

令和 3 年 6 月 28 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09123

研究課題名(和文)骨・肝・脂肪の臓器連関の視点からみた糖尿病性骨粗鬆症における組織因子の役割の解明

研究課題名(英文)Role of tissue factor in diabetic osteoporosis

研究代表者

辰巳 公平 (Tatsumi, Kohei)

奈良県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70555432

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、糖尿病による骨修復遅延における組織因子(TF)の役割を検討した。野生型およびTF欠損マウスにストレプトゾトシンを投与して糖尿病を誘発した。糖尿病誘発2週後に片側大腿骨に骨欠損を作成し、その骨修復過程をCTにて解析した。結果、糖尿誘発による骨密度低下の程度は両群間で有意差を認めなかったが、TF欠損状態は糖尿病における骨修復遅延を有意に増強した。マウスRAW264.7細胞の破骨細胞形成能はTF添加にて有意に抑制されたが、マウス骨芽細胞に対するTF添加の影響は確認されなかった。TFは、破骨細胞形成の抑制を介して、DMによる骨修復遅延を回復する方向に働く作用を有することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨粗鬆症患者は年々増加しており、その有効な治療法の確立が急務である。骨粗鬆症の原因は様々だが、糖尿病などの生活習慣病を基盤とした骨粗鬆症の診療の重要性が近年認識されてきた。糖尿病性骨粗鬆症については、有効な診断・治療を可能とするためには、その病態を分子レベルで解明することが必須である。本研究は、血液凝固反応の起始因子である組織因子(TF)に焦点をあて、TFが有する新規の生理的役割としての観点から骨粗鬆症病態の一端を解明することに成功した。本研究の成果は、糖尿病患者の骨折治療において骨修復を促進せしめる新規治療法もしくは新薬の開発に向けての重要な基盤となる知見を提供するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined the roles of tissue factor (TF) in delayed bone repair induced by diabetic state in mice using wild-type (WT) and low TF-expressing (LTF) mice. A diabetic state was induced by streptozotocin (STZ). A prolonged diabetic state significantly reduced bone mineral density (BMD) both in WT and LTF mice; these BMD parameters were similar between WT and LTF mice with or without STZ treatment. A diabetic state delayed bone repair following bone injury on the femoral bone in WT mice. Interestingly, a low level of TF was associated with further delay in bone repair in diabetes. In in vitro experiments, TF significantly decreased RANKL-induced osteoclast formation in RAW264.7 cells, whereas TF did not affect any gene expression levels in mouse primary osteoblasts. In conclusion, TF-induced suppression of bone remodeling might be involved in the protective effects of TF on delayed bone repair induced by a diabetic state.

研究分野：血栓止血学

キーワード：糖尿病性骨粗鬆症 骨修復 組織因子 破骨細胞

## 1. 研究開始当初の背景

本邦において骨粗鬆症患者は年々増加しており、その患者数は1300万人とも言われている。臨床研究により、1型・2型糖尿病患者では健常者に比し骨折リスクが有意に増加することが示され、近年では糖尿病の合併症の1つとしての骨粗鬆症が注目されている。糖尿病病態では、その基盤にインスリン作用不全、高血糖、Advanced glycation end products (AGEs) や酸化ストレスの増加が存在するものの、糖尿病骨粗鬆症の病態機序には未だ不明な点が多い。Tissue factor (TF) は、血液凝固外因系カスケードの最上流に位置する凝固因子であり、通常は血管外組織に存在し、炎症や組織損傷・出血を契機にして血中の活性化凝固第VII因子と結合することで凝固反応を開始する。TFは、血液凝固のみならず、細胞内シグナル・癌転移・血管新生など種々の生体反応に関連することが知られているが、骨代謝や骨修復におけるTFの果たす役割は調査した報告は稀である。

## 2. 研究の目的

本研究では、糖尿病による骨密度低下（糖尿病性骨粗鬆症）および骨修復遅延におけるTFの役割を解明することを目的に、マウスおよび培養細胞を用いた実験を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) Low-TF マウスについて

TF完全欠損マウス ( $mTF^{-/-}$ ) は胎生致死であるが、マウスTF遺伝子をノックアウトした上でヒトTFのminigeneを挿入することで正常の1-5%の活性レベルのTFが産生され、結果としてその個体は正常に出生できる。この微量のTF活性が残存するLow-TFマウス ( $mTF^{-/-}, hTF^{+/+}$ ) を本研究の実験に使用した。

