

学位論文（博士）

Methylglyoxal は、骨芽細胞の終末分化を抑制することにより、仮骨の石灰化を抑制し、骨折治癒を障害する

氏名 瀬戸 哲也

所属 山口大学大学院医学系研究科
医学専攻 整形外科学講座

令和7年1月

目次

1. 要旨	3
2. 研究の背景	3
3. 目的	4
4. 方法	4
5. 結果	7
6. 考察	8
7. 結語	10
8. 謝辞	10
9. 参考文献	11

1. 要旨

糖尿病患者における骨折治癒障害は、罹病期間の増大と医療費の増加につながる。解糖系の副産物である **Methylglyoxal (MG)** は、様々な合併症に関与しているが、骨折治癒への直接的な影響は明らかにされていない。本研究では、非糖尿病マウスの脛骨骨折モデルを用い、**MG** が骨折治癒を直接的に障害することを明らかにした。マイクロコンピューター断層撮影では、仮骨の体積骨密度が低下している一方で仮骨体積は変化しておらず、脆弱な骨構造が形成されることが示された。また仮骨では、石灰化に不可欠な *Osteocalcin* および *Bone sialoprotein* の発現が抑制されていることも明らかになった。生体力学的解析では、**MG** が骨折部位の衝撃吸収特性を低下させる一方で、弾性強度には影響を与えないことが示され、骨細胞外マトリックスにおける終末糖化産物の蓄積が主な要因ではないことが示唆された。さらに、*in vitro* では、細胞毒性をもたない濃度の **MG** が骨芽細胞の成熟および石灰化を阻害することが示された。トランスクリプトーム解析により、**MG** が骨芽細胞の成熟を制御する重要な転写因子である *Osterix* の発現を低下させる一方で、骨芽細胞初期分化に必要な *Runx2* には影響を与えないことが明らかになり、これが *Osteocalcin* などの石灰化関連因子の発現低下につながることを示唆された。これらの知見は、糖尿病患者においてしばしば観察される血中 *Osteocalcin* 濃度の低下と一致しており、**MG** が骨芽細胞へ与える有害な影響が骨代謝にとどまらない可能性を示唆している。本研究は、**MG** および **MG** 感受性経路が糖尿病、および血中 **MG** 濃度の上昇を特徴とする他の病態における骨折治癒を促進するための治療標的となる可能性を明らかにした。

2. 研究の背景

骨折治癒は、血腫が形成され、炎症や血管新生が誘導されることから始まる。その後、細胞外マトリックス (**Extracellular matrix : ECM**) に富んだ線維軟骨性仮骨が形成・同化される、複雑で緻密なプロセスである[1-4]。この **ECM** は主に線維芽細胞と軟骨細胞によって産生され、骨折部を安定させ、前骨芽細胞の増殖と分化、および骨芽細胞の成熟のための足場として機能する [1-4]。成熟した骨芽細胞、線維軟骨性の仮骨に **I 型 Collagen** や石灰化関連因子を沈着させ、硬く、石灰化の進んだ仮骨を形成する[3]。これにより骨折部位の強度が増加し、最終的なリモデリング期へと移行する。リモデリング期では、骨芽細胞と破骨細胞が骨の連続性と強度を取り戻し、もとの骨の形態に修復する[1-4]。**Runx2** は骨芽細胞分化のマスターレギュレーターであり、骨芽細胞の発生と機能に関与する数多くの遺伝子の発現を制御している[5,6]。骨芽細胞は成熟するにつれて表現型がダイナミックに変化し、分化初期から後期にわたり **I 型**

collagen や Osteopontin といった ECM タンパク質が継続して産生される一方で、分化が進むにつれて Osteocalcin や Bone sialoprotein などの石灰化関連因子の産生が増加することが知られている [5,7]。この変化は石灰化の過程において重要であり、Runx2 の下流で働くもう一つの重要な転写因子である Osterix によって制御される[6,8]。

ヒトの遺伝性疾患や動物モデルの研究により、骨芽細胞とその調節因子が骨折治癒において果たす重要な役割が明らかにされている[1,6]。しかし、この過程は糖尿病患者でしばしば障害され、骨折治癒障害の発生リスクが高まる

[1,4,9]。糖尿病モデル動物でも、同様に骨折治癒が遷延することが確認されており[10-12]、そのメカニズムの一つとして、微小血管障害が骨折部位への血流を妨げ、骨修復に必要な栄養素や酸素の供給を阻害することが挙げられている[1,4]。また、糖尿病は全身性の炎症や酸化ストレスを促進し、骨芽細胞よりも破骨細胞の活性を優位にすることで、骨代謝に悪影響を及ぼす可能性が示唆されている[4,9]。反応性カルボニル種、特に解糖系の副産物である

Methylglyoxal(MG) は、骨折治癒障害[15,16]を含む、糖尿病合併症に関与しているとされている[13,14]。実際に糖尿病患者 [14] や動物モデル [17,18] では、血中 MG 濃度が上昇することが報告されている。MG はタンパク質、脂質、核酸を修飾し[14,19]、終末糖化産物 (advanced glycation end-products : AGEs) や終末脂質過酸化産物 (advanced lipoxidation end-products : ALEs) の形成、さらには核酸の損傷を通じて細胞機能や組織の完全性を損なうことが知られている[14,19]。特に MG 濃度の上昇は、ECM の修飾[14,20]、ミトコンドリア機能障害[14]、血管新生障害を引き起こす酸化ストレスの増加[14]、および骨芽細胞のアポトーシス[21]と関連しており、これらはすべて骨代謝に影響を与える可能性がある。このように、MG 濃度の上昇は骨折治癒障害に寄与している可能性があるが、直接的な証拠はまだ不足している。

3. 目的

本研究は、健康なマウスの脛骨骨幹部骨折モデルを用いて、MG が骨折治癒に直接与える影響を調べた。また細胞培養系を用いて、MG が骨芽細胞の分化と機能に与える影響を解析することで、MG 濃度の上昇が骨基質の形成および修復をどのように損なうのかというメカニズムを明らかにすることを目的とした。

4. 方法

動物実験

9 週齢の雄 C57BL/6J マウス (Japan SLC、静岡) を用いた。全ての実験プロトコールは山口大学の動物実験管理委員会の承認を得た。イソフルラン麻酔下に、脛骨骨折を No.11 メス刃を用いて作成し、腓骨は温存した。26G の Quincke 型脊髄針 (Unisis、東京) を脛骨骨髓腔に挿入し、骨折部を内固定した。手術後、マウスには体重あたり 110 mg/kg の MG またはリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を 14 日間、1 日 1 回腹腔内投与した。マウスは CO₂ 吸入によって安楽死させ、その後血液および右脛骨を採取した。

マイクロコンピューター断層撮影 (micro-CT)

