

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：34419

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860152

研究課題名(和文)糖尿病が引き起こす骨軟骨再生障害における線溶系因子の役割解明

研究課題名(英文)Role of fibrinolytic system in bone regeneration impaired by diabetes

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) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、1型糖尿病に伴う骨修復・再生遅延に対す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型糖尿病雌マウスでは、骨修復の遅延および骨分化異常が認められたが、PAI-1遺伝子欠損によりこれらの有意な改善が認められた。本研究結果よりPAI-1が糖尿病による骨修復・再生遅延に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 impairment of bone repair induced by diabetes using streptozotocin-induced type 1 diabetic mice. Streptozotocin treatment impaired the bone repair and osteogenesis in femur of diabetic female mice, whereas PAI-1 deficiency improved them in diabetic female mice. Our findings suggest that PAI-1 is involved in bone repair and regeneration impaired by diabetes in mice.

研究分野：生理学、病態生理学

キーワード：糖尿病 骨再生 線溶系

1. 研究開始当初の背景

糖尿病罹患者数は世界的に急増しており、今後、糖尿病を併発している患者において、組織再生のための細胞移植療法が行われるケースの増加が予測される。糖尿病患者では組織修復・再生の遅延が起こることが知られており、その病態機序の理解による最適な組織再生環境の構築は、効果的な再生医療の実現のために重要であると考えられる。

糖尿病患者では、骨髄由来間葉系幹細胞の組織傷害部位への集積が障害されていることが報告されている。また、糖尿病患者における血管内皮前駆細胞の動員障害と数の減少が血管新生を障害し、治癒過程が障害されることも報告されている。さらに、線維芽細胞や角化細胞や血管内皮細胞など創傷治癒に重要な細胞の機能が、高血糖状態に暴露されたときに障害されることが *in vitro* の実験において示されてきた。また、臨床研究において、**Granulocyte colony-stimulating factor** によって誘導される造血幹細胞や血管新生に関わる細胞の動員が糖尿病患者では障害されており、これらが糖尿病による組織修復障害に関連している可能性が考えられている。そして、糖尿病によって骨折後の修復が遅延することをいくつかの報告が示しており、インスリンの投与によってこれらが改善することから、糖尿病による骨修復遅延はインスリン依存性であることが示唆されてきた。さらに最近の研究では、糖尿病による骨折治癒の障害は、アポトーシスや破骨細胞形成の増加による軟骨の喪失とそれに続く軟骨内骨化の減少が原因であることが示唆されている。軟骨細胞と骨芽細胞のアポトーシスの増加は **tumor necrosis factor (TNF)- α** の増加によってもたらされ、また同時に破骨細胞形成を促進することによって、初期の軟骨形成と骨折治癒を障害することが報告されている。しかしながら、糖尿病病態における骨修復・再生障害の詳細な機序に

ついては不明な点が多く残されている。

Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) は、プラスミノゲンアクチベーターを阻害することで、線溶系を阻害する因子である。いくつかの報告では、1型糖尿病や2型糖尿病の患者およびモデル動物において血中 PAI-1 濃度が増加することが示されている。PAI-1 は細胞外マトリックスの分解制御や、細胞遊走、アポトーシスなど様々な細胞の機能に関与していることが知られている。以前、Daciらはエストロゲン欠乏マウスにおける骨量減少に PAI-1 が関与することを報告した。さらに最近我々は、PAI-1 が雌マウスにおける糖尿病に伴う骨量減少に関与することを報告した。骨修復や骨再生の機序を理解することは、臨床的に非常に重要であるが、最近我々は、線溶系因子プラスミンの前駆体のプラスミノゲンがマウスにおける骨修復に重要であることを報告した。これらのことから組織線溶系は骨修復や骨折治癒に重要であることが示唆され、PAI-1 が骨修復過程において重要な役割を果たしている可能性が考えられる。しかしながら、糖尿病病態における骨修復・再生遅延に対する PAI-1 の役割は明らかではない。

2. 研究の目的

本研究では、糖尿病に伴う骨修復・再生遅延の機序を明らかにするために、ストレプトゾトシン誘導性糖尿病モデルマウスにおける骨修復・再生障害に対する PAI-1 欠損の影響について PAI-1 遺伝子欠損マウスを用いて検討した。