### (2) 糖尿病の誘発

雄性の野生型およびLow-TFマウス(8-12週齢)に対して、膵β細胞に対して細胞毒性を發揮する薬剤であるストレプトゾトシン(STZ; Sigma, #S0130)を50mg/kg/回の用量で計4日間連日腹腔内投与することで糖尿病を誘発した。対照群には同用量のPBSを投与した。最終投与の4日後に、テールクリッピングにより得られた微量血液にて血糖測定(Glutest Ace、三和科学)を行い、300mg/dL以上の血糖値を示した個体を糖尿病と定義した。糖尿病誘導2週間後に、定量CT解析にて脛骨の骨密度を測定(糖尿病骨粗鬆症の評価)し、その後、片側大腿骨に骨欠損を作製し、その骨修復過程を定量CTにて画像解析した。

### (3) 血漿TF抗原量の定量

糖尿病誘導・非誘導のマウスの下大静脈から3.8%クエン酸加採血を行い、遠心後に得られた血漿検体を用いてマウスTF抗原量を定量した。定量には、Mouse Tissue Factor SimpleStep ELISA Kit (Abcam, Cambridge, UK)を用いた。

### (4) 定量CT解析 (quantitative computed tomography)

骨密度測定および骨欠損作成後の欠損孔の経時観察の目的で定量CT解析を実施した。CTは、Latheta LCT-200 X-ray CT system (Hitachi Aloka Medical)を使用した。撮影中は、2%イソフルランの吸入麻酔にてマウスを鎮静した。CTの撮影条件は、tube voltage 50 kVp、tube current 500  $\mu$ A、integration time 3.6 ms、axial field of view 48 mm、isotropic voxel size 48  $\mu$ mに固定した。骨密度の測定は、マウスの脛骨にて行った。海綿骨の骨密度測定は、脛骨上端

部（近位成長板よりやや遠位）にて実施し、皮質骨の骨密度測定は、脛骨中間部にて実施した。脛骨の全骨密度の測定は、近位成長板の遠位端から 9600- $\mu\text{m}$ （100 スライス）の範囲で行った。片側大腿骨への骨欠損作製後の CT 撮影については、撮影にて得られた画像を VGStudio MAX2.1 software (Nihon Visual Science, Tokyo, Japan)にて 3 次元構築し、骨欠損孔の面積をイメージ解析ソフト Latheta software (Hitachi Aloka Medical)にて定量した。

#### （５）骨欠損作製

マウスを 2%イソフルランにて麻酔の上、右後脚の大腿部前面中央部に 5 mm 皮膚切開を加え、四頭筋を鈍的に剥離して大腿骨を露出した。その後、round bur (Komet®, Germany)を用いて 10,000 rpm の回転数にて大腿骨に骨髄まで至らない深さで欠損孔を作製した後、皮膚を縫合した。

#### （６）破骨細胞形成実験

マウスマクロファージ細胞株である Raw264.7 細胞 (ATCC) およびマウス初代骨髄細胞を破骨細胞形成実験に使用した。Raw264.7 細胞は、96-well プレートに 500 cells/well の密度で播種し、50 ng/mL 濃度の receptor activator of nuclear factor  $\kappa\text{B}$  ligand (RANKL) (Wako Pure Chem) と 10%の FBS を含む  $\alpha$  MEM 培地にて 5 日間培養した。培養後、細胞を 10%ホルムアルデヒドで固定後に、TRAP/ ALP Stain kit (Wako Pure Chem)を用いて tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP)の免疫染色を行い、TRAP 陽性の多核細胞 (multinucleated cells; MNCs)を破骨細胞としてカウントした。初代骨髄細胞は、8-10 週齢の雄性マウスの脛骨から採取したものを使用した。非分画の全骨髄細胞を 96-well プレートに  $1 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup> の密度で播種し、50 ng/mL 濃度の macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) (Wako Pure Chem)を含有する  $\alpha$  MEM 培地 (10% FBS, 1% penicillin/streptomycin 含む)にて 3 日間培養した。その後、培地を、50 ng/mL 濃度の M-CSF と 50 ng/mL 濃度の RANKL を含有する培地に交換し、さらに 4-5 日間培養することで破骨細胞形成を誘導し、TRAP 陽性の MNCs を破骨細胞としてカウントした。これら細胞からの破骨細胞形成に及ぼす TF の効果を探索する目的で、破骨細胞形成誘導過程において培地内に各種濃度の lipidated recombinant human TF (Dade Innovin; Sysmex)を添加した。

