

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10493

研究課題名(和文) 神経系による生理的骨代謝調整系の解明および喫煙(ニコチン)が骨代謝に与える影響

研究課題名(英文) Experimental study on the influence of nicotine to bone metabolism

研究代表者

佐藤 和毅 (SATO, KAZUKI)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・准教授

研究者番号：60235322

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)：副交感神経による、7ニコチン性アセチルコリン受容体(7nAChR)を介した骨調節機構の解明を行った。7nAChRは、副交感神経系を介しマクロファージからのTNF α を抑制し、骨芽細胞でのOPG、RANKLを制御することで破骨細胞の活性を正に制御し骨量低下に導く調節系に関わること、また、ニコチンはこの系を活性化することが示された。今回の解析により、副交感神経系による骨恒常性制御のメカニズムと、喫煙による作用物質であるニコチンが骨に及ぼす作用機序を新たに明らかにすることができた。

研究成果の概要(英文)：The nicotinic receptor 7nAChR reportedly regulates vagal nerve targets in brain and cardiac tissues, and the parasympathetic nervous system; however, its roles in bone metabolism were remained to be elucidated. Moreover, smoking is known as a risk of osteoporosis development, however, the mechanisms underlying have not been clarified. Our study revealed that 7nAChR suppressed TNF α expression in macrophages, decreased osteoprotegerin/RANKL ratio via the parasympathetic nervous system and upregulated osteoclastogenesis, resulting in loss of bone mass. Nicotine, the ligand of 7nAChR, activated the system. We now clarified a novel mechanism underlying controlling bone metabolism by the parasympathetic nervous system, and how nicotine, a main bioactive substance taken by smoking, affected bone.

研究分野：整形外科学

キーワード：ニコチン 7nAChR 骨代謝

1. 研究開始当初の背景

現在、本邦では人口の高齢化が急速に進んでおり、骨粗鬆症患者は 1300 万人と推測されます。骨粗鬆症は脊椎椎体骨折や大腿骨頸部骨折を引き起こします。これらの骨折は高齢者の ADL 低下を招き、統計的には脳血管障害に次ぐ「寝たきり」の大きな原因となっています。また、これに伴う医療費の急増は社会問題になっています。大腿骨頸部骨折に対する年間医療・介護費用は 6000 億円で、2025 年には倍増すると予想され、医療経済の観点からも骨粗鬆症対策は緊急の課題です。

生理的な骨代謝制御機構の解明は、創薬による骨粗鬆症予防と密に関連し、上記課題の解決につながる重要な研究テーマと考えます。骨代謝における骨局所の骨形成、骨吸収に関する機序は明らかになってきましたが、体系的な骨代謝調節機構は未解決です。その中で、近年、神経系による骨代謝制御の可能性が骨代謝におけるトピックの一つになっています。竹田らは交感神経系がレプチンを介して骨形成を阻害することを明らかにし (Cell, 2002)、神経系と骨代謝の関連を初めて報告しました。その後、神経伸長に必須な Sema3A が感覚神経の骨への侵入を介し骨代謝を制御する (Fukuda T. Nature, 2013) こと、神経系サイトカインであるニューロメジン U、ニューロペプチド Y などが骨代謝に影響を与えることが明らかになりました。

われわれはこれまでの研究で、副交感神経系のシグナル伝達に関わる 7nAChR がヒト成長軟骨細胞で発現していることを発見し、(1)ニコチンは 7nAChR を介して直接的に軟骨細胞に作用し、増殖、分化を抑制すること (*in vitro*)、(2)母体のニコチン摂取により胎児の内軟骨性骨化が障害され、発生段階における成長障害が生じること (*in vivo*) マウスを報告しました (Kawakita A, Sato K, et al. PLoS One, 2008)。さらに骨代謝系細胞における 7nAChR の発現を確認し、7nAChR のノックアウトにより骨表現型が変化することを世界に先駆けて発見しました。これらの研究成果から副交感神経系による 7nAChR を介した生理的骨代謝制御機構の存在を確信し、本研究を立案しました。副交感神経系と骨代謝の関連についてはこれまで一切報告がありません。

2. 研究の目的

本研究の目的は、神経系による生理的骨代謝調節系の解明と喫煙(ニコチン)が骨代謝に与える影響を明らかにすることです。

われわれは、これまでの骨軟骨代謝に関する研究から副交感神経系に係る 7ニコチン性アセチルコリン受容体(7nAChR)を介した生理的骨軟骨代謝制御機構の存在と、喫煙(ニコチン)がこの骨代謝制御機構に影響を与えることを確信し、本研究を立案しました。本研究では副交感神経系による 7nAChR を介した生理的骨代謝制御機