3. 研究の方法

1) 実験動物

10 週齢の雌性の野生型および PAI-1 遺伝子欠損マウス (C57BL/6J (81.25%) and 129/SvJ (18.75%) background) を用いた。これらのマウスは D. Collen 教授 (University

of Leuven, Belgium)より供与頂いた。

2) 糖尿病モデルの作製

雌性の野生型マウスおよび PAI-1 遺伝子欠損マウスに膵β細胞に選択毒性をもつストレプトゾトシン(STZ、Sigma, St Louis, MO, USA, # S0130) (50 mg/kg 体重)を腹腔内に4日間連続で投与して、糖尿病を誘発した。また、コントロール群(非糖尿病群)として生理食塩水を投与した。STZの最終投与から4日後に随時血糖値をグルコメーター(Glutest Ace, Sanwa Kagaku Kenkyusyo, Nagoya, Japan)で測定し、300mg/dl以上を糖尿病とみなした。糖尿病を誘発して2週間後に、右大腿骨に骨欠損を作製した。

3) 血液分析

血漿 total PAI-1 濃度は Murine Total PAI-1 ELISA kit (Molecular Innovations, MI, USA, # MPAIKT-TOT)を用いて測定した。

4) 骨欠損モデルの作製

2%イソフルランによってマウスを麻酔後、右大腿中央部の皮膚を長軸方向に5mm切開した。筋肉を分けて、大腿骨表面を露出させた後、ドリルを用いて直径0.9mmの穴を作製した。

5) 定量 computed tomography (qCT) 解析

マウスを2%イソフルランで麻酔し、大腿をX-ray CT system (Latheta LCT-200; Hitachi Aloka Medical, Tokyo, Japan)を用いてスキャンした。3DCT画像の構築はVGStudio MAX2.2 software (Nihon Visual Science, Tokyo, Japan)を用いて行なった。大腿骨の骨欠損部位の面積は、イメージ解析ソフト Image J を用いて計測した。

6) 組織免疫学的解析

骨欠損作製7日後のマウスの腹腔にソムノペンチル(50mg/kg)を投与して麻酔し、大腿骨を単離した。そして4%パラホルムアルデヒドで固定し、24時間脱灰処理を行って、パラフィン包埋し、切片を作製した。その後、組織免疫染色(ALP)、TRAP染色、アルシアンブルー染色を行なった。

7) リアルタイム PCR

骨組織サンプルは液体窒素中で破碎し、ホモジネートサンプルからRNAをRNeasy mini kit (Qiagen, Tokyo, Japan, # 74104)を用いて回収した。リアルタイムPCRはFast SYBR GREEN PCR Master Mix (Life Technologies Japan, Tokyo, Japan, # 4385610)を用いて StepOne Plus cyclor にて行なった。

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には unpaired t-test と 1元配置ANOVAを用い、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。すべての統計解析は StatView version 5.0 software (SAS Institute; Cary, NC, USA)を用いて行なった。

4. 研究成果

1) 雌性マウスにおける STZ 投与の影響

STZ 投与によって、野生型マウスおよび PAI-1 遺伝子欠損マウスの体重は STZ 投与7日後から有意な減少が認められた。また STZ 最終投与から4日後の血糖値は、非糖尿病群と比較して、野生型マウスおよび PAI-1 遺伝子欠損マウス共に著明な増加が見られ、糖尿病の誘発が確認された。STZ 投与による血糖値の上昇に伴い、野生型マウスにおける血中 PAI-1 濃度は増加した。

2) 大腿骨の骨欠損後の修復に対する PAI-1 欠損の影響

非糖尿病群の野生型および PAI-1 欠損マウスにおいて、大腿骨の骨欠損 7 日後の修復の程度に違いは認められなかった(図 1)。糖尿病群の野生型マウスでは、非糖尿病群の野生型マウスと比較して 7 日後において修復遅延が見られた(図 1)。この糖尿病による骨修復遅延は、PAI-1 遺伝子欠損マウスでは改善が認められた(図 1)。