#### （７）骨芽細胞実験

初代骨芽細胞は、日齢 3-6 の野生型新生仔マウスの頭蓋骨から樹立した。具体的には、外科的に採取した新生仔マウス頭蓋骨を 1 mg/mL 濃度のコラゲナーゼと 0.25%濃度のトリプシンにて消化し、得られた細胞を  $\alpha$  MEM 培地 (10% FBS, 1% penicillin/streptomycin 含む)にて培養し、2 回の継代を経た細胞を実験に使用した。アルカリフォスファターゼ (ALP) 活性を測定する目的で、細胞を 24-well プレートでコンフルエントになるまで培養した。培地交換してさらに 24 時間培養し、洗浄後に蒸留水にて溶解し超音波処理を行った。サンプルを遠心後、得られた上清にて laboratory assay ALP kit (Wako Pure Chemical)を用いて ALP 活性を定量した。また、補正用に全タンパク濃度を protein assay BCA kit (Wako Pure Chemical)にて定量し、ALP 活性は、U/total protein (mg)として算出した。また、骨芽細胞に対する TF の影響を探索する目的で、培地内に各種濃度の lipidated recombinant human TF を添加した。

## 4. 研究成果

### （１）糖尿病の誘発

STZ の投与により、野生型 (WT) マウス・Low-TF (LTF) マウスともに糖尿病化したが、糖尿病化後の体重変化の推移や血糖値において、両マウス群間で有意な差は認めなかった (図 1)。また、WT マウスにおいて、糖尿病化 2 週後に血漿中の TF 抗原量は、非糖尿病マウスに比べ有意に増加していた。なお、LTF マウスにおける TF 抗原量は、糖尿病誘発群においても検出下限であった。

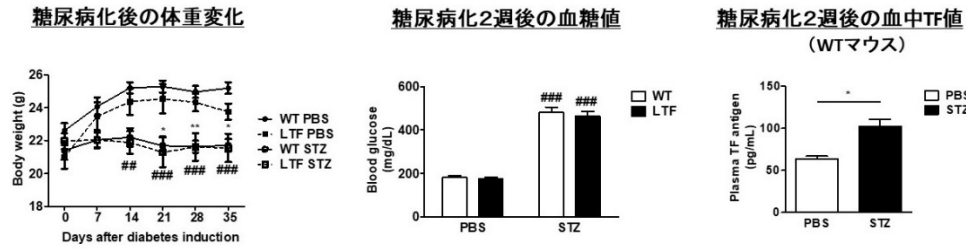


図1. ストレプトゾトシン投与による糖尿病の発症

(2) 糖尿病性骨粗鬆症の評価

糖尿病化2週間後に、脛骨のCT撮影にて骨密度の定量評価を行った。結果、WTマウス・LTFマウスともに、糖尿病化により全骨密度および海綿骨骨密度が有意に低下していた(図2)。しかし、その低下度合いについてWT・LTF間で有意差は認めなかった。

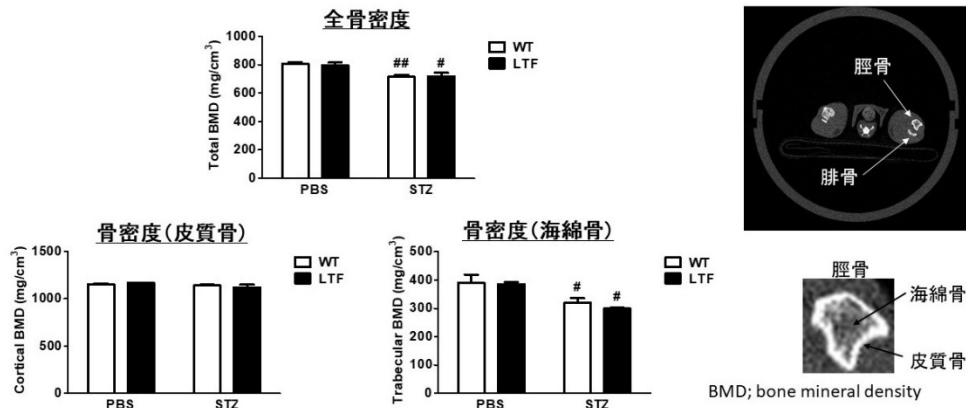


図2. 糖尿病化2週後の骨密度測定(脛骨)

