

令和元年6月24日現在

機関番号：32404

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11487

研究課題名(和文) 骨吸収と骨形成を相反的に制御するゲラニルゲラニオール の作用解明と骨粗鬆症への応用

研究課題名(英文) Elucidation of the action of geranylgeraniol which reciprocally controls bone resorption and bone formation and its application to osteoporosis

研究代表者

友村 美根子 (TOMOMURA, mineko)

明海大学・総合教育センター・教授

研究者番号：30217559

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ゲラニルゲラニオール(GGOH)は4つのイソプレン単位をもつジテルペンアルコールである。我々はGGOHが骨を吸収する破骨細胞の分化は抑制するが、骨を形成する骨芽細胞の分化は促進することを骨髄由来細胞と頭蓋骨由来細胞を用いて明らかにした。その作用は分化特異的遺伝子の発現調節を介していた。さらにマウスへのGGOH投与は細菌の炎症惹起因子であるリポ多糖(LPS)による頭蓋骨の吸収を抑制した。今回の研究によりGGOHは骨形成における相乗効果により骨粗鬆症の有効な治療薬となる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

健康な骨は骨吸収を担う破骨細胞と骨形成を担う骨芽細胞の相反する機能のバランスの上に維持されている。加齢や炎症などにより破骨細胞が優位になると骨破壊が進み骨粗鬆症を引き起こす。GGOHは破骨細胞の分化を止めるだけでなく、同時に骨芽細胞の分化を促進するので、総じて骨形成をプラスに向かわせる可能性があり、骨粗鬆症の有効的な治療薬となる可能性が期待できる。GGOHは植物油からも単離できる天然化合物であり、機能性食品としても活用できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Geranylgeraniol(GGOH) is a diterpene alcohol with four isoprene units. We found that GGOH inhibits the differentiation of bone-resorbing osteoclasts, but it promotes the differentiation of bone-forming osteoblast using primary culture from bone marrow cells and calvaria derived cells, respectively. The action was mediated by the regulation of differentiation-specific osteoclast and osteoblast gene expression. Furthermore, administration of GGOH to mice suppressed bone resorption of calvaria caused by the bacteria derived proinflammatory lipopolysaccharide (LPS). The present study suggested the GGOH can be an effective therapeutic agent for osteoporosis due to the synergistic effect on bone formation.

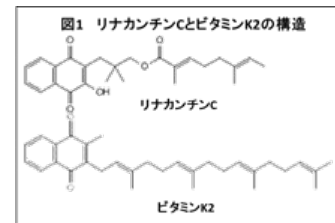
研究分野：生化学

キーワード：ゲラニルゲラニオール 破骨細胞 骨芽細胞 骨吸収 骨形成 骨粗鬆症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

骨組織は間葉系幹細胞から分化する骨芽細胞と血球系幹細胞から分化する破骨細胞が連携して働き、骨の吸収と再生のバランスを保っている。多くのサイトカインやシグナル分子、転写因子などの制御タンパク質が密接に関わっている。ステロイドホルモン(エトロゲン)や脂溶性ビタミン類(ビタミンD、ビタミンK、ビタミンE、ビタミンA)も核内受容体に結合し、転写因子として破骨細胞や骨芽細胞の分化を調節している。植物から破骨細胞や骨芽細胞の分化を調節する低分子化合物が次々と見つかるが、その機能は不明な点が多い。我々は白鶴霊芝に含まれる rhinacanthin C に強い破骨細胞抑制活性を見出した。rhinacanthin C はナフトキノ骨格を有するが、同じナフトキノ誘導体である rhinacanthin D、G、N、Q に比べて強い抑制活性を示したことから側鎖の構造が破骨細胞の分化抑制活性に重要と考えた。リナカンチンCの構造は側鎖にイソプレニル単位を有しビタミンK2(VK2)に似ている(図1)。そこで異なるイソプレニル単位のプレニルアルコールを用いて、破骨細胞と骨芽細胞の分化について検討した結果、イソプレニル4単位のゲラニルゲラニオール(GGOH)が破骨細胞の分化は抑制したが、骨芽細胞の分化を促進したので(図2)、さらにGGOHの骨代謝への効果について解析を深めることにした。



2. 研究の目的

本研究は、**GGOH**の破骨細胞分化抑制機序と骨芽細胞分化促進機序を解明し、1つの分子が相反する作用を示す機構と骨代謝における意義を明らかにする。また**GGOH**が骨粗鬆症などの骨代謝疾患の予防や治療薬のリード化合物としての可能性を検討することを目的とする。

