

## エクソソーム中の糖化ストレス誘導性 miRNA の網羅的解析

Comprehensive analysis of glycative stress-inducible miRNAs in exosomes

高部 稚子\*

Wakako TAKABE

Abstract: Advanced glycation end products (AGEs) are formed by proteins or lipids and carbohydrates or the degradation products of carbohydrates under the non-enzymatic reactions. Accumulation of AGEs in the body is implicated in the development of various diseases, one of which is an increased risk of bone fractures. Bone remodeling by osteoclasts, which remove mature bone tissue, and osteoblasts, which form new bone tissue, is important for the maintenance of bone mass and quality. In our previous study, we demonstrated that AGEs inhibited osteoclast differentiation. In this study, we hypothesized that microRNAs (miRNAs) contained in exosomes by which extracellularly secreted from cells are involved in that mechanisms. Mouse macrophage cell line, RAW264.7 were cultured in the presence of receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL) with AGEs or heated proteins. The culture medium were collected and purified exosome were used for miRNA extraction. Comprehensive analysis using the miRNA Oligo Chip revealed that the miRNAs contained in exosomes were compared between AGEs and heated protein. One hundred and twelve miRNAs were upregulated more than 10-fold by AGEs, while 103 miRNAs were downregulated by less than one-tenth.

### 1. はじめに

グルコースやフルクトースなどの還元糖は生命活動において必要不可欠な栄養素である。その一方で、過剰な糖は主としてそのアルデヒド基がタンパク質と反応し、様々な終末糖化産物(Advanced Glycation End Products, AGEs)を産生する。それ以外にも代謝の過程で得られる様々な還元性物質もまた AGEs の産生に寄与する。AGEs の蓄積がタンパクの機能不全や炎症を引き起こすことに端を発する糖化ストレスは、様々な疾病の危険因子として注目されている。その中でも糖尿病は、血管障害などの重篤な合併症の他に、骨折の危険因子であることが報告されている<sup>1)</sup>。日本における糖尿病患者数は年々増加しており、2014年度には予備群も含め2000万人以上と報告されたこと<sup>2)</sup>、また高齢者の骨折はその後の筋力低下による寝たきりを招き、健康寿命に多大な影響を与えることからその対策は喫緊の課題である。加齢・疾病に伴う骨折の要因として「骨質・骨量の低下による骨強度の低下」が考えられるが、架橋性の AGEs であるペントシジンは、骨コラーゲンに不要な架橋構造を形成することで骨弾性を低下させ、骨質の低下に寄与するとされている<sup>3)</sup>。それ以外にも、AGEs は骨機能の恒常性に重要な「破骨細胞による骨吸収」と「骨芽細胞による骨新生」からなる骨代謝バランスの崩壊にも関わるということが報告されている。

我々はこれまでに、マウスマクロファージ由来

RAW264.7 細胞に Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL) を作用させた破骨細胞分化モデルを用い、RANKL 刺激時に認められる主要な破骨細胞分化マーカーである Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) の活性及び成熟した破骨細胞の形態的特徴である細胞融合による多核化が、AGEs により抑制されることを報告している<sup>4)</sup>。成熟した破骨細胞は骨芽細胞分化因子を放出するため、破骨細胞分化が正常に行われなくなると、骨芽細胞の形成も低下し全体として骨代謝回転が停滞する「低回転型骨代謝異常」に陥ることが予測される。実際、糖尿病と骨粗鬆症両方に罹患している患者に低回転型骨代謝異常を示すマーカーの上昇が認められている<sup>5)</sup>。骨代謝が停滞することによる骨質の低下は、骨強度の低下に繋がり、最終的に骨折リスクの増加に寄与することが考えられる。

現在我々は、AGEs が破骨細胞分化過程を抑制するメカニズムについて解析を試みている。その過程で細胞外分泌小胞であるエクソソームを介した経路に着目した。エクソソームは直径 50-150 nm の細胞外分泌小胞でほとんどの真核細胞で分泌される。その内部にはメッセンジャー RNA(mRNA)、DNA、マイクロ RNA(miRNA)などの核酸やタンパク質などが含まれており、エンドサイトーシスによる細胞への取り込みを介して、細胞間のシグナル伝達に重要な役割を担うことが報告されている。特に miRNA は約 22 塩基長のタンパク質にならない non-coding RNA の 1 種