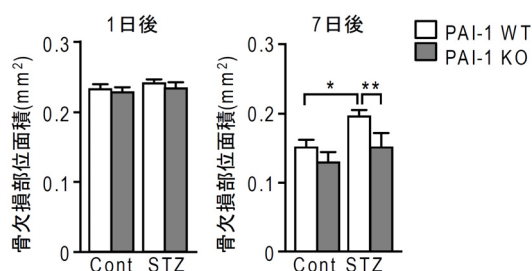


図 1. 糖尿病による大腿骨欠損後の骨修復遅延に対する PAI-1 遺伝子欠損の影響
骨欠損 1 日後と 7 日後の骨欠損面積。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ ($n = 5 \sim 6$)

3) 大腿骨の骨欠損後の修復部位における骨芽細胞数と破骨細胞数の解析

骨欠損 7 日後の骨修復部位における ALP 陽性骨芽細胞数は、非糖尿病群の野生型マウスおよび PAI-1 欠損マウスの間で違いは認められなかった(図 2A)。STZ 投与により野生型マウスの骨損傷部位における ALP 陽性細胞数は有意に減少した(図 2A)。しかし、PAI-1 欠損によって糖尿病による ALP 陽性細胞数の減少が改善された(図 2A)。骨欠損 7 日後の骨修復部位における N.Ob/BS と Ob.S/BS は、非糖尿病群の野生型マウスおよび PAI-1 欠損マウスの中に違いは認められなかった。一方、糖尿病群の野生型マウスではこれらの値が有意に減少したが、PAI-1 欠損によって改善が認められた(図 2B, C)。それに対して、TRAP 陽性多核細胞数は、糖尿病群の野生型および PAI-1 欠損マウスの間に違いは認められなかった(図 2D)。

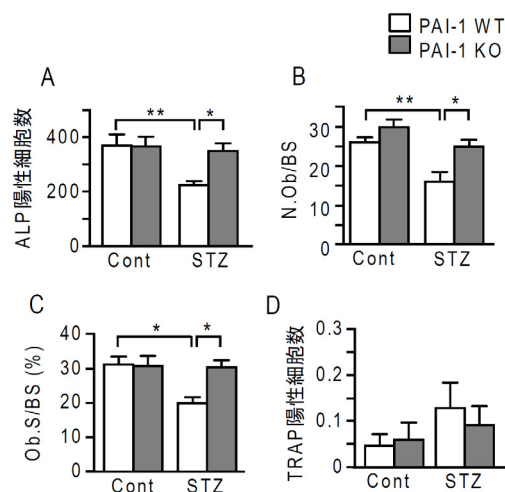


図 2. 糖尿病による骨芽細胞数と破骨細胞数の変化に対する PAI-1 遺伝子欠損効果
単位面積(1mm²)辺りの ALP 陽性細胞数 (A)、骨表面 1mm 辺りの骨芽細胞数 (N.Ob/BS) (B)、骨芽細胞表面/骨表面 (Ob.S/BS) (C)および骨表面 1mm 辺りの TRAP 陽性破骨細胞数 (D)。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ ($n = 5 \sim 6$)。

4) 骨修復部位における骨分化および骨吸収マーカーの解析

次に、骨損傷部位における骨分化マーカー遺伝子の発現量を測定した。Runx2、ALP、1 型コラーゲンの mRNA 発現量は、非糖尿病群の PAI-1 欠損マウスにおいて野生型マウスと比較して有意な増加が認められた(図 3)。Osterix および Osteocalcin mRNA の発現量は、非糖尿病群における野生型マウスと PAI-1 欠損マウスの間に違いは認められなかった(図 3)。STZ 投与によって野生型マウスの骨損傷部位における Runx2、Osterix、ALP、1 型コラーゲンおよび Osteocalcin の mRNA 発現量は有意に減少した。また、PAI-1 欠損により Osterix、ALP、1 型コラーゲンの STZ 投与による減少が有意に改善された(図 3)。

次に、大腿骨の骨損傷部位における骨吸収マーカーについて検討を行なった。TRAP、receptor activator of nuclear factor κ B ligand (RANKL)、Osteoprotegerin (OPG) mRNA の発現量および RANKL/OPG 比は、非糖尿病群における野生型マウスと PAI-1 遺

