

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 2 日現在

機関番号：34419

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790227

研究課題名(和文)骨粗鬆症の治療を目指した骨芽細胞の分化・機能異常におけるPAI-1の役割の解明

研究課題名(英文)The role of PAI-1 in impaired osteoblast differentiation and function

研究代表者

田村 行識(TAMURA, Yukinori)

近畿大学・医学部・助教

研究者番号：40580262

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、1型糖尿病および糖代謝異常を伴う肥満による骨粗鬆症の病態機序における線溶系阻害因子プラスミノゲンアクチベーターインヒビター1(PAI-1)の役割について検討した。ストレプトゾトシン誘導性1型糖尿病雌マウスおよび食餌誘導性肥満雌マウスでは、骨量減少が認められたが、PAI-1遺伝子欠損により1型糖尿病マウスでのみ骨量の改善が認められた。一方、肥満雌マウスでは、骨指標と血中腫瘍壊死因子(TNF-alpha)濃度との間に有意な負相関が認められた。本研究結果より、1型糖尿病と肥満による骨粗鬆症の病態機序に、それぞれPAI-1とTNF-alphaが関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The present study examined the role of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1), a principal inhibitor of fibrinolysis, in the pathogenesis of osteoporosis induced by type 1 diabetes and obesity with glucose metabolism abnormality using PAI-1-deficient mice. The bone loss occurred in both streptozotocin-induced type 1 diabetic and high-fat and high-sucrose diet-induced obese female mice. PAI-1 deficiency protected from the bone loss induced by type 1 diabetes, but not by obesity in female mice. On the other hand, the bone parameters such as bone mineral density and the levels of osteogenic genes were negatively correlated with the levels of circulating Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) in obese female mice. Taken together, our findings suggest that PAI-1 and TNF-alpha are involved in the pathogenesis of osteoporosis induced by type 1 diabetes and obesity, respectively.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：糖尿病 肥満 骨粗鬆症 PAI-1

## 1. 研究開始当初の背景

近年、わが国において、糖尿病などの生活習慣病を基盤として発症する骨粗鬆症の患者数が急増しており問題となっている。1型、2型糖尿病で認められる骨の脆弱化では、骨芽細胞への分化異常およびその機能低下が主要な原因となっている。高血糖、インスリンの絶対的および相対的不足、アディポサイトカインの分泌異常や終末糖化産物の増加などが、骨芽細胞機能の異常の原因であることが報告されているが、その詳細な機序については明らかではない。また、骨芽細胞は、脂肪細胞と同じく骨髄中の間葉系幹細胞から分化することが知られている。糖尿病病態では脂肪分化マーカーの PPAR $\gamma$  や aP2 の発現増加を伴い、骨髄中の脂肪分化が促進することが報告されており、間葉系幹細胞からの骨芽細胞への分化異常が、糖尿病に伴う骨脆弱化に関与していることが示唆されている。

線溶系阻害因子である Plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) は、内臓肥満に伴って脂肪細胞からの分泌が増加するアディポカインであり、糖代謝・脂質代謝異常など様々な代謝障害への関与が近年明らかとなっている。また、肥満モデルマウスにおける PAI-1 遺伝子欠損の効果の検討や培養脂肪細胞を用いた研究から PAI-1 が脂肪細胞の分化増殖を促進する働きがあることが示唆されている。さらに、老齢マウスでは骨髄脂肪細胞の PAI-1 の発現量が増加することや、骨髄間葉系幹細胞および骨芽細胞にも PAI-1 が発現していること、マウスにおける卵巣摘出骨粗鬆症モデルにおいて、PAI-1 の遺伝子欠損により、骨量の減少が抑制されることが報告されていることから、PAI-1 が骨分化・骨代謝異常に関与していることが考えられる。以上のことから、PAI-1 が脂肪細胞の分化・機能異常および骨代謝異常の両者に関与している可能性が極めて高いが、糖尿病に伴う骨の脆弱化における役割は明らかではない。

