

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860617

研究課題名(和文)喫煙誘導性肺気腫と骨粗鬆症に共通する病態

研究課題名(英文)Pathophysiologic mechanisms underlying emphysema and osteoporosis

研究代表者

佐々木 衛 (Sasaki, Mamoru)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：90573311

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：COPD患者における骨粗鬆症と肺気腫病変との共通する病態基盤は明らかとなっていない。長期喫煙曝露肺気腫マウスモデルを用いて、骨代謝、骨構造、骨組織を観察した。細胞レベルでの喫煙の影響を確認するために、破骨様細胞を用いてタバコ煙抽出液の投与実験を行った。動物実験では、短期喫煙曝露では骨吸収と骨形成がともに抑制される低回転性骨代謝が認められたが、長期喫煙では逆に高回転性骨代謝へと変化した。骨密度は増加したが、骨組織において破骨細胞の増加を認めた。細胞実験では、タバコ抽出液の投与により破骨細胞への分化が抑制され、短期喫煙による骨吸収抑制が細胞レベルで確認された。

研究成果の概要(英文)：The pathophysiologic mechanisms underlying emphysema and osteoporosis have not been fully elucidated. The aim of this study is to determine the effects of short- and long-term cigarette smoke (CS) exposure on bone metabolism, structure and histological changes in a mouse model of CS-induced emphysema. And we examined the effects of cigarette smoke extract (CSE) on the osteoclast-like cell in vitro.

In vivo, both bone resorption and formation markers were significantly decreased in short-term CS-exposed mice. However, those are inversely increased in long-term CS-exposed mice compared to air controls, implying a dynamic shift of bone metabolism from low- toward high-turnover. Bone volume of CS-exposed mice was increased, but bone histomorphometric analysis revealed the increase of osteoclasts. In vitro, CSE directly impaired the differentiation of osteoclast-like cells, this findings partly explain a phenomenon observed in vivo short-term CS exposed mice.

研究分野：呼吸器内科

キーワード：慢性閉塞性肺疾患 骨粗鬆症

### 1. 研究開始当初の背景

COPD はタバコ煙を主とする有害物質を長期に吸入曝露することで生じた肺の炎症性疾患である。末梢気道病変と肺気腫病変が複合的に作用することによって起こり、進行性である。骨粗鬆症や痩せ、心血管病変、抑うつ、糖尿病などの様々な全身併存症を伴い問題となる。肺気腫とは過膨張を伴う肺組織の萎縮と肺胞壁の破壊であり、肺胞でのアポトーシスや炎症性サイトカイン、プロテアーゼの関与が原因とされているが、発症機序は未だ明らかでない。

COPD 患者の骨粗鬆症性骨折のリスクは健康喫煙者の 1.61 倍と報告されており、圧迫骨折、腰痛の原因となり、ADL や QOL を著しく低下させる。COPD の肺病変である肺気腫は、骨粗鬆症の独立した危険因子として報告され、そのオッズ比は 3.58 倍であり、肺病変との関連が示唆される。さらに COPD で肺気腫 / 骨粗鬆症を持つ患者は血清 IL-6、TNF- $\alpha$  などの炎症性サイトカインが高値であり、骨代謝に関連する血清 RANK/RANKL/OPG との関連も報告され、肺の気腫化と骨の粗鬆化に共通の病態基盤が存在すると推測されるが、未だ明らかとなっていない。

### 2. 研究の目的

動物実験において、マウスに対して長期間喫煙曝露を行うことによって、肺気腫が認められる。長期喫煙曝露マウスにおいて、TNF- $\alpha$ 、IL-1 などの炎症性サイトカインの上昇、骨強度の低下が確認されているが、長期間喫煙により、骨粗鬆症(骨密度の有意な低下)モデルを確立したとする報告はない。また、肺気腫病変と骨粗鬆症を同一個体で経時的に観察している報告はなく、両病態発症機序における連環についての研究はない。細胞実験において、タバコ抽出液(CSE: cigarette smoke extract)が走化作用を抑制することや骨肉腫細胞にニコチンを投与して、骨形成が抑制されることが報告されている。CSE による骨系統細胞の炎症性サイトカインや RANK/RANKL/OPG 系を観察している報告はない。