(3) 骨欠損作製後の骨修復過程の評価

糖尿病化したマウスの片側大腿骨に骨欠損を作製し、欠損孔の面積を定量することで骨修復過程を経時モニタリングした。骨欠損作製7日目において、糖尿病マウスは非糖尿病マウスに比べ、欠損部位の面積が有意に大きく、骨修復が有意に遅延することが示された(図3)。また、その遅延度合いは、WTよりもLTFの方が有意に大きかった。すなわち、TF欠損状態では糖尿病による骨修復遅延がさらに増悪することが示唆された。

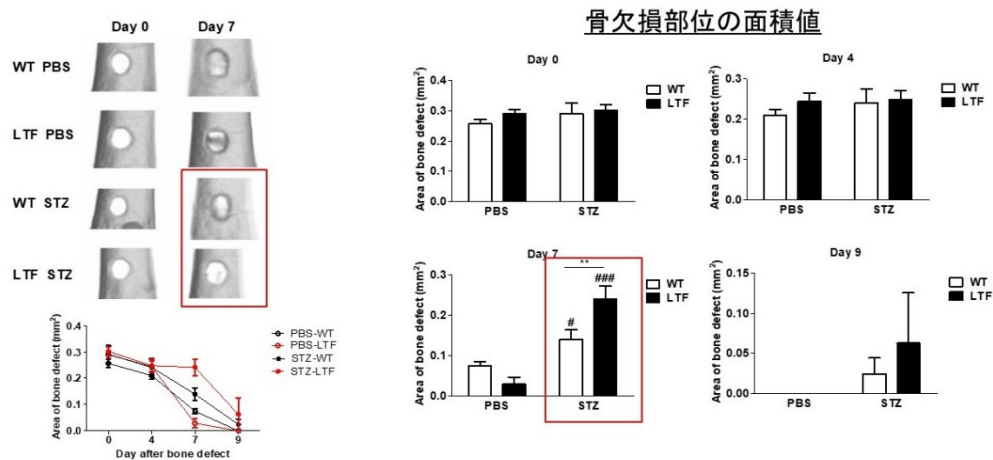


図3. 骨損傷後の骨修復過程モニタリング(大腿骨)

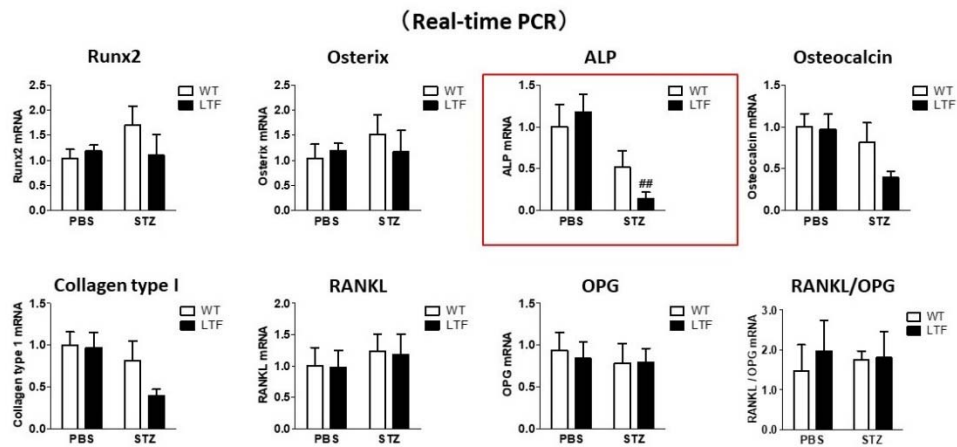


図4. 骨損傷7日後の受傷骨での骨代謝関連遺伝子の発現

#### (4) 破骨細胞形成に及ぼす TF の影響

Raw264.7 細胞およびマウス骨髄細胞を使用して破骨細胞形成を評価した。両細胞ともに、RANKL を添加することで明瞭な破骨細胞形成が誘導された。しかし、培地内に TF が存在することで、その誘導効率が Raw264.7 細胞では TF 用量依存性に有意に抑制され、マウス骨髄細胞でも抑制される傾向が確認された (図5)。さらに、Raw 264.7 細胞では、TRAP やカテプシン K などの破骨細胞関連遺伝子の発現も、TF 添加にて有意に抑制されることが確認された。なお、この破骨細胞形成過程において、細胞自体が発現する TF の発現量には変化は見られなかった。