## 2. 研究の目的

本研究では、糖代謝異常に伴う骨粗鬆症の病態機序における PAI-1 の役割を解明することを目的とし、ストレプトゾトシン(STZ)誘導性1型糖尿病モデルマウスおよび糖代謝異常を伴う高脂肪・高シヨ糖食誘導性肥満モデルマウスにおける骨の脆弱化に対する PAI-1 の役割を、PAI-1 遺伝子欠損マウスを用いて検討を行なった。

## 3. 研究の方法

### (1) 1型糖尿病および肥満モデルマウス

10週齢の雄性および雌性の野生型マウスおよび PAI-1 遺伝子欠損マウスに 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。糖尿病誘発から4週間後に、CT解析を用いて脛骨における骨密度および骨強度指標を評価し、その後6時間絶食させて解剖し、血液(血漿)、骨組織、心臓、肝臓、脾臓、腎臓、筋肉を採取し各解析に用いた。10週齢の雌性の野生型および PAI-1 遺伝子欠損マウスに高脂肪高シヨ糖食(HF/HFD)を20週間給餌し、インスリン負荷テスト(インスリン(0.3U/kg)腹腔内投与)およびグルコース負荷テスト(グルコース(1.5mg/kg)腹腔内投与)を行ない、糖代謝を評価した。さらにCT解析により脛骨の骨密度および骨強度指標を評価した。その後6時間絶食させ解剖し、血液、骨組織、内臓脂肪組織および肝臓を採取し各解析に用いた。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・動物実験実施指針に従い行なった。

### (2) 血液分析

血漿中の total PAI-1、インスリン、Gla-osteocalcin、総コレステロール、トリグリセライド、TNF-alpha、cross-linked C-telopeptide of type I collagen (CTX)は、それぞれマウス Total PAI-1 ELISA kit (Molecular Innovations)、超高感度マウスインスリン ELISA キット (Morinaga Institute of Biological Science)、マウス Gla-osteocalcin high-sensitive enzyme immunoassay kit (Takara-bio)、総コレステロール E テスト、トリグリセライド E テスト (Wako Pure Chemical Industries)、マウス TNF-alpha ELISA kit (R&D Systems)および RatLaps EIA kit (Immunodiagnostic Systems)を用いて測定した。

### (3) 組織学的解析

脛骨は4%パラホルムアルデヒドで16時間(4)固定し、その後7日間80%エタノールにて浸漬固定を行なった。厚さ4 $\mu$ mのパラフィン切片を作製し、ヘマトキシリンエオジン染色を行なった。また、破骨細胞数を評価するために、酒石酸耐性酸性ホスファターゼ (TRAP) 染色を tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP)/alkaline phosphatase (ALP) staining kit (Wako Pure Industry)を用いて行なった。

### (4) リアルタイム PCR 解析

マウスの骨組織、肝臓、心臓、肺、腎臓、脾臓、脂肪組織、筋肉および初代培養骨芽細胞から 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。

### (5) 細胞培養

生後3日の雌雄の新生マウスの頭蓋より初

代培養骨芽細胞を採取した。初代培養骨芽細胞を 6 ウェルプレートに  $1 \times 10^5$  個播種し、37 °C、5%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 MEM  $\alpha$  培地にて培養した。活性型 PAI-1 (20nM) を 24 時間添加し、その後、RNA を抽出してリアルタイム PCR 解析に用いた。また、活性型 PAI-1 (20nM) を骨分化培地 (アスコルビン酸および  $\beta$  グリセロリン酸含有培地) と共に添加し、21 日間培養後に Alizarin red 染色にて石灰化を評価した。

#### (6) 統計学的解析

すべてのデータは平均値  $\pm$  標準誤差で表した。統計学的有意差検定には、対応のない student の t 検定および one-way ANOVA を用い、 $p < 0.05$  を統計学的に有意とした。相関分析にはピアソンの相関分析を用いた。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) STZ 投与による血中 PAI-1 と各臓器の PAI-1 発現に対する影響

