発現誘導が確認された。したがって以降の実験においては、C2C12細胞の骨芽細胞形成の条件を、BMP2の刺激条件を刺激濃度400 ng/ml、刺激時間72時間とした。

### BMP2誘発性骨芽細胞形成における糖化HSAの影響

最初にWST-8を用いて糖化蛋白の細胞毒性を評価した。72時間のglyceraldehyde由来の糖化HSA (HSA-glycer)の処理では、最高濃度400 µg/mLでは細胞死誘導は確認されなかった (Fig. 2-a)。次に骨芽細胞形成に対するHSA-glycerの影響を評価するため、C2C12細胞にBMP2とHSA-glycerを同時に添加した。C2C12細胞を400 ng/mL BMP2と濃度の異なるHSA-glycerを添加し、72時間後、qPCRを行った。BMP2によって発現誘導されたALP及びOCの mRNA は、HSA-glycerによって発現抑制された (Fig. 2-b)。またALP染色においても、HSA-glycerによりBMP2誘導性のALP活性上昇が抑制された (Fig. 2-c)。これらのデータより、HSA-glycerがBMP2誘発性骨芽細胞形成を抑制することが示された。

### 糖化HSAの骨芽細胞分化調節転写因子の発現への影響

骨芽細胞分化調節転写因子として runt related transcription factor 2 (Runx2) や osterix のようないくつかの主要な転写因子が同定されている<sup>25)</sup>。本実験では、HSA-glycerがRunx2とosterixの発現に与える影響を検証した。Fig. 3-aに示すように、400 ng/mL BMP2は、osterixの mRNA 発現を誘導し、400 µg/mL HSA-glycer

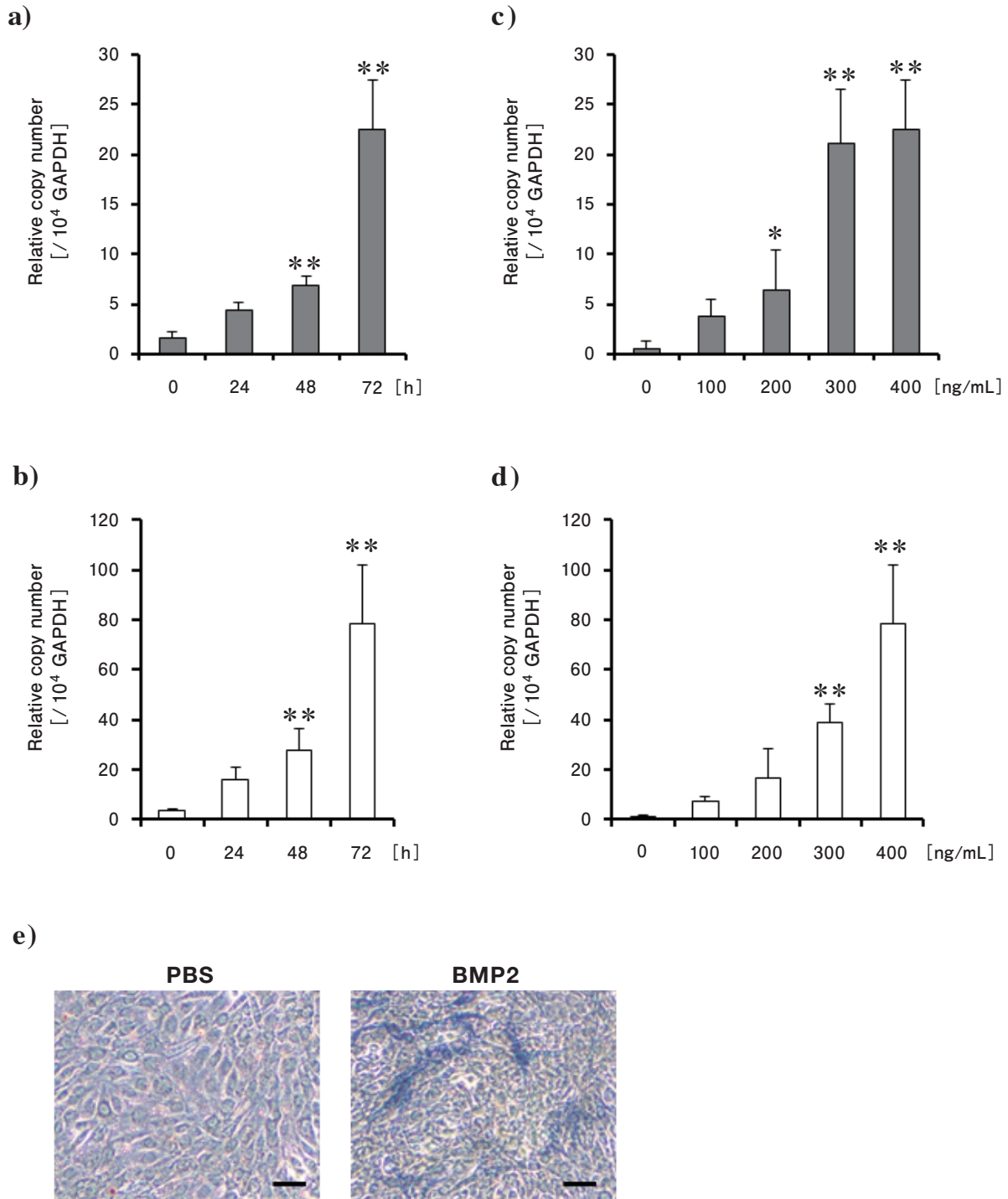
によりその発現上昇が抑制された。Glyceraldehydeを添加せずに60°C 40時間インキュベートした加熱HSAでは、BMP2によるosterixの mRNA 発現誘導への影響は認められなかった。またBMP2によるRunx2の mRNA 発現誘導もHSA-glycerにより抑制されたが、加熱HSAでは抑制されなかった (Fig. 3-b)。さらにRunx2の蛋白質発現量についても検証したところ、HSA-glycerによって抑制されたが、加熱HSAでは変化はなかった (Fig. 3-c)。これらのデータよりHSA-glycerが骨芽細胞分化調節転写因子の発現にも影響を与えることが示唆された。