2023年4月27日受理

\* 理工学部 物質生命科学科

であり、主に遺伝子の 3'-UTR に結合することで翻訳阻害を生じさせ、結果、miRNA が結合した mRNA がコードするタンパク質の減少が起こる。今回、我々は RAW264.7 細胞に AGEs を添加した際に細胞外に分泌されるエクソソームに含まれる miRNA が、破骨細胞分化抑制に関わるとの仮説を立てた。

本研究では、AGEs を RAW264.7 細胞に添加した際に放出されるエクソソームを培養液から単離し、含まれる miRNA を精製した。対照として還元性物質を加えず加熱したタンパク質(加熱タンパク質)を用い、エクソソームに含まれる miRNA の網羅的解析を行った。

## 2. 実験材料・方法

### 2.1 材料

マウス RANKL 組換えタンパク質は、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。

### 2.2 細胞培養

マウスマクロファージ細胞である RAW264.7 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 (FBS, 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。

### 2.3 糖化タンパク質(AGEs)の調製

糖化蛋白は、ヒト血清アルブミン (human serum albumin, HSA) と glyceraldehyde により調製した。50 mmol/L リン酸緩衝液 (PB, pH 7.4) 中で 8 mg/mL HSA と 33 mmol/L glyceraldehyde を 60°C で 40 時間反応させた。また、対照として glyceraldehyde 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。

### 2.4 エクソソームの単離及び純度の評価

RAW264.7 細胞を 96well plate に播種し、24 時間後に培地を 100 ng/mL RANKL 及び 500 µg/mL AGEs あるいは加熱 HSA を含む α-MEM I, 10% FBS に置き換え、更に 24 時間培養した。上清を回収し、MagCapture™ Exosome Isolation Kit PS (wako)を用いて付属のプロトコールに従いエクソソームを単離した。得られたエクソソームの個数及

び粒子径はナノサイト (NanoSight LM10, Quantum Design Japan, Tokyo, Japan)により解析した。その後エクソソームから miRNA を精製し、その純度について 2100Bioanalyzer (Agilent Technologies Japan, Tokyo, Japan)を用いた電気泳動による評価を行った。

## 2.5 miRNA の網羅的解析

得られた小分子 RNA を Cy5 近傍蛍光色素で標識した後、mouse microRNA Oligo Chip (3D-Gene, 東レ, Tokyo, Japan)と 32°C, 16 時間ハイブリダイゼーションを行った。Chip を洗浄後、スキャナー (3D-Gene Scanner 3000) を用いて最適 PMT 値 (レーザー100%) にて画像を取得、数値化ソフトで数値化した。解析は、各チップの数値データ (生データ) からバックグラウンド値 (BG 値) を減算した後、グローバルノーマライズ (チップ内シグナル強度の中央値を 25 に調整) により正規化した。

## 3. 結果

### 3.1 AGEs がエクソソームの個数及び粒径に及ぼす影響

RAW264.7 細胞に RANKL と同時に AGEs あるいは加熱 HSA を添加し 24 時間後の培養液から単離したエクソソームの個数及び粒径を Fig. 1 及び Table 1 に示す。エクソソームの粒子径の分布や分泌量は AGEs により変化しなかった。

