

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08195

研究課題名(和文) 糖尿病による骨/骨髄相互連関の幹細胞分化誘導障害における線溶系因子の役割の解明

研究課題名(英文) The role of fibrinolytic system during bone repair in diabetes mic

研究代表者

岡田 清孝 (OKADA, Kiyotaka)

近畿大学・医学部・准教授

研究者番号：20185432

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：骨損傷後の修復過程で線溶系因子であるプラスミノゲン(Plg)の関与が考えられる。本研究は、骨損傷早期の骨髄造血幹細胞の誘導における組織線溶系の関与について検討した。Plg欠損は、骨損傷後の修復を遅延させ、SDF-1とTGF- $\beta$ 1発現増加を阻害した。さらに、野生型マウスに対するTGF- $\beta$ 1シグナル阻害剤投与は、骨損傷で誘導される骨髄HSC数の低下を阻害した。さらに、骨損傷により誘導されるSDF-1発現増加を抑制した。以上より、骨損傷後の骨修復早期における骨局所への骨髄からのHSC誘導に、組織線溶系により誘導されるTGF- $\beta$ 1とそれに続く骨損傷部のSDF-1が関与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We previously revealed that stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) is involved in the changes in the number of bone marrow stem cells during the bone repair process in mice. Moreover, we reported that plasminogen (Plg) deficiency delays bone repair. We investigated the roles of Plg in the changes in bone marrow stem cells during bone repair. Plg deficiency significantly blunted a decrease in the number of HSCs after bone injury in mice. Plg deficiency significantly blunted the number of SDF-1- and Osterix-double-positive cells in the endosteum around the lesion as well as mRNA levels of SDF-1 and transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) elevated by bone injury. TGF- $\beta$ 1 signaling inhibition significantly blunted a decrease in the number of HSCs after bone injury. The present study showed that Plg is critical for the changes in bone marrow HSCs, TGF- $\beta$ 1 and SDF-1 at the damaged site during bone repair in mice.

研究分野：医歯薬学

キーワード：骨修復 SDF-1 プラスミノゲン 骨髄幹細胞 組織線溶

## 1. 研究開始当初の背景

骨組織では、骨芽細胞と破骨細胞により常にリモデリングを行っている。われわれは、これまで骨芽細胞による骨形成機構、骨形成促進剤開発の標的分子の検索などの研究を進めてきた。また、骨には骨髄組織があり、造血幹細胞 (HSC) や間葉系幹細胞 (MSC) が存在し、必要に応じて分化誘導して末梢血や各組織へ動員される。しかし、骨損傷後の骨再生修復時の骨組織と骨髄幹細胞との関係については不明な点が多い。そこで、マウス骨損傷モデルで骨髄細胞を予備検討したところ、骨髄幹細胞の挙動に特異的な変化を認め、さらに、その挙動にstromal cell derived factor 1 (SDF-1; CXCL12) とその受容体CXCR4の関与を推測させる結果を得た。SDF-1は骨組織において骨芽細胞やCXCL12-abundant reticular (CAR) 細胞が発現し幹細胞のCXCR4に結合してその制御因子として働くことが報告されている (Nature 466:829-834, 2010)。また、骨髄内には造血至適微細環境 (ニッチ) が存在する。造血幹細胞は、骨内膜ニッチで骨芽細胞とインテグリンを介して結合し静止状態に維持されている。ニッチ領域の造血幹細胞の分化誘導には、インテグリンからの解離や細胞外基質 (ECM) の分解が必要とされ、この反応に線溶系因子のplasmin とMMP-9が関与することが報告されている (Cell Stem Cell 2007)。われわれは、このplasminの酵素前駆体であるplasminogen (Plg) の遺伝子欠損 (KO) マウスを用いて骨欠損モデルで検討したところ、修復に関わるマクロファージの減少を伴う著しい骨再生遅延を示した。また、線溶系因子のKOマウスの解析から、線溶系因子が細胞の遊走、浸潤、転移や血管新生、さらには組織修復・再生などに組織線溶として重要な役割を果たすことを解明してきた。