脛骨は CosmoScan GX (Rigaku 社、東京都) を使用し、ボクセルサイズ 2.3 μ m でスキャンした。仮骨形成については、以前の報告に基づいてスコアリングされ[22]、Analyze v14.0 (AnalyzeDirect 社、米国カンザス州オーバーランドパーク) を用いて解析した。しきい値を設定し、仮骨組織を皮質骨や軟部組織と区別した。また、ハイドロキシアパタイトファントムを用いて体積骨密度 (Volumetric bone mineral density : vBMD) を算出した。

生体力学的分析

生体力学的特性は、MZ-500S (Maruto、東京) を用いた 3 点曲げ試験で評価した。脛骨を支持棒 (間隔 8mm) の上に、骨折部が中央になるように置いた。5mm/min の速度で、破断するまで試験を続けた。荷重-変形曲線を、CTRwin v1.05 (System supply、北海道) を用いて解析し、剛性、最大荷重、破断時間、および破断エネルギーを決定した。

初代培養骨芽細胞の単離と培養

初代培養骨芽細胞は、生後 2 日目のマウスの頭蓋骨から単離した[23]。採取した頭蓋骨は collagenase type X と Dispase II で処理した。細胞は 10%FBS を含む α -MEM で培養し、50 μ g/mL のアスコルビン酸、10mM の β -グリセロリン酸で分化誘導し、様々な濃度の MG を投与した。MG 濃度を維持するため、培地は 6 時間毎に交換した。

Quantitative PCR (qPCR)。

脛骨 (骨折部位を中心とした 4mm の骨組織) からの全 RNA は、TissueLyser II と RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen、ドイツ) を用いて抽出した。骨芽細胞については、ReliaPrep RNA Cell Miniprep System (Promega、米国) を用いて RNA を抽出した。cDNA の合成には ReverTra Ace qPCR RT Master Mix (Toyobo、大阪) を使用し、qPCR は THUNDERBIRD Next SYBR qPCR Mix

(Toyobo) を用いて行った。相対的な遺伝子発現量は *18S rRNA* で正規化した。*Runx2*、*Osterix*、*Bone sialoprotein*、*Colla1*、*Osteopontin*、および *18S rRNA* を標的とするプライマーの配列は、補足表 S1 に示した。

ALP (alkaline phosphatase) 活性の測定、および石灰化分析

ALP 活性は、TRACP & ALP assay kit (Takara Bio、滋賀) を用いて評価した。石灰化結節の形成は、Alizarin Red 染色により評価した。カルシウム含有量は、Metallo Assay CPZ III kit (Metallogenics、千葉) を用いて測定した。コラーゲン産生の指標となるヒドロキシプロリン含有量は、1N HCl での酸加水分解 (110°C、18 時間) 後に測定した。

RNA sequencing と遺伝子発現の解析

ライブラリーは Illumina NovaSeq 6000 を用いて調製および配列決定を行った。リードは GRCm38 リファレンス配列にマッピングされ、RNA-seq Analysis Portal v2.6 (CLC Genomics Workbench v22.0.1、Qiagen) および Cufflinks v2.2.1 program を使用して転写産物を解析した。遺伝子セット濃縮解析 (Gene Set Enrichment Analysis: GSEA) は、GSEA tool v4.3.2 を用いて実施した。

免疫ブロット解析

免疫ブロット解析には以下の一次抗体を使用した。anti-osteocalcin (Cloud-Clone、PAA471Mu01、テキサス州)、anti-osteopontin (Santa Cruz、sc-21742、テキサス州)、anti-methylglyoxal 5-hydro-5-methylimidazolone (HycultBiotech、HM5017、ミシガン州)、anti-osterix (Santa Cruz、sc-393325)、anti-Runx2 (Santa Cruz、sc-101145)、anti-bone sialoprotein (Bioss、bs-4729R、マサチューセッツ州) および anti- β -actin (Proteintech、HRP-60008、イリノイ州)。

培養上清中の Glu-osteocalcin の定量

培養上清中の Undercarboxylated osteocalcin (Glu-osteocalcin) の濃度は、Mouse Glu-Osteocalcin High Sensitive EIA Kit (Takara Bio) を用いて測定した。

統計解析

データは平均値±標準偏差で示した。統計的有意性は、GraphPad Prism v9.1.1 (GraphPad Software、カリフォルニア州) を使用し、Tukey の多重比較検定による one-way ANOVA、または対応のない Student's t-test により評価した。 $P < 0.05$ は有意であるとみなした。

5. 結果

3.1. MG は仮骨の石灰化を抑制し、骨折治癒を障害する

非糖尿病マウスの骨折治癒に対する MG の影響を評価するため、脛骨骨折マウスに 14 日間、MG を腹腔内投与した（図 1 a）。使用した投与量では、体重、肝機能、腎機能への影響は認められなかった（補足表 S2）。血漿中の MG 修飾タンパク質が増加したことから、腹腔内投与した MG が全身へ循環していることが分かった（図 1 b および補足図 S1）。X 線評価では、骨折後 14 日目で両群とも全てのマウスで仮骨形成が確認された（図 1 c）。しかし、3 点曲げ試験による生体力学的分析では、MG が破断エネルギーおよび破断時間を有意に低下させることが明らかになった（図 1 d, e）。これは、MG 投与により脛骨の衝撃吸収特性が損なわれ、耐久性が低下したことを示している。一方で、剛性および最大荷重には MG の影響は見られず（図 1 f, g）、初期の強度や変形抵抗性（弾性強度特性）は維持されていることが示唆された。

骨の脆性が増大した原因を解明するため施行した、micro-CT では、MG 投与群と対照群の間で仮骨体積は同程度である一方（図 1 h-j）、vBMD は MG 投与群で有意に低下していることが明らかになった（図 1 k）。この vBMD の低下に加え、骨折部位における *Osteocalcin* や *Bone sialoprotein* など石灰化関連因子の発現が減少していたこと（図 1 l, m）は、MG が骨芽細胞による仮骨石灰化を障害することを強く示唆している。

3.2. MG は in vitro で骨芽細胞の成熟および石灰化を直接阻害する

MG 投与マウスにおける仮骨石灰化の障害の背後にある分子細胞学的なメカニズムを解明するため、MG が骨芽細胞の分化および機能に与える直接的な影響を in vitro で検討した。先行研究と一致して[24-26]、高濃度の MG（500 μ M 以上）は骨芽細胞に著明な細胞毒性を持つことが分かった（補足図 S2）。一方、細胞毒性が低い濃度の MG（300 μ M 以下）では、わずかな細胞増殖抑制効果が観察されるにとどまった（補足図 S2）。しかし、分化誘導後 7 日目で ALP 活性は有意に低下しており（図 2 a）、MG により骨芽細胞の成熟および石灰化能が低下することが示唆された。また、分化誘導後 21 日目の Alizarin Red 染色（図 2 b, c）およびカルシウム含有量測定（図 2 d）により、細胞毒性が低い濃度の MG でも骨芽細胞の石灰化能を有意に抑制することが確認された。

骨芽細胞の終末分化には細胞周期の停止が必要とされる[27]ことを考慮すると、低濃度 MG による成熟障害は細胞増殖抑制効果によるものではない可能性がある[27]。この考えを支持するように、MG は初期分化マーカーである *Colla1*（図 2 e および補足図 S3 a）や、*Osteopontin*（補足図 S4）の発現には影