伝子欠損マウスの間で違いは認められなかった。野生型マウスおよび PAI-1 遺伝子欠損マウス共に、STZ 投与によって RANKL mRNA の発現量は減少したが、TRAP mRNA 発現量には影響は見られなかった。また、有意差は認められなかったが、STZ 投与によって OPG mRNA 発現量と RANKL/OPG 比は減少傾向を示した。糖尿病により減少した RANKL mRNA 発現量への PAI-1 欠損の影響は見られなかった。

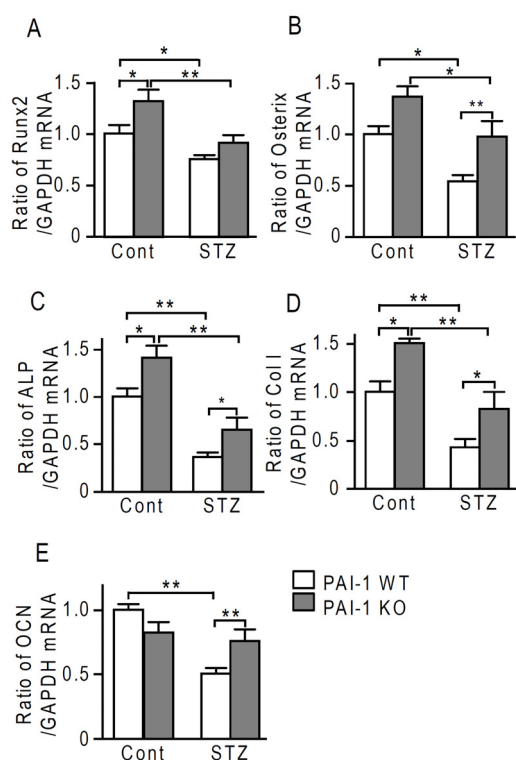


図 3. 糖尿病による大腿骨欠損部の骨分化障害に対する PAI-1 遺伝子欠損の影響 Runx2 (A), Osterix (B), ALP (C), 1 型コラーゲン (D) および Osteocalcin (OCN) (E) の mRNA 発現量。*p<0.05, **p<0.01 (n=5~6)。

5) 骨損傷部位における軟骨形成および軟骨分化・脂肪分化マーカーの解析

アルシアンブルー染色によって軟骨基質を染色した結果、PAI-1 欠損による骨欠損 7 日目の骨損傷部位における軟骨基質形成の有意な増加が認められた。STZ 投与によって野生型マウスおよび PAI-1 欠損マウス共に、軟骨基質形成が有意に減少した。しかし、

PAI-1 欠損による軟骨基質の形成に対する影響は認められなかった。また、骨欠損 7 日後の骨損傷部位における軟骨分化マーカーについて検討を行なった。非糖尿病群において PAI-1 欠損により 2 型コラーゲンと aggrecan mRNA 発現量が増加したが、10 型コラーゲンの mRNA 発現量には影響しなかった。STZ 投与によって野生型マウスの骨損傷部位における軟骨分化マーカー遺伝子の発現は有意に減少したが、PAI-1 欠損による影響は認められなかった。また、非糖尿病群において PAI-1 欠損は骨損傷部位における脂肪分化マーカーの peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR- γ) mRNA の発現量を減少させたが、adipocyte protein-2 (aP2) mRNA 発現量には影響を与えなかった。STZ 投与によって野生型マウスの骨損傷部位における aP2 mRNA 発現量は増加したが、PPAR γ mRNA 発現量には影響を与えなかった。また、PAI-1 欠損によるこれらの遺伝子発現量への影響は認められなかった。

6) 研究成果のまとめ

本研究において、PAI-1 遺伝子欠損が雌マウスにおける糖尿病による骨修復障害を改善することを見出し、その機序のひとつとして骨芽細胞数の減少の抑制を介することを示した。これらのことから、PAI-1 が糖尿病に伴う骨修復・再生障害に関与することが考えられる。また今後、間葉系幹細胞および iPS 細胞などの幹細胞の移植に対する糖尿病の影響と PAI-1 の役割について解析する予定である。本研究の成果は、糖尿病患者における骨折修復・再生障害に対する新たな治療法の開発と、効果的な再生医療の実現のための最適な移植・再生環境の構築につながることを期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件)

