

令和元年9月3日現在

機関番号：34509

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10924

研究課題名(和文)肝-筋-骨ネットワークを介した骨代謝異常と糖・脂質代謝異常の相互増幅機構の解明

研究課題名(英文) Roles of interaction between liver, muscle and bone in the maintaining bone and glucose/lipid metabolism.

研究代表者

田村 行識 (TAMURA, Yukinori)

神戸学院大学・栄養学部・講師

研究者番号：40580262

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、糖尿病病態やグルココルチコイド(GC)投与に伴う筋骨格系の異常に対する筋と骨の臓器連携の破綻の関与について検討を行った。GC投与と糖尿病に伴って、筋組織における筋-骨連携に関与する因子の発現が減少したことから、筋-骨連携の障害が示唆された。さらに、GC投与による筋-骨連携障害の機序として、脂肪組織や筋肉での産生・分泌が増加する液性因子のPAI-1が関与していることが明らかとなった。さらに、本研究によりビタミンD欠乏が、糖尿病における筋-骨連携の障害を増強することが示唆され、ビタミンD補充などの栄養学的な介入が筋-骨連携の調節を介して筋骨格系の異常を改善・予防しうる可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖尿病患者とGC投与患者では、糖代謝異常および筋骨格系異常が同時に引き起こされるが、その複雑な病態の解明には、様々な臓器の連携機構の理解が必要である。本研究では、糖尿病病態およびGC投与下における筋骨格系の異常に、筋と骨の臓器連携障害が関与しており、その臓器連携障害に、脂肪組織などの他の臓器から分泌される液性因子が関与する可能性を見出した。このような多臓器の連携障害の改善は、複数の代謝異常を同時に改善する可能性を有しているため、本研究で明らかとなった液性因子(PAI-1)や栄養学的要因(ビタミンD欠乏)を標的とした糖代謝異常と筋骨格系異常に対する効果的な予防・治療法の確立が今後期待できる。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we examined the role of impaired the interaction between muscle and bone in the development of musculoskeletal disorders induced by diabetes and glucocorticoid (GC) treatment. We found that glucocorticoid treatment and diabetic state decreased the expression of muscle-derived osteogenic factor in muscle tissue of mice, suggesting an impaired bone and muscle interaction. We also showed that plasminogen activator inhibitor-1(PAI-1) derived from adipose tissue and muscle was involved in the bone and muscle interaction impaired by GC treatment. Moreover, we revealed that vitamin D deficiency aggravated muscle atrophy and impairment of bone and muscle interaction in diabetic mice, suggesting that nutritional intervention can prevent musculoskeletal disorders through regulating the muscle and bone interaction.

研究分野：病態生理学

キーワード：糖尿病 グルココルチコイド 筋萎縮 骨粗鬆症 糖代謝異常 臓器連携

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

## 1. 研究開始当初の背景

近年、糖尿病病態に伴う合併症として、筋萎縮や骨粗鬆症などの筋骨格系の異常が引き起こされることが明らかとなってきたり、糖代謝異常と筋骨格系異常の相互関連性が注目されている。また、グルコルチコイド（GC）投与患者においても、糖代謝異常と筋萎縮、骨代謝異常の3者が同時に引き起こされることが知られている。これらの代謝異常の発症においては、様々な臓器連携の破綻が関与していることが考えられるが、詳細な機序については明らかではない。

筋肉は、糖代謝を担うインスリン感受性臓器として重要であることはよく知られている。以前より筋肉量と骨量は正相関することが報告されており、筋肉と骨代謝が関連していることが示唆されてきたが、その機序は不明であった。これまで、私共の研究グループでは、Osteoglycin や FAM5c といった筋細胞から分泌される新規の骨形成促進液性因子を見出し、筋細胞による直接的な骨代謝の調節機構が存在することを示してきた(Tanaka et al. *J Biol Chem.* 2011, BBRC 2012)。しかし、糖尿病病態や、グルコルチコイド投与が、筋と骨の臓器連携に与える影響は不明なままである。