響を与えなかった。これらの結果は、低濃度の MG が骨芽細胞の初期分化を妨げるのではなく、特に後期の成熟段階を標的とし、その石灰化能を抑制することを示唆している。

3.3. MG による骨芽細胞石灰化障害に関連する分子変化：トランスクリプトームおよびタンパク質解析で示された *Osterix* の発現低下

MG による骨芽細胞石灰化抑制の分子メカニズムを解明するため、骨芽細胞の石灰化を阻害する濃度 (300 μ M) の MG を用いてトランスクリプトーム解析を行った。MG 処理は、石灰化に関連する遺伝子の発現を有意に低下させた (図 3a)。この結果と一致して、MG 処理を受けた骨芽細胞では Bone sialoprotein と Osteocalcin のタンパク質発現が低下した (図 3 b, c および補足図 S3 b, c)。さらに培養上清中の分泌型 Osteocalcin (Glu-Osteocalcin) 濃度も低下した (図 3d)。これらの結果から、MG が骨芽細胞による石灰化に重要な因子の発現を抑制することが明らかとなった。

骨芽細胞の分化および石灰化において転写因子 *Runx2*[5,6]と *Osterix*[6,8]が果たす中心的な役割を考慮し、MG 処理を受けた骨芽細胞でのそれらの発現を解析したところ、MG は *Runx2* の発現には影響を与えない一方で、*Osterix* の発現を特異的に抑制した (図 3 e, f および補足図 S3 d, e)。これにより、MG が石灰化関連遺伝子の転写制御因子である *Osterix*[8]の発現を低下させることで、骨芽細胞の終末分化を妨げていることが強く示唆された。これらの分子レベルでの知見は、MG が骨代謝と骨折治癒に与える有害な影響を理解するための基盤となる。

6. 考察

糖尿病で増加することが知られる MG[14]は、骨折治癒を遷延させる可能性があることが報告されているが [15,16,28]、直接的な証拠は不足している。本研究は、非糖尿病マウスにおいて、MG が仮骨の石灰化を阻害することにより骨折治癒を障害することを初めて示し、糖尿病患者での骨折治癒障害に MG が寄与している可能性を支持する結果となった。MG の投与は、骨折部周囲に新たに形成された仮骨／骨複合体の脆弱性を増やした。この影響は、初期の仮骨形成、仮骨体積、または弾性強度の変化によるものではなく、主に石灰化の障害およびその後の微細構造の変化によるものであった。AGEs の骨内蓄積が、コラーゲン特性を変化させることで糖尿病における骨の脆弱性に寄与することが報告されているが[29-32]、これだけでは本研究の観察結果を十分に説明できない可能性がある。骨内の AGEs 架橋コラーゲンは通常、骨の変形能を低下させることが知られているが[31,32]、本研究では MG は変形能には影響を与えな

ったからである。一方で、MG は衝撃吸収特性や耐久性などの構造的特性を損なうことが本研究で明らかになった。糖尿病性骨疾患における MG、AGEs、および他の因子間の複雑な相互作用を解明するためには、さらなる研究が必要である。

糖尿病患者における血中 MG 濃度は報告により異なるが[14]、骨芽細胞の細胞死を引き起こすほど高くはないと思われる。なぜなら、2 型糖尿病患者では骨量が増加することが報告されており[31]、骨形成を担う骨芽細胞が生存し機能していると考えられるからである。なお、高濃度の MG は骨芽細胞の細胞死を引き起こすが（補足図 S2）[24-26,33]、本研究は、細胞毒性が低い濃度の MG でも石灰化能の低下という有害な影響を持つことを明らかにした。このことは、糖尿病において MG が骨芽細胞系細胞にとって細胞毒性を示さない濃度であっても、骨折治癒を障害する可能性を示唆している。その潜在的なメカニズムとしては、プロテアソーム分解の障害、酸化ストレス、ミトコンドリア機能障害、細胞内および細胞外 AGEs 形成の促進、および AGEs 受容体を介したシグナル伝達などが挙げられている[14]。これらの多面的な影響は骨折治癒を障害し、MG およびその下流のイベントが治療ターゲットとして重要であることを示唆している。ただし、本研究の実験モデルは MG のみに焦点をあてており、糖尿病の複雑で多因子的な特性を完全に反映していない点には注意が必要である。例えば、糖尿病モデルで一般的に観察される仮骨体積の減少[4,10,11,34,35]は本研究では認められなかった。仮骨体積の減少が認められなかった点については、糖尿病における他の化学的メディエーターや炎症応答の変化、血管新生障害といった追加の因子が関与している可能性がある。糖尿病性骨疾患に寄与する因子間の複雑な相互作用を解明するためには、今後さらなる研究が必要である。

本研究のトランスクリプトーム解析では、MG が骨芽細胞の石灰化に関連する遺伝子の発現を抑制し、*Osteocalcin* および *Bone sialoprotein* の発現が減少することが示された。これにより、MG が *in vivo* および *in vitro* の両方で石灰化を抑制する共通のメカニズムが存在することが示唆された。本研究は、MG が骨芽細胞の成熟および石灰化を制御する *Osterix*[6,8]の発現を抑制する一方、骨芽細胞の初期分化に重要な *Runx2*[5,6]の発現には影響を与えないことを明らかにした。これは、MG が骨芽細胞の終末分化、および ECM の石灰化を制御する経路を障害することを示している。なお、MG により発現が低下した *Osteocalcin* は、ハイドロキシアパタイト沈着に不可欠な役割を果たしているが[36,37]、これは糖尿病患者においてしばしば報告される、血中 *Osteocalcin* 濃度の低下に対するメカニズム的な説明となる可能性がある [38]。

Undercarboxylated osteocalcin は、様々な臓器に影響を及ぼすホルモンとして作

用することが知られており[39,40]、また主に骨芽細胞で産生されることから[39,40]、MG による Osteocalcin の発現減少は、骨代謝を超えて、糖代謝の調節異常、エネルギー消費、その他 Osteocalcin が媒介するプロセス[39-41]を含む、より広範な全身的影響を及ぼす可能性がある。

他の要因、例えばホルモン、マトリックスの特性、栄養素やミネラルの利用可能性なども ECM の石灰化速度や効率に影響を与える可能性があるものの[42,43]、本研究は、MG が骨芽細胞機能に直接的な影響を及ぼすことを明らかにし、糖尿病における骨折治癒障害の病態における潜在的な役割を果たすことが示唆された。興味深いことに、MG 処理は骨芽細胞の初期マーカーである Osteopontin[5,7]の発現を有意に増加させた（補足図 S4）。これは、MG による細胞ストレスに対するの代償的反応かもしれない。しかしながら、この代償反応は、MG が石灰化および骨形成に及ぼす有害な影響を克服するには不十分であると考えられる。

