

終末糖化産物は骨芽細胞の骨形成を低下させ, ERK1/2 のリン酸化を抑制する

酒 井 真 悠

日本大学大学院歯学研究科歯学専攻 口腔健康科学分野

(指導: 植田耕一郎 教授, 鈴木直人 教授, 田邊奈津子 准教授, 阿部仁子 准教授)

要旨

【目的】 過剰な糖とタンパクのメイラード反応によって, 終末糖化産物(AGEs)は生成される。AGEsは生体内でも生成され, 糖尿病などの高血糖状態でも増加する。また, 生体内に蓄積するAGEsは骨の脆弱性に影響を及ぼすことが示されているが, 骨芽細胞の石灰化に及ぼす影響についてのメカニズムは不明である。そこで本研究は, AGEsが骨芽細胞の骨形成に及ぼす影響を細胞生物学的に検討することを目的とした。

【方法】 AGEsが, 骨芽細胞の runt-related transcription factor 2(Runx2)および osterix, type I collagen(Col I), osteocalcin(OCN)の遺伝子, タンパク発現に及ぼす影響を調べ, また, alkaline phosphatase(ALP)活性およびカルシウム量についても検討した。さらに, AGEsが, 細胞内シグナル伝達因子 extracellular signal-regulated kinase 1/2(ERK1/2)のリン酸化に及ぼす影響を調べた。

【結果】 AGEsは, Runx2および osterix, Col I, OCNの発現, ALPの活性およびカルシウム量を減少させた。さらに, AGEsはERK1/2のリン酸化を抑制した。

【結論】 AGEsは *in vitro* において骨芽細胞の分化および石灰化を抑制することが示唆された。

キーワード: 終末糖化産物, 骨形成, ERK1/2

Advanced glycation end products depress osteogenesis and inhibit ERK1/2 phosphorylation in osteoblasts

Mayu Sakai

Nihon University Graduate School of Dentistry, Major in Oral Health Sciences

(Directors: Prof. Koichiro Ueda, Prof. Naoto Suzuki, Associate Prof. Natsuko Tanabe, Associate Prof. Kimiko Abe)

Abstract:

【Purpose】 Advanced glycation end products (AGEs), generated by excess sugars and proteins via Maillard reaction, are obtained from the intake of processed food. AGEs are often increased in hyperglycemic disorders such as diabetes and possibly associated with bone fragility. However, the role of AGEs in osteogenesis is yet to be understood. This study aimed at examining effects of AGEs on osteogenesis in osteoblasts.

【Methods】 Mouse osteoblastic cell line MC3T3-E1 cells treated with AGEs, were cultured for up to 21 days. The effect of AGEs on the mRNA and protein levels of osteoblast differentiation-related transcription factors, extracellular matrix proteins (ECMPs), extracellular signal-regulated kinases (ERK) 1/2 phosphorylation and alkaline phosphatase (ALP) activity in MC3T3-E1 cells, and calcium content in the extracellular matrix were examined.

【Results】 AGEs decreased the mRNA and protein levels of these transcription factors and ECMPs related to bone formation. AGEs also inhibited ERK1/2 phosphorylation and ALP activity in MC3T3-E1 cells, and the extracellular matrix calcification.

【Conclusions】 These results suggest that AGEs suppress osteogenesis in osteoblast through the inhibition of ERK1/2 phosphorylation.

Keywords: AGEs, osteogenesis, ERK1/2

(受付: 令和3年2月2日)

責任著者連絡先: 酒井真悠

日本大学大学院歯学研究科摂食機能療法学講座

〒101-8310 東京都千代田区神田駿河台 1-8-13

TEL: 03-3219-8197

FAX: 03-3219-8203

E-mail: sakai.mayu2@nihon-u.ac.jp

緒 言

終末糖化産物(advanced glycation end products: AGEs)は、タンパクと還元糖の非酵素的反応であるメイラード反応によって生成される¹⁾。生体内でAGEsは、糖尿病などの高血糖状態で生成され、高濃度AGEsは、糖尿病性合併症の発症に関連していることが報告されている^{2,3)}。また、AGEsは、生体の全ての組織および体液で生成され、生体内に蓄積する²⁾。生体内でのAGEsのメイラード反応は、生体外で生じるメイラード反応よりも低い温度で進む²⁾。加えて、生体内でのAGEsの蓄積は、インスリン抵抗性上昇に起因する糖尿病の増加に関連していると報告されている³⁾。また、高度な糖化は数週間にわたって起こり、生成されたAGEsはコラーゲンの生合成に影響を及ぼすと考えられている^{1,4,5)}。AGEsの一つであるペントシジン(PEN)とカルボキシメチルリジンが有するリジンおよびアルギニン残基は、それぞれ酵素的および非酵素的にコラーゲン線維に架橋することが報告されている⁶⁾。PENなどのAGEsが増加すると、骨の強度が低下することが*ex vivo*で報告されている⁷⁻¹⁰⁾。また、血清および尿中のPEN濃度の増加は、1型糖尿病(T1D)および2型糖尿病(T2D)患者の骨折リスクの増加と関連していることが横断的および前向きコホート研究から報告されている¹¹⁻¹³⁾。これらの知見から、糖尿病におけるAGEsの蓄積は、骨の脆弱性に影響を与えることが示唆されている。