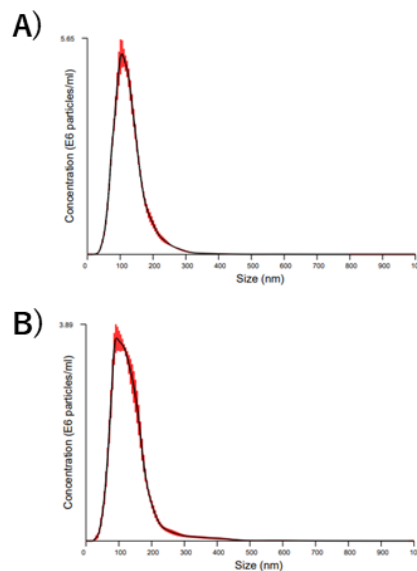


Fig. 1 各条件におけるエクソソームの粒子径の分布

A). 加熱 HSA 添加時, B). AGEs 添加時

Table 1 各条件におけるエクソソームの粒子径と粒子数

	粒子径 (nm)	粒子数 ( $10^8$ particles/sample)
加熱HSA	127 ± 1.5	4.78 ± 0.20
AGEs	133 ± 3.3	3.93 ± 0.28

### 3.2 AGEs 誘導性エクソソーム含有 miRNA の精製

前項で評価したエクソソームから miRNA を精製した。抽出した RNA を 2100Bioanalyzer を用いて電気泳動し、小分子 RNA 画分を検出した (Fig.2)。AGEs による小分子 RNA 総量及への影響は認められなかった。また純度にも問題はなく、次項の網羅的解析を行うこととした。

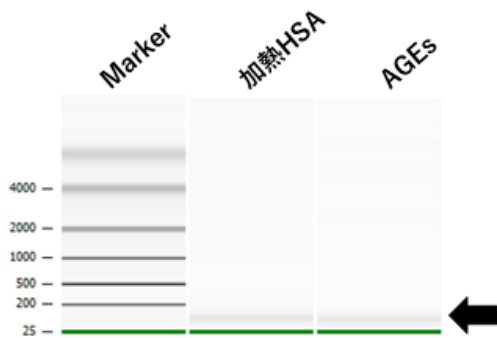


Fig.2 エクソソーム含有小分子 RNA の電気泳動解析

### 3.3 AGEs 誘導性エクソソーム含有 miRNA の網羅的解析

細胞外に分泌されたエクソソーム中に含まれる各 miRNA の発現量について、AGEs 添加時と対照である加熱 HSA 添加時について網羅的解析を行った。AGEs により発現が 10 倍以上亢進した miRNA は 112 種類 (Table 2), 10 分の 1 以下に減少した miRNA は 103 種類であった (Table 3)。

Table 2 AGEs により発現が 10 倍以上亢進した miRNA

Name	発現量		倍率
	加熱HSA	AGEs	[AGEs/加熱HSA]
mmu-miR-292a-3p		39.492296	41.51815417
mmu-miR-712-3p		29.081131	30.57292329
mmu-miR-361-3p		23.600051	24.81067877
mmu-miR-466h-5p		22.533356	23.68926612
mmu-miR-423-3p		20.787896	21.85426571
mmu-miR-106a-3p		20.391398	21.43742918
mmu-miR-7070-3p		20.076053	21.10590519
mmu-miR-675-3p		19.914825	20.93640743
mmu-miR-466f-3p		19.842275	20.86014094
mmu-miR-92b-3p		19.120099	20.10091542

Table 2 (continued)