本研究の目的は肺気腫と骨粗鬆症における共通の病態基盤を明らかにすることである。

### 3. 研究の方法

動物実験では、マウス C57BL/6 の 8 ~ 10 週齢雌に週 5 日、1 日 1 時間の喫煙曝露を 4 ~ 40 週間行う。micro CT を用いて胸部 CT を経時的に撮影し、肺気腫を定量、比較を行う。肺気腫の定量化として、CT 画像解析ソフトを用いて肺過膨張の指標となる呼気終末肺容積(EELV)を測定する。期間中毎月、部分尿を採取し骨吸収マーカーとして尿中デオキシピリノリジン(DPD)の測定し、クレアチニン補正を行う。各時点で犠牲死を行い、骨

形成マーカーとして血清オステオカルシン(OC)の測定、椎体(第4腰椎)の骨検体を micro CT 撮影し、解析ソフトを用いて、骨密度、骨梁構造(骨梁数/幅/間隔)を測定する。骨脱灰標本を HE 染色することにより、組織学的にも骨密度、骨梁構造、破骨細胞数、骨芽細胞数を測定する。

細胞実験では、マウス単球系の癌化細胞である RAW 264.7 を使用する。RAW264.7 は RANKL 投与により破骨細胞への分化成熟を起こすことが知られている。48well プレートに RAW cell を播種、接着後、各濃度の CSE を投与し、各時点での上清、mRNA を回収、ELISA による蛋白測定を行う。RANKL 投与により破骨細胞分化後に CSE を投与し、同様の評価を行う。CSE による破骨前駆細胞・破骨細胞への影響を評価する。破骨細胞への分化は TRAP 染色により評価可能であり、動物実験で確認された骨代謝の変化や炎症性サイトカイン、RANK/RANKL/OPG の変化、破骨細胞の活性化を細胞レベルで確認する

### 4. 研究成果

動物実験では、40 週間の喫煙曝露を行い、4、20、40 週目における肺組織平均肺胞径(Lm)、Destructive Index(DI)を測定した。喫煙群は 20 週目以降で Lm、DI の増加を認め、組織学的な肺気腫を認めた(図 1)。Micro CT では EELV の増加を認め、肺気腫が引き肺過膨張が同時に起こっていることを確認した。

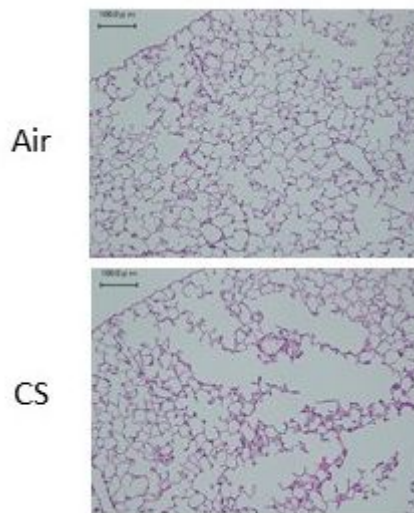


図 1 Air : 対照群 CS: 喫煙群

まだ肺気腫が認められていない 4 週目の喫煙群では、尿中 DPD と血清 OC は低下したが、肺気腫が認められる 20、40 週目の喫煙群では尿中 DPD と血清 OC の上昇を認めた(図 2)。短期の喫煙曝露では骨吸収、骨形成ともに抑制されるが、長期の喫煙曝露で肺気腫が生じると関連して、骨代謝が変化し、骨吸収が増加に転じると考えられた。

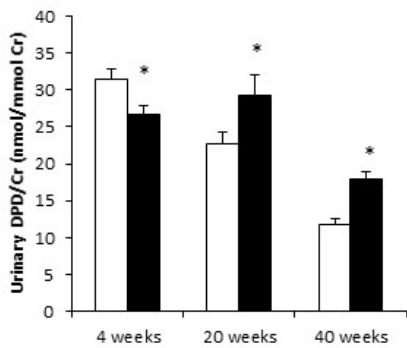


図2 白：対照群 黒：喫煙群

喫煙群は全期間で骨密度の増加を認めたが、20、40週目の骨組織評価では、骨芽細胞に変化はなかったが、破骨細胞の増加を認めた(図3)。長期喫煙により骨吸収が増加することは破骨細胞の分化誘導促進が起きているものと考えられた。

