

令和元年6月5日現在

機関番号：33602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11818

研究課題名(和文)植物由来低分子ポリフェノールの骨代謝改善作用

研究課題名(英文) Bone metabolism improving action of plant-derived low molecular weight polyphenols.

研究代表者

中村 浩志 (Nakamura, Hiroshi)

松本歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：00278178

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)：(1) LPS 誘導性EIU に対するマコモタケ懸濁液の効果 LPS投与から24時間後、対照群、マコモタケ懸濁液内服群ともに、眼球に充血などの臨床所見は確認できなかった。一方、マコモタケ懸濁液内服群では前房、硝子体内部における好中球浸潤はほとんど認められず、眼内の炎症性反応が有意に抑制された。(2) LPS誘導性炎症性サイトカイン産生に対するマコモタケタノール抽出液の効果 LPS によって誘導される単球・マクロファージ系細胞の炎症性サイトカイン産生促進に対して、マコモタケタノール抽出成分は濃度依存的に抑制した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で使用した低分子ポリフェノールは植物由来成分であり、昨今薬用成分に関するネガティブ因子として取りざたされているアレルギーや耐性菌などの出現の不安が少ない。我々は、マコモタケ抽出成分の中に抗炎症作用を有する未知の物質があることを見出した。歯周病のみならず、骨粗鬆症などの全身性疾患に対する新しい治療法とその予防方法の確立に向けてのトランスレーショナルな研究として独創性が大変高いと自負している。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to investigate the anti-inflammatory effect of Makomotake on endotoxin-induced uveitis (EIU) in mice. After the daily oral administration of Makomotake for 5 days, EIU was induced by the injection of a lipopolysaccharide (LPS) into the footpad of mice. At 24 hours-after injection, the eyes were enucleated and cells infiltrating the anterior chamber and vitreous cavity were counted histologically. Makomotake administration significantly reduced the total number of infiltrating cells. In addition, Makomotake suppressed the production of interleukin (IL)-1 and tumor necrosis factor (TNF)- in murine macrophages induced by LPS. Our findings show that Makomotake can be used as an anti-inflammatory agent against EIU, and that it may be useful for the treatment of acute uveitis.

研究分野：小児歯科

キーワード：ポリフェノール 抗炎症作用 マコモタケ LPS IL-1 TNF 歯周病 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

齲蝕や歯周病の予防には、機械的なプラークコントロールの他、洗口剤や歯磨剤への殺菌薬や消毒薬およびフッ素などの添加がおこなわれている。しかしながら、これらの添加剤の十分な効果は不明である。また、抗菌性の高い薬剤はアレルギーや強い刺激があるなど、生体への侵襲性も強く日常的な使用に適さない。

一方、植物に含まれるポリフェノールは、抗酸化作用・抗ウイルス作用・抗菌作用および抗腫瘍増殖作用などが知られているが、その効果や作用機序についての詳細は解明されていない。口腔領域の研究においても、*Streptococcus mutans* におけるプラーク形成抑制作用・菌体外多糖合成阻害作用などの抗菌作用が報告されている。しかしながら、ポリフェノールの長鎖ポリマーは細胞内や生体内への吸収が悪く十分な薬効が得にくい点から改良が必要とされる。

破骨細胞の分化と骨吸収機能の分子機構の解明により、RANKL 中和抗体やカテプシン K 阻害剤などの新たな骨吸収抑制剤が開発され、骨粗鬆症や関節リウマチをはじめとする代謝性骨疾患治療薬の地図が塗り替えられようとしている状況で、骨吸収と共役して骨形成を促進する薬剤の開発が望まれている。従来から骨粗鬆症の治療方法として女性ホルモンであるエストロゲンの補充療法が行われてきたが、副作用があるため使用には制限がある。そこで注目されたのが、エストロゲン様構造を有する大豆などに多く含まれるイソフラボンである。しかしながら、イソフラボン系薬剤には骨粗鬆症患者の骨折予防効果は認められない。