骨リモデリングは、骨芽細胞による骨形成と破骨細胞による骨吸収が動的平衡を保つことで維持されている。骨芽細胞は、細胞分化を促進させる様々な転写因子や石灰化物形成に関与する細胞外マトリックスタンパク(extracellular matrix proteins: ECMPs)を産生することで骨形成を調節している。runt-related transcription factor 2(Runx2)とその下流のosterixは、骨芽細胞の分化に必須なmaster regulatorである¹⁴⁾。また、type I collagen(Col I)とosteocalcin(OCN)は、骨芽細胞の分化に関連する重要なECMPsである。T1DとT2Dでは、骨代謝マーカーの発現が抑制されている¹⁵⁾。糖尿病に関連したAGEsの蓄積が骨の脆弱性と骨リモデリングに影響を与えていることは*in vivo*や*ex vivo*および臨床的研究から明らかにされている^{7,16-18)}。しかし、AGEsが*in vitro*において骨芽細胞の骨形成に及ぼすメカニズムの詳細は不明な点が多い。そこで、本研究は、AGEsが、骨芽細胞の石灰化およびシグナル伝達経路に及ぼす影響を検討した。具体的には、MC3T3-E1細胞をAGEsで刺激し、骨芽細胞分化に関与する転写因子およびECMPsの遺伝子およびタンパク発現、alkaline phosphatase(ALP)活性および細胞外マトリックス(ECM)のカルシウム量を調べた。加えてAGEsが骨芽細胞ヘリガンドと

して作用しているかを確認するために extracellular signal-regulated kinase 1/2(ERK1/2)のリン酸化に及ぼす影響を調べた。

材料および方法

1. 細胞培養

MC3T3-E1細胞を96または6-wellプレートに 2.0×10^4 cells/cm²の密度で播種し、10%ウシ胎児血清(FBS; Hyclone, Logman)、1%ペニシリン/ストレプトマイシン/アンホテリシンB(富士フィルム和光純薬)を添加したalpha modified Eagle's medium(α -MEM;富士フィルム和光純薬)を培地として用い、37°C、5%CO₂存在下で24時間培養し、細胞の生着を確認した。なお、培地の交換は3日ごとに行った。

2. AGEsの作製

AGEsの作製は先行研究に準じて行った¹⁹⁾。10gウシ血清アルブミン(50 mg/mL, BSA;富士フィルム和光純薬)と1.8g DL-グリセルアルデヒド(0.1 M, Sigma-Aldrich)に、0.4g ジエチレントリアミンペンタメトリック酸(5 mM, DTPA;ナカライテスク)を含む200 mLリン酸緩衝生理食塩水(0.2 M, PBS: pH7.4)を加え、滅菌条件下、37°C、回転数250 rpmに設定して7日間インキュベーターシェーカー(Marshall Scientific)で振盪させて作製した。次に、PD-10カラム(GE Healthcare Biosciences AB)を用いて、低分子量反応物とアルデヒドを除去した。

3. 細胞増殖

AGEsを0, 50, 100および200 μ g/mLとなるように調整した細胞培養培地で1, 3, 5, 7, 10および14日間培養し、細胞数を計測した。細胞数をcell-counting kit-8(同仁化学)を用いて計測した。

4. Real-time polymerase chain reaction(real-time PCR)

MC3T3-E1細胞を100 μ g/mLのAGEsで刺激し、real-time PCRのサンプルとして3, 7および14日目に細胞を回収した。AGEs非存在下のMC3T3-E1細胞(0 μ g/mL AGEs)は、コントロール群として使用した。細胞からRNeasy Mini Kit(QIAGEN)を用いて全RNAを抽出し、分光光度計NanoDrop 1000(Thermo Fisher Scientific)でRNA濃度を測定した。Prime Script RT Master Mix(タカラバイオ)を用いて500 ng/mLのRNAからcomplementary DNA(cDNA)を作成し、SYBR Green I(タカラバイオ)によるreal-time PCRを行った²⁰⁾。すなわち、cDNA溶液2 μ Lと表1に示すプライマーを含むSYBR Premix Taq(タカラバイオ)溶液23 μ Lで、Thermal Cycler Dice Real-Time System(タカラバイオ)を用いてPCR反応を行った。反応は、95°Cで5秒間および60°Cで30秒からなるサイクルを35回繰

り返した。PCR産物の特異性は融解曲線分析を Thermal Cycler Dice Real-Time System のソフトウェアで行った。その結果から $2\Delta\Delta$ Ct 法で遺伝子の増幅量を求め、ハウスキーピング遺伝子である β -actin の増幅量で補正した値を遺伝子発現量とした。

5. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) および Western blotting

MC3T3-E1 細胞を $100 \mu\text{g/mL}$ の AGEs で刺激し、培養3日目 (Runx2, I型プロコラーゲン: pro Col I および I型コラーゲン分子: mature Col I; m Col I), 7日目 (osterix) および 14日目 (OCN) に細胞を回収した。さらに, MC3T3-E1 細胞を $100 \mu\text{g/mL}$ の AGEs で5分間刺激し, ERK1/2 および phospho-ERK1/2 (p -ERK1/2) のタンパク発現を調べるために細胞を回収した。総タンパク量 $40\text{--}80 \mu\text{g}$ 相当を含む細胞培養液を SDS-PAGE の試料とした。SDS-PAGE は 10% ポリアクリルアミドゲル (Bio-Rad Laboratories) を用いて行い, 電気泳動後, ゲル上のタンパクを PVDF 膜 (Bio-Rad Laboratories) に転写した²¹⁾。

Western blotting においては, 1次抗体として抗 ERK1/2 抗体 (Cell Signaling Technology), 抗 p -ERK1/2 抗体 (Cell Signaling Technology), 抗 Runx2 抗体 (Santa Cruz Biotechnology), 抗 osterix 抗体 (Santa Cruz Biotechnology), 抗 Col I 抗体 (Santa Cruz Biotechnology), 抗 OCN 抗体 (Santa Cruz Biotechnology) および抗 β -actin 抗体 (Santa Cruz Biotechnology), また2次抗体としてビオチン標識の抗ウサギ IgG 抗体 (Santa Cruz Biotechnology) または抗マウス IgG 抗体 (Santa Cruz Biotechnology) を用いた。さらに, ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン溶液を加えた後 ECL prime reagents (GE Healthcare) で発光反応を行い, Chemidoc XRS (Bio-Rad Laboratories) で PVDF 膜を撮影し, それぞれのタンパク発現を調べた。バンドで示される発現の強さは Image J ソフトウェア (National Institutes of Health) で数値化し, β -actin 量で補正した値をタンパク定量に使用した。

表1 プライマーの配列

Target	Primers	GenBank Acc.
Runx2	5'-CACTCTGGCTTTGGGAAGAG-3' 5'-GCAGTTCCCAAGCATTTTCAT-3'	NM_001146038.2
Osterix	5'-GGTAGCGTCCTCCCATGGTTT-3' 5'-AGACGGGACAGCCAACCCCTAG-3'	NM_001348205.1
Col I	5'-AGAAGGATTGGTCAGAGCAGTG-3' 5'-ACAACAGGTGTCAGGGTGT-3'	NM_007743.3
OCN	5'-CAGACACCATGAGGACCA-3' 5'-AAGGCTTTGTCTCAGACTCAGGG-3'	NM_007541.3
RAGE	5'-TGAAGTACAGCCAGTGTCCCTA-3' 5'-TGCCATCGGGAATCAGAAAGT-3'	NM_007425.3
β -actin	5'-CATCCGTAAGACCTCTATGCCAAC-3' 5'-ATGGAGCCACCGATCCACA-3'	NM_007393.5

6. 細胞外マトリックス (ECM) のカルシウム量および ALP 染色

MC3T3-E1 細胞を $100 \mu\text{g/mL}$ AGEs, $50 \mu\text{g/mL}$ アスコルビン酸, 5mM β -グリセロリン酸および $1 \times 10^{-8} \text{M}$ デキサメタゾンとともに 21 日間培養した²²⁾。その後, $300 \mu\text{L}$ の 0.5M HCl を各 well に添加し, ECM を脱灰してカルシウムを溶出させた。カルシウム量は, カルシウム E テストキット (富士フィルム和光純薬) を使用して測定した²³⁾。ALP 染色は, 細胞を 10% パラホルムアルデヒド溶液 (富士フィルム和光純薬) で 20 分間固定し, ALP 染色液 (NBT/BCIP ready-to-use tables; Roche Diagnostics GmbH) を 30 分間反応させた²⁴⁾。

7. 統計学的分析

統計処理は, 結果の正規性は Shapiro-Wilk の正規性検定, 等分散は F 検定または Bartlett 検定で確認した後, 二元配置分散分析後 Tukey の多重比較, またはノンパラメトリック検定として Wilcoxon signed-rank test 検定を行い, 危険率 5% 未満を統計学的有意差とした。なお, 棒グラフの図中のバーは標準偏差, 箱ひげ図は上から最大値, 第3四分位, 第2四分位, 第1四分位および最小値を示す。これらの統計学的分析は EZR ソフトウェア (EZR 1.23; 自治医科大学附属さいたま医療センター) を用いた²⁵⁾。

結果

1. AGEs が MC3T3-E1 細胞の細胞増殖に及ぼす影響

$200 \mu\text{g/mL}$ AGEs 刺激群では, コントロール群と比較して, 培養 5, 7 および 10 日目において細胞数の有意な減少が認められた (図1)。そこで, 細胞数に影響を及ぼさなかった $100 \mu\text{g/mL}$ AGEs を以後用いた。