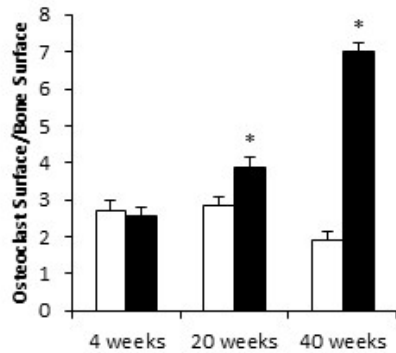


図3 白：対照群 黒：喫煙群

細胞実験では、CSEの投与により、RANKL投与によるRAW cellの破骨細胞への分化・成熟が抑制された。mRNAレベルでも破骨細胞が産生するプロテアーゼであるMMP-9とcathepsin-Kの発現低下を認めた(図4)。

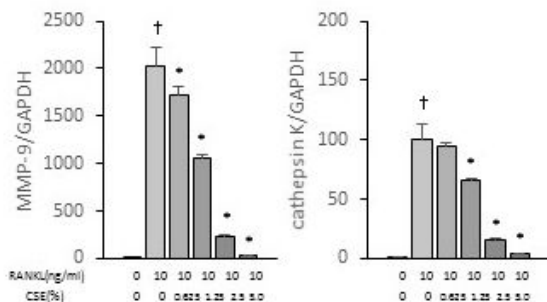


図4

動物実験で認められた喫煙曝露4週での尿中DPDの低下、骨吸収の抑制を細胞レベルでも確認できた。

40週間の長期間喫煙曝露を行い、経時的に肺と骨を同時に観察した報告は他になく、今回初めてその変化が観察できた。骨代謝は喫煙曝露の時間経過とともに低回転の代謝から高回転の代謝へと大きく変化すること

は新たな発見であり、今までの喫煙曝露による骨粗鬆症モデルでは観察されていない。喫煙やCOPDによる骨粗鬆症の病態を明らかにするうえで重要な発見であったと考えられる。ヒトのCOPD患者においても、骨密度の低下が認められる以前に易骨折性を認めるとの報告がある。骨強度に関わる骨質への変化について検討し、骨強度の低下が認められるのかどうか評価する予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Sasaki M, Chubachi S, Kameyama N, Sato M, Haraguchi M, Miyazaki M, Takahashi S, Betsuyaku T. Evaluation of cigarette smoke-induced emphysema in mice using quantitative micro-computed tomography. *Am J Physiol - Lung Cellular Molecular Physiology.* (査読有) 2015;308(10): L 1039-45 DOI: 10.1152/ajplung.00366.2014.

〔学会発表〕(計 5 件)

Sasaki M, Chubachi S, Kameyama N, Sato M, Haraguchi M, Miyazaki M, Takahashi S, Kuroda Y, Matsuo K, Betsuyaku T. Cigarette smoke-induced dynamic changes in bone metabolism and structure along with development of pulmonary emphysema in mice  
アメリカ胸部疾患学会 Poster discussion Session 2015年5月15-20日 コロラド州デンバー(アメリカ)

佐々木 衛、高橋 左枝子、亀山 直史、佐藤 美奈子、中鉢 正太郎、斎藤 史武、続 敬之、黄 英文、仲村 秀俊、浅野 浩一郎、別役 智子 「COPD患者における肺気腫進行に關与する危険因子の検討」 第55回日本呼吸器学会学術講演会 ミニシンポジウム 2015年4月17-19日 東京国際フォーラム(東京千代田区)

佐々木 衛、中鉢 正太郎、亀山 直史、佐藤 美奈子、原口 水葉、高橋 左枝子、黒田 有希子、松尾 光一、別役 智子 「喫煙はマウスの骨吸収を抑制し骨密度増加を促す」 第32回日本骨代謝学会ポスター発表 2014年7月24-25日 大阪国際会議場(大阪府大阪市)

佐々木 衛、中鉢 正太郎、亀山 直史、佐藤 美奈子、原口 水葉、高橋 左枝子、黒田 有希子、松尾 光一、別役 智子 「COPDにおける肺気腫病変と骨粗鬆症の關連」 第88回閉塞性肺疾患研究会 ミニシンポジウム 2014年7月19日 大手町サンケイプラザ(東京千代田区)

佐々木 衛、中鉢 正太郎、原口 水葉、高橋 左枝子、黒田 有希子、高田 伊知郎、

松尾 光一、別役 智子 「喫煙誘導性肺気腫マウスにおける骨代謝」 第 54 回 日本呼吸器学会学術講演会 ポスター発表  
2014 年 4 月 25-27 日 大阪国際会議場(大阪府大阪市)

〔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〕

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

佐々木 衛 (SASAKI Mamoru)

慶応義塾大学・医学部・助教

研究者番号：90573311

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし