

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592279

研究課題名(和文)喫煙(ニコチン)が骨代謝に及ぼす影響に関する実験的研究

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・講師

研究者番号：60235322

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：(1)マウス骨修復モデルで、ニコチン群は仮骨架橋形成が有意に不良だった。骨折部の仮骨量は少なく、内軟骨性骨化が障害されていると考えられた。(2)マウス大腿骨の培養におけるpentosidineの測定でニコチン群で有意に高くニコチン添加で骨質が低下した。7nAChR KOでは、いずれも有意な上昇はみられなかった。(3)骨形態計測では、7nAChR KOで骨密度は有意に高値を示した。破骨細胞数はKOで少なく、骨形成や軟骨形成の検討では両者に差がなかったことから7nAChRは生理的骨代謝において、破骨細胞を活性化させる代謝経路に関与することが推測された。

研究成果の概要(英文)：(1) To examine the influence of nicotine on ossification, a mouse bone restoration model was adopted. As the result performed after having maintained high density of internal nicotine for a long duration, the callus bridging formation was significantly worse than control group in two weeks. Additionally, few callus formation implied that the enchondral ossification was impaired. (2) We cultured the mouse thighbone and measured intraosseous pentosidine, one of AGEs. The result was that, not in 7nAChR knockout mouse (KO), but in wild type mouse (WT), pentosidine level was significantly higher in nicotine group, which indicated nicotine affects bone quality. (3) As a result of bone morphometry for WT and KO, in KO the bone density was significantly higher and osteoclasts were fewer. There was no difference in the histological examination of osteogenesis and chondrogenesis between them, by which it was supposed that 7nAChR activated osteoclasts in physiological bone metabolism.

研究分野：整形外科学

キーワード：骨代謝 ニコチン

1. 研究開始当初の背景

高齢化が進む現代では、加齢に伴う骨の脆弱化、骨質低下の解決が医療費抑制の点から社会の重要課題の一つである。また、喫煙は、骨粗鬆症の予防と治療のガイドライン(2006年)にて骨粗鬆症のリスクファクターの一つであるとされる。

したがって喫煙の骨代謝、骨治癒に対する影響の作用機序の解明・予防が重要である。その作用機序としては、喫煙により体内に取り込まれるニコチンが局所の循環障害を招き、間接的に骨代謝に負に作用するという内容が定説とされてきた。しかしながら、われわれは、これまでの研究(平成 21-23 年度科 研費補助金 研究基盤 C)からニコチンが軟骨細胞に 7nAChR を介し直接抑制的作用を示すことを明らかにした。つまり、定説とは異なるニコチンが骨代謝系に直接作用する機序があると考え、これを解明するため本研究を立案した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、喫煙(ニコチン)が骨代謝に関連する細胞(骨芽細胞、破骨細胞)、骨組織に対して直接かつ特異的に作用する機序の解明です。

3. 研究の方法

(1) (予備実験) western blot と抽出 mRNA の逆転写 PCR 解析にてヒト成長軟骨細胞において 7nicotinic acetylcholine 受容体 (nAChR) の発現を確認した。さらに、ニコチンは 7 nAChR 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)、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)を確認している。すなわち、ニコチンが軟骨細胞の nAChR を介して軟骨代謝に直接作用を有することを明らかとした。

また、7nAChR(-/-)マウスにおいては、骨強度低下、骨密度低下である可能性を小規模データにて確認しており、また、マウス骨折モデルに対するニコチン投与を施行したところ骨折治癒が不良である可能性を見出しており、これらの結果に基づき、以下の実験を行った。

(2) ニコチンが骨形成に及ぼす影響

まず、骨修復に対するニコチンの影響を検討した。C57BL/6 8 週齢マウスに対し骨折モデル(Tajima et al. J Orthop Res, 2010)を使用した。ニコチン投与群(n=5)には、2% sucrose + nicotine(hydrogen tartrate salt)を飲水として経口投与した。ニコチン濃度は、25 µg/ml にて開始し、投与 3 日目、4 日目は 50 µg/ml、投与 5 日目以降は 100 µg/ml とした。対照群(n=5)は、2% sucrose を飲水とした。ニコチン投与開始 7 日目に、各々の個体の両側脛骨に骨折処置を施行し、処置後 8 週まで、定期的に Soft X-ray で評価した。骨折処置

は、脛骨中央で骨切りし 23 ゲージ針にて髓内固定した。骨切り部の骨、仮骨の状態を評価の際に着目した。Soft X-ray でニコチン投与群/非投与群間に差異があった場合、同一の検体を peripheral quantitative CT(pQCT; 骨密度、骨強度を定量)によりさらに精査・検討する。この検討にて、内軟骨性骨化(骨切り部中央)と膜性骨化(骨切り部両端)が評価できる。