私共は、ストレプトゾトシン誘導性糖尿病モデルマウスを用いた研究において、肝臓で産生が増加する線溶系阻害因子の Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) が、糖尿病に伴う骨粗鬆症の発症に関与していることを明らかにしてきた (Tamura et al. *Diabetes* 2013)。また、PAI-1 遺伝子欠損マウスを用いた検討により、GC 投与に伴って脂肪組織および筋肉で産生が増加する PAI-1 が糖代謝異常と筋萎縮、骨粗鬆症に関与していることを明らかにしてきた (Tamura et al 2015)。これらの研究で、PAI-1 を介した臓器連携の異常が、糖尿病性骨粗鬆症およびグルコルチコイド投与による筋骨格系の異常に関与していることを見出したが、その機序の詳細や、PAI-1 が筋-骨連携に及ぼす影響については不明なままである。

また私共は、糖尿病に伴う筋骨格系の異常に対する栄養学的予防法の探索を目的として、ビタミン D に着目して研究を行ってきた。ビタミン D は、筋肉と骨の機能維持に重要な微量栄養素であり、これまでに私共は、ビタミン D 欠乏が、糖尿病性骨粗鬆症を増強することをマウスにおいて示してきた (Mao, Tamura et al. *Bone* 2014)。しかし、糖尿病病態においてビタミン D 欠乏が、筋萎縮と筋-骨連携に及ぼす影響については不明である。

## 2. 研究の目的

本研究では、糖尿病および GC 投与に伴う筋萎縮および骨粗鬆症における新たな病態機序の解明を目的として、糖尿病病態と GC 投与が、筋と骨の臓器連携にどのような影響を及ぼすかを検討した。また、筋-骨連携を調節する液性因子とその産生臓器および栄養学的要因についても検討し、糖代謝異常、筋萎縮、骨代謝異常を同時に改善・予防する方法の探索を行なった。

## 3. 研究の方法

### 1) グルコルチコイド投与モデルマウス

9週齢の雌性の野生型およびPAI-1遺伝子欠損マウス(C57BL/6(81.25%), 129/SvJ(18.75%) background)を用いた。マウスの皮下にプラセボペレットおよびコルチコステロン 1.5mg を含有したペレット(Innovative Research of America, Sarasota, FL, USA)を1週間おきに4回投与した。最初の投与から4週間後において、6時間絶食させた後、解剖して腓腹筋を採取した。すべての動物実験は文部科学省・動物実験指針、及び近畿大学医学部実験動物飼育管理研究施設および神戸学院大学の動物実験実施指針に従って行なった。

### 2) ビタミンD欠乏モデルおよびストレプトゾトシン(STZ)誘導性糖尿病モデルマウスの作製

ビタミンDを欠乏させるために、4週齢の雌性のC57BL/6マウスにビタミンD欠乏食を与えた。10週齢においてSTZ(50mg/kg体重)を4日間連続で腹腔内に投与し、その4日後に血糖値を測定し、1型糖尿病の誘発(300mg/dl以上)を確認した。糖尿病誘発1カ月後に定量CT(Latheta LCT-200(日立製作所))を用いて、脛骨周囲の筋肉量を評価した。

### 3) STZ誘導性糖尿病モデルマウスにおける骨欠損モデルの作製

STZ投与により糖尿病を誘発した野生型マウスおよびPAI-1欠損マウスを4週間飼育した後、2%イソフルランでマウスを麻酔後、右大腿中央部の皮膚を5mm切開し、筋肉を分けて、大腿骨を露出させた後、ドリルを用いて直径0.9mmの穴を作製した。

### 4) 組織免疫学的解析

骨欠損作製2日後の大腿骨を採取し、パラフィン切片を作製後に組織免疫染色を行なった。

### 5) 細胞実験

C2C12細胞(マウス筋芽細胞)は、37°C5%CO<sub>2</sub>環境下において、10%ウシ胎児血清、ペニシリンストレプトマイシン(100mg/ml)を含むDMEM培地で培養した。1.0×10<sup>5</sup>個/ウェルの細胞を6ウェルdishに播種し、12時間後にcontrol siRNAおよびPAI-1 siRNAをLipofectamine RNAi maxを用いて細胞に導入した。その6時間後に10%ウシ胎児血清を含む

新鮮な培地に交換した。

### 6) リアルタイム PCR

マウス腓腹筋、脂肪組織および培養細胞から RNeasy mini-kit (Qiagen)を用いて RNA を抽出し、StepOne Plus (Life Technologies Japan)を用いてリアルタイム PCR 解析を行なった。

