

博士学位論文審査要旨

2023年7月4日

論文題目： **The role of intracellular and extracellular AGEs on *in vitro* osteoclastogenic model of RAW 264.7 cells**
(RAW 264.7 細胞の *in vitro* 破骨細胞形成モデルにおける細胞内および細胞外 AGEs の役割)

学位申請者： **TANZIMA TARANNUM LUCY**

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 市川 寛

副査： 生命医科学研究科 教授 西川恵三

要 旨：

糖化ストレスは生体内のアルデヒドが過剰な状態、酸化ストレスはフリーラジカルが過剰な状態であり、両者は分子レベルで影響を及ぼす老化促進因子である。飲酒や高血糖時に生じる糖質由来アルデヒド、脳や骨など脂質を多く含む器官では脂肪酸の酸化により生じる脂肪酸由来アルデヒドは糖化剤として細胞の内外に終末糖化産物 (AGEs) を生成し、細胞の機能低下、細胞老化や分化異常を惹起する。また、細胞外の組織中 AGEs は RAGE (Receptor for AGEs) を介して炎症性サイトカイン放出を促す。本研究の目的は、マウスマクロファージ RAW264.7 細胞を用いた細胞培養モデルにおいて、AGEs と細胞老化の関係、異なる糖化剤 (glucose、fructose、pentose) により作成したコラーゲン由来 AGEs を用いた時の破骨細胞分化への影響について検証することである。

細胞の老化を模倣するために反復細胞部分培養により初期継代細胞と高次継代細胞とで比較した結果、継代数が増えるとともに、細胞内の蛍光性 AGEs が増加、RAGE 発現の減少を認め、分化障害として F アクチンリングのサイズ縮小と巨大破骨細胞形成に必須である細胞間融合の減少が観察された。これは糖化ストレスによる細胞内 AGEs 生成が反復継代に伴う分化能の喪失につながることを示している。

次に初期継代細胞の破骨細胞分化に対する AGEs (糖化コラーゲン蛋白 [300 kDa]、糖化コラーゲンペプチド [3~6 kDa]、遊離ペントシジン) の影響を検証した。糖化コラーゲン蛋白およびペプチドは RANKL (receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand) 誘導性破骨細胞の形成を促進した。この作用には糖化剤による差異はなかった。一方、遊離ペントシジンは RANKL 誘導性破骨細胞形成を有意に抑制した。

更年期女性にみられる高回転型骨粗鬆症では破骨細胞の活性化が問題になる。糖尿病、脂質異常症、飲酒といったアルデヒド過剰状態が加わると、骨重量の 3 分の 1 を占めるコラーゲンの糖化が惹起され、破骨細胞分化がさらに進む可能性がある。本研究は、骨の健康を維持するためには、糖化ストレスを誘導する因子を回避し、健康的なライフスタイルを目指すことが重要であることを示唆している。よって、本論文は、博士 (理学) (同志社大学) の学位論文として十分な価値を有するものと認められる。

総合試験結果の要旨

2023年7月4日

論文題目： The role of intracellular and extracellular AGEs on *in vitro* osteoclastogenic model of RAW 264.7 cells
(RAW 264.7 細胞の *in vitro* 破骨細胞形成モデルにおける細胞内および細胞外 AGEs の役割)

学位申請者： TANZIMA TARANNUM LUCY

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 市川 寛

副査： 生命医科学研究科 教授 西川恵三

要 旨：

上記審査委員は Tanzima Tarannum Lucy 氏に対する総合試験を 2023 年 7 月 3 日午後 4 時より 1 時間 40 分実施した。時間構成は口頭発表 60 分、質疑応答 20 分、口頭試問 20 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、ヒト臨床試験の計画、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。

本研究はマクロファージ (RAW 264.7) から破骨細胞への分化に及ぼす糖化ストレス (アルデヒド生成過剰状態) の影響について検証したものである。スリランカでは肥満や 2 型糖尿病などの糖化ストレスが強い疾病が増加傾向にあり、その結果、骨には骨質の低下、易骨折性の亢進といった問題が生じている。

細胞老化の模倣モデルである培養細胞の継代数比較を行った結果、継代数が増すにつれて細胞内の蛍光性終末糖化産物 (AGEs) が増え、細胞分化に必須である F アクチンリングのサイズ縮小と細胞間融合の減少が認められた。細胞内 AGEs 蓄積量が細胞老化の指標となる可能性を示唆する所見である。また、骨蛋白質のうち最大量を占めるコラーゲンが糖化反応によって生成されるコラーゲン由来 AGEs が RANKL 誘導性破骨細胞の形成を促進することを明らかにした。糖化ストレスを誘導する因子を回避し、健康的なライフスタイルを目指すことが骨代謝の恒常性維持に重要であることを示唆する所見である。