7. 結語

本研究は、細胞毒性が低い濃度の MG が、主に Osterix の発現抑制を介して骨芽細胞による石灰化を阻害することを明らかにした。この結果は、MG および MG に感受性のある経路が糖尿病性骨合併症の治療標的となる可能性を示唆している。基礎的なメカニズムを完全に解明し、糖尿病患者における骨修復および再生を改善するための標的治療法を開発するには、さらなる研究が必要である。

8. 謝辞

山口大学大学院医学系研究科薬理学講座 本田健先生、酒井大樹先生、辻竣也先生、坂本明彦先生には、研究の楽しさとともに、研究の進め方や、困難克服のための具体的な方策まで毎日丁寧にご指導いただきました。心からお礼申し上げます。また本研究を進めるにあたり終始あたたかいご指導と激励を賜りました山口大学大学院医学系研究科薬理学講座 朝霧成挙教授、山口大学大学院医学系研究科整形外科学講座 油形公則准教授、坂井孝司教授に心から感謝の意を表します。なお本研究は、日本学術振興会科学研究費補助金（20K09412, 23K14085, 24K12310, 24K12808, 24K12417）、UBE 財団、山口大学革新的研究開発推進事業（FOCS）、アイビー化粧品、上原記念財団、武田化学振興財団の助成を頂きました。この場を借りて深く御礼申し上げます。

9. 参考文献

- [1] L. Claes, S. Recknagel, A. Ignatius, Fracture healing under healthy and inflammatory conditions, *Nat Rev Rheumatol* 8 (2012) 133-143. 10.1038/nrrheum.2012.1.
- [2] S.C. Dennis, C.J. Berkland, L.F. Bonewald, M.S. Detamore, Endochondral ossification for enhancing bone regeneration: converging native extracellular matrix biomaterials and developmental engineering in vivo, *Tissue Eng Part B Rev* 21 (2015) 247-266. 10.1089/ten.TEB.2014.0419.
- [3] A. Salhotra, H.N. Shah, B. Levi, M.T. Longaker, Mechanisms of bone development and repair, *Nat Rev Mol Cell Biol* 21 (2020) 696-711. 10.1038/s41580-020-00279-w.
- [4] M. Tanios, B. Brickman, E. Cage, K. Abbas, C. Smith, M. Atallah, S. Baroi, B. Lecka-Czernik, Diabetes and Impaired Fracture Healing: A Narrative Review of Recent Literature, *Curr Osteoporos Rep* 20 (2022) 229-239. 10.1007/s11914-022-00740-z.
- [5] T. Komori, Runx2, a multifunctional transcription factor in skeletal development, *J Cell Biochem* 87 (2002) 1-8. 10.1002/jcb.10276.
- [6] S. Harada., G.A. Rodan., Control of osteoblast function and regulation of bone mass, *Nature* 423 (2003) 349-355. 10.1038/nature01660.
- [7] J.E. Aubin, F. Liu, L. Malaval, A.K. Gupta, Osteoblast and chondroblast differentiation, *Bone* 17 (1995) 77S-83S. 10.1016/8756-3282(95)00183-e. [8] J.S. Wang, N. Tokavanich, M.N. Wein, SP7: from Bone Development to Skeletal Disease, *Curr Osteoporos Rep* 21 (2023) 241-252. 10.1007/s11914-023-00778-7.
- [9] Y.Y. Wu, E. Xiao, D.T. Graves, Diabetes mellitus related bone metabolism and periodontal disease, *Int J Oral Sci* 7 (2015) 63-72. 10.1038/ijos.2015.2.
- [10] R.A. Kayal, J. Alblowi, E. McKenzie, N. Krothapalli, L. Silkman, L. Gerstenfeld, T.A. Einhorn, D.T. Graves, Diabetes causes the accelerated loss of cartilage during fracture repair which is reversed by insulin treatment, *Bone* 44 (2009) 357-363. 10.1016/j.bone.2008.10.042.
- [11] M.L. Brown, K. Yukata, C.W. Farnsworth, D.G. Chen, H. Awad, M.J. Hilton, R.J. O'Keefe, L. Xing, R.A. Mooney, M.J. Zuscik, Delayed fracture healing and increased callus adiposity in a C57BL/6J murine model of obesity-associated type 2 diabetes mellitus, *PLoS One* 9 (2014) e99656. 10.1371/journal.pone.0099656.
- [12] R. Tevlin, E.Y. Seo, O. Marecic, A. McArdle, X. Tong, B. Zimdahl, A. Malkovskiy, R. Sinha, G. Gulati, X. Li, T. Wearda, R. Morganti, M. Lopez, R.C. Ransom, C.R. Duldulao, M. Rodrigues, A. Nguyen, M. Januszyk, Z. Maan, K. Paik, K.S. Yapa, J. Rajadas, D.C. Wan, G.C. Gurtner, M. Snyder, P.A. Beachy, F. Yang, S.B.

- Goodman, I.L. Weissman, C.K. Chan, M.T. Longaker, Pharmacological rescue of diabetic skeletal stem cell niches, *Sci Transl Med* 9 (2017). 10.1126/scitranslmed.aag2809.
- [13] M.S. Shah, M. Brownlee, Molecular and Cellular Mechanisms of Cardiovascular Disorders in Diabetes, *Circ Res* 118 (2016) 1808-1829. 10.1161/CIRCRESAHA.116.306923.
- [14] C.G. Schalkwijk, C.D.A. Stehouwer, Methylglyoxal, a Highly Reactive Dicarbonyl Compound, in Diabetes, Its Vascular Complications, and Other Age-Related Diseases, *Physiol Rev* 100 (2020) 407-461. 10.1152/physrev.00001.2019.
- [15] T. Roszer, Inflammation as death or life signal in diabetic fracture healing, *Inflamm Res* 60 (2011) 3-10. 10.1007/s00011-010-0246-9.
- [16] T. Aikawa, H. Matsubara, S. Ugaji, J. Shirakawa, R. Nagai, S. Munesue, A. Harashima, Y. Yamamoto, H. Tsuchiya, Contribution of methylglyoxal to delayed healing of bone injury in diabetes, *Mol Med Rep* 16 (2017) 403-409. 10.3892/mmr.2017.6589.
- [17] Q. Huang, Y. Chen, N. Gong, Y.X. Wang, Methylglyoxal mediates streptozotocin-induced diabetic neuropathic pain via activation of the peripheral TRPA1 and Nav1.8 channels, *Metabolism* 65 (2016) 463-474. 10.1016/j.metabol.2015.12.002.
- [18] A.L. Oliveira, M.L. Medeiros, A.C. Ghezzi, G.A. Dos Santos, G.C. Mello, F.Z. Monica, E. Antunes, Evidence that methylglyoxal and receptor for advanced glycation end products are implicated in bladder dysfunction of obese diabetic ob/ob mice, *Am J Physiol Renal Physiol* 325 (2023) F436-F447. 10.1152/ajprenal.00089.2023.
- [19] N.T. Moldogazieva, I.M. Mokhosoev, T.I. Mel'nikova, Y.B. Porozov, A.A. Terentiev, Oxidative Stress and Advanced Lipoxidation and Glycation End Products (ALEs and AGEs) in Aging and Age-Related Diseases, *Oxid Med Cell Longev* 2019 (2019) 3085756. 10.1155/2019/3085756.
- [20] M. Saito, Y. Kida, S. Kato, K. Marumo, Diabetes, collagen, and bone quality, *Curr Osteoporos Rep* 12 (2014) 181-188. 10.1007/s11914-014-0202-7.
- [21] W.H. Chan, H.J. Wu, N.H. Shiao, Apoptotic signaling in methylglyoxal-treated human osteoblasts involves oxidative stress, c-Jun N-terminal kinase, caspase-3, and p21-activated kinase 2, *J Cell Biochem* 100 (2007) 1056-1069. 10.1002/jcb.21114.
- [22] M.M. McDonald, A. Morse, K. Mikulec, L. Peacock, P.A. Baldock, P.J. Kostenuik, D.G. Little, Matrix metalloproteinase-driven endochondral fracture union proceeds independently of osteoclast activity, *J Bone Miner Res* 28 (2013) 1550-1560. 10.1002/jbmr.1889.