### 7) 統計処理

すべてのデータは平均値±標準誤差で表した。統系的有意差検定には、対応のない student の t 検定および one-way ANOVA を用い、 $p < 0.05$  を統系的に有意とした。すべての統計学的解析は、StatView, version 5.0, software (SAS Institute)を用いて行なった。

## 4. 研究成果

### 1) GC 投与に伴う筋分解の亢進に対する PAI-1 遺伝子欠損の効果

GC 投与により組織量の減少がみられた野生型マウスの腓腹筋では、筋分解に関与するユビキチン-プロテアソーム系のマーカー遺伝子である MuRF-1 および Atrogin1 の mRNA 量は有意に増加した。一方、PAI-1 遺伝子欠損によって、これらの筋分解関連因子 (MuRF-1、Atrogin-1) の発現増加に有意な抑制がみられた (図 1)。

### 2) GC 投与に伴う筋分解亢進における PAI-1 の役割 (in vitro)

C2C12 細胞にデキサメサゾン (Dex) を処理すると、筋分解因子 (MuRF-1、Atrogin1) の mRNA 量は有意に増加し、さらに PAI-1 を同時処理すると、その増加が増強された。また、siRNA の遺伝子導入により内因性の PAI-1 発現を抑制すると、これらの筋分解因子の mRNA 量の Dex 処理による増加は有意に抑制された (図 2)。これらのことから、外因性の PAI-1 および筋細胞における内因性の PAI-1 の増加が、GC 投与に伴う筋細胞の分解亢進に関与していることが示唆された。

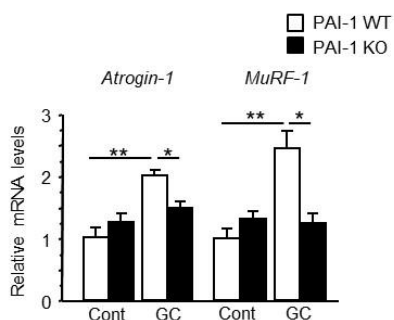


図 1. GC 投与に伴う筋分解因子の発現増加に対する PAI-1 遺伝子欠損の効果 (\*: $p < 0.05$ , \*\*: $p < 0.01$ , 主な発表論文 (2) より引用)

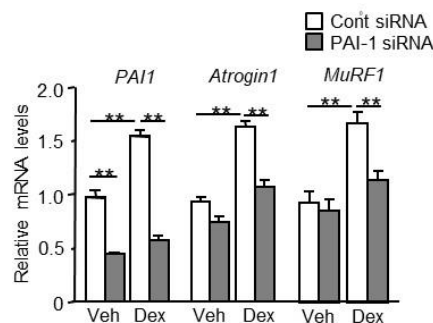


図 2. C2C12 細胞における Dex 処理による筋分解因子の発現増加に対する PAI-1 の内因性遺伝子発現抑制の効果 (\*\*: $p < 0.01$ , 主な発表論文 (2) より引用)

### 3) 筋-骨連携関連因子の発現に対する GC 投与および PAI-1 遺伝子欠損の影響

GC 投与により筋肉量の減少がみられた野生型マウスの腓腹筋では、筋由来骨形成促進因子の IGF-1、FGF-2、TGF- $\beta$ 、osteoglycin の mRNA 量の減少がみられた (図 3)。このことから、GC 投与による筋-骨連携の破綻が引き起こされていることが示唆された。一方、PAI-1 遺伝子欠損マウスでは、GC 投与による腓腹筋による IGF-1 mRNA の減少が起こらなかった (図 3)。このことから PAI-1 が筋組織の IGF-1 減少を介して、筋-骨連携の破綻に関与している可能性が考えられた。