構を明らかとし、さらに喫煙(ニコチン)がその骨代謝制御機構に与える影響をこれまでにない視点から明らかにすることを目指しました。

本研究で 7nAChR を介した副交感神経系による生理的骨代謝制御機構を解明し、さらにこの機構を介する喫煙(ニコチン)の骨代謝への影響、骨密度低下・骨強度低下の機序を明らかにします。

これまでの研究で軟骨細胞は 7nAChR を有すること、この受容体のリガンドの一つであるニコチンにより細胞増殖・分化が抑制されること (*in vitro*)、妊娠マウスへのニコチン投与により胎児の骨格形成が抑制され、7nAChR(-/-)マウスではこれがみられないこと (*in vivo*) を証明しました。また、7nAChR の生理的リガンドであるアセチルコリンもニコチン同様に軟骨細胞に直接作用することを見出しました。さらに、骨代謝系細胞における 7nAChR の発現を確認し、7nAChR のノックアウトにより骨表現型が変化することを世界に先駆けて発見しました。これらの結果からアセチルコリンと 7nAChR が生理的骨代謝調節に関与することを確認しました。すなわち、副交感神経終末から放出されたアセチルコリンが骨代謝調節を行っていると考えました。

同時に、副交感神経系による生理的骨調節系を明らかにすることで、喫煙により取り込まれる 7nAChR の外因性リガンドであるニコチンが骨代謝に与える影響を明らかにすることができると考えています。

3. 研究の方法

(平成 27 年度)

本研究では、ニコチンが骨に及ぼす影響の作用機序を明らかにし、体系的に解明することを目的とした。研究方法は、まず骨形成に対するニコチンの影響をマウス大腿骨骨折モデル、異所性骨化モデルを作成し soft x-ray にて評価し検討した。次に、骨質に対するニコチンの影響を検討するため、マウス大腿骨にニコチンを添加し organ culture を行い、骨質劣化マーカーとされる AGEs の一つである pentosidine 量を計測した。次に、7nAChR ノックアウト(7KO)マウスの骨形態計測(骨密度測定(DEXA 法)、骨形成速度測定(calcein double labelling 法)、Toluidin Blue 染色、TRAP 陽性細胞(破骨細胞)数の測定)を行った。

(平成 28 年度)

マウス大腿骨骨髄から誘導して得た破骨細胞の培養を行い、ニコチン、アセチルコリン(ともに 1 μM)に対する破骨細胞の反応性を細胞数、Real time PCR により破骨細胞活性の指標となる転写因子である Ctsk、Nfatc1 の発現を検討した。また、破骨細胞を制御している OPG を WT マウスと 7KO マウスで検討するため ELISA 法を用いてそれぞれの血清 OPG を測定した。さらにこの OPG の値の変化が、

ニコチン投与、迷走神経切断、WT マウスと 7KO マウス間での骨髄移植によりどのように生じるかを検討した。

(平成 29 年度)

平成 28 年度までにノックアウトマウスの骨髄、詳しくはマクロファージ系の細胞である Mac1 陽性細胞では、TNF が高値を示すことを FACS で確認した。血球系の中でもマクロファージが神経系からの刺激を受け、TNF を介して OPG をコントロールしている可能性を強く疑った。

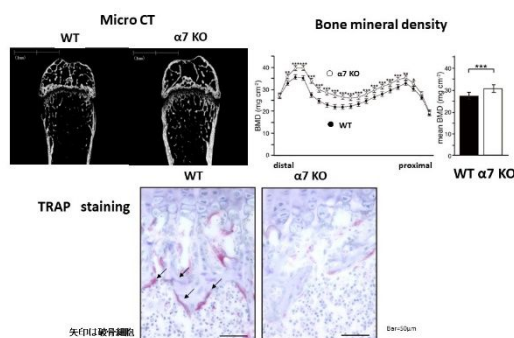
これを受けて、マクロファージから産生された TNF は、骨内の骨芽細胞の OPG 産生を制御している可能性を考え、骨芽細胞様細胞である MC3T3cell に TNF を加え培養する実験系を進めた。さらに、マクロファージから産生される TNF が破骨細胞調節系に Critical であることを示すための実験も進めた。

4. 研究成果

(平成 27 年度)