- [23] S. Kim, T. Koga, M. Isobe, B.E. Kern, T. Yokochi, Y.E. Chin, G. Karsenty, T. Taniguchi, H. Takayanagi, Stat1 functions as a cytoplasmic attenuator of Runx2 in the transcriptional program of osteoblast differentiation, *Genes Dev* 17 (2003) 1979-1991. 10.1101/gad.1119303.
- [24] E.M. Choi, K.S. Suh, S.Y. Rhee, Y.S. Kim, Sciadopitysin alleviates methylglyoxal-mediated glycation in osteoblastic MC3T3-E1 cells by enhancing glyoxalase system and mitochondrial biogenesis, *Free Radic Res* 48 (2014) 729-739. 10.3109/10715762.2014.903562.
- [25] K.S. Suh, E.M. Choi, S.Y. Rhee, Y.S. Kim, Methylglyoxal induces oxidative stress and mitochondrial dysfunction in osteoblastic MC3T3-E1 cells, *Free Radic Res* 48 (2014) 206-217. 10.3109/10715762.2013.859387.
- [26] K. Waqas, M. Muller, M. Koedam, Y. El Kadi, M.C. Zillikens, B.C.J. van der Eerden, Methylglyoxal - an advanced glycation end products (AGEs) precursor - Inhibits differentiation of human MSC-derived osteoblasts in vitro independently of receptor for AGEs (RAGE), *Bone* 164 (2022) 116526. 10.1016/j.bone.2022.116526.
- [27] S. Zhu, W. Chen, A. Masson, Y.P. Li, Cell signaling and transcriptional regulation of osteoblast lineage commitment, differentiation, bone formation, and homeostasis, *Cell Discov* 10 (2024) 71. 10.1038/s41421-024-00689-6.
- [28] S.W.T. Lai, E.J. Lopez Gonzalez, T. Zoukari, P. Ki, S.C. Shuck, Methylglyoxal and Its Adducts: Induction, Repair, and Association with Disease, *Chem Res Toxicol* 35 (2022) 17201746. 10.1021/acs.chemrestox.2c00160.
- [29] D. Vashishth, G.J. Gibson, J.I. Khoury, M.B. Schaffler, J. Kimura, D.P. Fyhrie, Influence of nonenzymatic glycation on biomechanical properties of cortical bone, *Bone* 28 (2001) 195-201. 10.1016/s8756-3282(00)00434-8.
- [30] W.D. Leslie, M.R. Rubin, A.V. Schwartz, J.A. Kanis, Type 2 diabetes and bone, *J Bone Miner Res* 27 (2012) 2231-2237. 10.1002/jbmr.1759.
- [31] N. Napoli, M. Chandran, D.D. Pierroz, B. Abrahamsen, A.V. Schwartz, S.L. Ferrari, I.O.F. Bone, G. Diabetes Working, Mechanisms of diabetes mellitus-induced bone fragility, *Nat Rev Endocrinol* 13 (2017) 208-219. 10.1038/nrendo.2016.153.
- [32] S. Khosla, P. Samakkarthai, D.G. Monroe, J.N. Farr, Update on the pathogenesis and treatment of skeletal fragility in type 2 diabetes mellitus, *Nat Rev Endocrinol* 17 (2021) 685-697. 10.1038/s41574-021-00555-5.
- [33] K.S. Suh, S. Chon, E.M. Choi, Limonene protects osteoblasts against methylglyoxal-derived adduct formation by regulating glyoxalase, oxidative stress, and mitochondrial function, *Chem Biol Interact* 278 (2017) 15-21. 10.1016/j.cbi.2017.10.001.

- [34] N. Follak, I. Kloting, H. Merk, Influence of diabetic metabolic state on fracture healing in spontaneously diabetic rats, *Diabetes Metab Res Rev* 21 (2005) 288-296. 10.1002/dmrr.537.
- [35] K.I. Ko, L.S. Coimbra, C. Tian, J. Alblowi, R.A. Kayal, T.A. Einhorn, L.C. Gerstenfeld, R.J. Pignolo, D.T. Graves, Diabetes reduces mesenchymal stem cells in fracture healing through a TNF alpha-mediated mechanism, *Diabetologia* 58 (2015) 633-642. 10.1007/s00125-014-3470-y.
- [36] T. Moriishi, R. Ozasa, T. Ishimoto, T. Nakano, T. Hasegawa, T. Miyazaki, W. Liu, R. Fukuyama, Y. Wang, H. Komori, X. Qin, N. Amizuka, T. Komori, Osteocalcin is necessary for the alignment of apatite crystallites, but not glucose metabolism, testosterone synthesis, or muscle mass, *PLoS Genet* 16 (2020) e1008586. 10.1371/journal.pgen.1008586.
- [37] S. Vimalraj, Alkaline phosphatase: Structure, expression and its function in bone mineralization, *Gene* 754 (2020) 144855. 10.1016/j.gene.2020.144855.
- [38] S.K. Kunutsor, T.A. Apekey, J.A. Laukkanen, Association of serum total osteocalcin with type 2 diabetes and intermediate metabolic phenotypes: systematic review and meta-analysis of observational evidence, *Eur J Epidemiol* 30 (2015) 599-614. 10.1007/s10654-015-0058-x.
- [39] P. Ducy, The role of osteocalcin in the endocrine cross-talk between bone remodelling and energy metabolism, *Diabetologia* 54 (2011) 1291-1297. 10.1007/s00125-011-2155-z.
- [40] A. Mizokami, T. Kawakubo-Yasukochi, M. Hirata, Osteocalcin and its endocrine functions, *Biochem Pharmacol* 132 (2017) 1-8. 10.1016/j.bcp.2017.02.001.
- [41] F. Long, Building strong bones: molecular regulation of the osteoblast lineage, *Nat Rev Mol Cell Biol* 13 (2011) 27-38. 10.1038/nrm3254.
- [42] T. Komori, What is the function of osteocalcin?, *J Oral Biosci* 62 (2020) 223-227. 10.1016/j.job.2020.05.004.
- [43] A. Arnold, E. Dennison, C.S. Kovacs, M. Mannstadt, R. Rizzoli, M.L. Brandi, B. Clarke, R.V. Thakker, Hormonal regulation of biomineralization, *Nat Rev Endocrinol* 17 (2021) 261-275. 10.1038/s41574-021-00477-2.