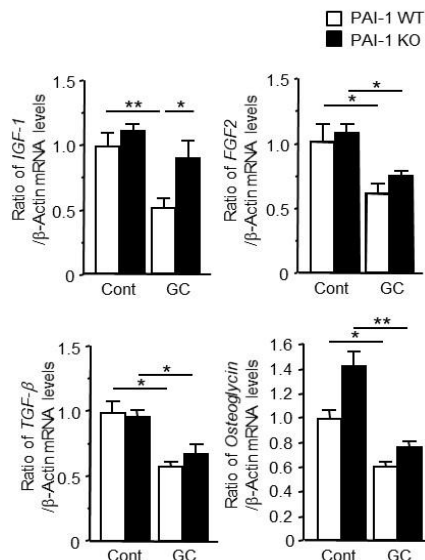


図 3. GC 投与および PAI-1 遺伝子欠損が筋-骨連携因子の発現量に及ぼす影響 (\*: $p < 0.05$ , \*\*: $p < 0.01$ , 主な発表論文 (2) より引用)

#### 4) ビタミンD欠乏が糖尿病マウスにおける筋量減少に及ぼす影響

ストレプトゾトシン投与によって糖尿病を誘発したマウスにおいて、腓腹筋量の減少が見られた。ビタミンD欠乏食を与えた糖尿病マウスでは、糖尿病に伴う筋量減少が増強された。なお、体重で補正した筋肉量の評価においても同様の結果を示した(図4)。

#### 5) ビタミンD欠乏が糖尿病マウスにおける筋分解に及ぼす影響

糖尿病マウスの腓腹筋では、筋分解関連因子(MuRF-1、Atrogin-1)の発現増加がみられ、ビタミンD欠乏により、その増加が増強された(図5)。

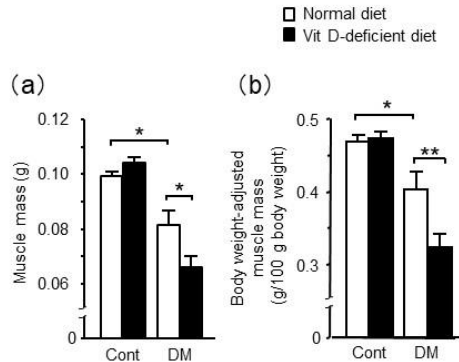


図4. ビタミンD欠乏が糖尿病マウスにおける筋量減少に及ぼす影響 (\*:p<0.05, \*\*:p<0.01, 主な発表論文(3)より引用)

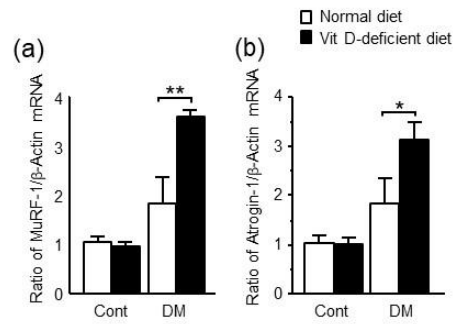


図5. ビタミンD欠乏が糖尿病マウスにおける筋分解因子(MuRF-1、Atrogin-1)の発現量に及ぼす影響 (\*:p<0.05, \*\*:p<0.01, 主な発表論文(3)より引用)

#### 6) 糖尿病およびビタミンD欠乏が筋-骨連携に及ぼす影響

糖尿病マウスの腓腹筋では、IGF-1、FGF-2、などの筋由来骨形成促進因子のmRNA量の減少がみられたことから、糖尿病に伴って筋-骨連携が障害されていることが示唆された。また、ビタミンD欠乏食によって、糖尿病によるIGF-1およびFGF-2のmRNA量の減少がさらに増強されたことから、ビタミンD欠乏が筋-骨連携の障害を増悪する可能性が示唆された(図6)。

#### 7) 糖尿病に伴う骨修復遅延に対するPAI-1の役割の検討

以前の私共の検討において、糖尿病病態では、肝臓でのPAI-1産生が増加することで、血液中のPAI-1の増加をもたらし、骨組織における骨損傷後の修復遅延を引き起こされることをマウスにおいて明らかにしてきた。その機序をさらに検討するために、骨欠損2日後の骨損傷部位の組織学的解析を行なった。

糖尿病マウスの大腿骨における骨欠損2日後の損傷部位では、正常マウスと比較して、マクロファージの集積の著しい減少がみられた。一方、PAI-1遺伝子欠損マウスでは、このマクロファージの動員障害が著明に改善されていた(図7)。