### C2C12細胞における糖化HSAによるBMP2誘導性Smadリン酸化の阻害

BMP2シグナル伝達経路はSmad経路によって部分的に制御されている<sup>31)</sup>。一般的なBMPシグナル伝達経路では、BMPのI型受容体とII型受容体が二量体を形成し、II型受容体がリン酸化してI型受容体を活性化する。その後、I型受容体がSmad 1/5/8をリン酸化する (Smad 8はSmad 9としても知られる)。本実験ではBMP2によって誘導されるSmad経路に対するHSA-glycerの影響を検証することを目的とした。400 ng/mL BMP2を添加後24時間でSmad 1/5/9のリン酸化が誘導されるが、400 µg/mL HSA-glycerをBMP2と同時添加した場合にはリン酸化は有意に抑制された (Fig. 4)。これらのデータよりHSA-glycerに含まれていたAGEsが骨芽細胞形成の初期段階へ影響を与えている可能性が示唆された。

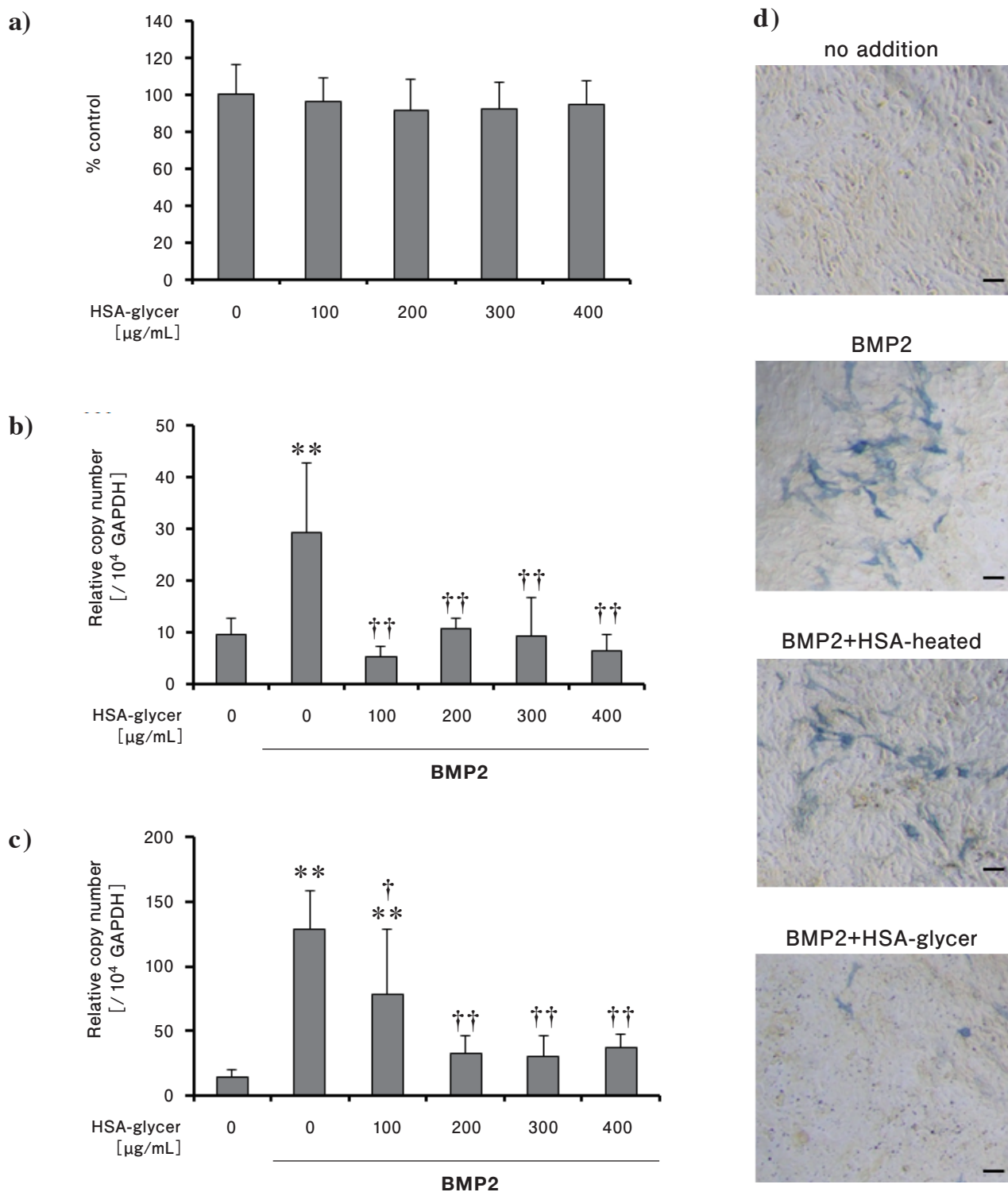
### 骨リモデリングを調節するBMP2誘発性サイトカインへの糖化蛋白の影響

我々のデータはHSA-glycerが骨芽細胞分化を抑制することを示唆している。骨リモデリングには破骨細胞形成も重要な要素となる。