

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 29 日現在

機関番号：37116

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H07390

研究課題名(和文)慢性閉塞性肺疾患モデルマウスにおける筋・骨代謝動態の解析と有効な治療薬の検討

研究課題名(英文)Analysis of muscle/bone metabolism dynamics and consideration of valid therapeutic drugs in chronic obstructive pulmonary disease model mice

研究代表者

塚本 学 (TSUKAMOTO, Manabu)

産業医科大学・医学部・非常勤医師

研究者番号：70778159

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：慢性閉塞性肺疾患(COPD)モデルマウスの脊椎や下肢骨、下肢筋肉における変化を調査した。COPDモデルマウスは、エラスターゼ(PPE)誘導性肺気腫モデルを用い、気管内にPPE 0.1Uを投与した群をCOPD群、生理食塩水を投与した群を対照群とした。マイクロCTで解析した胸椎と腰椎の骨密度変化率は、PPE気管内投与4週以降、COPD群が対照群に対し有意に低値であった。骨組織標本上では、腰椎と脛骨ともにCOPD群の有意な海綿骨量減少と骨形成能低下を示した。一方、COPD群では遅筋(Ⅰ型筋繊維)が豊富なヒラメ筋重量が有意に減少しており、筋組織標本上では中間広筋におけるⅠ型筋繊維の萎縮を認めた。

研究成果の概要(英文)：Changes at the vertebrae, lower limb bones, and lower extremity muscles in chronic obstructive pulmonary disease (COPD) model mice were investigated. COPD model were used the elastase (PPE)-induced emphysema model. COPD group was mice administered with PPE 0.1 U intratracheally and control group was with saline. The change rate of bone mineral density at the vertebrae analyzed by micro CT was significantly lower in COPD group than that in the control group after weeks 4 of PPE or saline administration. On the bone tissue specimens, both the lumbar vertebrae and the tibiae in the COPD group showed significantly trabecular bone loss and the decline of osteogenesis ability. On the other hand, the weight of soleus muscle in the COPD group rich in the slow muscle fiber (type-I muscle fibers) was significantly decreased, and the muscle tissue specimen showed atrophy of type-I muscle fiber in the intermediate vastus.

研究分野：骨代謝関連

キーワード：慢性閉塞性肺疾患 続発性骨粗鬆症 男性骨粗鬆症 COPD骨粗鬆症モデル動物 肺気腫 骨形態計測
マイクロCT サルコペニア

1. 研究開始当初の背景

(1) ヒトにおいて、慢性閉塞性肺疾患 (COPD) は、肺内病変の他にも肺外病変として骨格筋や骨への障害が指摘されており、骨粗鬆症のリスクファクターとされている (Rabe KF. AJRCCM 2007, Kjensli A. Bone 2007)。COPD を発症している患者では、その 23.6~38.8% が骨粗鬆症と診断されており (Watanabe R. JBMM 2014)、椎体骨折有病率は 24~63% と報告されている (Lehouck A. Chest 2011)。腰椎より胸椎の椎体骨折が多いという特徴があることが知られており (Graat-Verboom. JBMR 2011)、肺気腫化と胸椎骨密度が負の相関を示すとする報告もある (Ikezo K. Respir Med 2015)。一方、COPD 症例は抗重力筋の筋量が低下しているという特徴があり、筋肉に関しても関連性が示唆されている。

(2) ヒトにおいては COPD という病態が筋・骨代謝に悪影響を及ぼすことが示唆されているにもかかわらず、その詳細なメカニズムについては不明であり、COPD 関連骨粗鬆症に関する研究の歴史は浅いため、COPD の動物モデルを用いた筋肉や骨に関する研究の報告は未だない。従って、COPD が生体内における筋肉や骨の代謝にどのような影響を与えているのかは定かではないのが現状である。

2. 研究の目的

(1) 本研究の目的は、COPD モデルマウスにおける、椎体や長管骨、下肢筋肉での変化を調査することである。

(2) 本研究結果に基づいて、COPD 関連骨粗鬆症の病態メカニズム解明や有効な治療薬の検討へと発展させる。最終的には、ヒトにおける COPD 関連骨粗鬆症の治療に応用することを目的としている。

3. 研究の方法

(1) COPD モデルマウスは、エラスターゼ (PPE; porcine pancreatic elastase) 誘導性肺気腫モデルマウスを用いた。COPD の研究においては広く用いられている動物モデルである (Kobayashi S et al. AJRCMB 2013)。マウスの気管内に PPE を投与することにより人為的にマウスの肺の気腫化を誘導し、COPD に類似した状態にさせる。