骨形成に対するニコチンの影響は両群とも仮骨形成を含む骨癒合形態、骨癒合期間において両群間に差は見られなかった。7KO マウスでの同様であった。骨質に対するニコチンの影響の検討では、pentosidine 量はニコチンを添加することで有意に増加した ($p < 0.05$; $p = 0.02$)。7KO マウスの検討では、WT マウスに比べ骨密度は、有意に高く ($p < 0.001$; $p = 5.6 \times 10^{-6}$)、組織上の破骨細胞数は有意に少なかった ($p < 0.05$; $p = 0.035$)。骨形成速度、軟骨形成の組織学的検討では、両者に差がなかった。

ニコチンの作用によりマウス骨組織に AGEs の蓄積が有意にみられたことからニコチンが骨質を低下させるという新たな知見が得られた。骨密度の検討から 7nAChR が骨代謝に大きく関わる事が明らかとなった。



(平成 28 年度)

骨質に対するニコチンの影響の検討では、pentosidine 量はニコチンを添加することで有意に増加した。7KO マウスの検討では、WT マウスに比べ骨密度は、有意に高く、組織上の破骨細胞数は有意に少なかった。血清 OPG 濃度の検討では、7KO マウスは WT マウスに比べ有意に高かった。迷走神経切断では

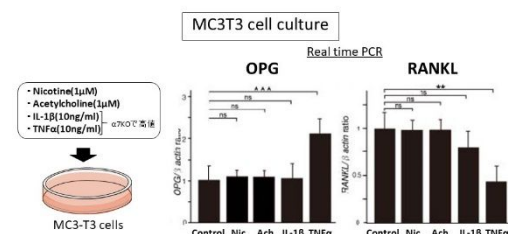
有意に上昇し、ニコチンのマウスへの経口投与により有意に低下した。7KO マウスと WT マウス間で骨髄移植を行うと血清 OPG 濃度は、ドナーが 7KO であった場合に高値を示した。

ノックアウトマウスの表現型から予測される野生型マウスでの生理的なレセプターを介した破骨細胞の調節系は、7レセプターを介したシグナルが迷走神経系を介し、アセチルコリンを放出され、血球系などを介さず骨での7レセプターが関与し、最終的には、OPG が Downregulation されることで破骨細胞活性を抑制すると考えた。血球系が関与しないことを示すため、野生型、ノックアウトマウス型両者で入れ替える骨髄移植実験を行った結果、ノックアウトマウス由来の骨髄が移植された群で血漿 OPG が高かった。したがって、神経系は、血球系を介して、骨にシグナルが伝達されるメカニズムがあると予測した。また、血球系が直接 OPG をコントロールしていないことも分かった。

(平成 29 年度)

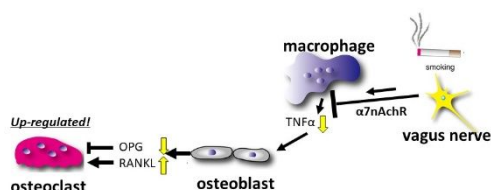
ノックアウトマウスの骨髄、詳しくはマクロファージ系の細胞である Mac1 陽性細胞では、TNF が高値を示すことが FACS での検討で分かった。したがって、血球系の中でもマクロファージが神経系からの刺激を受け、TNF を介して OPG をコントロールしている可能性が明らかになった。骨芽細胞様細胞である MC3T3cell に TNF を加え培養すると IL1 などより鋭敏に OPG の産生が促進することが分かった。その結果、マクロファージから産生された TNF は、骨内の骨芽細胞の OPG 産生を制御していると考えられた。

マクロファージから産生される TNF がこの破骨細胞調節系に Critical であることを示すために 2 つの方法で検討した。一つは、TNF の阻害剤であるエタネルセプトをマウスに投与する実験で、これをノックアウトマウスに投与しますと予測通り OPG が有意に低下することを確認した。また、7ノックアウトマウスでは高い OPG 値を示したが、さらに TNF もノックアウトさせたダブルノックアウトマウスでは、OPG が低下していることを確認した。



以下の 2 つを結論として導いた。

1. 副交感神経系、マクロファージ上の 7nAChRからのシグナル伝達により TNF を調節する 'Anti-inflammatory pathway' を介し、骨芽細胞からの OPG 産生を負に制御することで破骨細胞活性を上げる経路がある
2. ニコチンは、この系を刺激することで破骨細胞活性を高める



(平成 27-29 年度まとめ)