STZ 投与により、雌雄の野生型マウスとともに血中 PAI-1 濃度が増加した。さらに雌マウスにおける血中 PAI-1 濃度の増加がより顕著に認められ、血中 PAI-1 濃度に性差が認められた (図 2)。また、各臓器の PAI-1 mRNA 発現量を検討したところ、肝臓において雌マウスでのみ STZ による PAI-1 mRNA の著明な発現誘導が認められ、血中 PAI-1 濃度の性差は肝臓での PAI-1 mRNA 発現量の違いに起因する可能性が考えられた。

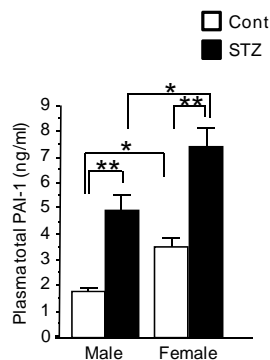


図1 STZ 投与による雌雄の野生型マウスの血中 PAI-1 濃度に対する影響

#### (2) STZ 投与による骨の脆弱化に対する PAI-1 遺伝子欠損の効果

脛骨の HE 染色による組織解析において、雌雄の野生型マウスともに、STZ 投与によって海綿骨の減少と脂肪滴の著明な増加が認められた。しかし、雌マウスの脛骨においてのみ、PAI-1 遺伝子欠損によりこれらの抑制が認められた (図 1A)。さらに、CT 解析の結果、STZ 投与によって雌雄の野生型マウスともに海綿骨密度、皮質骨密度および骨強度

指標の減少が認められ、この減少は雌マウスでより顕著であった。雌マウスにおいて PAI-1 遺伝子欠損により、STZ 投与による骨密度および骨強度指標の低下の改善が認められた (図 2B-D)。しかしながら、この PAI-1 遺伝子欠損による骨保護効果は、雄マウスでは認められなかった (data not shown)。

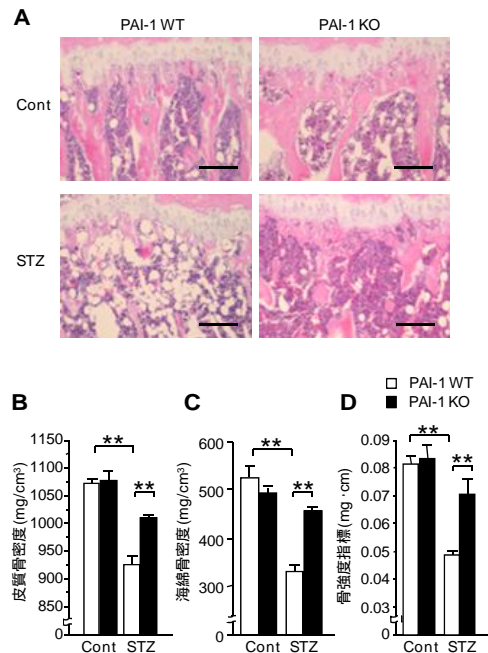


図2 雌マウスの脛骨における STZ 投与による骨の脆弱化に対する PAI-1 遺伝子欠損効果

#### (3) STZ 投与による脛骨の骨分化遺伝子の発現低下に対する PAI-1 遺伝子欠損の効果

脛骨における Runx2、Osterix、Alkaline phosphatase (ALP) といった骨分化遺伝子の発現量は、骨密度と同様に雌雄の野生型マウスとともに STZ 投与によって減少したが、PAI-1 遺伝子欠損により雌マウスの脛骨においてのみ、骨分化遺伝子の発現低下が改善した (図 3A-C)。また、血中の骨形成マーカーのオステオカルシンも同様に、雌のマウスにおいてのみ PAI-1 遺伝子欠損により、その血中濃度の減少が阻害された (data not shown)。これらのことから、雌の脛骨において STZ 投与による骨分化障害が PAI-1 遺伝子欠損により改善していることが示唆された。