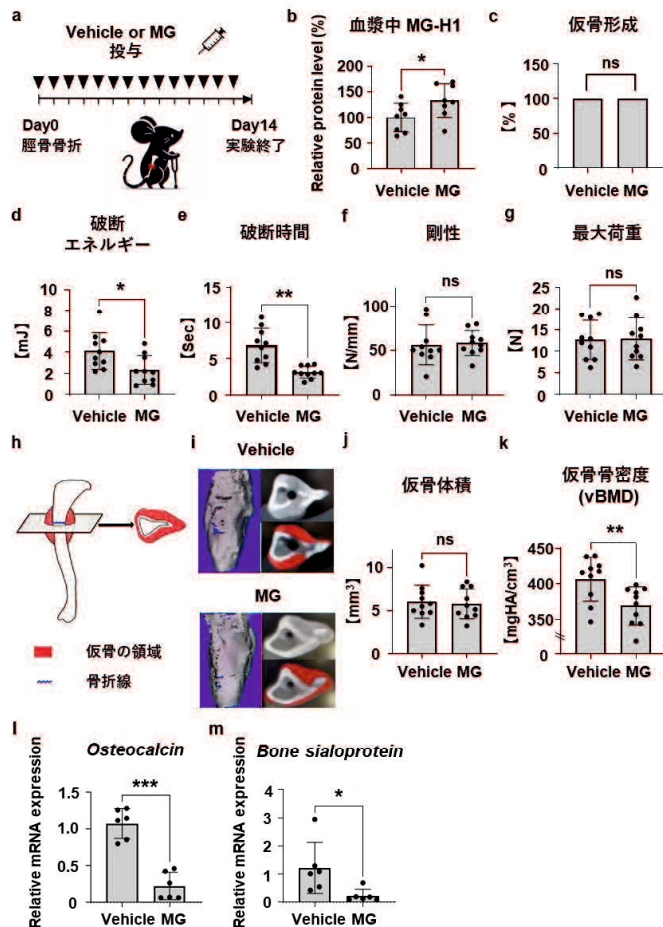


図 1. Methylglyoxal (MG) は仮骨石灰化を抑制し、骨折治癒を障害する

(a) 実験スケジュール：マウス脛骨骨折モデルに、14 日間毎日、MG

(110mg/kg) または PBS を腹腔内注射した (b) デンシトメトリーにより定量化した血漿中の MG 修飾タンパク質量 (免疫ブロットを補足図 S1 に示す) (c) 仮骨形成の X 線評価 (d-g) 生体力学的特性：破断エネルギー (d)、破断時間

(e)、剛性 (f)、最大荷重 (g) (h) 脛骨における仮骨の領域、および骨折線の模式図 (i) Micro-CT 画像：3D 再構成 (左)、横断像 (右上)、仮骨の領域 (赤、右下) (j,k) 仮骨体積 (j) 仮骨骨密度 (vBMD) (k) (l,m) 14 日目の

Osteocalcin (l) および Bone sialoprotein (m) の遺伝子発現

データは平均値±標準偏差で示した。それぞれ Vehicle 群と MG 群の比較は

(b) n=8 対 n=8、(c-g, j, k) n=10 対 n=10、(l, m) n=6 対 n=6 で行われた。統計学的有意差は対応のない t 検定を用いて算出し、* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 、ns は有意差なしとした。

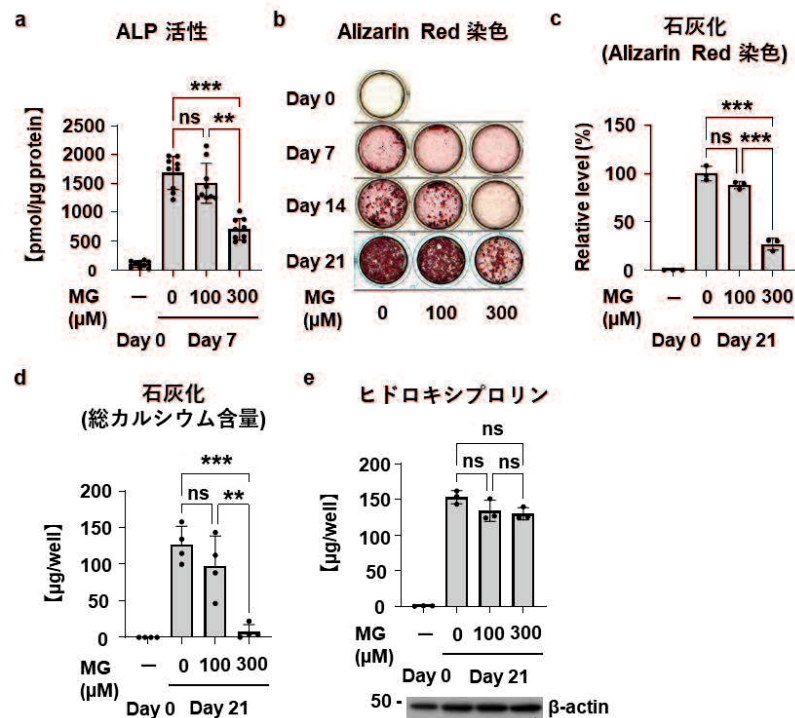


図 2. Methylglyoxal (MG) は、in vitro で骨芽細胞の成熟と石灰化を直接障害する

初代培養骨芽細胞に対し MG を 7 日間または 21 日間投与し、6 時間ごとに培地交換を行った (a)総タンパク量で正規化した ALP 活性 (b)石灰化結節の Alizarin Red 染色 (c)定量化した Alizarin Red 染色 (Day0, Day21) (d)総カルシウム含量 (e)コラーゲン産生を示すヒドロキシプロリン量

データは平均値±標準偏差で示した。それぞれ(a)n=9、(c,e)n=3、(d)n=4 で試験を行った。統計的有意差は Tukey の多重比較検定を用いた one-way ANOVA により算出し、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 、ns は有意差なしとした。