一方、糖尿病は骨粗鬆症を誘発し、骨折リスクを高める一要因とされている。さらに、糖尿病病態では、骨髄間葉系幹細胞の分化・動員異常で骨折後の骨軟骨修復障害が起こることが知られている。最近、われわれは、糖尿病による骨粗鬆症の病態機序に線溶系因子のPlg activator inhibitor-1 (PAI-1) が重要な役割を果たすことを報告した。

## 2. 研究の目的

骨軟骨再生過程での骨と骨髄との相互連関による骨髄幹細胞の分化誘導機構を解明し、その機構における組織線溶の役割を明らかにする。また、糖尿病による骨損傷後の骨修復異常を解明する。

## 3. 研究の方法

### 1) 実験動物

PlgKO マウスとその野生型 (PlgWT) マウスは、8-10週令を使用した。また、PAI-1KO マウスとその野生型 (PAI-1WT) マウスは、8週令の雌を使用した。両KOマウスはD.Collen教授 (University of Leuven,

Belgium) より供与頂いた。

### 2) マウス骨損傷モデル

マウスを麻酔下で右大腿骨にドリルで直径0.9mmの骨損傷を作製し、骨損傷モデルを作成した。

### 3) マウス糖尿病モデル

マウスに膵β細胞に選択毒性をもつストロプトゾトシン (STZ, Sigma) (50 mg/kg 体重) を腹腔内4日間連続投与して、糖尿病を誘発した。STZ投与から4日後に随時血糖値が300 mg/dL以上を糖尿病とみなした。糖尿病を誘発して2週間後のマウスを実験に使用した。

### 4) 定量computed tomography (qCT) 解析

マウスを2%イソフルランによって麻酔後、大腿骨損傷部をX-ray CT system (Latheta LCT200; Hitachi Aloka Medical, Tokyo, Japan) を用いてスキャンした。3DCT画像の構築はVGS MAX2.2 softwareを用いて行った。大腿骨損傷部の面積は、イメージ解析ソフトImage Jを用いて解析した。

### 5) 骨髄幹細胞解析

マウスの骨髄間質細胞を大腿骨より採取し、等量のFiccol-Paque PLUS (GE Healthcare Bio-Sciences, Sweden) 上に重層後、630 gで15分間遠心し、中間層の細胞を得た。この細胞を造血幹細胞と間葉系幹細胞の色素標識した表面マーカー蛋白の抗体を反応させ、FACS AriaII cell sorter (BD Biosciences, USA) を用いて解析した。

### 6) 組織免疫学的解析

骨損傷後、14日までの経時的マウスから麻酔科で大腿骨採取した。大腿骨は4%パラホルムアルデヒドで固定後、24時間脱灰処理し、パラフィンにて切片を作製した。作製した大腿骨切片を用いて組織免疫学的解析を行った。

### 7) 遺伝子発現解析

マウス大腿骨中の各遺伝子発現はFast SYBR GREEN PCR Master Mix (Life Technologies Japan, Tokyo, Japan) を用いてStepOne Plus cyclorで解析した。大腿骨検体を液体窒素中で破碎後、RNeasy mini kit (Qiagen, Tokyo, Japan) を用いてRNAを抽出した。

### 8) 統計解析

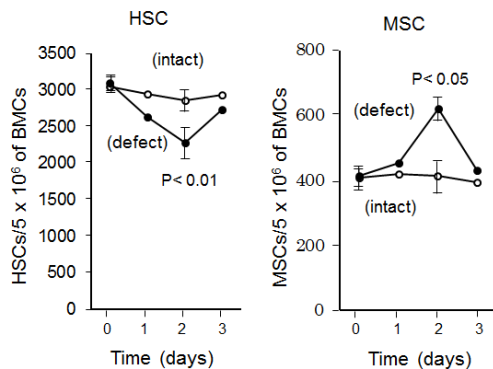
データは平均値±標準誤差で表した。統計学的有意差検定はunpaired t-test とANOVAを用いて行った。

## 4. 研究成果

### 1) 骨損傷後の修復過程における骨髄幹細胞骨髄幹細胞解析

マウスの骨損傷後の骨髄幹細胞の変化を

FACS で解析した。骨損傷 2 日後の損傷部位の幹細胞数は、HSC が有意に低下し、MSC が有意に増加した。これに対し、非損傷大腿骨中の幹細胞数は変化しなかった。