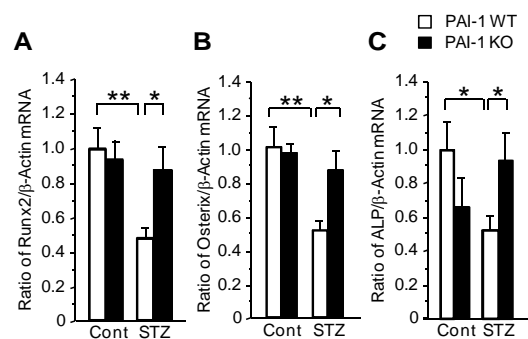


図3 雌マウスの脛骨における STZ 投与による骨分化遺伝子の発現低下に対する PAI-1 遺伝子欠損効果

(4) STZ 投与および PAI-1 遺伝子欠損が脛骨における破骨細胞数に及ぼす影響

雄マウスにおいて、STZ 投与により破骨細胞数の変化は認められなかったが、雌マウスの脛骨においては STZ 投与により破骨細胞数の有意な減少がみとめられた (図 4A, B)。PAI-1 遺伝子欠損により雌マウスの脛骨における破骨細胞数の減少の改善が認められた (図 4A, B)。しかし、雄マウスの脛骨において PAI-1 遺伝子欠損による破骨細胞数への影響は認められなかった。同様に、雌マウスの脛骨においてのみ骨吸収マーカーの RANKL mRNA の発現が STZ 投与により低下し、PAI-1 遺伝子欠損によりその発現量に改善が認められた (図 4C)。

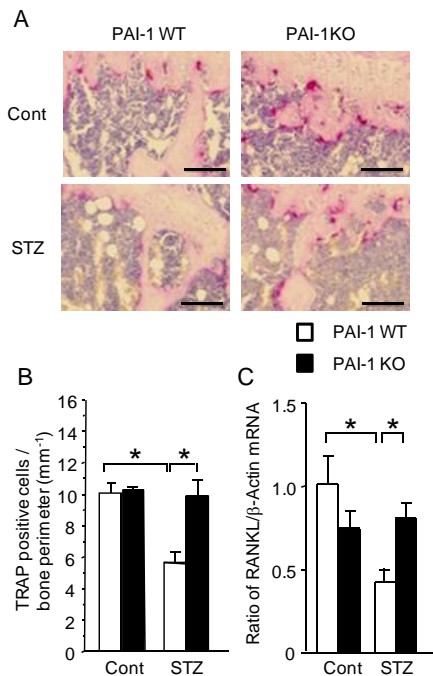


図4 雌マウスの脛骨における STZ 投与による破骨細胞数の減少および RANKL mRNA の発現低下に対する PAI-1 遺伝子欠損効果

(5) 骨芽細胞の分化および石灰化に対する PAI-1 の影響

骨芽細胞に対する PAI-1 の直接的な影響を検討するために、マウスの頭蓋冠由来初代培養骨芽細胞において、活性型 PAI-1 リコンビナント蛋白の 24 時間処理の影響を検討した。活性型 PAI-1 処理により、雌マウスの頭蓋冠由来初代培養骨芽細胞において、Runx2、Osterix および ALP といった骨分化マーカー遺伝子の発現量の低下が認められた (図 5)。さらに活性型 PAI-1 は雌マウスの頭蓋冠由来初代培養骨芽細胞の石灰化も抑制した (図 5)。しかしながら、雄マウスの頭蓋冠由来初代培養骨芽細胞では、PAI-1 の分化および石灰化への影響は認められなかった。このことから、骨芽細胞において PAI-1 はその分化および石灰化を直接抑制し、その効果には性差が存在することが示唆された。

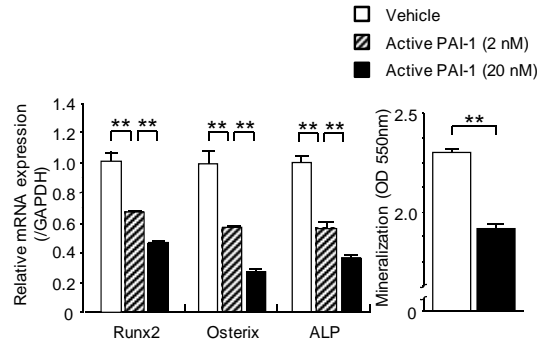


図5 雌マウス頭蓋冠由来初代培養骨芽細胞の骨分化遺伝子発現および石灰化に対する活性型 PAI-1 の影響

(6) STZ 投与による脛骨の脂肪分化マーカー発現増加に対する PAI-1 遺伝子欠損の効果

雌マウスおよび雄マウスの脛骨において STZ 投与によって脂肪分化マーカーの PPAR $\gamma$  と aP2 の発現が著明に増加し、脂肪分化が促進していることが示唆された。しかし、雌マウスの脛骨では、PAI-1 遺伝子欠損によって糖尿病による脂肪分化誘導が著明に抑制されていた (図 6A, B)。

