

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21591960

研究課題名（和文）喫煙（ニコチン）による胎児・小児の骨軟骨成長障害に関する研究

研究課題名（英文） Experimental Study on Nicotine Nicotine acts directly on growth plate chondrocytes to delay enchondral ossification through the alpha7 homopentameric neuronal nicotinic acetylcholine receptor -

研究代表者

佐藤 和毅（SATO KAZUKI）

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：60235322

研究成果の概要（和文）：われわれはニコチンが成長軟骨細胞に直接かつ特異的に作用して内軟骨性骨化に影響を与えると推測し、本研究を行なった。成長軟骨細胞 3 次元培養において、ニコチンは容量依存性に軟骨基質産生と肥大化を抑制し、同細胞において alpha7 nicotinic acetylcholine receptor の発現を認めた。ニコチンは野生型マウス胎児の骨格成長を抑制した。ニコチンは軟骨細胞の特異的受容体を介し、基質産生と肥大化を抑制し内軟骨性骨化を遅延させると推測された。

研究成果の概要（英文）：We investigated the effect of nicotine on human growth plate chondrocytes, a major component of enchondral ossification. The chondrocytes were derived from extra human fingers. Both human and murine growth plate chondrocytes expressed alpha7 nicotinic acetylcholine receptor (nAChR), which constitutes functional homopentameric receptors. Nicotine inhibited matrix synthesis and hypertrophic differentiation in human growth plate chondrocytes in suspension culture in a concentration-dependent manner. Methyllycaconitine (MLA), a specific antagonist of alpha7 nAChR, reversed the inhibition of matrix synthesis and functional calcium influx by nicotine in human growth plate chondrocytes in vitro. In vivo, maternal nicotine exposure resulted in delayed skeletal growth of alpha7 nAChR  $+/+$  fetuses but not in alpha7 nAChR  $-/-$  fetuses, implying that skeletal growth retardation by nicotine is specifically mediated via fetal alpha7 nAChR. These results suggest that nicotine, from cigarette smoking, acts directly on growth plate chondrocytes to decrease matrix synthesis, suppress hypertrophic differentiation, and consequently to delay enchondral ossification via alpha7 nAChR, leading to delayed skeletal growth and delayed fracture repair or non-union.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：喫煙（ニコチン）

## 1. 研究開始当初の背景

これまでに喫煙が骨折後の骨癒合率を低下させること、喫煙する妊婦の胎児は骨格の発育遅延を来たすことが報告されており、喫

煙が骨折治癒や骨格発生の過程における内軟骨性骨化に何らかの影響を与えることが推測される。また成長過程の骨端軟骨が障害される離断性骨軟骨炎（いわゆる小児の野球

肘)はヘビースモーカーの親をもつ子供に多く発生することが報告されており、喫煙は成長軟骨細胞にも何らかの影響を与える可能性が示唆される。

われわれはタバコに含まれる主要な生理活性物質であるニコチンに注目し、このニコチンが成長過程の軟骨細胞に直接かつ特異的に作用することにより、骨格の発生や成長、骨折治癒過程にみられる内軟骨性骨化に負の影響を与えると推測し、本研究を立案した。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、喫煙(ニコチン)が胎児および小児の骨軟骨の成長を障害することを実験的に明らかにすることである。

## 3. 研究の方法

(1) (予備実験) ヒト多指症患者から手術的に切除された余剰指由来の成長軟骨細胞におけるニコチン受容体 (nAChR) の発現を調べた。はじめにスクリーニングとして、成長軟骨から Isogen (Nippon gene) を用いて RNA を抽出し、メッセンジャーレベルでその発現を解析した。さらに、培養細胞において nAChR の発現を蛋白レベルで、western blot および免疫細胞学的に解析した。

その結果、同培養細胞の免疫染色、抽出蛋白質の western blot、および抽出 RNA の逆転写 PCR において 7 nAChR subunit の発現が確認された。軟骨細胞でのニコチン受容体発現はこれまで報告されておらず、われわれは世界に先がけてこれを発見した。この新しい事実は、タバコの主要な生理活性物質であるニコチンが増殖・分化過程の軟骨細胞に直接かつ特異的に作用する可能性を示唆する。この結果に基づき、以下の実験を行った。