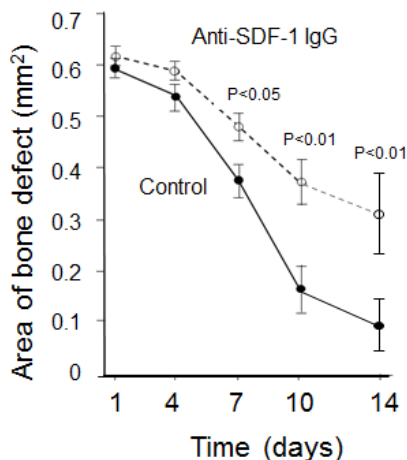
### SDF-1 発現

骨損傷後の SDF-1 発現を免疫染色法と RT-PCR 法で解析した。SDF-1 のタンパク質発現は、損傷後 1 および 2 日に骨損傷部位周囲で増加した。骨損傷 2 日後の SDF-1 発現細胞は、損傷部数位の骨内膜で見られ、osterix 陽性であった。

また、SDF-1 mRNA 発現は、骨損傷 2 日後の損傷大腿骨で増加したが、非損傷大腿骨では変化しなかった。

### SDF-1/CXCR-4 系阻害

骨損傷後の修復過程における SDF-1/CXCR-4 系の役割について、SDF-1 中和抗体 (R&D Systems, USA) 局所投与または CXCR-4 アンタゴニスト (AMD3100; Sigma-Aldrich, UK) の腹腔内投与で検討した。中和抗体または ADM の投与マウスは、骨損傷後の修復が遅延した。さらに、これらのマウスは、骨髄幹細胞数変化が抑制された。



## 2) 骨損傷後の修復過程における組織線溶

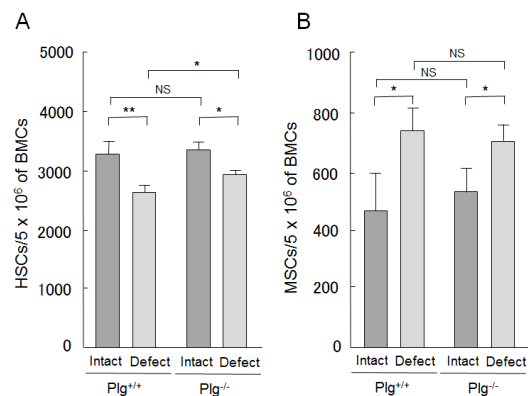
### 骨損傷後の修復過程

PlgK0 マウスの骨損傷後の修復は、PlgWT マウスに比べて有意に遅延した。

また、PAI-1K0 マウスの骨損傷後の修復は、PAI-1WT マウスに比べて有意に促進した。

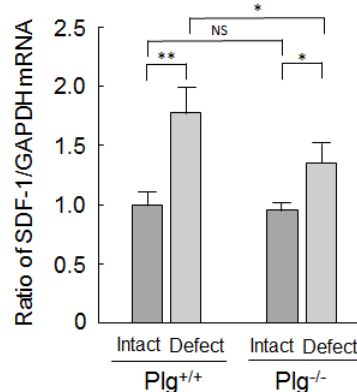
### 骨髄幹細胞解析

骨損傷 2 日後に誘導される HSC 数の低下は、PlgK0 マウスで抑制された。これに対し、骨損傷 2 日後に誘導される MSC 数の増加は、PlgK0 と PlgWT で差はなかった。