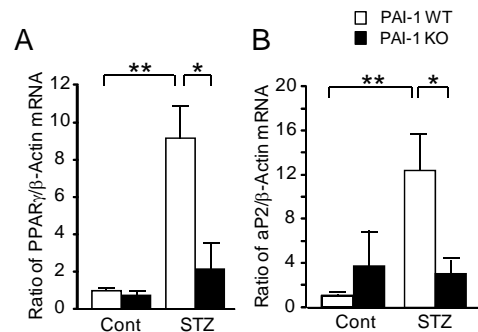


図6 雌マウスの脛骨における STZ 投与による脂肪分化マーカー発現の増加に対する PAI-1 遺伝子欠損の効果

(7) 肥満マウスにおける糖・脂質代謝異常に対する PAI-1 遺伝子欠損効果

雌の野生型マウスにおいて高脂肪・高ショ糖食を 20 週間与えた結果、体重の増加とともに、高血糖、高インスリン血漿、耐糖能異常、インスリン抵抗性および高コレステロール血症を呈したが、PAI-1 遺伝子欠損によってこれらの異常の有意な改善が認められた (図 7A, B)。

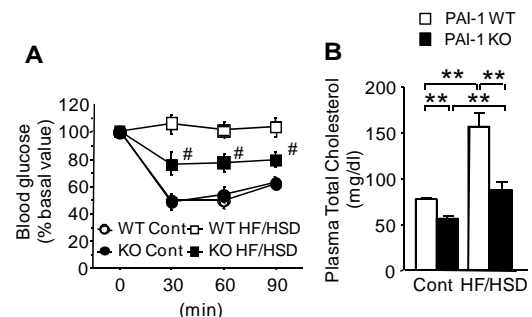


図7 肥満雌マウスにおけるインスリン抵抗性および高コレステロール血症に対する PAI-1 遺伝子欠損効果

(8) 肥満モデルにおける骨の脆弱化に対する PAI-1 遺伝子欠損の影響

高脂肪・高シヨ糖食の投与によって、野生型マウスにおいて海面骨密度および骨強度指標の有意な低下が認められた (図 8A, B)。PAI-1 遺伝子欠損マウスにおいてもこれらの骨指標が低下し、PAI-1 遺伝子欠損による影響は認められなかった (図 8A, B)。同様に、高脂肪・高シヨ糖食による脛骨における骨分化マーカー (Osterix, ALP) の遺伝子発現の低下に対しても PAI-1 遺伝子欠損による影響は認められなかった (図 8C, D)。

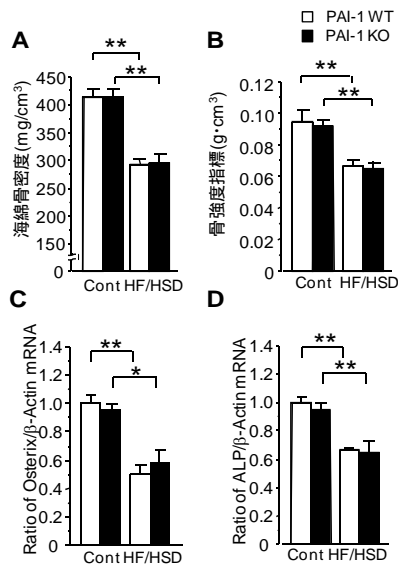


図 8 肥満雌マウスの脛骨における骨密度および骨分化マーカーの遺伝子発現に対する PAI-1 遺伝子欠損の影響

(9) 肥満および PAI-1 遺伝子欠損が骨吸収に及ぼす影響

高脂肪・高シヨ糖食投与によって脛骨における RANKL mRNA の発現、RANKL/OPG ratio および血中 CTX は有意に減少し、肥満により骨吸収が抑制されていることが示唆された (図 9A-D)。しかしながら、これらの骨吸収マーカーに対する PAI-1 遺伝子欠損による影響は認められなかった (図 9A-D)。