本研究では、イネ科植物マコモダケ抽出成分に注目した。マコモダケは、イネ科植物であるマコモの根元出来る肥大した茎の部分であり、ベトナム・タイ・ラオスなどのアジア各国で食用や薬用とされてきた。この肥大化した茎は、黒穂菌に寄生されることにより成長した新芽である。日本においても、沼や湖などの水辺に群生しており、秋が収穫時期であり、たけのこを優しくしたような食感とほのかな甘みと香りがある。また、マコモダケは食物繊維・ビタミン・ミネラルが豊富であり、健康食品としても有用である。

ポリフェノールは、ほとんどの植物に色素として含まれている苦味や渋みの成分であり、5000 種類以上存在するとも言われている。赤ワインに含まれているポリフェノールが心臓疾患発症率を低下させるという結果や、お茶に含まれるカテニンの殺菌作用・コレステロール低下作用は良く知られている。マコモダケの中にも、各種ポリフェノールが含まれている可能性が十分ある。

2. 研究の目的

本研究においては、イネ科植物マコモダケ抽出成分を用いて、低分子化ポリフェノールおよび新規植物由来の生理活性物質が有する抗炎症作用について、細胞培養系と炎症誘発動物モデルを用いて解析する。本研究の成果は、歯周病の予防・治療のみならず、骨粗鬆症をはじめとする全身性疾患に対する新しい治療法の確立に大きく貢献するものと考えられる。

3. 研究の方法

(1) 実験動物

エンドトキシン誘発性ぶどう膜炎 (endotoxin-induced uveitis: EIU) 実験モデルでは 8 週齢の雄 C57BL/6J マウス、マウス骨髄マクロファージ培養実験では 7 週齢の雄 ddY マウスを実験に用いた。

(2) マコモダケ成分抽出

100% エタノール 100ml 中にマコモダケ粉末 20g を添加し、4℃ の環境下で 10 日間の転倒混和を行った。マコモダケ懸濁液を濾過およびフィルター滅菌して得られたマコモダケ抽出液 (65 µg/ml) を遠心式濃縮器にて 10 倍の濃度 (650 µg/ml に濃縮し実験に使用した。

(3) エンドトキシン誘発性ぶどう膜炎誘導実験

マウスに 1% PBS (対照群) もしくは、マコモダケ懸濁液 (0.2% w/v・PBS) 1ml を毎日 5 日間内服させた。内服開始から 5 日後、*Escherichia coli* 由来 LPS を後肢より注入し、EIU を誘導した。LPS 注入 24 時間後に両側の眼球を採取した。

(4) マウス骨髄マクロファージ培養

7 週齢 ddY マウスの脛骨から骨髄細胞を採取し、M-CSF 存在下で、10% FBS を含む α -MEM 培地にて培養した。16 時間後、浮遊細胞 (血球系細胞) を回収し、M-CSF 存在下で 3 日間培養を行ったものを骨髄マクロファージとして実験に用いた。

(5) ELISA 法による TNF- α ・IL-1 産生量の解析

マウス骨髄マクロファージをコンフルエントになるまで培養を行った後、LPS およびマコモダケ抽出成分を同時添加し、24 時間培養後培養培地を回収し、Mouse TNF- α ELISA kit, Mouse IL-1 ELISA kit を用いて培地中の TNF- α , IL-1 量を測定した。

4. 研究成果

(1) LPS 誘導性 EIU に対するマコモダケ懸濁液の効果

LPS 投与から 24 時間後、対照群、マコモダケ懸濁液内服群ともに、眼球に充血などの臨床所見は確認できなかった。しかし、ヘマトキシリン・エオジン染色による眼球の組織像では対照群の前房と硝子体中に多数の好中球が浸潤しているのが認められた。一方、マコモダケ懸濁液内服群では前房、硝子体内部における好中球浸潤はほとんど認められず、眼内の炎症性反応が