骨芽細胞は破骨細胞形成において重要な役割を果たすサイトカインである osteoprotegerin (OPG) と receptor activator of NF-κB ligand (RANKL) を分泌する。破骨細胞前駆細胞におけるRANKLとその受容体RANKとの結合は破骨細胞形成の引き金となり、OPGはデコイ受容体として働き、RANKLとRANKとの結合を妨げる。このように破骨細胞形成に対するOPGはRANKLと相反する働きを担うことから、RANKL/OPG比は骨代謝回転の主要な指標とされている。そこでHSA-glycerがOPGおよびRANKLの発現に与える影響についてqPCRを用いて評価した。C2C12細胞を400 ng/mL BMP2および400 µg/mL HSA-glycerで48時間処理した後、qPCRを行った。Figs. 5-a及びbで示すように、HSA-glycerによりRANKLの mRNA 発現量は減少したが (Fig. 5-a)、その一方でOPGの mRNA 発現量は変化がなかった (Fig. 5-b)。したがってHSA-glycer添加によりRANKL/OPG比が減少したことから、HSA-glycerは破骨細胞形成をも遅延させる可能性が示唆された。



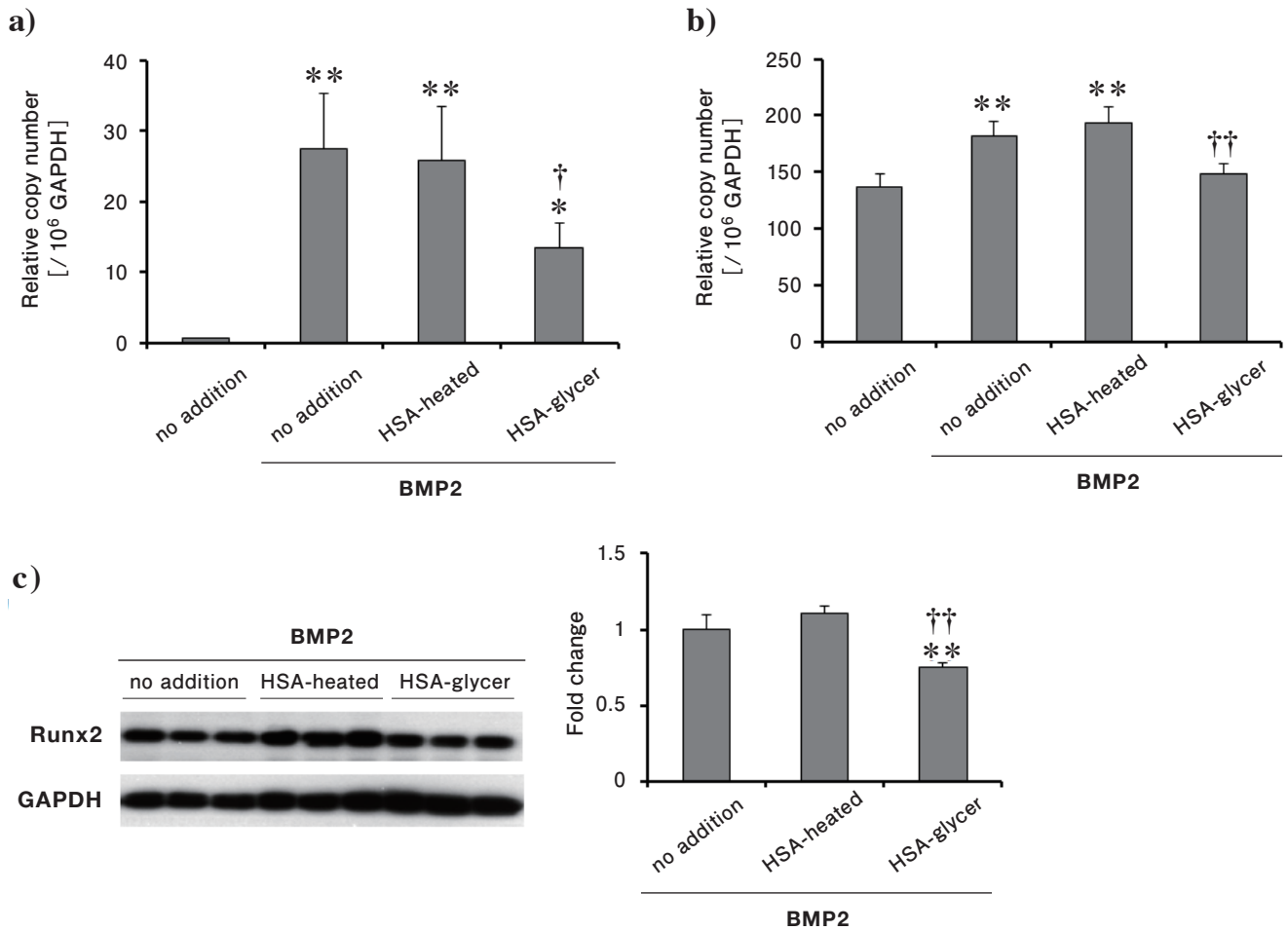
**Fig. 1. BMP2 increases the expression levels of ALP and OC in C2C12 cells.**

(a, b) Sucrose (Suc). Time-dependent induction of ALP and OC, the markers of osteoblastgenesis, by BMP2. C2C12 cells were treated with 400 ng/mL BMP2 for up to 72 h. Quantitative real-time PCR (qPCR) analyses were performed for (a) ALP and (b) OC. All data obtained were normalized by GAPDH and shown as the mean ± SD (n = 6). \*\*p < 0.01 vs. Time 0. (c, d) Concentration-dependent induction of ALP and OC by BMP2. C2C12 cells were treated with up to 400 ng/mL BMP2 for 72 h. The expression levels of (c) ALP and (d) OC. All data obtained were normalized by GAPDH and shown as the mean ± SD (n = 6). \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 vs. 0 ng/mL BMP2. (e) BMP2 induced ALP activity in C2C12 cells. C2C12 cells were treated with 400 ng/mL BMP2 for 72 h. ALP staining were performed to determine ALP activity. The images shown are representative of three independent experiments with similar results. Bar, 100 μm. BMP2, bone morphogenetic protein 2; ALP, alkaline phosphatase; OC, osteocalcin; PCR, polymerase chain reaction; GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; SD, standard deviation.



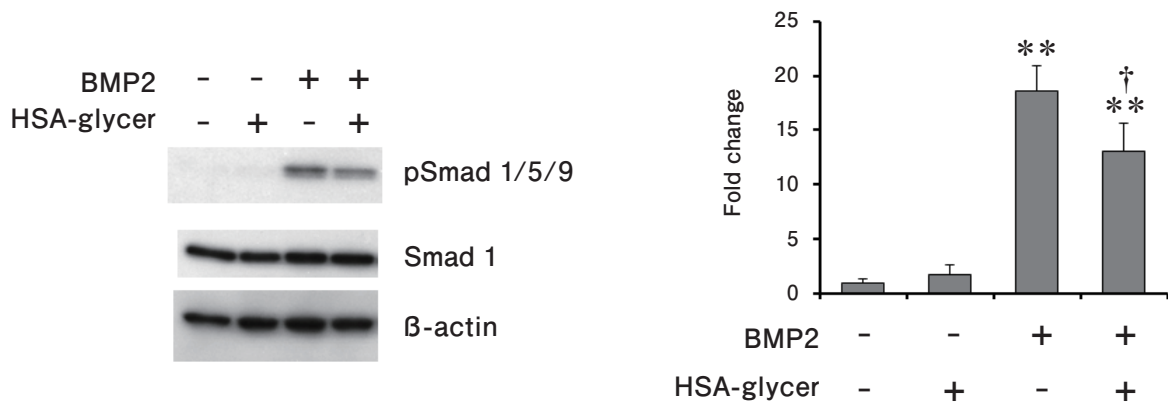
**Fig. 2.** Glyceraldehyde-derived glycosylated HSA suppress BMP2-induced ALP and OC in C2C12 cells.

(a, b, c) C2C12 cells were treated with glyceraldehyde-derived glycosylated HSA (HSA-glycer) up to 400  $\mu\text{g/mL}$  for 72 h with or without 400 ng/mL BMP2. (a) WST-8 assay was performed to determine cytotoxicity of HSA-glycer ( $n = 6$ ). (b, c) Effect of HSA-glycer on BMP-2-induced mRNA expression of (b) ALP and (c) OC. All data obtained were normalized by GAPDH and shown as the mean  $\pm$  SD ( $n=6$ ). \*\*  $p < 0.01$  vs. without BMP2. †  $p < 0.05$ , ††  $p < 0.01$  vs. BMP2 without HSA-glycer. (d) Effect of glycosylated HSA on BMP-2-induced ALP activity. C2C12 cells were treated with 400  $\mu\text{g/mL}$  HSA-glycer or HSA-heated and 400 ng/mL BMP2 for 72 h. ALP activity was examined by ALP staining assay. The images shown are representative of three independent experiments with similar results. Bar, 100  $\mu\text{m}$ . HSA, human serum albumin; BMP2, bone morphogenetic protein 2; ALP, alkaline phosphatase; OC, osteocalcin; WST-8, 2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulphophenyl)-2H-tetrazolium; GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; SD, standard deviation.



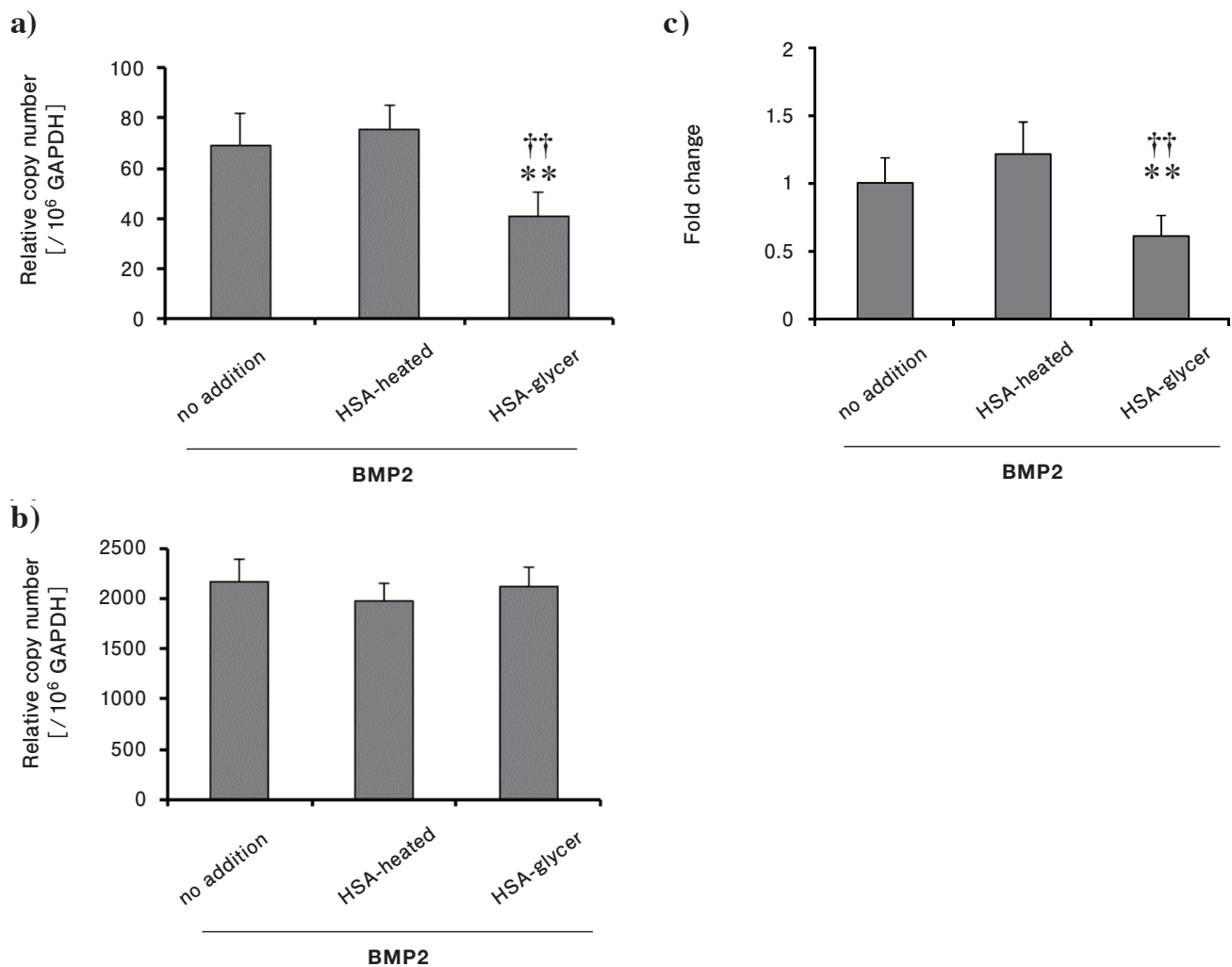
**Fig.3. Glyceraldehyde-derived glycated HSA inhibit the expression of transcription factors regulate osteoblastogenesis.**

C2C12 cells were treated with 400 µg/mL HSA-glycer or HSA-heated and 400 ng/mL BMP2 for 48 h. qPCR analysis were performed for (a) Osterix and (b) Runx2. All data obtained were normalized by GAPDH and shown as the mean ± SD (n = 4). \* p < 0.05, \*\* p < 0.01 vs. no addition. † p < 0.05, †† p < 0.01 vs. BMP2. (c) Samples (30 µg of proteins) of the crude extract were used for western blot analysis using antibody against Runx2. The bars show the mean ± SD (n = 3) of the ratio against BMP2. \*\* p < 0.01 vs. BMP2. †† p < 0.01 vs. BMP2 with HSA-heated. HSA, human serum albumin; glycer, glyceraldehyde; BMP2, bone morphogenetic protein 2; PCR, polymerase chain reaction; qPCR, quantitative real-time PCR; GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; SD, standard deviation.



**Fig.4. Effect of glyceraldehyde-derived glycated HSA on BMP2-induced Smad phosphorylation.**

C2C12 cells were treated with 400 µg/mL HSA-glycer and 400 ng/mL BMP2 for 24 h. Samples (20 µg of proteins) of the crude extract were used for western blot analysis using antibody against phosphor-Smad 1/5/9, Smad 1 and β-actin. The bars show the mean ± SD (n = 3) of the ratio against no addition. \*\* p < 0.01 vs. no addition. † p < 0.05 vs. BMP2. HSA, human serum albumin; glycer, glyceraldehyde; BMP2, bone morphogenetic protein 2; SD, standard deviation.



**Fig. 5.** Glyceraldehyde-derived glycated proteins inhibited BMP2-induced RANKL, but not OPG.

C2C12 cells were treated with 400  $\mu$ g/mL HSA-glycer and 400 ng/mL BMP2 for 48 h. qPCR analyses were performed for (a) RANKL and (b) OPG. (c) The ratio of RANKL/OPG. All data obtained were normalized by GAPDH and shown as the mean  $\pm$  SD (n = 4). \*\* p < 0.01 vs. BMP2. †† p < 0.01 vs. BMP2 with heated-HSA. HSA, human serum albumin; BMP2, bone morphogenetic protein 2; RANKL, receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand; OPG, osteoprotegerin; GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; SD, standard deviation.

## 考察

骨粗鬆症は、骨量及び骨質の低下による骨強度の低下が原因とされ、骨折につながり高齢者のQOLを低下させる。骨粗鬆症は閉経後の女性だけでなく糖尿病患者に罹患率が高いことから、高血糖状態が続くことにより生じるAGEs及び、AGEsによって引き起こされる糖化ストレスと骨粗鬆症の関連について研究がなされている。骨質の維持には骨芽細胞と破骨細胞のバランスが保たれたスムーズな骨リモデリングが重要である。本研究では糖化ストレスが骨質に与える影響について、特に骨芽細胞が分化する過程に着目しC2C12細胞を用いて検証した。

Katagiriらの研究より、マウスの筋芽細胞であるC2C12はBMP2刺激により骨芽細胞へ分化することが報告されており<sup>32)</sup>、本実験においてもC2C12細胞において

BMP2依存的に骨芽細胞のマーカーであるALP、OCの発現及び石灰化が観察された (Fig. 1)。この条件下において、糖化蛋白の影響を検証した。今回用いたAGEsは、フルクトース代謝の過程で生じるglyceraldehyde<sup>33)</sup>と、ヒト血液中に最も多く含まれる蛋白であるHSAから生じたglyceraldehyde由来の糖化蛋白 (HSA-glycer) である。本研究結果は、HSA-glycerがBMP2誘導性の骨芽細胞分化マーカー及びALP活性を抑制することを示した (Fig. 2)。

その他の研究においても、マウスの骨髄から単離した間質細胞であるST2細胞について、ウシ血清アルブミン (BSA)と反応させたglyceraldehyde由来のAGEsが、OCのmRNAの発現抑制及びALPの活性抑制、石灰化を抑制することが報告されている<sup>34)</sup>。またglycolaldehydeにおいても、NotsuraらがBSAと反応させて得られたAGEsが、ST2細胞において石灰化の抑制及びOC mRNAの発現を



抑制することを報告している<sup>35)</sup>。以上の報告より、本研究と使用した細胞は異なるが、血清アルブミンとglyceraldehyde及びglycolaldehyde由来のAGEsは骨芽細胞の分化抑制を誘導することが報告されている。しかしその一方でGlyceraldehydeやglycolaldehyde由来のAGEsはtoxic AGEとも呼ばれ、細胞障害を呈することが報告されている<sup>36, 37)</sup>。先に述べたST2細胞では、AGEsが骨芽細胞分化抑制だけでなく細胞死誘導への関与することが示されたが<sup>34, 35)</sup>、本実験で用いた糖化蛋白は細胞毒性を示さなかった(**Fig. 2-a**)。これは、主に糖化条件が異なることに由来していると考えられる。今回の我々の結果から、骨芽細胞分化過程のAGEsによる抑制には細胞傷害による影響は少ないと考えられた。

骨芽細胞分化に必須の転写因子としてはRunx2やosterixが知られている。Runx2はOCやcollegen type Iの発現調節に関与することが報告されている<sup>38)</sup>。Osterixは、Runx2によって調節を受けることが知られているが<sup>39)</sup>、MatsubaraらはRunx2ノックアウトマウスの間葉系細胞においてもosterixの発現があることを報告している<sup>40)</sup>。このことからosterixの発現メカニズムにはRunx2依存性及び非依存性の両方の発現経路があると考えられている。本研究ではHSA-glycerがRunx2及びosterixの発現に与える影響について検証した(**Fig. 3**)。その結果、Runx2発現はmRNA、蛋白質ともにglyceraldehyde由来のAGEsにより20%ほどの弱い発現抑制を受けた(**Fig. 3-b, c**)。しかしながらその一方で、osterixのmRNA発現は、50%以上の発現抑制が観察された(**Fig. 3-a**)。このことから、Runx2非依存的なosterixの発現誘導メカニズムもAGEsによって制御されている可能性が考えられた。

MirandaらのII型糖尿病と骨粗鬆症を併発している患者を対象に実施された臨床試験においても、健常者に比べ糖尿病患者はRunx2及びosterixの発現抑制が観察されている<sup>41)</sup>。このことから、糖尿病患者で蓄積亢進しているAGEsが、これらの転写因子の異常を介して骨代謝に影響を与えている可能性が示唆された。

本研究ではHSA-glycerがBMP2受容体の活性化を介して起こるSmadのリン酸化を抑制することで骨芽細胞分化を抑制することを示した(**Fig. 4**)。これまでに糖化ストレスとSmadシグナルに関しては、Sassi-Gahaらが、糖化反応中間体の一種である3-deoxyglucosone (3-DG)由来のAGEsによりcollagen type Iの発現抑制及びSmad経路を抑制するSmad7を発現上昇させることを報告している<sup>42)</sup>。しかしながら糖化ストレスがSmadの発現に与える影響についての報告は少なく、また本実験の結果ではHSA-glycerによるSmadのリン酸化の抑制レベルが30%程度であるにもかかわらず(**Fig. 4**)、顕著な骨芽細胞分化抑制を示しており(**Fig. 2**)、これらの差異については今後更なる検証が必要であると考えられる。

我々はHSA-glycerが骨芽細胞分化を抑制することを示したが、更に骨代謝バランスについての評価を行うため、

骨代謝の指標であるRANKL/OPG比<sup>40, 43, 44)</sup>を検証した(**Fig. 5**)。RANKLは、骨細胞及び骨芽細胞から産生される破骨細胞分化促進因子であり、骨芽細胞から産生されるOPGは破骨細胞分化抑制因子である。骨芽細胞と破骨細胞からなる骨形成リモデリングのバランスを保つためには、RANKL/OPG比が一定であることが必要と考えられるが、本研究結果からは、HSA-glycer添加によりRANKL/OPG比は減少した(**Fig. 5-c**)。RANKL/OPG比の値が低い場合、破骨細胞分化が抑制されることで骨吸収が遅くなり、その結果、骨代謝は遅くなると考えられる。骨代謝回転の遅滞は、骨質を下げ骨強度が低下する原因となるとされている。事実、糖尿病を有しており骨粗鬆症に罹患する患者のRANKL/OPG比の減少が確認されている<sup>41, 43)</sup>。