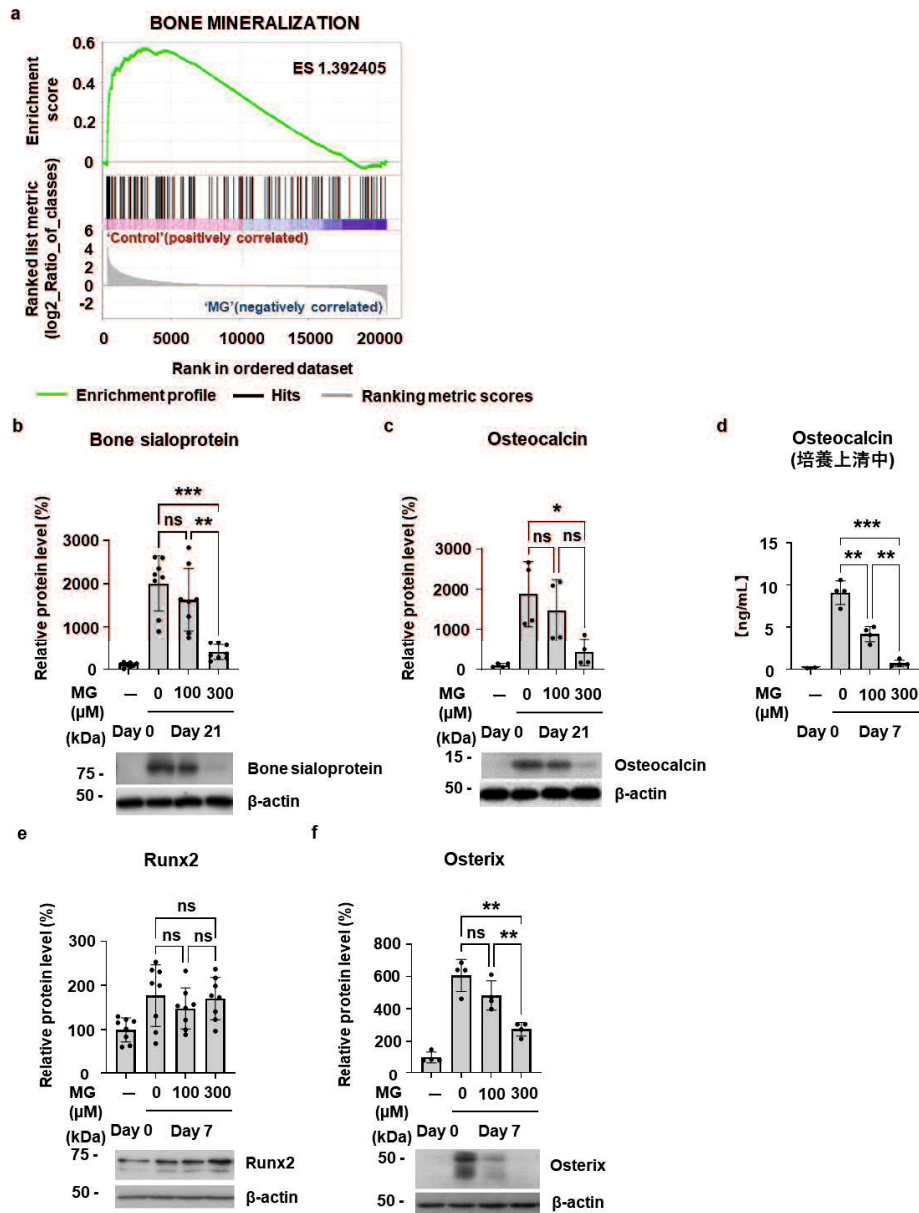
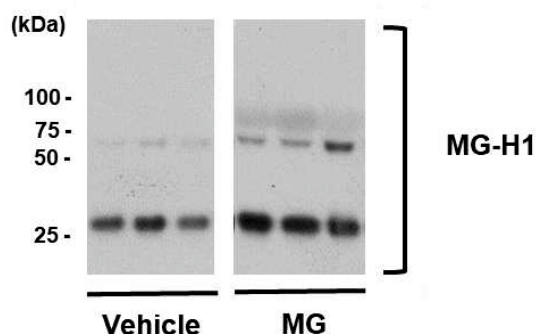
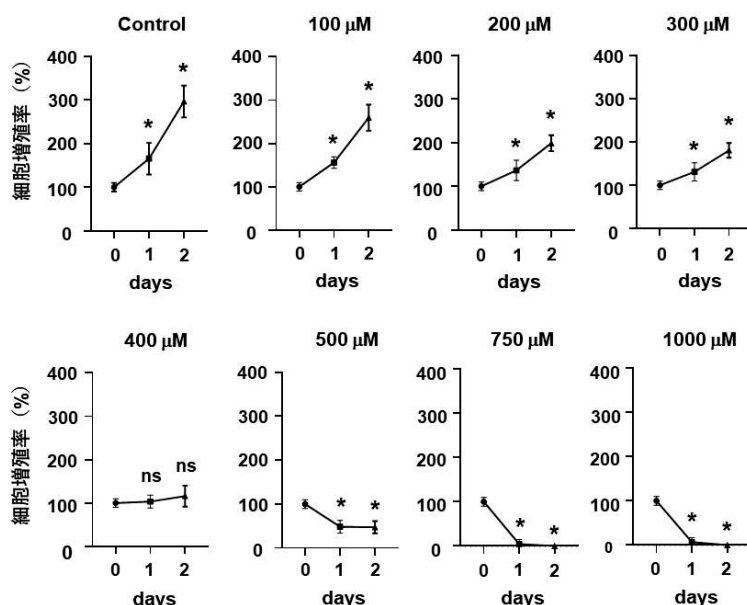


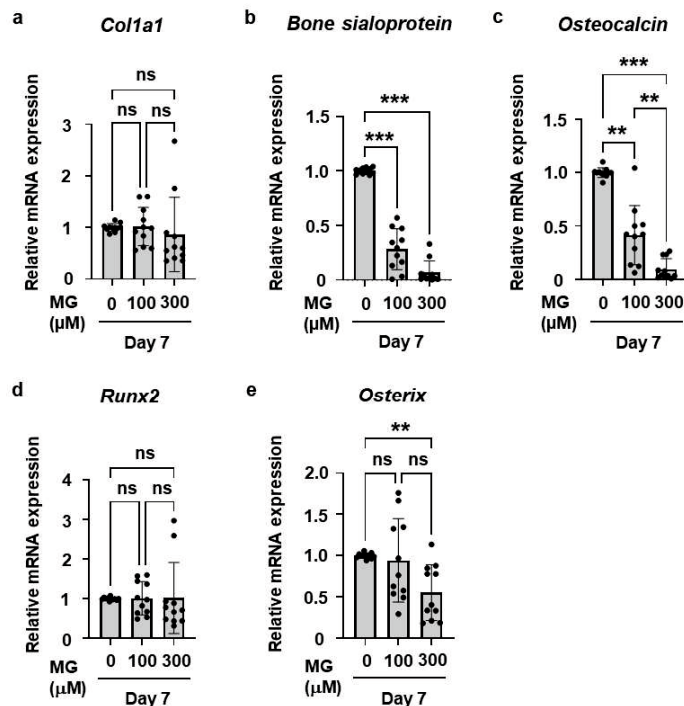
図 3. Methyglyoxal (MG) は Osterix とその下流の石灰化関連因子を抑制する
(a)MG (300μM) で処理した骨芽細胞の RNA-seq 解析。遺伝子セット濃縮解析 (GSEA) から、石灰化関連因子が発現低下していることが示された **(b,c)**β-actin で正規化した Bone sialoprotein**(b)**と Osteocalcin**(c)**のタンパク質量 **(d)**ELISA で測定した、培養上清中の Glu-Osteocalcin 量 **(e,f)**β-actin で正規化した Osterix**(e)**および Runx2**(f)**のタンパク質量
 データは平均値±標準偏差で示した。それぞれ**(b,e)**n=8、**(c,d,f)**n=4。統計的有意差は Tukey の多重比較検定を用いた one-way ANOVA により算出し、 $p < 0.05$ 、*** $p < 0.01$ 、** $p < 0.001$ 、ns は有意差なしとした。