(2) 本研究のプロトコルを図 1 に示す。野生型雄マウス 12 週齢に対し、PPE 0.1U を気管内に投与して、COPD モデルマウスを作成した (COPD 群)。対照群には、気管内に生理食塩水を投与した。マイクロ CT を用いて、経時的 (気管内投与後 0、4、8、12 週) に胸腰椎の骨密度測定を行った。12 週目 (24 週齢) で屠殺し、血液、肺、脊椎、両下肢骨、両下

肢筋を採取した。

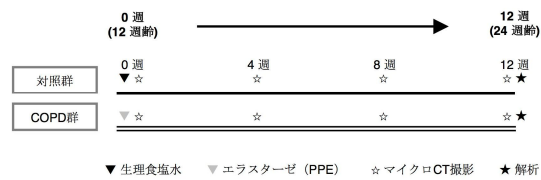


図 1: 本研究のプロトコール

(3) PPE 誘導性肺気腫モデルマウスにおける椎体や長管骨の海綿骨量や下肢筋肉重量の変化を調査した。更に、骨代謝動態や筋繊維への影響を組織学的に評価した。血漿中の骨代謝マーカー (Osteocalcin: 骨形成マーカー、TRACP-5b: 骨吸収マーカー) の変動も調査した。

4. 研究成果

(1) 両群における体重の推移に明らかな違いを認めなかった (図 2A)。COPD 群では対照群と比較し、組織学的に肺胞壁の消失や炎症細胞の浸潤を認め、平均肺胞壁間距離 (Lm) が有意に増加していた (図 2B、2C)。

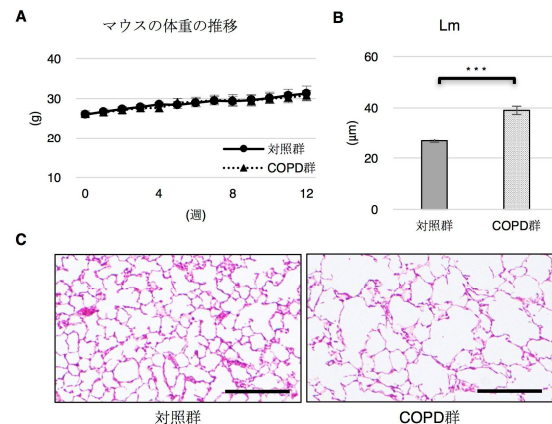


図 2: 体重の推移と肺気腫の評価

(A) マウスの体重の推移、(B) 平均肺胞壁間距離、(C) 肺胞の組織像。COPD 群では、肺胞壁の消失に伴い、一つ一つの肺胞が大きく、肺胞壁同士の距離が伸びている。

(2) 生体内で測定した胸腰椎の骨密度変化率は、PPE 気管内投与 4 週以降、COPD 群が対照群に対し有意に低値を示した (図 3)。

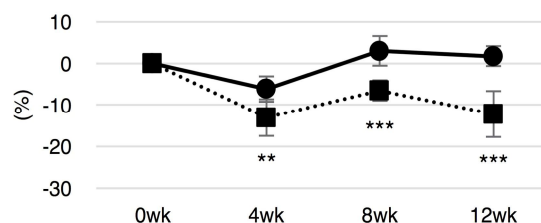
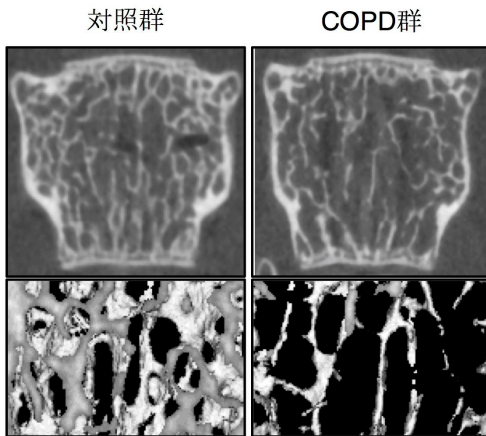


図3：胸腰椎の骨密度変化率

マイクロ CT による生体内での解析。データは、平均 ± 標準偏差で示す。実線が対照群、点線が COPD 群。** p<.01 *** p<.001

(3) マイクロ CT で撮影した第 1 腰椎と大腿骨遠位部の海綿骨微細構造を専用ソフトで解析したところ、COPD 群では対照群に比べ有意に海綿骨微細構造の劣化を示した (図 4)。