有意に抑制された。

(2) LPS 誘導性炎症性サイトカイン産生に対するマコモタケタノール抽出液の効果

LPS によって誘導される単球・マクロファージ系細胞の炎症性サイトカイン TNF- α 、IL-1 β 産生促進に対するマコモタケ抽出液の効果について検討を行った。骨髄マクロファージの TNF- α および IL-1 β 産生に対して、マコモタケタノール抽出成分は濃度依存的に抑制した。

本研究では、マコモタケの抗炎症作用に注目し実験を行った。赤ワインのポリフェノールであるレスベラトロールの内服は抗酸化作用を発揮し、炎症および癌の発生を抑制することが報告されている。EIU の実験モデルにおいてもレスベラトロールの内服は眼内の炎症反応を抑制することが報告されている。マコモタケ懸濁液の内服でも、レスベラトロール同様に抗酸化作用による EIU 発生の抑制が行われた可能性がある。実際に、過去の成分解析によりマコモタケ中には水溶性、脂溶性の両方の溶性を有するポリフェノールが豊富に含まれていることが分かっている。また、*in vitro* の実験ではマコモタケタノール抽出成分が LPS によって誘導される骨髄マクロファージの TNF- α 、IL-1 β 産生を有意に抑制した。この結果から、マコモタケの炎症抑制効果は脂溶性成分によるものと考えられる。

マコモタケには神経膠腫細胞の増殖に影響を与えるグリコシド化合物 Makomotindoline が含まれていることが報告されている。マコモタケ中に含まれている。水溶性、脂溶性の両方に溶性を有するポリフェノールなどの物質が、今回の *in vitro* 実験の系に作用した候補として挙げられる。しかしながら、どのような有機成分が炎症性サイトカインの産生抑制に関与しているかについては詳細な成分解析と検討を必要とする。

マコモタケ抽出成分の LPS に対する直接作用や、細胞内シグナルへの影響の有無などは不明である。今回の実験結果でみられた TNF- α 、IL-1 β 産生に対するマコモタケ抽出物の応答性の違いなども含めて、その作用メカニズムの解明もまた今後の重要な研究課題である。

本実験の結果から、マコモタケを経口摂取することで細菌成分が引き起こす眼内の炎症発症を抑制する可能性が示された。マコモタケおよびその抽出成分は眼内炎をはじめとした炎症性疾患の発生防止、症状の緩和に有効な栄養補助食品、薬剤としての利用が期待できる。

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 9 件)

Ikebuchi Y, Aoki S, Honma M, Hayashi M, Sugamori Y, Khan M, Kariya Y, Kato G, Tabata Y, Penninger JM, Udagawa N, Aoki K, Suzuki H.
Coupling of bone resorption and formation by RANKL reverse signalling.
Nature, 561:195-200, 2018 (査読有)

Nakamichi Y, Udagawa N, Suda T, Takahashi N
Mechanisms involved in bone resorption regulated by vitamin D.
J Steroid Biochem Mol Biol, 177:70-76, 2018 (査読有)

Uehara S, Udagawa N, Kobayashi Y
Non-canonical Wnt signals regulate cytoskeletal remodeling in osteoclasts.
Cell Mol Life Sci, 75:3683-3692, 2018 (査読有)

Murakami K, Kikugawa S, Kobayashi Y, Uehara S, Suzuki T, Kato H, Udagawa N, Nakamura Y
Olfactomedin-like protein OLFML1 inhibits Hippo signaling and mineralization in osteoblasts.
Biochem Biophys Res Commun 28:419-425, 2018 (査読有)

Uehara S, Udagawa N, Mukai H, Ishihara A, Maeda K, Yamashita T, Murakami K, Nishita M, Nakamura T, Kato S, Minami Y, Takahashi N, Kobayashi Y
Protein kinase N3 promotes bone resorption by osteoclasts in response to Wnt5a-Ror2 signaling.
Sci Signal 10: eaan0023, 2017 (査読有)