補足図 S1. 血漿中の Methylglyoxal (MG) 修飾タンパク質の免疫ブロット
マウスに vehicle (PBS) または MG (110 mg/kg) を 14 日間連続腹腔内投与し、免疫ブロットを行った。血漿サンプルを直ちに調製し、anti-methylglyoxal 5-hydro-5-methylimidazolone (MG-H1) を用いた免疫ブロットに使用した。各群 8 サンプルを用い、うち 3 サンプルの代表的データを示す。

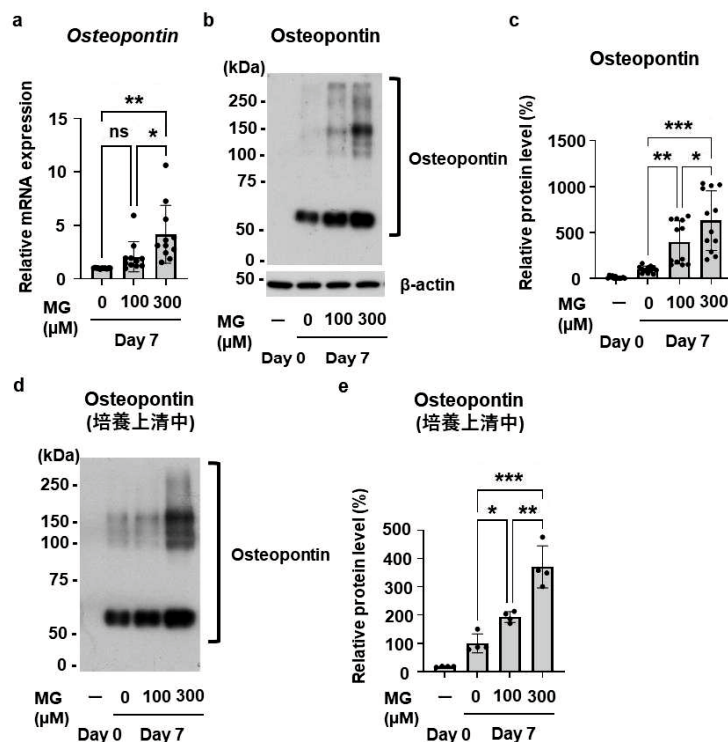


補足図 S2. 骨芽の細胞増殖率に対する Methylglyoxal (MG) の影響
初代培養骨芽細胞を異なる濃度の MG で 2 日間処理した。培地は毎日交換した。生細胞数は 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay で評価した。細胞増殖率は 0 日目を 100% として計算した。データは平均値±標準偏差で示した (n=6)。統計学的有意差は、Tukey の多重比較検定を用いた one-way ANOVA により算出し、* $p < 0.05$ ns は有意差なしとした。



補足図 S3.骨芽細胞関連遺伝子の発現に対する Methylglyoxal (MG) の影響

初代培養骨芽細胞を、0~300 μ M の MG で 7 日間処理した。それぞれの遺伝子の発現レベルは qPCR で評価し、18S rRNA の発現レベルで正規化した。データは平均値 $\pm$ 標準偏差で示した (n=11)。統計的有意性は、Tukey の多重比較検定を用いた one-way ANOVA により算出し、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 、ns は有意差なしとした。



補足図 S4. Methylglyoxal (MG) は Osteopontin の発現を上昇させる

初代培養骨芽細胞を 0~300 μM の MG で 7 日間処理した。(a)18S rRNA で正規化した Osteopontin の遺伝子発現 (b,c)Osteopontin のタンパク質発現を免疫ブロットで評価し(b)、デンシトメトリーで定量化した(c) (d,e)培養上清中の Osteopontin を免疫ブロット分析で評価し(d)、デンシトメトリーで定量化した(e) 発現レベルは β-actin で正規化した。データは平均値±標準偏差で示した。それぞれ(a,c)では n=11、(e)では n=4 であった。統計的有意性は、Tukey の多重比較検定を用いた one-way ANOVA により算出し、* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 、ns は有意差なしとした。

補足表 S1. 定量的 RT-PCR に使用したオリゴヌクレオチド

遺伝子	Forward primer	Reverse primer
<i>Runx2</i>	5'-AACGATCTGAGATTTGTGGGC-3'	5'-CCTGCGTGGGATTTCTTGTT-3'
<i>Osterix</i>	5'-ACTCATCCCTATGGCTCGTG-3'	5'-GGTAGGGAGCTGGGTTAAGG-3'
<i>Osteocalcin</i>	5'-CCAAGCAGGAGGGCAATA-3'	5'-AGGGCAGCACAGGTCCTAA-3'
<i>Bone sialoprotein</i>	5'-CAGGGAGGCAGTGACTCTTC-3'	5'-AGTGTGGAAAGTGTGGCGTT-3'
<i>Col1a1</i>	5'-ACATGTTTCAGCTTTGTGGACC-3'	5'-TAGGCCATTGTGTATGCAGC-3'
<i>Osteopontin</i>	5'-TCACTCCAATCGTCCCTACA-3'	5'-GACTCCTTAGACTCACCGCT-3'
<i>18S</i>	5'-CTCAACACGGGAAACCTCAC-3'	5'-CGCTCCACCAACTAAGAACG-3'

補足表 S2. Methylglyoxal (MG) が体重、肝機能、腎機能に及ぼす影響

	Vehicle (<i>n</i> = 10)	MG (<i>n</i> = 10)	<i>p</i> 値
体重 (g)	26.41 ± 1.64	26.23 ± 1.61	0.72
AST (IU/L)	28.7 ± 5.59	30.7 ± 14.26	0.68
ALT (IU/L)	3.7 ± 3.7	4.1 ± 4.1	0.65
Cre (mg/dL)	0.086 ± 0.014	0.091 ± 0.025	0.59

血漿中の aspartate aminotransferase(AST)、alanine aminotransferase(ALT)および creatinine(Cre)は、7180 Clinical Analyzer（日立ハイテック）を使用し、それぞれ L-Type AST.J2、ALT.J2 および creatinine M 測定キット（富士フイルム和光）を用いて測定した。MG 投与は体重、肝機能、腎機能に有意な影響を与えなかった。データは平均値±標準偏差で示した（Vehicle 対 MG 投与マウス：n=10 対 10）。統計学的有意性は、対応のない Student's t-test により算出した。