次に、骨新生に対するニコチンの影響を検討した。C57BL/6 8 週齢マウスに対し異所性骨化モデル(Kawasaki et al. Biomaterials, 2010)を使用した。BMP2 とニコチン含有のゼラチンフォーム(Gelform®)をマウス大腿部筋内に包埋し、異所性骨化部の大きさ、形状、濃度などを対照群(ニコチンなしのゼラチンフォームを包埋)と soft X-ray にて比較検討した。この検討にて、BMP2 は主に骨芽細胞に作用するため、膜性骨化に対するニコチンの影響が評価できる。

さらに、7nAChR(-/-)マウスでの検討を行う。この結果により 7nAChR を介した作用を推測する。

ニコチンが骨質に及ぼす影響を検討した。まず、Garnero(2006)、Vashith(2001)らの方法に準拠し、C57BL/6 8 週齢マウス大腿骨 organ culture を nicotine 有無の条件下で行う。骨強度・骨質評価マーカー(骨質劣化に伴い蓄積する老化架橋物質 advanced glycation endproducts ; AGEs の一つである pentosidine)を評価する(in vitro)。

次に、糖尿病マウス(研究室で作成済み)を使用し、ニコチン含有水を持続的に(3 ヶ月)経口投与した。非投与の対照群の大腿骨と前述した in vitro 実験同様に比較検討する。

さらに、7nAChR(-/-)マウスを用い、上記実験を野生型マウスと比較した。これにより、7nAChR の骨質へ生理的作用機序の推測を行う。

7 nAChR の生理的役割の検討を行う。

以下の a-c を野生型マウスと 7nAChR(-/-)マウスで比較検討を行う

a: 骨密度: 下腿骨の pQCT b: 骨形態計測: Calcein 腹腔内注射による骨標識(骨形成速度を評価)と TRAP 染色(破骨細胞特異的な染色法)、Toluidine Blue 染色(軟骨基質の染色)、これにより野生型マウス / 7nAChR(-/-)マウスの組織学的比較検討から 7nAChR の骨代謝における生理的役割を推測する。c: マウス大腿骨 Bone Marrow から誘導した破骨細胞培養 つまり、骨髄幹細胞から誘導した破骨細胞(当教室で作成済み)を使用し、ニコチンやアセチルコリン(生理条件下でのリガンド)に対する破骨細胞の反応性(核数、大きさに注目)を解析する。さらに、発現遺伝子の解析(Realtime PCR)を行うことで、7nAChR を介した細胞内への下流シグナル伝達経路の解明を進める。

本研究は以下の倫理面に配慮して実験

を行った。

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。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 7 nAChR 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。また、これを介したニコチンの細胞内シグナル伝達が、7nAChR 特異的拮抗薬である MLA にて遮断されることが見出されている。*In vitro* において、軟骨細胞の増殖、肥大化分化、基質産生がニコチン濃度依存性に抑制されることが分かった。また、*in vivo* で、ニコチン暴露した野生型マウスより得られた胎児の検討で、軟骨層の短縮がみられ、7nAChR(-/-)マウスではこれを認めないことから、ニコチンが成長軟骨に発現する 7nAChR を介して直接マトリックスの合成や骨格形成を制御することを見いだした。

(2) 骨修復に対するニコチンの影響についての結果である。両群とも骨折処置後 14 日目程で骨癒合が得られ、骨癒合期間、仮骨形成を含む骨癒合形態において両群間に明らかな差は見られなかった。次に、骨折処置をニコチン投与から 4 週まで待機し再検討を行ったがやはり X 線像で明瞭な両者の差異はありませんでした。次に nicotine 濃度が不十分であると考え最大限にすることとした。nicotine 投与群(n=5)には、nicotine pellet 5mg 21days release (IRA 社、11.9mg/kg/day) を背部皮下に埋没させた(腹腔内設置では即死)。Pellet 設置から 3 週後、骨折処置を行いさらに同 pellet を 1 個追加設置した。その後、X 線評価を数日ごとに行った。nicotine pellet 投与群と対照群を評価したが両群とも同様に 14 日程で骨癒合し、骨癒合期間、仮骨形成を含む骨癒合形態に明らかな差はこの場合も見られなかった(図 1)。Nicotine pellet 5mg 21days release を腹腔内設置するとマウスは即死し、また 5mg 以上の濃度の pellet では、皮下設置にて即死する結果だったので、マウスに対するニコチン投与による体内ニコチン濃度は最高濃度にて検討を行っていることが確認できている。