Name	発現量		倍率
	加熱HSA	AGEs	[AGEs/加熱HSA]
mmu-miR-6931-3p		19.115834	20.09643092
mmu-miR-18b-3p		18.222713	19.15749468
mmu-miR-467f		18.10263	19.03125768
mmu-miR-7655-5p		18.041165	18.96663713
mmu-miR-6384		17.384017	18.27577524
mmu-miR-411-3p		17.339562	18.22903897
mmu-miR-210-3p		17.320952	18.20947471
mmu-miR-758-5p		17.157979	18.03814403
mmu-miR-20a-3p		16.950928	17.82046404
mmu-miR-7094-1-5p		15.815643	16.62694719
mmu-miR-669h-3p		15.660049	16.46337484
mmu-miR-6996-3p		15.430159	16.2216841
mmu-miR-6362		15.102142	15.87684668
mmu-miR-695		14.831918	15.59275881
mmu-miR-92a-1-5p		14.809636	15.56933802
mmu-miR-1306-3p		14.688923	15.44243122
mmu-miR-6897-3p		14.381298	15.11902499
mmu-miR-881-3p		14.018726	14.73785337
mmu-miR-1247-5p		13.822943	14.53202653
mmu-miR-487b-5p		13.515643	14.20896337
mmu-miR-879-5p		13.454178	14.14434633
mmu-miR-6930-3p		13.425779	14.11449298
mmu-miR-5133		13.368579	14.05435753
mmu-miR-380-5p		13.304291	13.98677067
mmu-miR-7021-3p		13.290054	13.97180202
mmu-miR-6973b-3p		13.261509	13.94179486
mmu-miR-32-3p		13.115076	13.78784901
mmu-miR-7055-3p		13.053828	13.72345944
mmu-miR-6950-3p		12.979532	13.645351
mmu-miR-181a-2-3p		12.901384	13.56319631
mmu-miR-7024-3p		12.898937	13.5606206
mmu-miR-7664-5p		12.822787	13.48056445
mmu-miR-7673-3p		12.818826	13.47639953
mmu-miR-669f-3p		12.816523	13.47398133
mmu-miR-466f		12.542411	13.18580732
mmu-miR-6904-3p		12.535662	13.17871316
mmu-miR-325-3p		12.49351	13.13440007
mmu-miR-6924-3p		12.398714	13.03473818
mmu-miR-881-5p		12.336099	12.96891157
mmu-miR-329-3p		12.26425	12.89337722
mmu-miR-7015-3p		12.142133	12.76499529
mmu-miR-6940-3p		12.080147	12.69983018
mmu-miR-134-3p		12.075918	12.69538551
mmu-miR-138-5p		12.043593	12.66140149
mmu-miR-3074-5p		11.968631	12.58259251
mmu-miR-300-3p		11.904792	12.51548071
mmu-miR-452-5p		11.753535	12.3564636
mmu-miR-344c-3p		11.74612	12.34866691
mmu-miR-669p-3p		11.740037	12.34227466
mmu-miR-6237		11.6884	12.28798879
mmu-miR-465a-5p		11.620222	12.21631108
mmu-miR-130a-3p		11.59616	12.19101718
mmu-miR-8118		11.58986	12.18439067
mmu-miR-3110-5p		11.488351	12.07767624
mmu-miR-7a-2-3p		11.280076	11.85871677

Table 2 (continued)

Name	発現量		倍率
	加熱HSA	AGEs	[AGEs/加熱HSA]
mmu-miR-5615-3p		11.275739	11.85415811
mmu-miR-7225-5p		11.271959	11.85018601
mmu-miR-7214-3p		11.18888	11.76284148
mmu-miR-467c-3p		11.184578	11.75831967
mmu-miR-7660-5p		11.10202	11.67152847
mmu-miR-3093-5p		11.055082	11.62218162
mmu-miR-409-3p		11.033322	11.59930452
mmu-miR-7029-3p		11.012228	11.57712964
mmu-miR-6897-5p		10.95584	11.51784973
mmu-miR-331-5p		10.892594	11.45135966
mmu-miR-6420		10.682647	11.23064125
mmu-miR-3475-3p		10.678831	11.2266314
mmu-miR-7031-3p		10.621291	11.16613965
mmu-miR-7077-3p		10.566163	11.10818189
mmu-miR-6963-3p		10.454574	10.99086783
mmu-miR-485-3p		10.437709	10.97313991
mmu-miR-6419		10.40004	10.93353561
mmu-miR-1930-5p		10.33602	10.86623313
mmu-miR-7029-5p		10.325006	10.85465524
mmu-miR-6948-3p		10.309509	10.83836325
mmu-miR-466l-3p		10.225097	10.74961958
mmu-miR-6951-3p		10.217052	10.74116222
mmu-miR-6945-3p		10.109244	10.6278252
mmu-miR-191-5p		10.061458	10.57758666
mmu-miR-202-3p		10.042399	10.55755238
mmu-miR-467a-3p		10.004693	10.51791108
mmu-miR-30b-3p		9.93144	10.44089876
mmu-miR-15a-3p		9.928957	10.43828939
mmu-miR-1904		9.898	10.40574389
mmu-miR-196a-2-3p		9.873756	10.38025514
mmu-miR-6979-3p		9.827303	10.33142105
mmu-miR-6345		9.790713	10.29295415
mmu-miR-539-5p		9.7777	10.27927351
mmu-miR-339-5p		9.754788	10.25518704
mmu-miR-3569-3p		9.724462	10.22330527
mmu-miR-6962-3p		9.715679	10.21407109
mmu-miR-6937-3p		9.710783	10.20892462
mmu-miR-3106-3p		9.703998	10.20178997
mmu-miR-466j		9.680906	10.17751329
mmu-miR-7041-3p		9.67664	10.17302831
mmu-miR-3068-5p		9.648834	10.14379788
mmu-miR-466n-5p		9.647016	10.14188138
mmu-miR-125b-2-3p		9.618956	10.11238646
mmu-miR-664-3p		9.616994	10.11032171
mmu-miR-133a-3p		9.599825	10.09227557
mmu-miR-615-3p		9.586848	10.07863182
mmu-miR-3073a-5p		9.584995	10.07668362