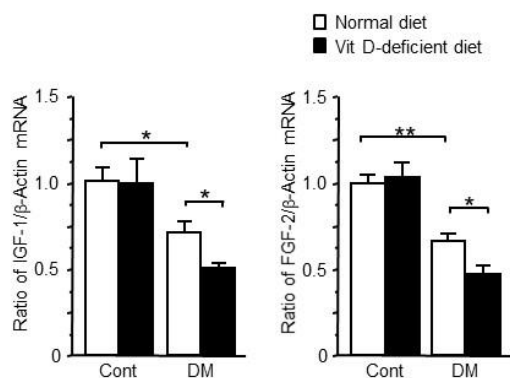


図6. 糖尿病病態およびビタミンD欠乏がマウスの腓腹筋における筋-骨連携因子の発現量に及ぼす影響 (\*:p<0.05, \*\*:p<0.01, 主な発表論文(3)より引用)

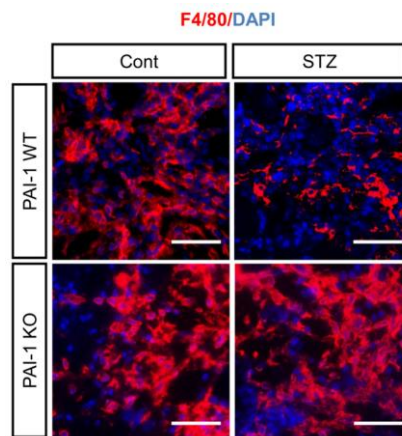


図7. 糖尿病病態およびPAI-1遺伝子欠損が骨損傷部位におけるマクロファージの集積に及ぼす影響(主な発表論文(1)より引用)

また、糖尿病マウスにおける骨損傷部位では、マクロファージの貪食能の低下がみられたが、PAI-1 遺伝子欠損によってこの点についても改善が認められた (図 8)。これらの結果から、糖尿病病態では、PAI-1 が骨損傷部位へのマクロファージの集積とその貪食能を低下させることにより、骨修復の遅延を引き起こしていることが示唆された。

#### 8) 総括

本研究成果から、GC 投与下および糖尿病病態では、筋-骨連携が障害されている可能性が示唆された。また、GC 投与下および糖尿病病態において肝臓、筋肉、脂肪組織などの臓器で増加する PAI-1 が、筋肉あるいは骨への直接作用を介して、あるいは筋-骨連携の障害を介して、筋萎縮や骨粗鬆症、骨修復遅延を引き起こしている可能性が示唆された。

また、本研究では、ビタミン D 欠乏が、糖尿病病態における筋-骨連携の障害をさらに増強することを見出した。これらの研究成果は、筋-骨連携障害を標的とした筋骨格系の異常に対する新たな予防・治療法の可能性を示すものであり、今後のさらなる研究が待たれる。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

- 1) 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*. 159:1875-1885,2018.
- 2) **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*. 36:148-156, 2018.
- 3) **Tamura Y**, Fujito H, Kawao N, Kaji H. Vitamin D deficiency aggravates diabetes-induced muscle wasting in female mice. *Diabetol Int*. 8:52-58, 2017.
- 4) Shimoide T, Kawao N, **Tamura Y**, Morita H, Kaji H. Novel roles of FKBP5 in muscle alteration induced by gravity change in mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 479:602-606, 2016.
- 5) Kawao N, Morita H, Obata K, **Tamura Y**, Kaji H. The vestibular system is critical for the changes in muscle and bone induced by hypergravity in mice. *Physiol Rep*. 4:e12979, 2016.

[学会発表] (計 11 件)

- 1) Kawao N, Shimoide T, **Tamura Y**, Okada K, Okumoto K, Kurashimo S, Horiuchi Y, Tatsumi K, Matsuo O, Kaji H. Roles of macrophages and PAI-1 in diabetic delayed bone repair in female mice. 9th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies. 2019.3.28-31.神戸
- 2) 下出孟史、河尾直之、**田村行識**、岡田清孝、蔵下伸治、奥本勝美、堀内喜高、辰巳公平、松尾理、梶博史. 糖尿病による骨修復遅延におけるマクロファージの機能低下と PAI-1 の役割. 第 18 回 日本再生医療学会総会 2019. 3. 21-23. 神戸
- 3) Shimoide T, Kawao N, **Tamura Y**, Okada K, Okumoto K, Kurashimo S, Horiuchi Y, Tatsumi K, Matsuo O, Kaji H. Roles of macrophages and plasminogen activator inhibitor-1 in delayed bone repair induced by diabetic state in female mice. American Society for Bone and Mineral Research 2018 Annual Meeting. 2018.9.28-10.7. Montreal