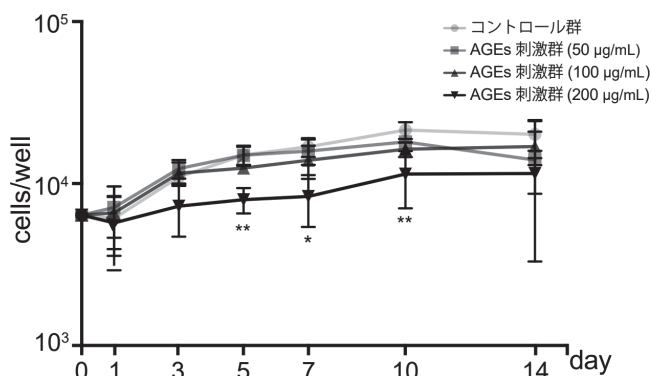


図1 MC3T3-E1 細胞の細胞増殖に対する AGEs の影響
培養 1, 3, 5, 7, 10 および 14 日目の細胞数。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, two-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test, AGEs vs. untreated control, $n=6$

2. AGEs が MC3T3-E1 細胞の骨芽細胞分化促進関連転写因子と ECMPs に及ぼす影響

AGEs 刺激は、培養 3 日目の Runx2、培養 7 および 14 日目の osterix の遺伝子発現を有意に減少させた (図 2 A, B)。また、AGEs 刺激は、培養 3 日目の Runx2 および培養 7 日目の osterix のタンパク発現を有意に減少させた (図 2 C, D)。培養の 3、7 および 14 日

目で AGEs 刺激は、OCN の遺伝子発現を有意に減少させた (図 2 F)。また、AGEs 刺激は培養 14 日目に OCN のタンパク発現を有意に減少させた (図 2 I)。一方、Col I の遺伝子発現には、AGEs 刺激の影響は認められなかった (図 2 E)。しかし、AGEs 刺激は、培養 3 日目に m Col I タンパク発現を有意に減少させたが、pro Col I には影響を及ぼさなかった (図 2 G, H)。