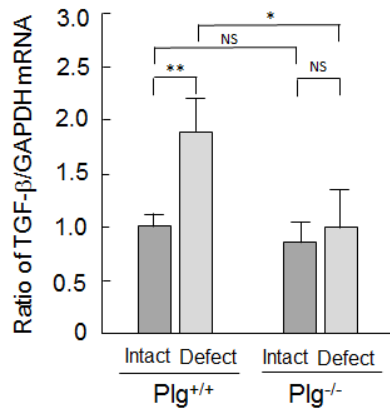
### SDF-1 発現

骨損傷で誘導される SDF-1 発現は、骨損傷部位の免疫染色および RT-PCR とともに PlgK0 マウスで抑制された。



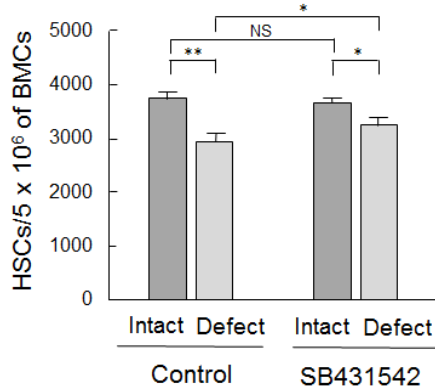
### TGF-β発現

PlgWT マウスの骨損傷後の損傷部位での TGF-β発現は、非損傷部位に比べて有意に増加した。また、骨損傷により誘導される TGF-β発現の増加は、PlgK0 マウスで抑制された。



#### TGF-βシグナル伝達阻害

PlgWT マウスへの TGF-βシグナル伝達阻害剤 (SB431542; Sigma-Aldrich, UK) の腹腔内投与は、骨損傷後の修復を遅延させた。また、TGF-βシグナル伝達阻害剤の投与は、骨損傷で誘導される HSC 数の低下と SDF-1 発現の増加を抑制した。



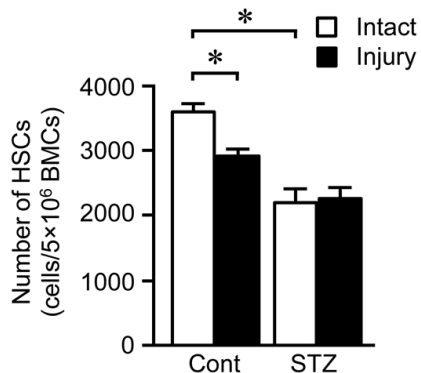
### 3) 糖尿病誘発モデル

#### 骨損傷後の修復過程

糖尿病誘発マウスの骨損傷後の修復は、対照マウスに比べて有意に遅延した。

#### 骨髄幹細胞解析

糖尿病誘発マウスの骨髄 HSC 数は、対照マウスに比べ有意に低下した。また、骨損傷 2 日後に誘導される HSC 数の低下は、糖尿病誘発マウスで抑制された。



## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者を及び連携研究者には下線)

(雑誌論文)(計 10 件)

Okada K, Kawao N, Tatsumi K, Ishida M, Takafuji Y, Kurashimo S, Okumoto K, Kojima K, Matsuo O, Kaji H. Roles of plasminogen in the alterations in bone marrow hematopoietic stem cells during bone repair. *Bone Rep* 2018; 8: 195–203. DOI:10.1016/j.boner.2018.04.005 査読有

Shimoide T, Kawao N, Tamura Y, Okada K, Horiuchi Y, Okumoto K, Kurashimo S, Ishida M, Tatsumi K, Matsuo O, Kaji H. Role of macrophages and plasminogen activator inhibitor-1 in delayed bone repair in diabetic female mice. *Endocrinology* 2018;159:1875–1885. DOI:10.1210/en.2018-00085. 査読有

Tamura Y, Kawao N, Shimoide T, Okada K, Matsuo O, Kaji H. Role of plasminogen activator inhibitor-1 in glucocorticoid-induced muscle change in mice. *J Bone Miner Metab* 2018;36:148–156. DOI:10.1007/s00774-017-0825-8. 査読有

Okada K, Kojima K, Okumoto K, Kawao N, Matsuo O, Kaji H. A synthetic peptide derived from staphylokinase enhances FGF-2-induced skin wound healing in mice. *Thromb Res* 2017; 157: 7–8. DOI:10.1016/j.thromres.2017.06.032. 査読有

Moritake A, Kawao N, Okada K, Tatsumi K, Ishida M, Okumoto K, Matsuo O, Akagi M, Kaji H. Plasminogen activator inhibitor-1 deficiency enhances subchondral osteopenia after induction of osteoarthritis in mice. *BMC Musculoskelet Disord* 2017; 18: 392. DOI:10.1186/s1289-017-1752-5. 査読有

Okada K, Kawao N, Yano M, Tamura Y, Kurashimo S, Okumoto K, Kojima K, Kaji H. Stromal cell-derived factor-1 mediates changes of bone marrow stem cells during bone repair process. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2016; 310: E15–23. DOI:10.1152/ajpendo.00253.2015. 査読有