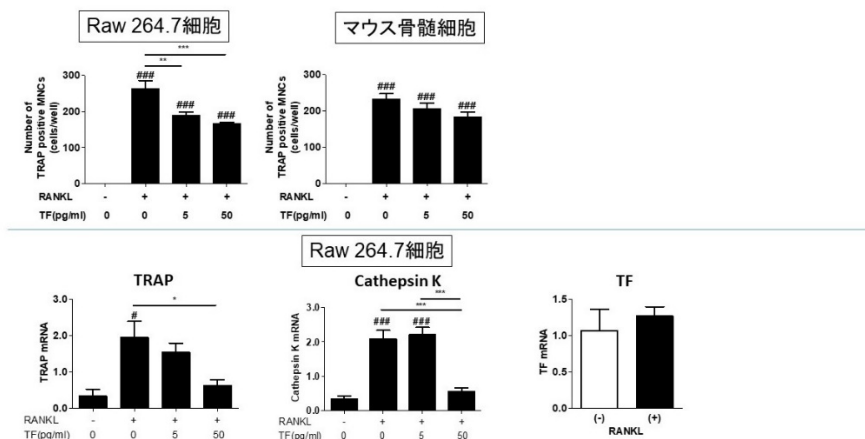


図5. 破骨細胞を用いたin vitro検討(破骨細胞形成実験)

#### (5) 骨芽細胞に及ぼす TF の影響

新生仔マウスの頭蓋骨から樹立した初代骨芽細胞を用いた検討を行った。樹立した細胞を培養下で各種濃度の TF を添加して一定期間培養後に各種の骨代謝関連マーカーの遺伝子発現と ALP 活性を定量したが、有意な変動を示すものは認めなかった。

以上の実験結果から、TF は、高血糖状態ではその血中濃度が増加し、糖尿病による骨修復遅延を是正する方向に働く作用を有することが示唆された。培養細胞を用いた検討にて、TF が骨吸収系への抑制作用を示したことから、Low-TF マウスにおいては、TF 活性低下により骨修復の骨リモデリングにおける骨吸収の優位性が増加し、結果として糖尿病による骨修復遅延が増強される結果となった可能性が考えられた。すなわち、TF 発現を増強させることが、糖尿病における骨修復遅延の改善につながる可能性がある。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 9件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takafuji Yoshimasa, Tatsumi Kohei, Kawao Naoyuki, Okada Kiyotaka, Muratani Masafumi, Kaji Hiroshi	4. 巻 16
2. 論文標題 Effects of fluid flow shear stress to mouse muscle cells on the bone actions of muscle cell-derived extracellular vesicles	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0250741
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0250741	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Takafuji Yoshimasa, Tatsumi Kohei, Kawao Naoyuki, Okada Kiyotaka, Muratani Masafumi, Kaji Hiroshi	4. 巻 108
2. 論文標題 MicroRNA-196a-5p in Extracellular Vesicles Secreted from Myoblasts Suppresses Osteoclast-like Cell Formation in Mouse Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Calcified Tissue International	6. 最初と最後の頁 364 ~ 376
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00223-020-00772-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Takafuji Yoshimasa, Tatsumi Kohei, Ishida Masayoshi, Kawao Naoyuki, Okada Kiyotaka, Kaji Hiroshi	4. 巻 134
2. 論文標題 Extracellular vesicles secreted from mouse muscle cells suppress osteoclast formation: Roles of mitochondrial energy metabolism	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bone	6. 最初と最後の頁 115298 ~ 115298
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bone.2020.115298	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ishida Masayoshi, Tatsumi Kohei, Okumoto Katsumi, Kaji Hiroshi	4. 巻 29
2. 論文標題 Adipose Tissue-Derived Stem Cell Sheet Improves Glucose Metabolism in Obese Mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Stem Cells and Development	6. 最初と最後の頁 488 ~ 497
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/scd.2019.0250	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takafuji Yoshimasa, Tatsumi Kohei, Ishida Masayoshi, Kawao Naoyuki, Okada Kiyotaka, Matsuo Osamu, Kaji Hiroshi	4. 巻 234
2. 論文標題 Plasminogen activator inhibitor 1 deficiency suppresses osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells in mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Cellular Physiology	6. 最初と最後の頁 9687 ~ 9697
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jcp.27655	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ishida Masayoshi, Kawao Naoyuki, Okada Kiyotaka, Tatsumi Kohei, Sakai Kazuko, Nishio Kazuto, Kaji Hiroshi	4. 巻 159
2. 論文標題 Serpina3n, dominantly expressed in female osteoblasts, suppresses the phenotypes of differentiated osteoblasts in mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Endocrinology	6. 最初と最後の頁 3775-3790
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1210/en.2018-00639	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Moritake Akihiro, Kawao Naoyuki, Okada Kiyotaka, Ishida Masayoshi, Tatsumi Kohei, Matsuo Osamu, Akagi Masao, Kaji Hiroshi	4. 巻 29
2. 論文標題 Plasminogen activator inhibitor-1 is involved in interleukin-1 -induced matrix metalloproteinase expression in murine chondrocytes	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Modern Rheumatology	6. 最初と最後の頁 959 ~ 963
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/14397595.2018.1525018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Okada Kiyotaka, Kawao Naoyuki, Tatsumi Kohei, Ishida Masayoshi, Takafuji Yoshimasa, Kurashimo Shinzi, Okumoto Katsumi, Kojima Kotaro, Matsuo Osamu, Kaji Hiroshi	4. 巻 8
2. 論文標題 Roles of plasminogen in the alterations in bone marrow hematopoietic stem cells during bone repair	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Bone Reports	6. 最初と最後の頁 195 ~ 203
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bonr.2018.04.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shimoide Takeshi, Kawao Naoyuki, Tamura Yukinori, Okada Kiyotaka, Horiuchi Yoshitaka, Okumoto Katsumi, Kurashimo Shinji, Ishida Masayoshi, Tatsumi Kohei, Matsuo Osamu, Kaji Hiroshi	4. 巻 159
2. 論文標題 Role of Macrophages and Plasminogen Activator Inhibitor-1 in Delayed Bone Repair in Diabetic Female Mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Endocrinology	6. 最初と最後の頁 1875 ~ 1885
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1210/en.2018-00085	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kawao Naoyuki, Moritake Akihiro, Tatsumi Kohei, Kaji Hiroshi	4. 巻 103
2. 論文標題 Roles of Irisin in the Linkage from Muscle to Bone During Mechanical Unloading in Mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Calcified Tissue International	6. 最初と最後の頁 24 ~ 34
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00223-018-0387-3	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計6件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 辰巳 公平、江原 裕基、河尾 直之、石田 昌義、高藤 義正、岡田 清孝、Nigel Mackman、嶋 緑倫、梶 博史
2. 発表標題 糖尿病による骨修復遅延におけるtissue factorの関与
3. 学会等名 第43回 日本血栓止血学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kohei Tatsumi, , Hiroki Ehara, Yoshimasa Takafuji, Naoyuki Kawao, Masayoshi Ishida, Kiyotaka Okada, Nigel Mackman, Midori Shima, Hiroshi Kaji
2. 発表標題 Role of tissue factor in delayed bone repair induced by diabetic state in mice
3. 学会等名 The XXIX Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis
4. 発表年 2021年



1. 発表者名 江原裕基、辰巳公平、榎本明史、五十嵐善彦、梶博史、濱田傑
2. 発表標題 糖尿病におけるインプラント埋入後の骨修復遅延への凝固因子の関与
3. 学会等名 第50回 日本口腔インプラント学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高藤義正、辰巳公平、石田昌義、河尾直之、岡田清孝、梶博史
2. 発表標題 Roles of extracellular vesicles secreted from mouse muscle cells in muscle-bone interactions
3. 学会等名 第97回 日本生理学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高藤義正、辰巳公平、石田昌義、河尾直之、岡田清孝、梶博史
2. 発表標題 骨修復関連細胞に対する筋芽細胞由来細胞外小胞の作用
3. 学会等名 第19回 日本再生医療学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 江原裕基、辰巳公平、河尾直之、石田昌義、高藤義正、岡田清孝、川口美紅、Nigel Mackman、梶博史
2. 発表標題 糖尿病による骨修復遅延におけるtissue factor(TF)の関与
3. 学会等名 第38回 日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------