- ① **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*. 64:2194-2206, 2015. doi: 10.2337/db14-1192. 査読有
- ② Yasui M, **Tamura Y**, Minami M, Higuchi S, Fujikawa R, Ikedo T, Nagata M, Arai H, Murayama T, Yokode M. The Prostaglandin E2 Receptor EP4 Regulates Obesity-related Inflammation and Insulin Sensitivity. *PLoS One*. 10:e0136304, 2015. doi: 10.1371/journal.pone.0136304. 査読有
- ③ 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*. 10:e0123982, 2015. doi: 10.1371/journal.pone.0123982. 査読有
- ④ Shiomi A, Kawao N, Yano M, Okada K, **Tamura Y**, Okumoto K, Matsuo O, Kaji H. α 2-Antiplasmin is involved in bone loss induced by ovariectomy in mice. *Bone*. 79:233-241, 2015. doi: 10.1016/j.bone.2015.06.009. 査読有
- ⑤ Kawao N, **Tamura Y**, Okumoto K, Yano M, Okada K, Matsuo O, Kaji H. Tissue-type plasminogen activator deficiency delays bone repair: roles of osteoblastic proliferation and vascular endothelial growth factor. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 307:E278-288, 2014. doi: 10.1152/ajpendo.00129.2014. 査読有
- ⑥ **Tamura Y**, Inoue A, Ijiri Y, Naemura A, Yamamoto J. Short- and long-term treatment with folic acid suppresses thrombus formation in atherogenic mice in vivo. *Pathophysiology*. 21:169-175, 2014. doi: 10.1016/j.pathophys.2014.04.001. 査読有
- ⑦ Mao L, Kawao N, **Tamura Y**, Okumoto K, Okada K, Yano M, Matsuo O, Kaji H. Plasminogen activator inhibitor-1 is involved in impaired bone repair associated with diabetes in female mice. *PLoS One*. 9:e92686, 2014. doi: 10.1371/journal.pone.0092686. 査読有
- ⑧ Yano M, Kawao N, Okumoto K, **Tamura Y**, Okada K, Kaji H. Fibrodysplasia Ossificans progressiva-related activin-like kinase

signaling enhances osteoclast formation during heterotopic ossification in muscle tissues. *The Journal of Biological Chemistry*. 289:16966-16977, 2014. doi: 10.1074/jbc.M113.526038. 査読有

[学会発表] (計 6 件)

- ① 河尾直之、毛 莉、田村行識、奥本勝美、岡田清孝、松尾 理、梶 博史. 糖尿病による骨修復・再生遅延における plasminogen activator inhibitor-1 の役割. 第 15 回日本再生医療学会総会. 2016. 3. 17-19 大阪国際会議場 (大阪)
- ② 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. 2015. 07. 23-25 京王プラザホテル (東京)
- ③ 田村行識、河尾直之、矢野昌人、岡田清孝、奥本勝美、千葉康敬、松尾理、梶博史. ステロイド性骨粗鬆症、糖尿病および筋萎縮の病態機序における Plasminogen Activator Inhibitor-1 の役割. 第 33 回日本骨代謝学会学術集会. 2015. 07. 23-25 京王プラザホテル (東京)
- ④ **Tamura Y**, Kawao N, Yano M, Okada K, Okumoto K, Chiba Y, Matsuo O, Kaji H. Plasminogen Activator Inhibitor-1 Is Involved In Glucocorticoid-Induced Osteopenia, Diabetes And Muscle Wasting In Mice. 4th Joint Meeting of ECTS and IBMS. 2015.04.25-28 Rotterdam, Netherlands
- ⑤ 河尾直之、毛莉、田村行識、奥本勝美、岡田清孝、矢野昌人、松尾理、梶博史. Plasminogen activator inhibitor-1 は糖尿病による骨修復遅延に関与する. 第 32 回日本骨代謝学会学術集会. 2014.07.24-26 大阪国際会議場 (大阪)
- ⑥ 田村行識、毛莉、河尾直之、矢野昌人、岡田清孝、奥本勝美、梶博史. 糖尿病とビタミン D 欠乏が骨修復と骨密度に及ぼす影響について. 第 32 回日本骨代謝学会学術集会. 2014.07.24-26 大阪国際会議場 (大阪)

[その他]

ホームページ

<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