(2) ヒト成長軟骨細胞の3次元培養を行ない、これにニコチンを添加した場合の影響を組織学的に解析した。ニコチンの影響を in vitro で明らかにすることが目的である。

軟骨細胞は単層培養では脱分化しやすい。そのため軟骨細胞の表現型を長期間維持したままニコチンの影響を明らかにするため、3次元培養を行なった。まずアガロースゲル3次元培養を行ない、ニコチンを各種濃度で培養液に添加し、細胞の増殖や軟骨基質産生、肥大分化に与える影響を組織学的に検討した。次にアルジネートビーズ3次元培養を4ヵ月行い、ニコチンを各種濃度で添加した。4ヵ月後にビーズを組織学的に観察し、軟骨基質産生に与える影響を確認した (Alcian blue, safranin O 染色)。

(3) ヒト成長軟骨細胞におけるニコチンの下流シグナルの同定

単層培養ヒト軟骨細胞を 0.5mM のニコチンで刺激し、蛍光カルシウム指示薬を用いて細胞内カルシウムイオン動態の観察 (calcium influx assay) をおこなった。

さらに、以下の2種類のニコチンの antagonist (阻害剤) を加え他場合のカルシウムイオン動態も観察した。

-bungarotoxine (Competitive antagonist)  
Mecamylamine (nonselective nAChR antagonist)

次に in vivo でニコチンが内軟骨性骨化に与える影響を調べる目的で以下の実験を行った。

(4) マウス胎児の de novo 内軟骨性骨化に対するニコチンの影響の観察

野生型妊娠マウス (C57BL6J マウス) をニコチン入り飲料水摂取群と対照群の2群に分け、その胎児の de novo 内軟骨性骨化の進行過程を組織学的に観察した。

胎生 15 日マウスの大腿骨の成長をニコチン非摂取マウスの胎児と組織学的に比較した。顕微鏡学的に大腿骨長 (Femur Length; FL)、肥大層の厚み (Hypertrophic Length of the Femur; HL)、さらにこれらの値から大腿骨における肥大層の占める率 (HL/FL) を算出した。

(5) 7 nAChR (-/-) マウスを用いた in vivo 実験

a. 7 nAChR (-/-) マウスにおける胎児の骨格発生を詳細に検討

妊娠マウスにニコチン入り飲料水を摂取させ、胎児の内軟骨性骨化の進行度を観察する: 7 nAChR (-/-) 胎児の骨格の発生を組織学的に観察し野生型の胎児と比較することにより、7 nAChR が内軟骨性骨化に対して生理的な役割を持つか否かを検討する。

b. 7 nAChR (-/-) マウスを用いた in vivo 実験

7 nAChR (-/-) マウスを用いて妊娠マウスに対するニコチン投与実験を行います: 妊娠 7 nAChR (+/-) マウスにニコチンを投与し、その胎児の骨格発生を genotype ごとに詳細に検討します。これにより、内軟骨性骨化に対するニコチンの影響に 7 nAChR が関与するかどうかを in vivo で明らかにする。

本研究は以下の倫理面に配慮して実験を行った。

ヒト幹細胞を用いる基礎研究について  
現時点では、ヒト由来の幹細胞 (手術検体余剰指を含む) を用いた基礎研究につい

て、当該施設の倫理委員会の承認を得ており（受付番号 88, H16 年 8 月承認 他）検体提供者の個人情報の保護、研究に関するインフォームド・コンセント取得を厳守し、研究を行っている。

#### 実験動物を用いる研究について

実験動物を用いる研究については、当該施設動物実験指針に準拠して研究を実施する（承認番号：2006-013）。特に、動物愛護と動物福祉の観点から実験動物使用は、目的に合致した最小限にとどめる。また、その際、麻酔等手段により苦痛を与えない等の倫理的配慮を行う。実験者は、管理者と相互協力の下、適切な環境での飼育管理を行う。

#### 4. 研究成果

##### (1) (予備実験)

培養ヒト軟骨細胞(ヒト多指症患者から分離)の免疫染色、抽出蛋白質の western blot、および抽出 RNA の逆転写 PCR において 7nAChRc subunit の発現が確認された。培養ヒト軟骨細胞の三次元培養では、ニコチンがアルシアンブルー染色陽性の軟骨基質量やアルカリフォスファターゼ活性、X 型コラーゲン合成を抑制することを確認した。