3. 研究の方法

- (1)培養骨髄細胞をマクロファージコロニー刺激因子で処理するとマクロファージに分化する。さらに、レセプターアクチベータNF Bリガンド(RANKL)を加えると酒石酸耐性酸ホスファターゼ(TRAP)活性陽性の多核細胞の破骨細胞へと分化する。この系を用いて破骨細胞分化におけるGGOHの効果と作用機序について解析する。
- (2)頭蓋冠由来骨芽前駆細胞をビタミンCとグリセロリン酸添加で培養するとアルカリホスファターゼ(ALP)活性陽性の骨芽細胞に分化する。この系を用いて骨芽細胞分化におけるGGOHの効果と作用機序について解析する
- (3)頭蓋冠由来骨芽前駆細胞と骨髄由来破骨前駆細胞を共存培養すると、細菌の炎症惹起因子であるリポ多糖(LPS)で破骨細胞が分化誘導される。LPSによる破骨細胞の分化誘導におけるGGOHの効果と作用機序について解析する。
- (4)マウスの切歯歯髄組織から歯髄細胞を単離培養し、ビタミンCとグリセロリン酸添加による象牙芽細胞への分化誘導時におけるGGOHの効果調べる。
- (5)マウスの頭蓋冠にLPSを連続注入し、炎症性骨吸収モデルマウスを作製する。炎症性骨吸収におけるGGOH腹腔投与による効果について調べる。

4. 研究成果

- (1)イソプレニル4単位のゲラニルゲラニオール(GGOH)が破骨細胞の分化マーカーである酒石酸耐性酸ホスファターゼ(TRAP)のRANKL刺激による誘導を抑制し、骨髄由来破骨前駆細胞の破

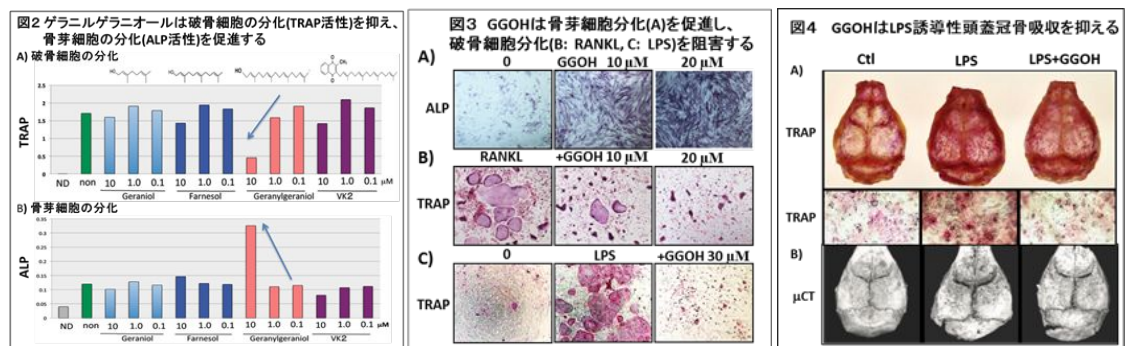
骨細胞への分化を強く抑制した。 反対に GGOH は骨芽細胞の分化マーカーであるアルカリホスファターゼ(ALP)の誘導を促進し、頭蓋冠由来骨芽前駆細胞の分化を特異的に促進した(図 2, 図 3A,B)。 MAP キナーゼのうち、JNK の活性化が GGOH の効果と関連していた。

(2)骨髄由来破骨前駆細胞と頭蓋冠由来骨芽前駆細胞の共存培養下で、RANKL 刺激と同様に LPS 添加によって TRAP 陽性成熟破骨細胞を示す赤色巨細胞が形成されたが、GGOH の添加により LPS 刺激による破骨細胞の分化が抑制された(図 3C)。

(3)マウス頭蓋冠に LPS を注入すると TRAP 染色が増強し(図 4A)、 μ CT による 3 次元再構成で黒化度の高い骨吸収がみられた(図 4B)。 GGOH は LPS による破骨細胞増加(LPS 活性染色)と骨吸収(3 次元再構成)を抑制し炎症性骨吸収を抑制した。

(4)培養歯髄細胞に GGOH を添加すると分化指標であるアリザリンレッド S の染色活性が上がり、石灰化が促進された。

(5)ビスホスホネートは骨芽細胞への分化を強く抑制する。しかし、ゲラニルゲラニオールの同時添加により、ビスホスホネートの骨芽細胞分化抑制作用が緩和された。



5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 12 件)