最後に、本研究ではHSA-glycerが骨芽細胞分化を抑制することを示したが、我々は同じHSA-glycerが、マウス由来マクロファージ様細胞RAW264.7のRANKL誘導性破骨細胞分化をも抑制することを報告している<sup>45)</sup>。これらを合わせると、glyceraldehyde由来の糖化蛋白は骨芽細胞分化と破骨細胞分化両方を抑制し、結果、低回転型骨代謝を促すことが考えられた。

当研究室ではこれまでに500種類以上の植物からAGEsの生成抑制作用を持つ植物を見出している。現在までに様々な骨粗鬆症治療薬が上梓されているが、我々はAGEsが骨リモデリングの異常を起こすことで骨粗鬆症の発症に関与しているという観点から、AGEsの生成抑制作用を持つ植物の効果を今後検証していく予定である。

## 結論

本研究ではglyceraldehyde由来の糖化蛋白質が、Smad経路の阻害を介してBMP2誘発性骨芽細胞形成を抑制することを示した。また骨代謝回転の低下により骨質の低下を惹起する可能性が考えられた。

## 謝辞

本研究の一部は総合科学技術・イノベーション会議のSIP(戦略的イノベーション創造プログラム 研究課題番号14533567)「次世代農林水産業創造技術」(農研機構生研センター委託研究)より支援を受け実施された。

## 利益相反申告

研究を遂行するにあたり利益相反に該当する事項はない。

## 参考文献

- 1) Consensus Development Conference: Diagnosis, prophylaxis, and treatment of osteoporosis. *Am J Med.* 1993; 94: 646-650.
- 2) Asaoka D, Nagahara A, Shimada Y, et al. Risk factors for osteoporosis in Japan: Is it associated with *Helicobacter pylori*? *Ther Clin Risk Manag.* 2015; 11: 381-391.
- 3) Siris ES, Miller PD, Barrett-Connor E, et al. Identification and fracture outcomes of undiagnosed low bone mineral density in postmenopausal women: Results from the National Osteoporosis Risk Assessment. *JAMA.* 2001; 12; 286: 2815-2822.
- 4) Kanis JA, McCloskey EV, Johansson H, et al. European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women. *Osteoporos Int.* 2013; 24: 23-57.
- 5) Schwartz AV, Sellmeyer DE, Ensrud KE, et al. Older women with diabetes have an increased risk of fractures: A prospective study. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997; 86: 2-38.
- 6) Yamaguchi T, Sugimoto T. Bone metabolism and fracture risk in type 2 diabetes mellitus. *Endocr J.* 2011; 58: 613-624.
- 7) Vestergaard P. Discrepancies in bone mineral density and fracture risk in patients with type 1 and type 2 diabetes: A meta-analysis. *Osteoporos Int.* 2007; 18: 427-444
- 8) Kan H, Yamagishi S, Ojima A, et al. Elevation of serum levels of advanced glycation end products in patients with Non-B or Non-Hepatocellular carcinoma. *J Clin Lab Anal.* 2015; 29: 480-484.
- 9) Vlassara H, Striker GE. Advanced glycation endproducts in diabetes and diabetic complications. *Endocrinol Metab Clin N Am.* 2013; 42: 697-719.
- 10) Takeuchi M, Yamagishi S. Possible involvement of advanced glycation end-products (AGEs) in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Curr Pharm Des.* 2008; 14: 973-978.
- 11) Ward MS, Fortheringham AK, Cooper ME, et al. Targeting advanced glycation endproducts and mitochondrial dysfunction in cardiovascular disease. *Curr Opin Pharmacol.* 2013; 13: 654-661.
- 12) Gugliucci A. Glycation as the glucose link to diabetic complications. *Osteopath Assoc.* 2000; 100: 621-634.
- 13) Negre-Salvayre A, Salvayre R, Augé N, et al. Hyperglycemia and glycation in diabetic complications. *Antioxid Redox Signal.* 2009; 11: 3071-3109.
- 14) Yamagishi S. Role of advanced glycation end products (AGEs) in osteoporosis in diabetes. *Curr. Drug Targets.* 2011; 12: 2096-2102.
- 15) Takeuchi M, Yamagishi S. TAGE (toxic AGEs) hypothesis in various chronic diseases. *Medical Hypotheses.* 2004; 63: 449-452
- 16) Saito M, Marumo K. Collagen cross-links as a determinant of bone quality: A possible explanation for bone fragility in aging, osteoporosis, and diabetes mellitus. *Osteoporos Int.* 2010; 21: 195-214.
- 17) Vashishth D. The role of the collagen matrix in skeletal fragility. *Curr Osteoporos Rep.* 2007; 5: 62-66.
- 18) Shiraki M, Kuroda T, Tanaka S, et al. Nonenzymatic collagen cross-links induced by glycoxidation (pentosidine) predicts vertebral fractures. *J Bone Miner Metab.* 2008; 26: 93-100
- 19) Lerner UH. Bone remodeling in post-menopausal osteoporosis. *J Dent Res.* 2006; 85: 584-595.
- 20) Mamun-Or-Rashid ANM, Takabe W, Yagi M, et al. Glycated-HSA inhibits osteoclastogenesis in RAW264.7 cells depending on the glycyating agents via downregulating RANKL-signaling. *Glycative Stress Research.* 2017; 4: 217-231.
- 21) Pederson L, Ruan M, Westendorf JJ, et al. Regulation of bone formation by osteoclasts involves Wnt/BMP signaling and the chemokine sphingosine-1-phosphate. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008; 105: 20764-20769.
- 22) Urist MR. Bone: Formation by autoinduction. *Science.* 1965; 150(3698): 893-899.
- 23) Jimi E, Hirata S, Shin M, et al. Molecular mechanisms of BMP-induced bone formation: Cross-talk between BMP and NF- $\kappa$ B signaling pathways in osteoblastogenesis. *Japanese Dental Science Review.* 2010; 46: 33-42.
- 24) Franceschi RT, Xiao G. Regulation of the osteoblast-specific transcription factor, Runx2: Responsiveness to multiple signal transduction pathways. *J Cell Biochem.* 2003; 88: 446-454.
- 25) Marie PJ. Transcription factors controlling osteoblastogenesis. *Arch Biochem Biophys.* 2008; 473: 98-105.
- 26) Kim YJ, Lee MH, Wozney JM, et al. Bone morphogenetic protein-2-induced alkaline phosphatase expression is stimulated by Dlx5 and repressed by Msx2. *J Biol Chem.* 2004; 279: 50773-50780.
- 27) Gangoiti MV, Cortizo AM, Arnol V, et al. Opposing effects of bisphosphonates and advanced glycation end-products on osteoblastic cells. *Eur J Pharmacol.* 2008; 600: 140-147.
- 28) Mao YX, Cai WJ, Sun XY, et al. RAGE-dependent mitochondrial pathway: A novel target of silibinin against apoptosis of osteoblastic cells induced by advanced glycation end products. *Cell Death Dis.* 2018; 9: 674.
- 29) Xiong M, Liu L, Liu Z, et al. Inhibitory effect of zinc on the advanced glycation end product-induced apoptosis of mouse osteoblastic cells. *Mol Med Rep.* 2015; 12: 5286-5292.
- 30) McCarthy AD, Etcheverry SB, Bruzzone L, et al. Effects of advanced glycation end-products on the proliferation and differentiation of osteoblast-like cells. *Mol Cell Biochem.* 1997; 170: 43-51.
- 31) Chen G, Deng C, Li YP. TGF- $\beta$  and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation. *Int J Biol Sci.* 2012; 8: 272-288.
- 32) Katagiri T, Yamaguchi A, Komaki M, et al. Bone morphogenetic protein-2 converts the differentiation pathway of C2C12 myoblasts into the osteoblast lineage. *J Cell Biol.* 1994; 127(6 Pt 1): 1755-1766.
- 33) Hagopian K, Ramsey JJ, Weindruch R. Enzymes of glycerol and glyceraldehyde metabolism in mouse liver: Effects of caloric restriction and age on activities. *Biosci Rep.* 2008; 28: 107-115.