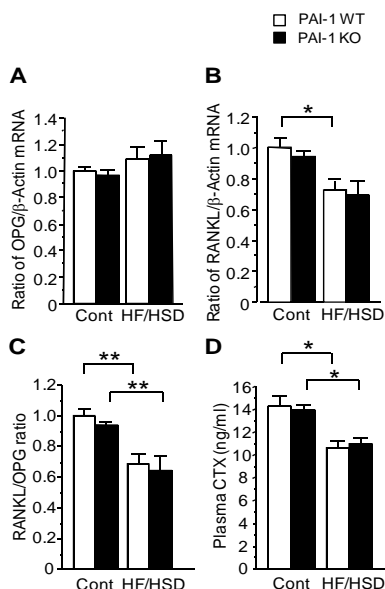


図 9 肥満雌マウスにおける骨吸収に対する PAI-1 遺伝子欠損の影響

(10) 肥満による血中 TNF- $\alpha$ 濃度への影響とその骨指標との関連性

野生型マウスおよび PAI-1 遺伝子欠損マウスともに、高脂肪高シヨ糖食の投与によって血中 TNF- $\alpha$ の増加が認められた (図 10A)。さらに、血中 TNF- $\alpha$ と骨パラメーターとの間で相関分析を行なったところ、脛骨における海面骨密度、Osterix mRNA および ALP mRNA の発現量との間に有意な負相関が認められた (図 10B-D)。

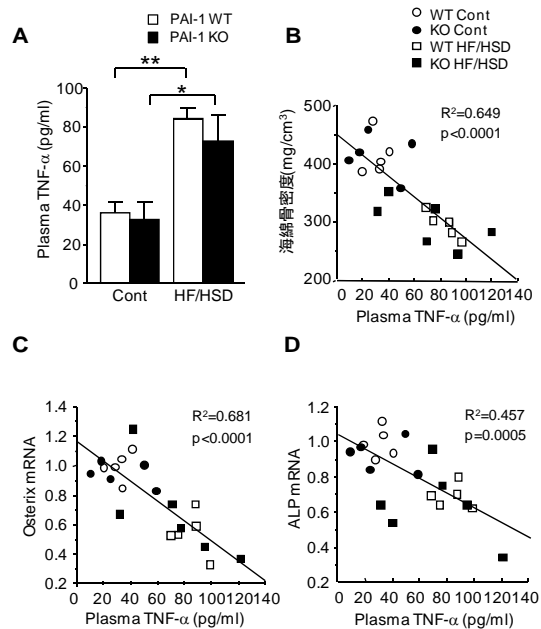


図 10 雌マウスにおける肥満と PAI-1 遺伝子欠損による血中 TNF- $\alpha$ に対する影響と、血中 TNF- $\alpha$ と骨指標との関連性

(11) 成果のまとめ

本研究成果より、1 型糖尿病による骨の脆弱化に PAI-1 が関与しており、その病態生理学的役割には性差が存在することが示唆された。一方、糖代謝異常を伴う肥満による骨の脆弱化には、PAI-1、インスリン抵抗性および脂質代謝異常ではなく、TNF- $\alpha$ が関与することが示唆された。また、PAI-1 および TNF- $\alpha$ が、それぞれ 1 型糖尿病および肥満病態における骨脆弱性の診断マーカーとなり得る可能性もあり、今後の臨床的検討が期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 10 件)

**Tamura Y**, Kawao N, Yano M, Okada K, Matsuo O, Kaji H. Plasminogen activator inhibitor-1 deficiency ameliorates insulin resistance and hyperlipidemia but not bone loss in obese female mice. *Endocrinology*. 155:1708-17, 2014 doi: 10.1210/en.2013-1888 査読有