Name	発現量		倍率
	加熱HSA	AGEs	[AGEs/加熱HSA]
mmu-miR-208a-5p	50.570947		0.020788571
mmu-miR-7215-3p	35.126566		0.029928841
mmu-miR-6383	35.092304		0.029958066
mmu-miR-3060-5p	25.304302		0.041546205
mmu-miR-7006-5p	24.343775		0.043185476
mmu-miR-7679-3p	22.7012		0.046310219
mmu-miR-6896-5p	22.58435		0.04654983
mmu-miR-6941-3p	21.593324		0.048686243
mmu-miR-466i-5p	20.532266		0.051202228
mmu-miR-6935-3p	20.205391		0.052030548
mmu-miR-93-5p	19.576879		0.053700972
mmu-miR-5621-3p	19.536152		0.053812931
mmu-miR-7651-3p	19.252632		0.054605383
mmu-miR-2183	19.010981		0.05529951
mmu-miR-412-3p	18.948306		0.0554824
mmu-miR-181b-1-3p	18.654383		0.056356604
mmu-let-7c-5p	18.330136		0.057353514
mmu-miR-5046	17.802094		0.059054713
mmu-miR-7678-5p	17.380073		0.06048868
mmu-miR-5622-5p	17.04016		0.061695283
mmu-miR-7074-3p	16.898613		0.062212056
mmu-miR-467a-5p	16.713347		0.062901686
mmu-miR-138-2-3p	16.688406		0.062995693
mmu-miR-216a-3p	16.63698		0.063190417
mmu-miR-196b-3p	16.054693		0.065482259
mmu-miR-764-3p	15.967801		0.065838592
mmu-miR-3473d	15.787378		0.066591018
mmu-miR-466m-5p, mmu-	15.69786		0.066970772
mmu-miR-448-3p	15.691043		0.066999851
mmu-miR-200a-5p	15.129387		0.069487125
mmu-miR-6936-5p	15.020007		0.069993157
mmu-miR-497b	14.831809		0.070881277
mmu-miR-1951	14.612646		0.07194437
mmu-miR-6977-3p	14.603789		0.071988003
mmu-miR-291b-3p	14.495734		0.072524633
mmu-miR-6980-3p	14.442983		0.072789512
mmu-miR-7051-3p	14.397054		0.073021717
mmu-miR-6360	14.079036		0.074671142
mmu-miR-130c	14.07299		0.074703218
mmu-miR-3068-3p	14.032689		0.074917756
mmu-miR-6954-3p	13.861237		0.075844428
mmu-miR-873b	13.833547		0.075996237
mmu-miR-96-5p	13.801197		0.076174382
mmu-miR-7227-3p	13.713765		0.076660031
mmu-miR-3103-3p	13.482753		0.077973516
mmu-miR-20b-3p	13.468459		0.078056263
mmu-miR-6932-3p	13.213107		0.079564766
mmu-miR-1963	13.189012		0.079710114
mmu-miR-6933-3p	13.179737		0.079766213
mmu-miR-297c-5p	13.107261		0.080207275
mmu-miR-551b-3p	13.052423		0.080544261
mmu-miR-7060-3p	13.044891		0.08059078
mmu-let-7b-5p	13.000753		0.080864371
mmu-miR-1941-3p	12.919063		0.081375697
mmu-miR-7068-3p	12.671487		0.082965612

