

博士学位論文審査要旨

2017年8月30日

論文題目： Modulation of *in vitro* osteoclastogenesis by glycated proteins

糖化蛋白による破骨細胞分化への影響

学位申請者： MAMUN OR RASHID A N M

審査委員：

主査： 生命医科学研究科 教授 米井 嘉一

副査： 生命医科学研究科 教授 萩原 明於

副査： 生命医科学研究科 教授 池川 雅哉

要旨：

研究内容は糖化蛋白による破骨細胞分化への影響についてである。背景として日本の高齢化に伴う寝たきり者の増加、糖尿病など糖化ストレスの強い疾病増加といった状況の中、寝たきり要因の一つである骨粗鬆症に着目した。先行研究では、糖化ストレスにより骨コラーゲンの糖化をきたし、脆弱な架橋形成を形成、骨質が低下し骨折リスクが上昇することが知られている。今回は、糖化ストレスが骨粗鬆症に及ぼす影響について、終末糖化産物（AGEs）がマクロファージから破骨細胞への分化・成熟に及ぼす影響について細胞生物学的検討を行った。

本論文は、序盤では詳細な条件設定を施行しながら培養マクロファージ（RAW264.7）から破骨細胞への分化・成熟に至る培養系モデルを確立した事を示し、次に本モデルにおける糖化蛋白添加による影響について検討した。その結果、糖化コラーゲン（I型及びII型）は破骨細胞の分化・成熟を促進させ、高回転型骨代謝異常を惹起する可能性が示された。

さらに検証を進めた結果、ヒト血清アルブミン（HSA）を glyceraldehyde や glycolaldehyde と反応させた時に生成される AGEs（以下、糖化 HSA と呼ぶ）がマクロファージ培養系モデルで破骨細胞分化を抑制する事が示された。その機序として、① RANKL 刺激でマクロファージからの HMGB1 分泌が増加し破骨細胞分化を促進するが、糖化 HSA は HMGB1 分泌を低下させる事、② その理由として細胞質内 HMGB1 量は変わらないが、核内 HMGB1 量が低下する事、③ 糖化 HSA は NF κ B シグナルを阻害して ERK リン酸化を促進する事、④ SiRNA を用いた実験から ERK リン酸化は RAGE に依存する事、⑤ 糖化 HSA は破骨細胞分化に必須の転写因子である NFATc1 と c-FOS の発現を減少させ、Ca オシレーションの低下を惹起する事を示した。低アルブミン血症を伴う高齢者やアルブミン尿・低アルブミン血症を伴う腎不全患者では骨粗鬆症の進行が顕著であることが知られているが、単なるアルブミン不足に加えて、糖化 HSA による破骨細胞分化・成熟抑制作用が弱まることが一因になっている可能性がある。これらの成果はこれまでに報告がない新規所見であり、骨粗鬆症の進展・重症化の予防策を考案するために大変有意義と考えられる。

よって、本論文は、博士（理学）（同志社大学）の学位を授与するにふさわしいものであると認められる。

総合試験結果の要旨

2017年8月30日

論文題目： Modulation of *in vitro* osteoclastogenesis by glycated proteins

糖化蛋白による破骨細胞分化への影響

学位申請者： MAMUN OR RASHID A N M

審査委員：

主査： 生命医科学研究科 教授 米井 嘉一

副査： 生命医科学研究科 教授 萩原 明於

副査： 生命医科学研究科 教授 池川 雅哉

要 旨：

上記審査委員はMAMUN OR RASHID A N M君に対する総合試験を2017年8月2日午後3時より約2時間30分実施した。時間構成は口頭発表70分、質疑応答40分、口頭試問30分であった。

総合試験において学位申請者は、提出された論文の内容に関する口頭試問に適切に回答し、研究内容と意義、研究方法、解析法について深い理解を示すとともに、研究の背景について広範な専門知識を有していることを示した。

研究内容は糖化蛋白による破骨細胞分化への影響についてである。背景として日本の高齢化に伴う寝たきり者の増加、糖尿病など糖化ストレスの強い疾病増加といった状況の中、寝たきり要因の一つである骨粗鬆症に着目し、糖化ストレスが骨粗鬆症に及ぼす影響について、終末糖化産物(AGEs)がマクロファージから破骨細胞への分化・成熟に及ぼす影響について細胞生物学的検討を行った。その結果、コラーゲン蛋白由来AGEsは破骨細胞の分化・成熟を促進させ、アルデヒド/アルブミン由来AGEsは分化・成熟を抑制することが示された。前者は高回転型骨代謝異常を惹起し、後者は破骨細胞由来の骨芽細胞成長・増殖因子の低下による骨芽細胞低形成を惹起する機序が示唆された。これらの所見は骨粗鬆症の進展・重症化の予防策を考案するために有意義と考えられる。

学位申請者は、本研究科修了に必要な所定の単位を修得していること、修了要件を満たしていることを成績原簿より確認した。語学能力については、申請者は母国バングラデシュにおいて高等教育をすべて英語で受け、英文原著論文を4編執筆(うち2編掲載済、1篇受諾、残1篇は査読中)、国際学会での発表経験(1回)があり、英語の資質は十分備わっていると判断した。

よって、総合試験の結果は合格であると認める。

博士学位論文要旨

論文題目 : Modulation of *in vitro* osteoclastogenesis by glycated proteins
糖化蛋白による破骨細胞分化への影響

氏名: MAMUN OR RASHID A N M

要旨 :

The differentiation and activation of osteoclast cells are of great importance in bone metabolism as osteoclasts resorb bone and activate osteoblast cells to rebuild the bone and thereby maintain bone quality and strength. Bone quality is an important factor that is determined by the native structure of the bone building blocks collagen (20% of bone weight), hydroxyapatite. Advanced glycation endproducts (AGEs) in human body (bone, serum, skin, urine etc.) increases with age and bone mineral density and bone quality decreases, resulting in high risk of big bone fracture. AGEs, such as *N*^ε-(carboxymethyl)-lysine (CML), pentosidine are elevated in serum of osteoporotic patients could be due to osteoclastic bone loss. Both osteoblast, osteoclast along with their precursors possess receptor for AGEs (RAGE) and it is a multifunctional receptor plays vital role in differentiation and inflammation. RAGE regulates osteoclastogenesis by binding with extracellular high mobility group box 1 (HMGB1) and activates osteoclastogenic downstream signals, thereby supports osteoclast cells to mature full functional. RAGE when binds with AGEs in regular culture media, it triggers to several cytokines such as, tumor necrosis factor alpha (TNF α), Interleukin 1 beta (IL-1 β), Interleukin 6 (IL-6) production that are inflammatory and osteoclastogenic, too. Therefore, I investigated the effect of glycated proteins in RANKL-induced osteoclastogenesis in RAW264.7 cells.

The receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL) and Macrophage Colony-Stimulating Factor (M-CSF) are the main ligands known to induce osteoclastic differentiation (osteoclastogenesis) pathways and survival related pathways, respectively. In the present study, at first I examined whether both are require for *in vitro* osteoclastogenesis and survival of RAW264.7 cells. I found that RANKL alone at a concentration of 100 ng/mL could induce osteoclastogenesis by forming giant multinucleated osteoclast cells that also showed higher Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) activity than in the presence of M-CSF. RANKL alone activated osteoclastogenic NF- κ B, ERK, p-38 MAPK, NFATc1, and anti-apoptotic Akt in RAW264.7 cells and increased both maturation as well as activation

markers such as Cathepsin-K (CTSK), V-type proton ATPase (Atp6v), TRAP, Matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) mRNA expression. RANKL-induced osteoclastogenesis was not dependent on M-CSF, but was dependent on FBS, cell density, media content. This study shows that any change among essential components can lead to inappropriate *in vitro* osteoclastogenesis in RAW264.7 cells. Therefore, in rest of the experiments, I used 100 ng/mL RANKL in α MEM containing 10% FBS and cell density at 1×10^4 cells/well in 96-well plate and total 5 days of incubation.

Collagen is bone organic material that loses its native structure due to glycation stress. Collagen native structure is crucial for maintaining bone health. HSA is an abundant protein in blood and thereby present in bone microenvironment. CML-HSA, pentosidine are most abundant AGEs found in osteoporotic patients. Therefore, I selected collagen type I, II, and HSA to investigate their effect on *in vitro* osteoclastogenesis. Glycated proteins were prepared using collagen-I or collagen-II or HSA incubating with glycation agents (glucose, fructose, glycolaldehyde, glyceraldehyde, glyoxal) in phosphate buffer (pH 7.4) and incubated at 60 °C for 24 or 40 h depending on the protein used. After glycation, non-reacted glycation agents and phosphate buffer were removed by ultrafiltration and used in *in vitro* osteoclastogenesis. Glycated proteins significantly modulated RANKL-induced osteoclastogenesis depending on the protein types and glycation agents; glucose and fructose derived glycated collagen-I and II significantly increased TRAP activity, whereas glycolaldehyde, glyceraldehyde, glyoxal derived glycated HSA and CML-HSA decreased. None of the experimental AGEs causes cell death in osteoclastogenic media. Glycation of collagen-I increased fluorescent AGE formation, fructose derived glycated collagen-I obtained 10 times higher fluorescent AGEs formation intensity, however, the effect was almost same as glucose derived glycated collagen-I that showed relatively lower fluorescence. In case of HSA, glycolaldehyde showed highest fluorescence intensity and highest inhibition of TRAP activity. CML-HSA also showed similar inhibitory effect demonstrated that the inhibition is due to AGEs. This data shows that glycated proteins significantly modulate RANKL-induced osteoclastogenesis.

As functional osteoclast are important for the removal of bone parts and the activation of bone forming osteoblast cells, and glycated-HSA inhibited osteoclastogenesis, demonstrated the formation of malfunctioning osteoclast by glycated-HSA and thereby alter bone remodeling. Therefore, I selected glycolaldehyde and glyceraldehyde derived glycated-HSA to investigate their mode of action. None of the glycated-HSA reduced early osteoclastogenic TRAF6, DC-STAMP, OC-STAMP, integrin $\beta 3$ mRNA expression. Glycated-HSA inhibited RANKL-induced late osteoclastogenesis (3~5 days) as it reduced TRAP activity of 3 days RANKL-treated cells. However, RANKL+ HSA-AGEs treated cells rescued TRAP activity

when the media was changed with RANKL alone after 3 days.

This data shows that HSA-AGEs can alter late osteoclastogenesis. Glycated-HSA did not induce TRAP activity in the absence of RANKL.

Secreted high mobility group box protein1 (HMGB1) is known to binds with receptor for AGEs (RAGE) and play an important role on osteoclastogenesis. We found that glycolaldehyde and glyceraldehyde derived glycated-HSA inhibited RANKL-induced HMGB1 secretion, downregulate osteoclastogenic nuclear factor- κ B (NF- κ B), nuclear factor of activated T-cells cytoplasmic 1 (NFATc1), c-Fos, calcium influx without altering RAGE expression.