Sakagami H, Masuda Y, Tomomura M, Yokose S, Uesawa Y, Ikezoe N, Asahara D, Takao K, Kanamoto T, Terakubo S, Kagaya H, Nakashima H, Sugita Y, Quantitative Structure-Cytotoxicity Relationship of Chalcones. *Anticancer Res*, 査読有, Vol. 37, No.3, 2017, 1091-1098. DOI:10.21873/anticancer.11421

Suzuki R, Sakagami H, Amano S, Fukuchi K, Sunaga K, Kanamoto T, Terakubo S, Nakashima H, Shirataki Y, Tomomura M, Masuda Y, Yokose S, Tomomura A, Watanabe H, Okawara M, Matahira Y. Evaluation of Biological Activity of Mastic Extracts Based on Chemotherapeutic Indices, *In Vivo*, 査読有, Vol.31, No.4, 2017, 591-598. DOI: 10.21873/invivo.11099

Tomomura M, Tomomura A, Oizumi T, Yasui T and Sakagami H. Extract of *Sasa senanensis* Rehder Leaf promotes osteoblast differentiation in MC3T3-E1 Cells, *J Meikai Dent Med*, 査読有, Vol.46, No.2, 2017, 111-116.

Sakagami H, Uesawa Y, Masuda Y, Tomomura M, Yokose S, Miyashiro T, Murai J, Takao K, Kanamoto T, Terakubo S, Kagaya H, Nakashima H, Sugita Y, Quantitative Structure-Cytotoxicity Relationship of Newly Synthesized Piperinic Acid Esters, *Anticancer Res*, 査読有, Vol. 37, No.11, 2017, 6161-6168. DOI: 10.21873/anticancer.12065

Sakagami H, Tomomura M, Dental Application of Natural Products, *Medicines (Basel)*, 査読有, Vol.5, No.1, 2018, pii: E21. DOI: 10.3390/medicines5010021 Review.

Sakagami H, Tsuji M, Tomomura M, Masuda Y, Iwama S, Nakagawa M, Suzuki H, Tanaka K, Abe T, Tamura N, Tomomura A, Yokose S, Takeshima H, Natori T, Horiuchi M, Fujisawa T, Kiuchi Y, Oguchi K, Yasui T, Oizumi H, Oizumi T, Protection of Differentiating Neuronal Cells from Amyloid Peptide-induced Injury by Alkaline Extract of Leaves of *Sasa senanensis* Rehder, *In Vivo*, 査読有, Vol.32, No.2, 2018, 231-239. DOI: 10.21873/invivo.11229

Shi H, Nagai J, Sakatsume T, Bandow K, Okudaira N, Sakagami H, Tomomura M, Tomomura A, Uesawa Y, Takao K, Sugita Y, Quantitative Structure-Cytotoxicity Relationship of 2-(N-cyclicamino)chromone Derivatives, *Anticancer Res*, 査読有, Vol.38, No.7, 2018, 3897-3906. DOI: 10.21873/anticancerres.12674

Sakagami H, Shi H, Bandow K, Tomomura M, Tomomura A, Horiuchi M, Fujisawa T, Oizumi T, Search of Neuroprotective Polyphenols Using the "Overlay" Isolation Method, *Molecules*, 査読有, Vol.23, No.8, 2018, pii: E1840. DOI: 10.3390/molecules23081840.
Nagai J, Shi H, Kubota Y, Bandow K, Okudaira N, Uesawa Y, Sakagami H, Tomomura M, Tomomura A, Takao K, Sugita Y, Quantitative Structure-Cytotoxicity Relationship of Pyrano[4,3-b]chromones, *Anticancer Res*, 査読有, Vol.38, No.8, 2018, 4449-4457. DOI: 10.21873/anticancerres.12747

Shi H, Nagai J, Sakatsume T, Bandow K, Okudaira N, Uesawa Y, Sakagami H, Tomomura M, Tomomura A, Takao K, Sugita Y, Quantitative Structure-Cytotoxicity Relationship of 3-(N-Cyclicamino)chromone Derivatives, *Anticancer Res*, 査読有, Vol.38, No.8, 2018, 4459-4467. DOI: 10.21873/anticancerres.12748

Kawaguchi S, Bandow K, Tamura N, Tomomura M, Shimada J, Tomomura A, Effect of caldecrin on the lipopolysaccharide-induced osteoclast differentiation, *J Meikai Dent Med*, 査読有, Vol.47, No.2, 2018, 126-138.