7 ニコチン性アセチルコリン受容体 (7 nicotinic acetylcholine receptor: 7nAChR) は、主に脳や心臓に発現し、副交感神経系による機能調節に関連していることが報告されているが、骨代謝との関連に関する報告は乏しい。そこで、副交感神経による 7nAChR を介した骨調節機構の解明を試みた。まず 7nAChR ノックアウト(以下 KO) マウスの骨表現型が野生型マウスに比べ有意な骨密度の増加と破骨細胞数の減少を示すことを見出した。しかし、*in vitro* にて 7nAChR のリガンドであるアセチルコリンやニコチンを野生型、7nAChR KO マウス由来の破骨細胞分化系に添加しても、破骨細胞分化には影響がなかったことから、7nAChR は間接的に破骨細胞形成を正に制御することが示唆された。そこで、血清 osteoprotegerin(OPG), RANKL を ELISA 法にて検討したところ、7nAChR KO は野生型に比べ有意に OPG/RANKL 比が高値を示すことが明らかとなった。また、7nAChR・OPG ダブルノックアウト(DKO)マウスでは、7nAChR KO における骨の表現型である骨量増加と破骨細胞数減少が改善したことから、7nAChR KO の表現型は OPG 高値に基づくものであることが明らかになった。さらに、野生型マウスに対し副交感神経切除を行ったところ、7nAChR KO と同様に血清 OPG/RANKL 比の増加を示し、ニコチンを投与すると逆に血清 OPG/RANKL 比は減少した。脳組織をはじめ 7nAChR が豊富に発現している臓器が OPG/RANKL の制御を行っていることを確認するため、野生型、7nAChR KO マウス間で骨髄移植を行った結果、仮定に反し骨髄がその制御を行っていることが明らかとなった。さらに FACS にて 7nAChR KO マウス由来の Mac1 陽性マクロファージにおいて TNF が野生型に比べ高値であることがわかり、TNF は骨芽細胞様細胞である MC3T3 細胞を強く刺激し

OPG 産生を促すことが *in vitro* にて示された。また、7nAChR KO・TNF KO マウスでは、7nAChR KO の骨表現型が改善されていること、*in vivo* において TNF 阻害剤であるエタネルセプトを投与すると 7nAChR KO マウスの血清 OPG/RANKL 比が野生型と同レベルに低下するとの結果を得た。これらの結果から、7nAChR は、副交感神経系を介しマクロファージからの TNF を抑制し、骨芽細胞での OPG, RANKL を制御することで破骨細胞の活性を正に制御し骨量低下に導く調節系に関わること、また、ニコチンはこの系を活性化することが示された。今回の解析により、副交感神経系による骨恒常性制御のメカニズムと、喫煙による作用物質であるニコチンが骨に及ぼす作用機序を新たに明らかにすることができた。

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)

Mito K, Sato Y, Kobayashi T, Miyamoto K, Nitta E, Iwama A, Matsumoto M, Nakamura M, Sato K, Miyamoto T. The nicotinic acetylcholine receptor 7 subunit is an essential negative regulator of bone mass. *Scientific Reports* 2017 Mar 28;7:45597. doi: 10.1038/srep45597.(査読あり)

[学会発表](計4件)

(1)Kazuaki Mito, Takeshi Miyamoto, Kazuki Sato, Morio Matsumoto, Masaya Nakamura. 7 nicotinic acetylcholine receptor has a role to regulate bone mass by controlling OPG and RANKL. Annual Meeting of Orthopaedic Research Society, 2018.

(2)Kazuaki Mito, Takeshi Miyamoto, Kazuki Sato, Morio Matsumoto, Masaya Nakamura. 7nAChR is required to regulate osteoclasts and bone mass via TNF and OPG/RANKL ratio. The American Society for Bone and Mineral Research 2017 Annual Meeting, 2017.

(3)三戸一晃, 宮本健史, 佐藤和毅, 松本守雄, 中村雅也. 7ニコチン性アセチルコリン受容体は OPG と RANKL を介した破骨細胞と骨量抑制に必須である. 第 32 回日本整形外科学会基礎学術集会, 2017.

(4)三戸一晃, 宮本健史, 佐藤和毅, 松本守雄, 中村雅也. 7ニコチン性アセチルコリン受容体による OPG/RANKL 比の低下を介し破骨細胞活性を抑制する骨調節のしくみ. 第 35 回日本骨代謝学会, 2017.

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

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 (信濃町)・准教授
研究者番号：60235322

(2) 研究分担者

宮本 健史 (MIYAMOTO, Takeshi)
慶應義塾大学・医学部 (信濃町)・特任准
教授
研究者番号：70383768

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

三戸 一晃 (MITO, Kazuaki)