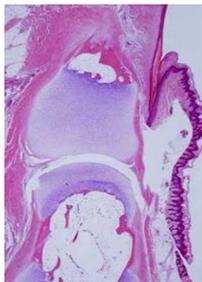


図 1



図 2

図 1 余剰指の縦断面の HE 染色切片。ヒト成長軟骨細胞の樹立に用いた。

図 2 培養ヒト成長軟骨細胞の抗 7nAChRc 免疫染色像

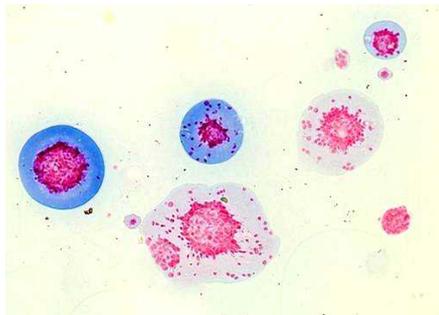


図 3 ヒト成長軟骨細胞のアガロースゲル三次元培養の alcian blue 染色像。

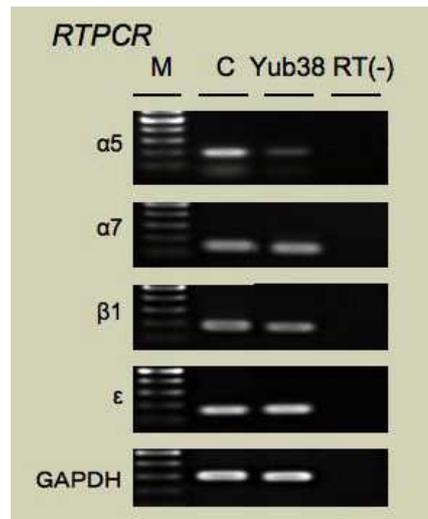


図 4

7nAChRc mRNA 発現 (RT-PCR)

軟骨細胞でのニコチン受容体発現はこれまで報告されておらず、われわれは世界に先がけてこれを発見した。この新しい事実は、タバコの主要な生理活性物質であるニコチンが増殖・分化過程の軟骨細胞に直接かつ特異的に作用する可能性を示唆する。この結果に基づき、以下の実験を継続した。

(2)アガロースゲル培養において、ニコチンは容量依存性にアガロースゲル、アルギン酸ビーズ三次元培養ではニコチン濃度依存性に細胞の増殖性と alcian blue 陽性 matrix 量 Collagen type X (Col X)、Alkaline Phosphatase 活性 (ALP)の免疫染色性を減少させた。

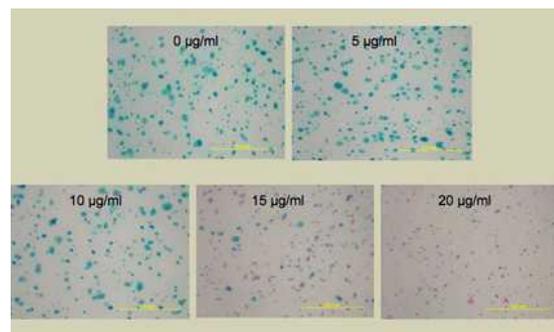


図 5 A Agarose gel 軟骨細胞培養に対するニコチンの影響(alcian blue)

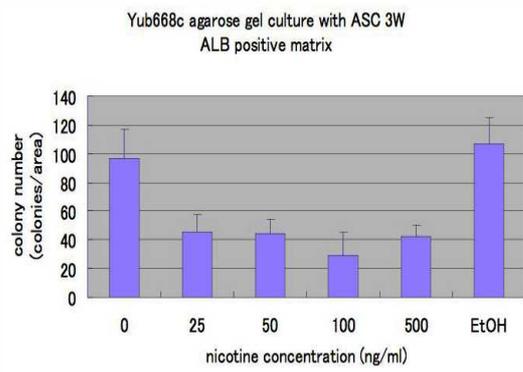


図 5-B Agarose gel 軟骨細胞培養に対するニコチンの影響(colony 数)