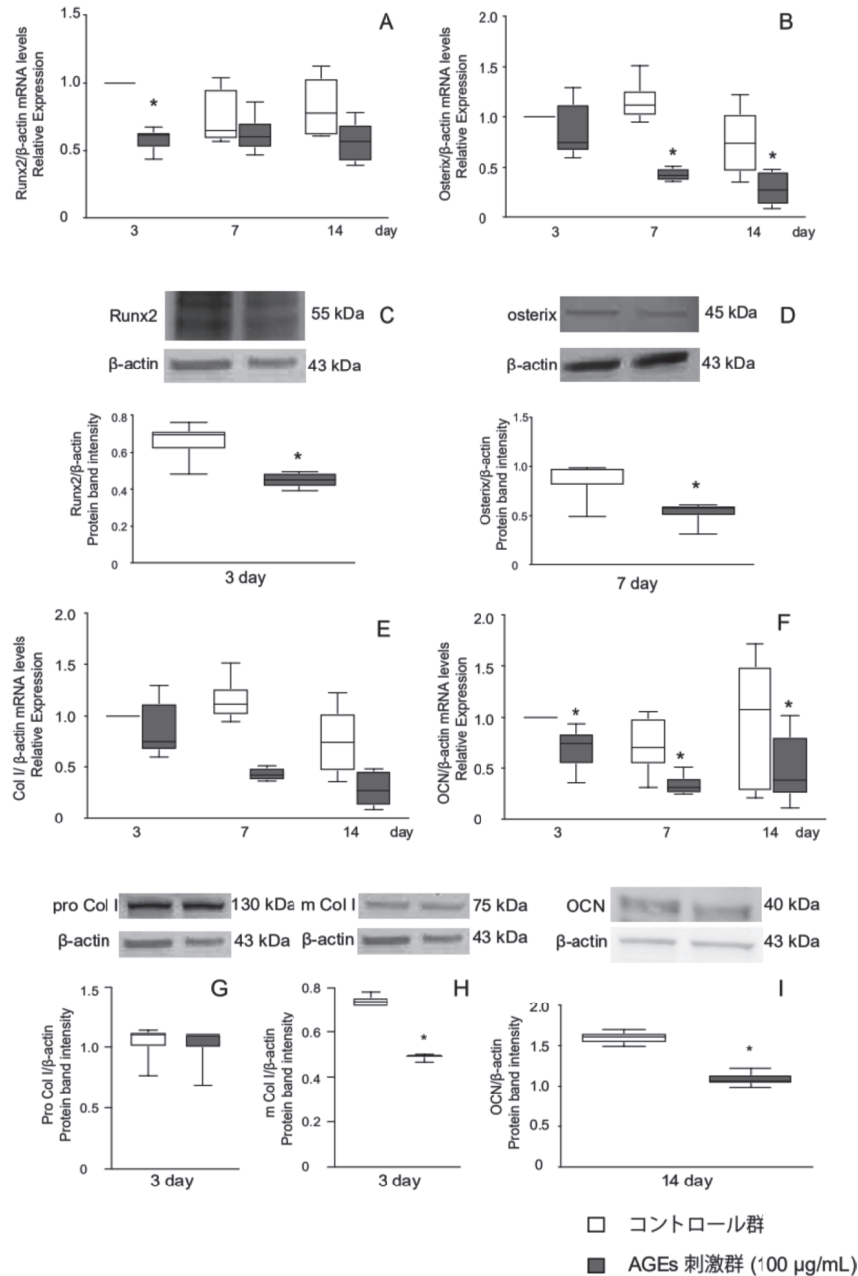


図 2 MC3T3-E1 細胞の骨芽細胞分化促進関連転写因子と ECMPs 発現に対する AGEs の影響

Runx2 (A), osterix (B), Col I (E) および OCN (F) の遺伝子発現。* $P < 0.05$, Wilcoxon signed-rank test, AGEs vs. untreated control, $n=6$

Runx2 (C), osterix (D), pro Col I (G), m Col I (H) および OCN (I) のタンパク発現。

* $P < 0.05$, Wilcoxon signed-rank test, AGEs vs. untreated control, $n=3$

3. AGEs が ECM のカルシウム量および ALP 染色に及ぼす影響

コントロール群における ECM のカルシウム量は、培養日数依存的に増加したが、AGEs 刺激群では、培養 14 および 21 日目で有意に減少した(図 3 A)。また、AGEs 刺激群では、全ての培養日数でコントロール群と比較して ALP 染色性が低下していた(図 3 B)。

4. AGEs が MC3T3-E1 細胞の ERK1/2 のリン酸化に及ぼす影響

AGEs 刺激 5 分後でコントロール群と比較し、ERK1/2 のリン酸化が低下した(図 4)。

考 察

糖尿病では、骨粗鬆症および骨折のリスクが高いことがこれまでの研究で報告されている。T1D は T2D と比較して骨密度が低く、股関節骨折のリスクが高い。一方で、T2D は、骨密度が正常であるにもかかわらず、股関節骨折のリスクは上昇することが示されており、糖尿病と骨の脆弱性についての詳細は、十分には解明されていない^{26,27)}。なかでも、骨の脆弱性を引き起こす要因の 1 つと考えられている AGEs は、糖尿病に起因する高血糖状態によって生体内で生成される²⁸⁾。しかし、AGEs が骨芽細胞の骨形成に及ぼす影響については不明な点が多い。

そこで本研究は、AGEs が ECM における石灰化および骨芽細胞のシグナル伝達経路に及ぼす影響を調べた。

Runx2 は未分化間葉細胞から骨芽細胞への分化誘導する master regulator で、発現を抑制させると骨芽細胞の分化は抑制する¹⁶⁾。Runx2 ヘテロ欠損マウスでは、鎖骨頭蓋異形成症と呼ばれる骨格異形成症が発生し、これは骨芽細胞の分化の遅延が起因となっている。さらに、Runx2 ホモ欠損マウスは出生直後に死亡し、骨芽細胞が未成熟であるため骨形成が全く認められないことから、Runx2 のホモ欠損が膜内骨化プロセスと軟骨内骨化プロセスの両方を完全にブロックすることを示唆している²⁹⁾。osterix は、Runx2 の下流に存在する転写因子で、Runx2 と同様に骨芽細胞の分化を調節している。本研究では、AGEs が Runx2 と osterix の発現を抑制することが示された。この結果から、AGEs が Runx2 と osterix 発現を減少させることで骨芽細胞の分化を抑制している可能性が示唆された。次に ECMPs の遺伝子発現とタンパク発現に対する AGEs の影響を検討した。

Col I の重合体であるコラーゲン線維は、主要な ECMPs であり、骨の無機成分の主体であるヒドロキシアパタイト(HA)の結晶核形成のための足場として機能している³⁰⁾。コラーゲン分子形成過程で Col I の 3 本の α 鎖ポリペプチドは細胞内で三重らせん構造となるプロ