A: 第 1 腰椎



B: 大腿骨遠位部

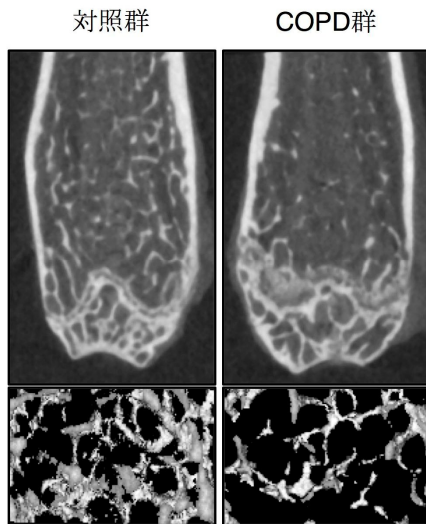


図4：海綿骨微細構造の解析

マイクロ CT で撮影した画像データを専用ソフトで解析した。(A) 第 1 腰椎、(B) 大腿骨遠位部。それぞれ、冠状断像 (上段) 3D 画像 (下段) を展示した。COPD 群では対照群に比べ、海綿骨梁が粗であり、連結度が低いことがわかる。

(4) 非脱灰標本における骨形態計測による組織学的な評価では、腰椎、脛骨近位部ともに COPD 群の有意な海綿骨量の減少および骨形成能の低下を示した (図 5)。

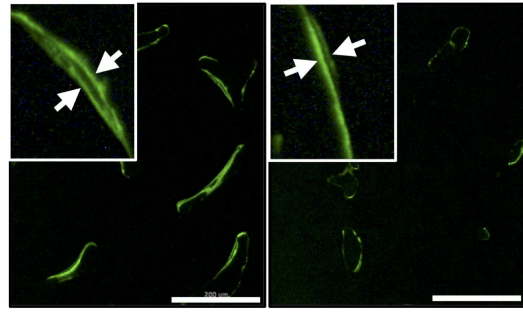


図5：腰椎における海綿骨領域の観察

屠殺 7 日前と 3 日前にカルセイン投与を行っており、蛍光顕微鏡でカルセインによる二重標識像が組織標本上で確認できる。対照群 (左) より COPD 群 (右) の二重標識幅が狭く、骨形成能の低下を示した。

(5) 対照群に対し COPD 群では、ヒラメ筋重量が有意に減少していた。筋組織標本上では大腿四頭筋における遅筋 (I 型筋繊維) の筋繊維萎縮を認めた (図 6)。

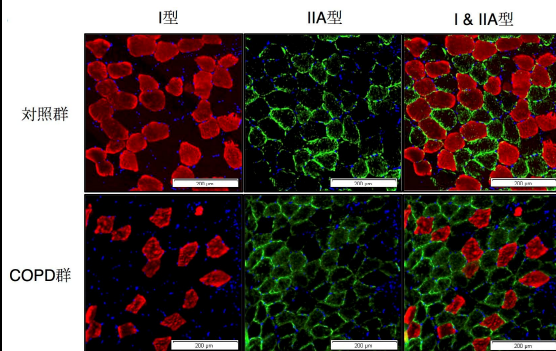


図6：中間広筋における I 型筋繊維の萎縮

対照群 (上段) と比較し、COPD 群 (下段) では、I 型筋繊維数の減少や筋繊維の大小不同を認めており萎縮の所見であった。赤が I 型筋繊維、緑が II A 型筋繊維を示す。

< 引用文献 >

- Rabe KF, et al. Update in chronic obstructive pulmonary disease 2006. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007; 175(12):1222-1232.
- Kjensli A, et al. Low bone mineral density is related to severity of chronic obstructive pulmonary disease. *Bone.* 2007; 40(2):493-497.
- Watanabe R, et al. Osteoporosis is highly prevalent in Japanese males with chronic obstructive pulmonary disease and is associated with deteriorated pulmonary function. *J Bone Miner Metab.* 2015; 33(4): 392-400.
- Lehouck A, et al. COPD, bone metabolism, and osteoporosis. *Chest.* 2011; 139(3):648-657.

Graat-Verboom L, et al. Osteoporosis in COPD outpatients based on bone mineral density and vertebral fractures. *J Bone Miner Res.* 2011;26(3):561-568.

Ikezoe K, et al. Bone mineral density in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Med.* 2015;109(9):1181-1187.

Kobayashi S, et al. A single dose of lipopolysaccharide into mice with emphysema mimics human Chronic obstructive pulmonary disease exacerbation as assessed by micro-computed tomography. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2013;49(6):971-977.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計1件)

Manabu Tsukamoto, Akinori Sakai. Immobilization and bone remodeling disorder. *Clinical Calcium*, 査読有, 27巻, 2017, 1723-1730. DOI: CliCa171217231730.

[学会発表](計1件)

Manabu Tsukamoto, Toshiharu Mori, Yasuaki Okada, Hokuto Fukuda, Wang Ke-Yong, Kazuhiro Yatera, Akinori Sakai. The Relationship between Severity of Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Bone Metabolism Biomarkers. The American Society for Bone and Mineral Research Annual Meeting 2017.

6. 研究組織

(1)研究代表者

塚本 学 (TSUKAMOTO, Manabu)

産業医科大学・医学部・非常勤医師

研究者番号：70778159