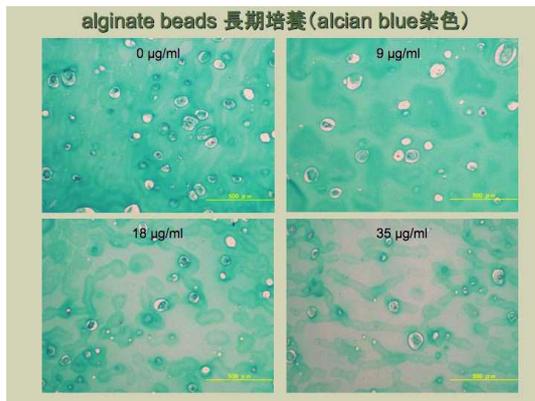


図 6 Alginate beads 3 ヲ月培養軟骨細胞に対するニコチン濃度の影響 (Alcian blue)



図 7 Alginate beads 3 ヲ月培養軟骨細胞に対するニコチン濃度の影響 (Safranin-O)

(3)同培養細胞を 0.5mM のニコチンで刺激したところ一過性の細胞内カルシウム濃度の上昇が観察された(図 8, 9)。

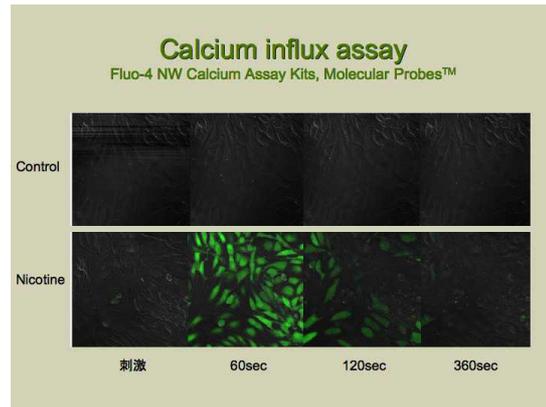


図 8 0.5mM ニコチン刺激でのカルシウムイメージ

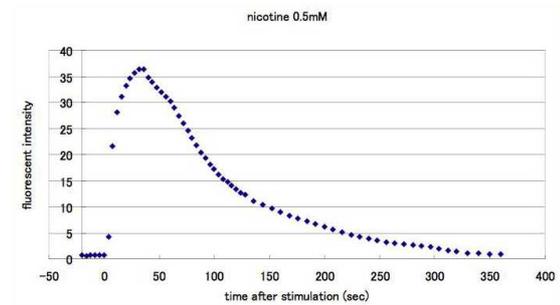


図 9 0.5mM ニコチン刺激での細胞内カルシウム濃度の経時的変化

さらに、二種類の antagonist ;  
 -bungarotoxine (Competitive antagonist)  
 Mecamylamine (nonselective nAChR antagonist)によりカルシウム濃度の上昇は抑制された。(図 10, 11)。

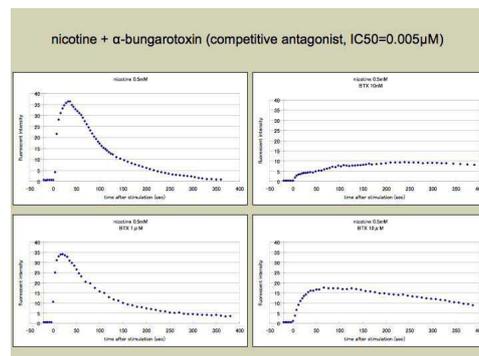


図 10 -bungarotoxine (Competitive antagonist)投与

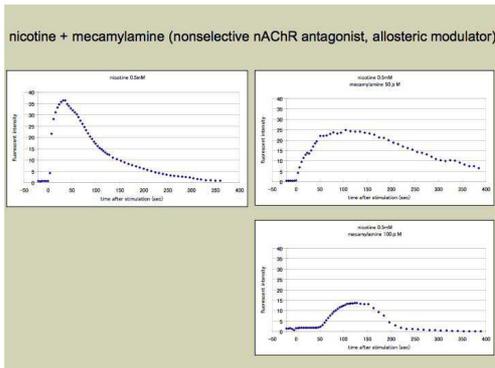


図 11 Mecamylamine (nonselective nAChR antagonist)