- 34) Okazaki K, Yamaguchi T, Tanaka K, et al. Advanced glycation end products (AGEs), but not high glucose, inhibit the osteoblastic differentiation of mouse stromal ST2 cells through the suppression of osterix expression, and inhibit cell growth and increasing cell apoptosis. *Calcif Tissue Int.* 2012; 91: 286-296.
- 35) Notsu M, Yamaguchi T, Okazaki K, et al. Advanced glycation end product 3 (AGE3) suppresses the mineralization of mouse stromal ST2 cells and human mesenchymal stem cells by increasing TGF- $\beta$  expression and secretion. *Endocrinology.* 2014; 155: 2402-2410.
- 36) Usui T, Shizuuchi S, Watanabe H, et al. Cytotoxicity and oxidative stress induced by the glyceraldehyde-related Maillard reaction products for HL-60 cells. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2004; 68: 333-340.
- 37) Takino J, Kobayashi Y, Takeuchi M. The formation of intracellular glyceraldehyde-derived advanced glycation end-products and cytotoxicity. *J Gastroenterol.* 2010; 45: 646-655.
- 38) Harada H, Tagashira S, Fujiwara M, et al. Cbfa1 isoforms exert functional differences in osteoblast differentiation. *J Biol Chem.* 1999; 274: 6972-6978.
- 39) Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, et al. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell.* 2002; 108: 17-29.
- 40) Matsubara T, Kida K, Yamaguchi A, et al. BMP2 regulates osterix through Msx2 and Runx2 during osteoblast differentiation. *J Biol Chem.* 2008; 283: 29119-29125.
- 41) Miranda C, Giner M, Montoya MJ, et al. Influence of high glucose and advanced glycation end-products (ages) levels in human osteoblast-like cells gene expression. *BMC Musculoskelet Disord.* 2016; 17: 377.
- 42) Sassi-Gaha S, Loughlin DT, Kappler F, et al. Two dicarbonyl compounds, 3-deoxyglucosone and methylglyoxal, differentially modulate dermal fibroblasts. *Matrix Biol.* 2010; 29: 127-134.
- 43) Gerdhem P, Isaksson A, Akesson K, et al. Increased bone density and decreased bone turnover, but no evident alteration of fracture susceptibility in elderly women with diabetes mellitus. *Osteoporosis Int.* 2005; 16: 1506-1512.
- 44) Persy V, D'Haese P. Vascular calcification and bone disease: The calcification paradox. *Trends Mol Med.* 2009; 15: 405-416.
- 45) Mamun-Or-Rashid ANM, Takabe W, Yagi M, et al. Glycated-proteins modulate RANKL-induced osteoclastogenesis in RAW264.7 cells. *Glycative Stress Res.* 2017; 4: 232-239.