マウスに対するニコチン投与の骨密度への影響を検討した報告では、投与期間を 3 ヶ

月以上とし結果を得ていることを参考にし、体内ニコチン濃度を高く長時間維持した状態で再度骨折処置による検討を行った。ニコチン投与群(n=5)に飲水によるニコチン経口投与を 9 ヶ月行った後、同様の骨折処置とその後 X 線評価を 1 週間毎に行った。その結果、骨折処置後 2 週時点でニコチン投与群では、骨折部での仮骨架橋形成が不良だった。この時点で sacrifice し骨強度を検討したところ、ニコチン群で低い結果となった。さらに pQCT で両群の骨折部仮骨量、骨密度(仮骨部、皮質骨)を測定した。この結果、ニコチン群で骨皮質での骨密度は明らかに低くはなかったが、骨折部では仮骨量が少ないにも関わらず骨密度が高いことが分かった。

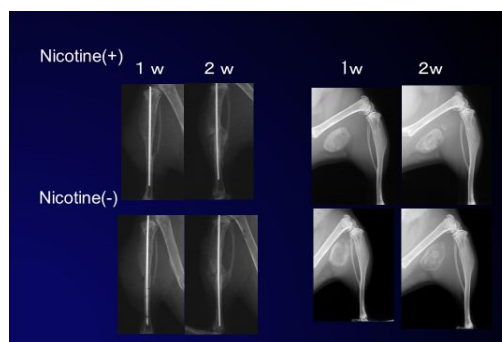


図 1 ; 骨折モデル・異所性骨化モデルによるニコチン作用の検討

これにより内軟骨性骨化がより障害されていると考えられた。この結果は、われわれが予備実験として行った *in vitro* の検討でニコチン投与により軟骨細胞が増殖、分化が阻害されることを明らかにした結果を *in vivo* にて検証できたものといえる。

次に、**骨新生に対するニコチンの影響**を異所性骨化モデルを使用し比較検討を行った。これは骨新生に対する検討、また機序としては膜性骨化と同様の骨形成過程に対する検討となる。BMP2 2 μ g と nicotine(1mg/ml, 100 μ g/ml, 1000 ng/ml, 100ng/ml)を含有した Gelform[®] (5mmx5mm)をマウス大腿筋内に設置した後、1 週毎に X 線評価を行った。結果は、いずれのニコチン濃度においてもニコチン群と対照群両群間に明らかな X 線像上の相違は見られなかった。(図 1)

野生型マウスから得た大腿骨を用いたニコチンによる骨質の検討では、10%FCS 群と 10%FCS+nicotine100 μ g/ml 群(各 n=5)において、骨強度を示す破断エネルギーの測定値は、両者に明瞭な差はなかったもの(p=0.92)、pentosidine 量の平均値はそれぞれ 31.7 \pm 1.02 μ g/ml, 35.4 \pm 2.86 μ g/ml で nicotine を添加した群で有意に骨質低下があると考えられた (t-test analysis) (p<0.05; p=0.02)(図 2)。

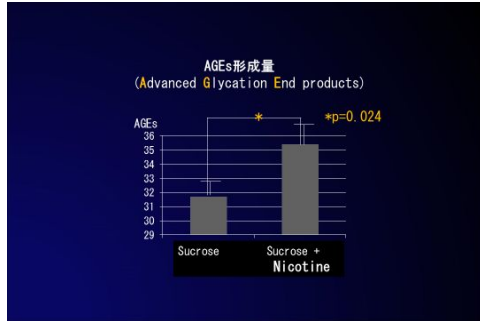


図 2 ; ニコチンの骨質に対する影響

野生型マウス(WT)、7nAChR(-/-)マウス(KO)から得た大腿骨を用い比較した検討で10%FCS+ribose0.2M+nicotine100µg/ml群でWTでは、nicotine添加により有意ではないがAGEsが上昇する傾向がある一方(p=0.44)、KOでは認めなかった(p=0.96)。骨強度にはWT、KOともnicotineによる有意な変化は見られなかった(各々p=0.99, 0.61)。