Table 3 AGEs により発現が 10 倍以上減少した miRNA

Table 3 (continued)

Name	発現量		倍率 [AGEs/加熱HSA]
	加熱HSA	AGEs	
mmu-miR-669a-3-3p	12.609536		0.083373222
mmu-miR-5099	12.492145		0.084156697
mmu-miR-700-5p	12.484012		0.084211507
mmu-miR-5104	12.464813		0.084341238
mmu-miR-195a-5p	12.443406		0.084486328
mmu-miR-7043-3p	12.434611		0.084546093
mmu-miR-24-2-5p	12.323746		0.085306661
mmu-miR-6956-3p	12.293665		0.085515408
mmu-miR-1843b-5p	12.273987		0.085652502
mmu-miR-342-3p	12.271596		0.085669192
mmu-miR-6928-3p	12.252398		0.085803422
mmu-miR-6974-3p	12.235895		0.085919154
mmu-miR-669a-5p, mmu-r	12.219507		0.086034374
mmu-miR-184-5p	12.216575		0.086055034
mmu-miR-6949-5p	12.188886		0.086250516
mmu-miR-7228-5p	12.187157		0.086262761
mmu-miR-466f-5p	12.135068		0.086633031
mmu-miR-7002-3p	12.124543		0.086708227
mmu-miR-8091	12.089322		0.086960835
mmu-miR-103-1-5p	12.083999		0.086999155
mmu-miR-1955-5p	12.053378		0.087220157
mmu-miR-302b-3p	11.923314		0.088171597
mmu-let-7a-5p	11.91458		0.088236232
mmu-miR-1298-3p	11.767649		0.089337946
mmu-miR-3089-5p	11.737324		0.089568782
mmu-miR-10b-5p	11.699773		0.08985624
mmu-miR-6537-3p	11.686499		0.089958324
mmu-miR-7657-3p	11.634349		0.090361542
mmu-miR-7243-5p	11.604931		0.090590608
mmu-miR-23a-3p	11.46541		0.091692987
mmu-miR-871-3p	11.416793		0.092083457
mmu-miR-7048-3p	11.32649		0.092817587
mmu-let-7d-5p	11.294262		0.093082457
mmu-miR-1954	11.29187		0.093102183
mmu-miR-193b-3p	11.283615		0.093170277
mmu-miR-9769-3p	11.248333		0.093462536
mmu-miR-1961	11.245401		0.093486885
mmu-miR-1839-3p	11.136684		0.094399531
mmu-miR-204-5p	11.054515		0.095101196
mmu-miR-6929-3p	11.049191		0.095147021
mmu-miR-23b-3p	10.907523		0.096382812
mmu-miR-106a-5p	10.897242		0.096473733
mmu-miR-466c-5p	10.855434		0.09684529
mmu-miR-20a-5p	10.735652		0.097925833
mmu-miR-154-3p	10.708982		0.098169712
mmu-miR-669d-2-3p	10.663176		0.098591426
mmu-miR-669i	10.646795		0.098743117
mmu-miR-7243-3p	10.592193		0.099252125

#### 4. まとめ

糖化ストレス(glycative stress)は還元糖やアルデヒドにより産生される AGEs による生体へのストレスと、その後の反応を総合的にとらえた概念である。糖化ストレスは、がん<sup>6)</sup>、アルツハイマー病<sup>7,8)</sup>、動脈硬化<sup>9)</sup>、糖尿病合併症<sup>10)</sup>、骨粗鬆症<sup>11)</sup>など様々な疾病に関与することが報告され