Suzuki R, Fukami S, Tomomura M, Tomomura A, Shirataki Y, Screening for natural medicines effective for the treatment of osteoporosis, *J Nat Med*, 査読有, Vol.73, No.1, 2019, 331-337. DOI: 10.1007/s11418-018-1258-y

〔学会発表〕(計 11 件)

深見 聡、鈴木 龍一郎、友村美根子、友村 明人、坂上宏、白瀧 義明、骨芽細胞を分化促進させる生薬の探索、第 63 回日本生薬学会(富山)2016.9

友村美根子、坂東 健二郎、鈴木龍一郎、白瀧義明、坂上宏、友村明人：骨芽細胞と破骨細胞におけるグラニルゲラニオールの効果、第 89 回日本生化学会大会(仙台)2016.9

川口祥子、坂東健二郎、田村暢章、友村美根子、友村明人、嶋田淳、LPS 誘導性破骨細胞分化に対するカルデクリンの効果、第 39 回日本分子生物学会年会(横浜)2016.1

坂上宏、鈴木龍一郎、天野滋、須永克佳、金本大、福地邦彦、寺久保繁美、白瀧義明、増田宜子、横瀬敏志、友村美根子、友村明人、中島秀喜、渡邊博文、大川原正喜、又平芳春、マスティック画分の生物活性の化学療法係数に基づいた再評価、第 136 回薬理学会関東部会(東京)2017.7

深見 聡、鈴木 龍一郎、友村 美根子、友村 明人、白瀧 義明、フサザクラに含まれる骨芽細胞の分化を促進する化合物の探索、第 64 回日本生薬学会(船橋)2017.9

坂上宏、友村美根子、増田宜子、明海大学歯科医学総合研究所(M-RIO)の設立ー有害作用

の少ない口腔疾患治療薬の開発をめざして、第 59 回歯科基礎医学会学術大会(松本)2017.9
坂上宏、植沢芳広、増田宜子、友村美根子、金本大成、寺久保繁美、宮城昂幹、村井淳一、
高尾浩一、横瀬敏志、加賀谷肇、中島秀喜、杉田義昭、ピペリン酸エステル誘導体の構造
活性相関：腫瘍選択性とアポトーシス誘導、第 137 回薬理学会関東部会(東京)2017.10
坂上宏、史海霞、坂東健二郎、友村美根子、友村明人、ヒト口腔扁平上皮癌に対する高い
選択性と低いケラチノサイト毒性を有する新規クロモン誘導体の創製、第 60 回歯科基礎
医学会学術大会 2018.9

坂上 宏、史 海霞、永井純子、坂詰つかさ、坂東健二郎、奥平准之、植沢芳広、友村美根
子、友村明人、高尾浩一、杉田義昭、3-(N-サイクリックアミノ)クロモン誘導体の定量的
構造 細胞傷害性相関解析、第 138 回日本薬理学会関東部会(福岡)2018.10

永井純子、史海霞、久保田夕香、坂東健二郎、奥平准之、植沢芳広、坂上宏、友村美根子、
友村明人、高尾浩一、杉田義昭、ピラノ[4,3-b]クロモン誘導体の定量的構造 細胞傷害性
相関解析、第 138 回日本薬理学会関東部会(福岡)2018.10

植沢芳広、史海霞、永井純子、坂詰つかさ、坂東健二郎、坂上宏、友村美根子、友村明人、
高尾 浩一、杉田義昭、2-(N-cyclicamino)chromone 誘導体の定量的構造 細胞傷害性相関
解析、第 138 回日本薬理学会関東部会(福岡)2018.10

〔図書〕(計 2 件)

骨粗鬆症特集:ゲラニルゲラニオールと骨代謝、Medical Science Digest、Vol.43、No.9、
pp7-9、ニューサイエンス社、2017 年

Mineko Tomomura、Osteo Observations、IMPACT、Volume 2019、No.6、pp79-81、Science
Impact Ltd、2019、DOI: <https://doi.org/10.21820/23987073.2019.6.79>

6 . 研究組織

研究分担者

坂東 健二郎 (BANDOW, kenjiro) 明海大学・歯学部・講師 研究者番号: 50347093

鈴木龍一郎 (SUZUKI, ryuichiro) 城西大学・薬学部・准教授 研究者番号: 20415201

友村明人 (TOMOMURA, akito) 明海大学・歯学部・教授 研究者番号: 60188810