(4)また妊娠マウスをニコチン入り飲料水摂取群と対照群の2群に分け、その胎児の de novo 内軟骨性骨化の進行過程を組織学的に観察したところ、ニコチン入り飲料水摂取群は対照群よりも内軟骨性骨化が遅延しており骨長も小さかった(図 12)。

胎生 15 日マウスの大腿骨の成長をニコチン非摂取マウスの胎児と組織学的に比較したところ、顕微鏡学的に大腿骨長 (Femur Length; FL)、肥大層の厚み (Hypertrophic Length of the Femur; HL)、さらにこれらの値から算出した大腿骨における肥大層の占める率 (HL/FL) は有意な差をもってニコチン非摂取群が大きかった。

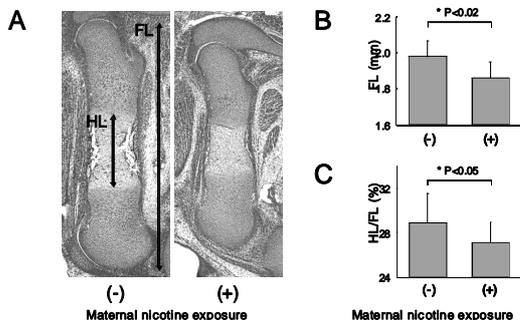


図 12

A ニコチン非摂取(左)/摂取(右)  
B 大腿骨長 (Femur Length; FL)  
C 肥大層の厚み (Hypertrophic Length of the Femur; HL)  
非摂取群では大腿骨長、肥大層の厚みのいずれも摂取群に比べも有意に大きい。

#### 【考察】

軟骨細胞での nicotinic acetylcholine 受容体の発現はこれまで報告されていない。わたしたちは予備実験でヒト成長軟骨細胞における  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine 受容体 (nAChR) の発現を世界に先駆け発見した。さらに、軟骨培養実験で、ニコチンが alcian blue 染色陽性の軟骨基質量や alkaline phosphatase 活性、type X collagen を減少さ

せることも確認した。これらの結果はニコチンが増殖・分化過程の軟骨細胞に直接かつ特異的に作用する可能性を示唆するものである。

予備実験の結果より骨端軟骨細胞には  $\alpha 7$  subunit の 5 量体からなる nAChR が発現しており、実験(3) 細胞内カルシウムイオン動態の観察 (calcium influx assay) でニコチン刺激による細胞内カルシウム濃度の上昇が同細胞の増殖や分化を抑制し内軟骨性骨化を遅延させる可能性が示唆された。

さらに、妊娠マウスを用いた in vivo 実験 (実験(4)) はその仮説を裏付けたが、ニコチンの胎盤を含めた母体への影響も無視できないため、 $\alpha 7$  subunit の遺伝子改変マウスを用いて胎児の内軟骨性骨化に与える影響を検討する必要がある、実験(5)、すなわち  $\alpha 7$  nAChR(-/-)マウスを用いた in vivo 実験を行った。

実験(5)については現在進行形 (データは出そろいましたが、それを現在解析中) で、本研究成果報告には間に合いませんでした。大変申し訳ございません。

現在までの結果からは、ニコチンの内軟骨性骨化に対する作用が  $\alpha 7$  nAChR を介する、という推測に矛盾しない結果が得られています。

#### 【結論】

- ニコチンは軟骨細胞の特異的受容体  $\alpha 7$  nAChR を介して、基質産生と肥大化を抑制し内軟骨性骨化を遅延させる。
- この事実は、ニコチン (喫煙) が骨折治療における内軟骨性骨化に負の作用を有することの根拠の一つになる。

#### 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 0 件)

(論文作成中)

〔学会発表〕(計 1 件)

(1) Kawakita A, Sato K, Ikegami H, Takayama S, Umezawa A, Toyama Y: Nicotine acts on growth plate chondrocytes to delay skeletal growth through the  $\alpha 7$  neuronal nicotinic acetylcholine receptor. 55th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society: Poster presentation (2010. 2. 22 -25, Las Vegas, USA)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計0件）

取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

佐藤 和毅 (SATO KAZUKI)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：60235322

### (2) 研究分担者

斉藤 憲太 (SAITO KENTA)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：90383893