ている。本研究では、その中でも骨障害に関する研究を行ってきた。これまでに我々は、AGEs は骨代謝に重要な役割を持つ骨芽細胞・破骨細胞双方の分化を抑制することを報告してきたが、現在はさらに研究を進め、破骨前駆細胞から破骨細胞に至る過程への AGEs の寄与についてのメカニズムの解明を目指している。

我々は AGEs による破骨細胞分化抑制過程において、複数の分化に関わる遺伝子が抑制されていることを明らかにしており、本研究ではそのメカニズムに細胞外分泌小胞であるエクソソームが関わるとの仮説を立て、破骨前駆細胞に AGEs を添加した際に細胞外に放出されるエクソソームに含まれる miRNA について網羅的解析を行った。

対照として用いた加熱 HSA と比較すると、エクソソームに含まれる miRNA の発現レベルは大きく異なっており、これらが関与する可能性が示唆された。本研究結果は、細胞間シグナル伝達に関わるエクソソームを介して他の細胞・組織に破骨細胞分化の抑制を促し、結果、全身で破骨細胞の分化抑制、ひいては骨代謝の停滞に影響を与える可能性を示唆したと考えられる。今後は AGEs により発現抑制される破骨細胞分化関連遺伝子を制御する miRNA について *in silico* 解析を含めた更なる研究を行うことで、疾病との因果関係を明らかにし、将来的には発症前の初期マーカーとしての可能性などの検証につなげる。

#### 謝辞

本研究は、静岡理科大学 令和 2 年度個人研究推進支援費を受けて実施された。ここに記して謝意を表す。

#### 参考文献

- 1) P. Vestergaard, "Discrepancies in bone mineral density and fracture risk in patients with type 1 and type 2 diabetes--a meta-analysis", *Osteoporos Int.* 2007; 18(4): 427-44.
- 2) 厚生労働省, 国民健康・栄養調査, 2014
- 3) M. Saito, K. Marumo, "Collagen cross-links as a determinant of bone quality: a possible explanation for bone fragility in aging, osteoporosis, and diabetes mellitus", *Osteoporos. Int.* 2010; 18: 195-214
- 4) A.N.M. Mamun-Or-Rashid, W. Takabe, M. Yagi, Y. Yonei, "Glycated-HSA inhibits osteoclastogenesis in RAW264.7 cells depending on the glycosylating agents via downregulating RANKL-signaling.", *Glycative Stress Res.* 2017; 4: 217-231
- 5) P. Gerdhem, A. Isaksson, K. Akesson, K.J. Obrant, "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.
- 6) H. Kan, S. Yamagishi, A. Ojima, K. Fukami, S. Ueda, M. Takeuchi, H. Hyogo, H. Aikata, K. Chayama, “Elevation of Serum Levels of Advanced Glycation End Products in Patients With Non-B or Non-C Hepatocellular Carcinoma.”, *J. Clin. Lab. Anal.* 2015, 29, 480–484.
- 7) M.N. Zakaria, H.M. El-Bassossy, W. Barakat, “Targeting AGEs Signaling Ameliorates Central Nervous System Diabetic Complications in Rats.” *Adv. Pharmacol. Sci.* 2015, 346259.
- 8) M. Takeuchi, S. Yamagishi, “Possible involvement of advanced glycation end-products (AGEs) in the pathogenesis of Alzheimer’s disease.”, *Curr. Pharm. Des.* 2008, 14, 973–978.
- 9) M.S. Ward, A.K. Fortheringham, M.E. Cooper, J.M. Forbes, “Targeting advanced glycation endproducts and mitochondrial dysfunction in cardiovascular disease.”, *Curr. Opin. Pharmacol.* 2013, 13, 654–661.
- 10) H. Vlassara, G.E. Striker, “Advanced glycation endproducts in diabetes and diabetic complications.”, *Endocrinol. Metab. Clin. N. Am.* 2013, 42, 697–719.
- 11) S. Yamagishi, “Role of advanced glycation end products (AGEs) in osteoporosis in diabetes.”, *Curr. Drug Targets*, 2011, 12, 2096–2102.