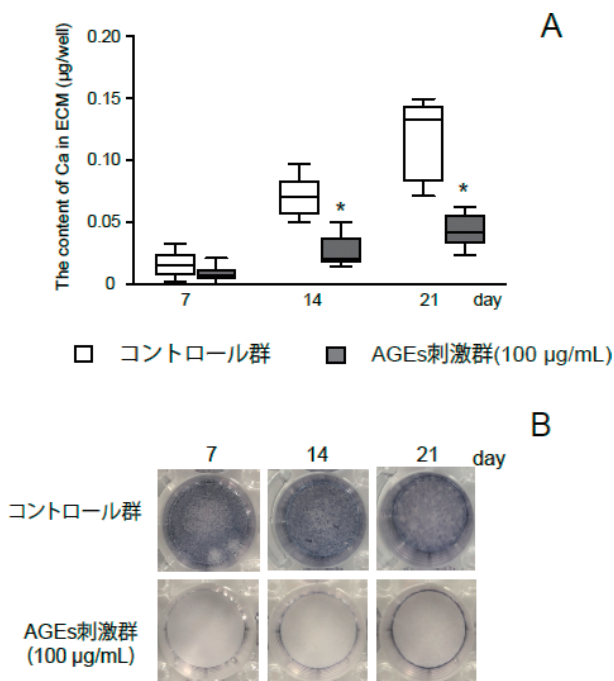


図 3 MC3T3-E1 細胞の ECM のカルシウム量および ALP 染色に対する AGEs の影響

AGEs 存在 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) または非存在下で ECM のカルシウム量 (A) および ALP 染色像 (B) を図で示す。* $P < 0.05$, Wilcoxon signed-rank test, AGEs vs. untreated control, $n=6$

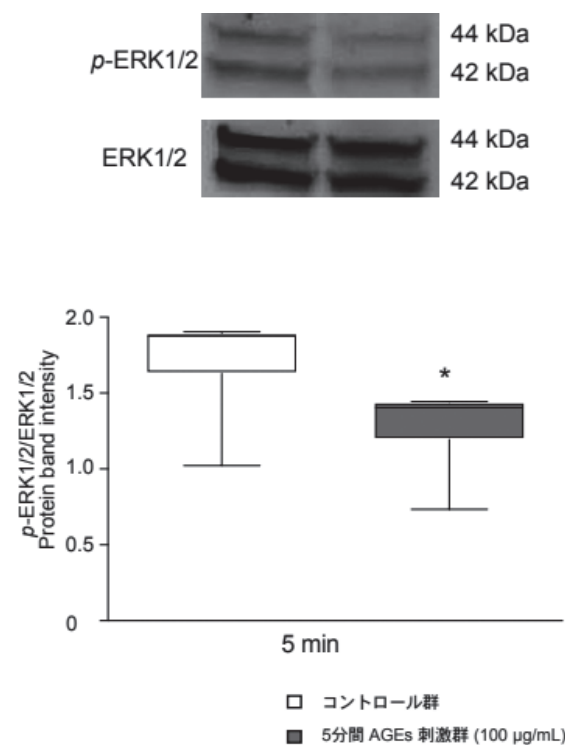


図 4 MC3T3-E1 細胞の ERK1/2 およびリン酸化 ERK1/2 のリン酸化に対する AGEs の影響

リン酸化 ERK1/2 のタンパク発現。* $P < 0.05$, Wilcoxon signed-rank test, AGEs vs. untreated control, $n=3$

コラーゲンとなり、細胞外に分泌された後、N 末および C 末ポリペプチドが切断され、コラーゲン分子となる³¹⁾。本研究では、AGEs は Col I の遺伝子発現に影響を及ぼさなかった。一方、AGEs は m Col I 発現を抑制したが、pro Col I 発現には影響を及ぼさなかった。これらの結果は、AGEs が、コラーゲン分子からコラーゲン線維を形成するプロセスに影響を及ぼす可能性を示している。

OCN は、骨に含まれる非コラーゲン性タンパクの約 15% を占め、 γ -カルボキシグルタミン酸残基を持つ低分子量のタンパクである。OCN は石灰化開始後の骨芽細胞分化後期に発現し、石灰化を抑制する³²⁾。本研究では、AGEs によって骨芽細胞分化が抑制されることにより石灰化が開始しないため、骨芽細胞での OCN 発現が生じないと考えられた。

石灰化は、骨芽細胞由来の細胞膜近くの基質小胞内で HA 結晶の核が形成されることで開始する。HA 結晶は基質小胞を破って成長し、やがて HA の沈着が生じる。また、ピロリン酸は、HA 結晶の成長を阻害する³³⁾。骨芽細胞の高い ALP 活性は、石灰化に必要な局所におけるリン酸濃度の上昇と、ピロリン酸の分解を介して骨芽細胞の石灰化を上昇させると報告されている³³⁾。Gerstenfeld ら³⁴⁾は、石灰化開始時期に高い ALP 活性を維持することは、骨芽細胞性の石灰化において重要であること示している。本研究では、AGEs は ALP 活性を減少させ、ECM のカルシウム量を抑制した。これらの結果は、AGEs が *in vitro* において骨芽細胞性の石灰化を抑制することを示唆するものである。

ERK1/2 は、mitogen-activated protein kinase (MAPK) スーパーファミリーの 1 つで、骨芽細胞の分化に関連する ECMPs, fibroblast growth factors および bone morphogenetic protein などが関与するさまざまな分子によってリン酸化される^{35,36)}。本研究では、AGEs が骨芽細胞に ligand としての作用を確認するために、AGEs が ERK1/2 のリン酸化に及ぼす影響を調べた。その結果、AGEs は ERK1/2 のリン酸化を抑制したことから、AGEs が骨芽細胞に発現する受容体 (receptor of AGEs : RAGE) を介して直接作用していることが明らかになった。