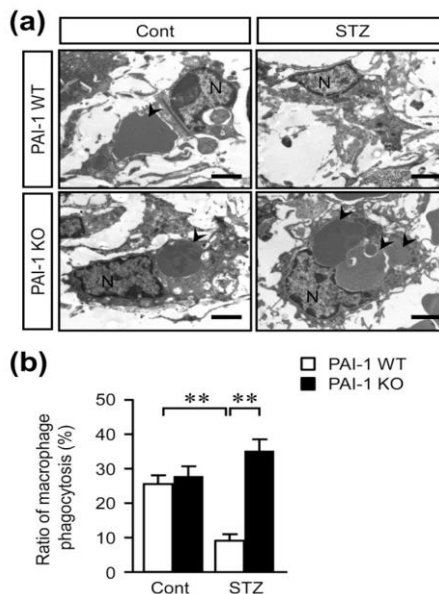


図 8. 糖尿病病態および PAI-1 遺伝子欠損が骨修復部位におけるマクロファージの貪食能に及ぼす影響 (\*:p<0.05, \*\*:p<0.01, 主な発表論文 (1) より引用)

- 4) 下出孟史、河尾直之、**田村行識**、岡田清孝、蔵下伸治、奥本勝美、堀内喜高、辰巳公平、松尾 理、梶 博史. 糖尿病による骨修復遅延でのマクロファージ機能低下における Plasminogen Activator Inhibitor-1 (PAI-1) の役割. 第 36 回日本骨代謝学会学術集会. 2018.7.26-28.長崎
- 5) 下出孟史、河尾直之、**田村行識**、岡田清孝、蔵下伸治、奥本勝美、辰巳公平、松尾 理、梶 博史. 糖尿病による骨修復遅延における造血幹細胞・マクロファージの役割. 第 17 回日本再生医療学会総会. 2018.3.21-23. 横浜
- 6) 河尾直之、下出孟史、**田村行識**、高藤義正、石田昌義、辰巳公平、森田啓之、梶 博史. 重力変化により誘導される新規因子 FKBP5 の骨格筋における役割. 第 4 回日本サルコペニア・フレイル学会大会. 2017.10.14-15.京都
- 7) Shimoide T, Kawao N, **Tamura Y**, Morita H, Kaji H. Roles of FKBP5, a novel factor induced by gravity change, in skeletal muscle. The Joint Annual Scientific Meetings of the Endocrine Society of Australia, the Society for Reproductive Biology and the Australian and New Zealand Bone and Mineral Society. 2016.8.21-24 Gold Coast, Australia
- 8) 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. 2016.07.20-23 大阪
- 9) 河尾直之、森田啓之、小畑孝二、**田村行識**、奥本勝美、梶 博史. 重力変化は前庭系と交感神経系を介して筋量と骨量に影響をおよぼす. 第 34 回日本骨代謝学会学術集会. 2016.07.20-23 大阪
- 10) **田村行識**、河尾直之、下出孟史、岡田清孝、松尾理、梶博史. グルココルチコイド過剰による筋委縮における Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1)の役割. 第 34 回日本骨代謝学会学術集会. 2016.07.20-23 大阪
- 11) 下出孟史、**田村行識**、河尾直之、岡田清孝、森田啓之、梶 博史. 重力変化に反応する新規因子 FKBP5 の骨格筋における役割. 第 34 回日本骨代謝学会学術集会. 2016.07.20-23 大阪

[その他]

ホームページ等

- 1) 近畿大学医学部再生機能医学教室ホームページ  
<https://www.med.kindai.ac.jp/physio2/index.html>
- 2) 神戸学院大学教員総覧  
<https://www.kobegakuin.ac.jp/information/public/teacher/nutrition/tamura.html>

6. 研究組織

2) 研究協力者

研究協力者氏名：河尾 直之 (KAWAO Naoyuki)

所属研究機関名：近畿大学

部局名：医学部 再生機能医学教室

職名：講師

研究者番号：70388510

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。