糖尿病マウスは、ニコチン投与により死亡する個体が多く、期間内には検討できなかった。

7nAChR(-/-)と野生型マウスにおける骨形態計測の検討では、7nAChR(-/-)マウスの方が、骨密度が有意に高い(p=0.00131)結果が得られた。また、組織における単位面積あたりの破骨細胞数は、7nAChR(-/-)マウスで有意に少なかった(p=0.035)。一方で、骨形成系、軟骨形成系の組織学的指標となるカルセインラベル、トルイジンブルー染色では両者に明瞭な差は見られなかった。したがって、7nAChR(-/-)マウスでは、何らかの要因で破骨細胞が抑制されていることで骨密度上昇が結果として生じていると考えた。次に、7nAChR(-/-)と野生型マウスの骨髄細胞から誘導して得た破骨細胞に対するニコチンとアセチルコリンに対する反応をみた。Real Time PCRにてmRNAレベルでの差異を検討したが、CTSK, OC-STAMPなど破骨細胞の活動性のマーカーには大きな変化が現れなかった。このことから、ニコチンはさらに上流をターゲットとし、破骨細胞はその下流に位置していると考えた。(図3-1,2)

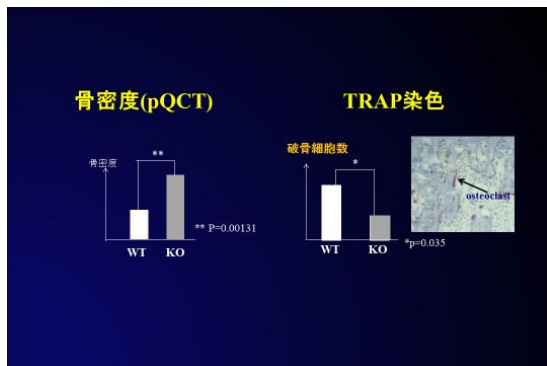


図 3-1 ; 野生型 (WT) と 7nAChR(-/-) の骨形態計測 (骨密度と TRAP 染色)

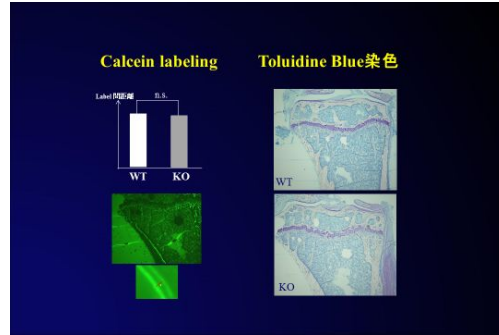


図 3-2; 野生型(WT)と 7nAChR(-/-)の骨形態計測 (Calcein ラベリングと Toluidine blue 染色)

【考察】

*In vivo*にてマウスに対するニコチンの影響を骨折モデル、異所性骨化モデルを用いその影響をX線像所見で検討したが有意な所見が得られなかった。これは一つには骨折モデルではマウスの骨癒合がニコチンの影響を見るには早期であること、また異所性骨化モデル含めX線による画像評価ではニコチンの影響による変化を検知するのに適していない可能性があると考えている。一方、野生型マウスでの骨折モデルに対して行ったpQCTでは、ニコチンの影響による内軟骨性骨化、つまり軟骨形成を経る骨形成に対する障害作用が明らかとなり、これまでになく新たな知見を得ることができた。この知見により喫煙患者では骨折後の骨治癒が不良であるという臨床的、周知の事実の機序に対する説明ができることになった。さらに分子的機序を明らかにするにあたり7nAChR(-/-)マウスに対しても骨折モデルを適用し骨折部を野生型と同様のpQCTを用いた解析を行うことを考えている。野生型と7nAChR(-/-)マウスを比較することで、骨折治癒過程における7nAChR(-/-)を介した経路の解明への糸口になると考えている。

骨質に対するニコチンの影響は、これまでに報告がない。ニコチンにより有意にAGEsの蓄積がみられることより、糖尿病などと同様に骨質の低下が生じるというこれまで報告されていない知見が得られた。

骨形態計測の結果から、7nAChR破骨細胞を活性化する生理的経路に参与している可能性が示唆された。同レセプターは、元来神経系に発現していることが知られており、神経系と骨代謝の関連は未だ不明な分野である。今後さらに新たな知見が順次得られていくこと可能性があると考えられる。

7nAChRをノックアウトすることで骨に関する発現系に変化が生じたことは、同レセプターが骨代謝調節系に関しCriticalな役目を果たしていることを示唆し、重要な新見である。

【結論】

・マウス骨折モデルの検討から骨折治癒過程においてニコチンは軟骨形成阻害に関わることが示唆された。

・ニコチンは骨質を低下させることが in vitro レベルで明らかとなった。

・ 7nAChR は、生理的骨代謝経路においては骨吸収系を促進する系に関与することが明らかとなった。

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0件)
(論文作成中)

〔学会発表〕(計0件)

〔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〕
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

宮本 健史 (MIYAMOTO TAKESHI)
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号：70383768

(3)連携研究者

なし