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 3 編発表しており、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

Abstract of Doctoral Dissertation

論文題目: The role of intracellular and extracellular AGEs on *in vitro*
Title of Doctoral Dissertation osteoclastogenic model of RAW 264.7 cells
(RAW 264.7 細胞の *in vitro* 破骨細胞形成モデルにおける細胞内
および細胞外 AGEs の役割)

氏名: TANZIMA TARANNUM LUCY
Name

要旨:
Abstract

Background:

Glycative stress is a comprehensive concept that refers to the state of excess aldehydes caused by an unfavorable condition like hyperglycemia; unhealthy lifestyle habits such as high-sugar and high-fat diet, excessive alcohol consumption; and the subsequent non-enzymatic reactions that produce carbonylated proteins and advanced glycation end products (AGEs). AGEs are reported to be associated with several inflammatory and metabolic diseases including diabetic complications, Alzheimer's disease, arthritis, osteoporosis, and chronic kidney disease. Osteoporosis is a metabolic disease characterized by low bone density and decreased bone strength associated with excess bone resorption by osteoclasts followed by reduced bone formation by osteoblasts. Bone is continuously remodeled by two cell types; osteoblasts and osteoclasts to maintain bone homeostasis. Pentosidine (pent) and *N*-(carboxymethyl)-lysine (CML) has been reported to be elevated in the serum of osteoporotic patients. Pent forms an abnormal cross-link with collagen (col) protein which is the main structural protein of bone and thereby causes structural and functional damage to the col, ultimately reducing bone mineralization, bone quality, and bone strength.

Materials and Methods:

Mouse macrophage RAW 264.7 cells were used for *in vitro* study and receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL) was used to stimulate osteoclastogenesis (OS). Glucose/fructose/ribose was used to glycate col and col-peptide (col-pep). Commercially available standard pent was used to check the effect of free pent on OS. A microplate reader was used to check the fluorescence intensity of AGEs, and HPLC analysis was performed to measure pent and intermediates formation. Osteoclastogenic differentiation was examined by measuring tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) activity and TRAP staining. Cell viability was checked by WST-8 assay or sensolyte cell viability and proliferation assay kit. Reverse-transcriptase PCR (RT-PCR) and Western blotting were performed to check mRNA expression and protein expression respectively. Immunofluorescent staining was done to check the cellular morphology, multinucleated cell formation, actin ring formation, and intracellular signaling. Ca^{2+} influx was checked by Fluo-4 NW calcium assay Kit.

Results:

Chapter 1: Intracellular fluorescent AGE, pent, and CML formation were found to be increased, and the receptor for AGEs (RAGE) to be decreased with passaging. TRAP staining data revealed reduced formation of multinucleated osteoclasts with cell passaging. Maturation marker and early osteoclastogenic marker gene expressions were reduced with increasing passage number. In the cells of higher passage number, the F-actin ring size was smaller than that of the lower passage number indicating reduced cell-cell fusion and osteoclast-osteoclast fusion.

Chapter 2: In col glycation models, ribose produced the highest amount of pent followed by fructose and

glucose. All three extracellular col-AGEs stimulated RANKL-induced osteoclastogenic differentiation (OS) independent of the amount of pent formation. Ca^{2+} influx and mRAGE expression were significantly increased by all three groups; mMITF-E, and mItgB3 were significantly increased by Col-fru; and mNFATc1 was increased by Col-rib than the control RANKL group. Different signaling pathways were activated depending on the glycation agents. The formation of 3-DG, GO, and MGO varied depending on the glycation agent used to glycate col-pep. TRAP activity was significantly stimulated by glycated col-pep without any cell death similar to glycated col-protein. On the other hand, free pent inhibited OS significantly at higher concentrations providing evidence of the feedback inhibition effect of free pent. Immunofluorescence data revealed that free pent reduced p38 activation. Osteoclastogenic gene expressions were found to be lowered by free pent.

Discussion:

Intracellular AGE formation reduced OS by reducing cell-cell fusion and inhibiting osteoclastogenic gene expression. In contrast, extracellular collagen protein-derived AGEs and collagen peptide-derived AGEs showed stimulatory effects on OS by activating different signaling pathways depending on the glycation agent; whereas free pentosidine significantly reduced OS. This study suggests that extracellular collagen or collagen-peptide glycation induces OS to remove the glycated proteins or peptides and may release free pent on the extracellular space. Then these free pent shows feedback inhibition on the OS.

Conclusion:

The findings of this study indicate that intracellular and extracellular AGEs alter OS *in vitro*, suggesting that prevention of AGE formation through lifestyle habits that alleviate glycation stress is important for bone metabolism homeostasis.