結 論

本研究は、AGEs (100 μ g/mL) を加えた細胞培養培地で MC3T3-E1 細胞を刺激し、その影響を検討した。その結果、以下のことが示された。

1. AGEs は、Runx2 および osterix の遺伝子およびタンパク発現を減少させた。
 2. AGEs は、Col I の遺伝子発現には影響を及ぼさなかった一方で、m Col I のタンパク発現を減少させた。
 3. AGEs は、OCN の遺伝子発現およびタンパク発現を減少させた。
 4. AGEs は、ALP 活性を低下させた。
 5. AGEs は、ECM のカルシウム沈着量を減少させた。
 6. AGEs は、ERK1/2 のリン酸化を抑制した。
- 以上の結果から、AGEs が骨芽細胞の分化を抑制することで石灰化に対しても抑制的に作用することが示唆された。

稿を終えるに、本研究遂行にあたり、格別たるご指導ご鞭撻を賜りました日本大学歯学部摂食機能療法学講座の植田耕一郎教授、生化学講座教授の鈴木直人教授に謹んで心より感謝申し上げます。

また、本研究を通じ多大なるご協力とご助言を賜りました本学部生化学講座の田邊奈津子准教授、摂食機能療法学講座の阿部仁子准教授を始め、摂食機能療法学講座および生化学講座の皆様へ深く感謝致します。

本論文に関して、開示すべき利益相反はない。

文 献

- 1) Singh R, Barden A, Mori T, Beilin L (2001) Advanced glycation end-products: a review. *Diabetologia* 44, 129-146.
- 2) Ahmed N, Argirov OK, Minhas HS, Cordeiro CAA, Thornalley PJ (2002) Assay of advanced glycation endproducts (AGEs): surveying AGEs by chromatographic assay with derivatization by 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl-carbamate and application to N ϵ -carboxymethyl-lysine- and N ϵ -(1-carboxyethyl)lysine-modified albumin. *Biochem J* 364, 1-14.
- 3) Vlassara H, Striker GE (2011) AGE restriction in diabetes mellitus: a paradigm shift. *Nat Rev Endocrinol* 7, 526-539.
- 4) Boel E, Selmer J, Flodgaard HJ, Jensen T (1995) Diabetic late complications: will aldose reductase inhibitors or inhibitors of advanced glycosylation endproduct formation hold promise? *J Diabetes Complications* 9, 104-129.
- 5) Yamamoto M, Sugimoto T (2016) Advanced glycation end products, diabetes, and bone strength. *Curr Osteoporos Rep* 14, 320-326.
- 6) Monnier VM, Sell DR, Nagaraj RH, Miyata S, Grandhee S, Odetti P, Ibrahim SA (1992) Maillard reaction-mediated molecular damage to extracellular matrix and other tissue proteins in diabetes, aging, and uremia. *Diabetes* 41, 36-41.
- 7) Wang X, Shen X, Li X, Agrawal CM (2002) Age-related changes in the collagen network and toughness of bone. *Bone* 31, 1-7.
- 8) Hernandez CJ, Tang SY, Baumbach BM, Hwu PB, Sakkee AN, van der Ham F, DeGroot J, Bank RA, Keaveny TM (2005) Trabecular microfracture and the influence of pyridinium and non-enzymatic glycation-mediated collagen cross-links. *Bone* 37, 825-832.

- 9) Nyman JS, Roy A, Tyler JH, Acuna RL, Gayle HJ, Wang X (2007) Age-related factors affecting the postyield energy dissipation of human cortical bone. *J Orthop Res* 25, 646-655.
- 10) Belmokhtar K, Ortilon J, Jaisson S, Massy ZA, Rombi CB, Doué M, Maurice P, Fritz G, Gillery P, Schmidt AM, Rieu P, Touré F (2019) Receptor for advanced glycation end products: a key molecule in the genesis of chronic kidney disease vascular calcification and a potential modulator of sodium phosphate co-transporter PIT-1 expression. *Nephrol Dial Transplant* 34, 2018-2030.
- 11) Yamamoto M, Yamaguchi T, Yamauchi M, Yano S, Sugimoto T (2008) Serum pentosidine levels are positively associated with the presence of vertebral fractures in postmenopausal women with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 93, 1013-1019.
- 12) Schwartz AV, Garnero P, Hillier TA, Sellmeyer DE, Strotmeyer ES, Feingold KR, Resnick HE, Tylavsky FA, Black DM, Cummings SR, Harris TB, Bauer DC (2009) Pentosidine and increased fracture risk in older adults with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 94, 2380-2386.
- 13) Neumann T, Lodes S, Kästner B, Franke S, Kiehnopf M, Lehmann T, Müller UA, Wolf G, Sämann A (2014) High serum pentosidine but not esRAGE is associated with prevalent fractures in type 1 diabetes independent of bone mineral density and glycaemic control. *Osteoporos Int* 25, 1527-1533.
- 14) Long F (2011) Building strong bones: molecular regulation of the osteoblast lineage. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13, 27-38.
- 15) Hygum K, Starup-Linde J, Harsløf T, Vestergaard P, Langdahl BL (2017) Mechanisms in endocrinology: Diabetes mellitus, a state of low bone turnover - a systematic review and meta-analysis. *Eur J Endocrinol* 176, 137-157.
- 16) Krakauer JC, McKenna MJ, Buderer NF, Rao DS, Whitehouse FW, Parfitt A M (1995) Bone loss and bone turnover in diabetes. *Diabetes* 44, 775-782.
- 17) Saito M, Fujii K, Mori Y, Marumo K (2006) Role of collagen enzymatic and glycation induced cross-links as a determinant of bone quality in spontaneously diabetic WBN/Kob rats. *Osteoporos Int* 17, 1514-1523.
- 18) Manavalan JS, Cremers S, Dempster DW, Zhou H, Dworakowski E, Kode A, Kousteni S, Rubin MR (2012) Circulating osteogenic precursor cells in type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 97, 3240-3250.
- 19) Okazaki K, Yamaguchi T, Tanaka K, Notsu M, Ogawa N, Yano S, Sugimoto T (2012) 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* 91, 286-296.
- 20) Ma L, Xiang L, Ma X, Zhang S, Gong P (2020) Effects of α CGRP on the adhesion, proliferation and differentiation of osteoblasts cultured on titanium surfaces. *J Hard Tissue Biol* 29, 205-214.
- 21) Torigoe G, Nagao M, Tanabe N, Manaka S, Kariya T, Kawato T, Sekino J, Kato S, Maeno M, Suzuki N, Shimizu N (2017) PYK2 mediates BzATP-induced extracellular matrix proteins synthesis. *Biochem Biophys Res Commun* 494, 663-667.
- 22) Tanabe N, Ito-Kato E, Suzuki N, Nakayama A, Ogiso B, Maeno M, Ito K (2004) IL-1 α affects mineralized nodule formation by rat osteoblasts. *Life Sci* 75, 2317-2327.
- 23) Manaka S, Tanabe N, Kariya T, Naito M, Takayama T, Nagao M, Liu D, Ito K, Maeno M, Suzuki N, Miyazaki M (2015) Low-intensity pulsed ultrasound-induced ATP increases bone formation via the P2X7 receptor in osteoblast-like MC3T3-E1 cells. *FEBS Lett* 589, 310-318.
- 24) Naito M, Ohashi A, Takahashi T (2015) Dexamethasone inhibits chondrocyte differentiation by suppression of Wnt/ β -catenin signaling in the chondrogenic cell line ATDC5. *Histochem Cell Biol* 144, 261-272.
- 25) Kanda Y (2013) Investigation of the freely available easy-to-use software "EZ" for medical statistics. *Bone Marrow Transplant* 48, 452-458.
- 26) Vestergaard P (2007) Discrepancies in bone mineral density and fracture risk in patients with type 1 and type 2 diabetes-a meta-analysis. *Osteoporos Int* 18, 427-444.
- 27) Shanbhogue VV, Mitchell DM, Rosen CJ, Bouxsein ML (2016) Type 2 diabetes and the skeleton: new insights into sweet bones. *Lancet Diabetes Endocrinol* 4, 159-173.
- 28) Brownlee M (1992) Glycation products and the pathogenesis of diabetic complications. *Diabetes Care* 15, 1835-1843.
- 29) Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K, Shimizu Y, Bronson RT, Gao YH, Inada V, Sato M, Okamoto R, Kitamura Y, Yoshiki S, Kishimoto T (1997) Targeted disruption of *Cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* 89, 755-764.
- 30) Boskey AL (1992) Mineral-matrix interactions in bone and cartilage. *Clin Orthop Relat Res* 281, 244-274.
- 31) Gelse K, Pöschl E, Aigner T (2003) Collagens-structure, function, and biosynthesis. *Adv Drug Deliv Rev* 55, 1531-1546.
- 32) Wolf G (1996) Function of the bone protein osteocalcin: definitive evidence. *Nutr Rev* 54, 332-333.
- 33) Orimo H (2010) The mechanism of mineralization and the role of alkaline phosphatase in health and disease. *J Nippon Med Sch* 77, 4-12.
- 34) Gerstenfeld LC, Chipman SD, Glowacki J, Lian JB (1987) Expression of differentiated function by mineralizing cultures of chicken osteoblasts. *Dev Biol* 122, 49-60.
- 35) Jun JH, Yoon WJ, Seo SB, Woo KM, Kim GS, Ryoo HM, Baek JH (2010) BMP2-activated Erk/MAP kinase stabilizes Runx2 by increasing p300 levels and histone acetyltransferase activity. *J Biol Chem* 285, 36410-36419.
- 36) Choi YH, Gu YM, Oh JW, Lee KY (2011) Osterix is regulated by Erk1/2 during osteoblast differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 415, 472-478.