Mao L, **Tamura Y**, Kawao N, Yano M, Okada K, Okumoto K, Kaji H. Influence of diabetic state and vitamin D deficiency on bone repair in female mice. *Bone*. 61:102-108, 2014. doi: 10.1016/j.bone.2013.12.024. 査読有

Yano M, Kawao N, **Tamura Y**, Okada K, Kaji H. A novel factor, Tmem176b, induced by activin-like kinase 2 signal promotes the differentiation of myoblasts into osteoblasts. *Exp Clin Endocrinol Diabet*. 122:7-14, 2014. [https://www.jstage.jst.go.jp/article/endocrj/60/12/60\\_EJ13-0270/\\_article](https://www.jstage.jst.go.jp/article/endocrj/60/12/60_EJ13-0270/_article) 査読有

**Tamura Y**, Kaji H. Parathyroid hormone and Wnt signaling. *Clin Calcium*. 2013 23:847-852. doi: CliCa1306847852 査読無

**Tamura Y**, Kawao N, Oakda K, Yano M, Okumoto K, Matsuo O, Kaji H. Plasminogen activator inhibitor-1 is involved in streptozotocin-induced bone loss in female mice. *Diabetes*. 62:3170-3179, 2013. doi: 10.2337/db12-1552. 査読有

Kawao N, **Tamura Y**, Okumoto K, Yano M, Oakada K, Matsuo O, Kaji H. Plasminogen plays a crucial role in bone repair. *J Bone Miner Res*. 28:1561-1574, 2013. doi: 10.1002/jbmr.1921. 査読有

**Tamura Y**, Yano M, Kawao N, Okumoto K, Ueshima S, Kaji H, Matsuo O. Enzamin ameliorates adipose tissue inflammation with impaired adipocytokine expression and insulin resistance in db/db mice. *J Nutr Sci*. 2: 1-10, 2013. doi: <http://dx.doi.org/10.1017/jns.2013.34>. 査読有

Mao L, Yano M, Kawao N, **Tamura Y**, Okada K, Kaji H. Role of matrix metalloproteinase-10 in the BMP-2 inducing osteoblastic differentiation. *Endocr J*. 60: 1309-1319, 2013. <http://dx.doi.org/10.1507/endocrj.EJ13-0270>. 査読有

Okada K, Ueshima S, Kawao N, Yano M, **Tamura Y**, Tanaka M, Sakamoto A, Hatano M, Arima M, Miyata S, Nagai N, Tokuhisa T, Matsuo O. Lack of both  $\alpha 2$ -antiplasmin and plasminogen activator inhibitor type-1 induces high IgE production. *Life Sci*. 93: 89-95, 2013. doi: 10.1016/j.lfs.2013.05.023. 査読有

**Tamura Y**, Murayama T, Minami M, Matsubara T, Yokode M, Arai H. Ezetimibe ameliorates early diabetic nephropathy in db/db mice. *J Atheroscler Thromb*. 19(7):608-618, 2012. <http://dx.doi.org/10.5551/jat.11312> 査読有

〔学会発表〕(計4件)

**田村 行識** 「Role of plasminogen activator inhibitor-1 in the development of insulin resistance and osteoporosis in obese female mice」第91回日本生理学会大会 2014年3月16-18日 鹿児島

**田村 行識** 「糖尿病病態とビタミンD欠

乏状態が骨修復に及ぼす影響の検討」第13回再生医療学会総会 2014年3月4-6日 京都

**Tamura Y**. Plasminogen activator inhibitor-1 contributes to the pathogenesis of diabetic osteoporosis in female mice. 2nd Joint Meeting of the International Bone and Mineral Society/Japanese Society of Bone and Mineral Metabolism. May 29-June 1, 2013 Kobe

**田村 行識** 「プラスミノゲンアクチベーターインヒビター1は糖尿病性骨粗鬆症の病態に關与する」第56回日本糖尿病学会学術集会 2013年5月16-18日 熊本

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.kindai.ac.jp/physio2/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

田村 行識 (TAMURA, Yukinori)

近畿大学・医学部・助教

研究者番号：40580262