Nakamichi Y, Udagawa N, Horibe K, Mizoguchi T, Yamamoto Y, Nakamura T, Hosoya A, Kato S, Suda T, Takahashi N
VDR in osteoblast-lineage cells primarily mediates vitamin D treatment-induced increase in bone mass by suppressing bone resorption.
J Bone Miner Res 32:1297-1308, 2017 (査読有)

Nakamura M, Nakamichi Y, Mizoguchi T, Koide M, Yamashita T, Ara T, Nakamura H, Penninger JM, Furuya Y, Yasuda H, Udagawa N

The W9 peptide directly stimulates osteoblast differentiation via RANKL signaling.
J Oral Biosciences 59:146-151, 2017 (査読有)

Yamashita T, Udagawa N, Thirukonda GJ, Uehara S, Yamauchi H, Suzuki N, Li F, Kobayashi Y, Takahashi N
Platypus and opossum calcitonins exhibit strong activities, even though they belong to mammals.
Gen Comp Endocrinol 246:270-278, 2017

Yang M, Arai A, Udagawa N, Hiraga T, Lijuan Z, Ito S, Komori T, Moriishi T, Matsuo K, Shimoda, K, Zahalka HA, Kobayashi Y, Takahashi N, Mizoguchi T
Osteogenic factor Runx2 marks a subset of leptin receptor-positive cells that sit atop the bone marrow stromal cell hierarchy.
Sci Rep 7:4928, 2017 (査読有)

[学会発表](計 5件)

中村浩志、中村美どり、平林厚二、大須賀直人
小児用マウスガードの研究開発
第 57 回日本小児歯科学会大会, 2019

宇田川信之
臓器年齢と酸化ストレス-破骨細胞研究からの骨年齢
日本抗加齢学会総会 (第 18 回) (招待講演), 2018

宇田川信之
骨改造制御の新局面: 骨吸収から骨形成・骨再生への橋渡し機構を探る-破骨細胞の骨形成シグナルにおける重要性-
歯科基礎医学会学術大会 (第 60 回) (招待講演), 2018

小出雅則, 宇田川信之
歯槽骨の骨リモデリングにおける骨細胞の役割
日本骨代謝学会学術集会 (第 36 回) (招待講演), 2018

Udagawa N, Koide M, Uehara S, Arai A, Mizoguchi T, Yamashita T, Nakamura M, Kobayashi Y, Takahashi N, Kumakura S, Fukuda C, Tsuda E
Sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin 15 (Siglec-15) plays important roles in the induction of both bone-resorbing activity of osteoclasts and osteoblast differentiation.
The American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR) 2018 Annual Meeting (国際学会), 2018

Udagawa N, Uehara S, Koide M, Arai A, Mizoguchi T, Nakamura M, Kobayashi Y, Takahashi N, Fukuda C, Tsuda E
Anti-Siglec-15 antibody inhibits bone-resorbing activity of osteoclasts and stimulates osteoblast differentiation.
The American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR) 2017 Annual Meeting (国際学会), 2017

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名: 中村 美どり
ローマ字氏名: NAKAMURA, Midori
所属研究機関名: 松本歯科大学
部局名: 歯学部
職名: 准教授
研究者番号: 90278177

研究分担者氏名: 大須賀 直人
ローマ字氏名: OOSUGA, Naoto

所属研究機関名：松本歯科大学
部局名：歯学部
職名：教授
研究者番号：80247535

研究分担者氏名：八上 公利
ローマ字氏名：YAGAMI, Kimitoshi
所属研究機関名：松本歯科大学
部局名：歯学部
職名：教授
研究者番号：00210211

研究分担者氏名：定岡 直
ローマ字氏名：SADAOKA, Sunao
所属研究機関名：松本歯科大学
部局名：歯学部
職名：助教
研究者番号：80549395

研究分担者氏名：宇田川 信之
ローマ字氏名：UDAGAWA, Nobuyuki
所属研究機関名：松本歯科大学
部局名：歯学部
職名：教授
研究者番号：70245801