Kawao N, Yano M, Tamura Y, Okumoto K, Okada K, Kaji H. Role of osteoclasts in the heterotopic ossification enhanced by fibrodysplasia ossificans progressiva-related activin-like kinase 2 mutation in mice. *J Bone Miner Metab* 2016; 34: 517–525. DOI:10.1007/s00774-015-0701-3. 査読有

Shiomi A, Kawao N, Yano M, Okada K, Tamura Y, Okumoto K, Matsuo O, Kaji H.  $\alpha_2$ -Antiplasmin is involved in bone loss induced by ovariectomy in mice. *Bone* 2015;79:233-241. DOI:10.1016/j.bone.2015.06.009. 査読有

Kawao N, Tamura Y, Horiuchi Y, Okumoto K, Yano M, Okada K, Matsuo O, Kaji H. The tissue fibrinolytic system contributes to the induction of macrophage function and CCL3 during bone repair in mice. *PLoS One* 2015;10:e0123982. DOI:10.1371/journal.pone.0123982. 査読有

Tamura Y, Kawao N, Yano M, Okada K, Okumoto K, Chiba Y, Matsuo O, Kaji H. Role of plasminogen activator inhibitor-1 in glucocorticoid-induced diabetes and osteopenia in mice. *Diabetes* 2015; 64: 2194-2206. DOI:10.2337/ab14-1192. 査読有

[学会発表](計8件)

岡田清孝、河尾直之、児嶋耕太郎、蔵下伸治、奥本勝美、辰巳公平、石田昌義、松尾理、梶博史。骨損傷後の骨髄造血幹細胞変化におけるプラスミノゲン/SDF-1/TGF-系の役割。第17回日本再生医療学会総会。(横浜)2018。

下出孟史、田村行識、岡田清孝、河尾直之、蔵下伸治、奥本勝美、辰巳公平、石田昌義、梶博史。造血幹細胞・マクロファージは糖尿病による骨修復遅延に関与する。第35回日本骨代謝学会学術集会。(福岡)2017。

岡田清孝、河尾直之、児嶋耕太郎、蔵下伸治、奥本勝美、辰巳公平、石田昌義、松尾理、梶博史。骨損傷により誘導される骨髄造血幹細胞変化におけるSDF-1とプラスミノゲンの連関。第16回日本再生医療学会総会。(仙台)2017。

児嶋耕太郎、岡田清孝、河尾直之、蔵下伸治、奥本勝美、辰巳公平、石田昌義、松尾理、梶博史。Roles of plasminogen in the alterations in bone marrow hematopoietic stem cells during bone repair. 第94回日本生理学会大会。(浜松)2017。

岡田清孝、河尾直之、児嶋耕太郎、蔵下伸治、奥本勝美、田村行識、下出孟史、松尾理、梶博史。骨損傷後のSDF-1による骨髄造血幹細胞誘導におけるプラスミノゲンの関与。第34回日本骨代謝学会学術集会。(大阪)2016。

岡田清孝、河尾直之、田村行識、皆島 健、

蔵下伸治、奥本勝美、児嶋耕太郎、梶博史。骨修復再生過程における骨髄幹細胞の役割。第93回日本生理学会大会。(札幌)2016。

岡田清孝、河尾直之、田村行識、矢野昌人、蔵下伸治、奥本勝美、児嶋耕太郎、梶博史。骨修復過程に誘導される骨髄幹細胞変化とSDF-1の役割。第33回日本骨代謝学会学術集会。(東京)2015。

岡田清孝、河尾直之、田村行識、矢野昌人、蔵下伸治、奥本勝美、児嶋耕太郎、梶博史。骨修復・再生過程における骨髄幹細胞の役割。第36回日本炎症・再生医学会。(東京)2015。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡田 清孝 (OKADA, Kiyotaka)  
近畿大学・医学部・准教授  
研究者番号：20185432

(2) 研究分担者

河尾 直之 (KAWAO, Naoyuki)  
近畿大学・医学部・講師  
研究者番号：70388510

梶 博史 (KAJI, Hiroshi)  
近畿大学・医学部・教授  
研究者番号：90346255