

令和 2 年 6 月 17 日現在

機関番号：32403

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K20677

研究課題名(和文) スダチ果皮特有フラボノイドを用いた歯周病性歯槽骨吸収の新たな予防法の確立を目指す

研究課題名(英文) Aims to establish a new preventive method for periodontal alveolar bone resorption using sudachi pericarp specific flavonoids

研究代表者

伊東 順太 (Ito, Junta)

城西大学・薬学部・助教

研究者番号：40609096

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)：歯槽骨吸収を主たる病態とする歯周病は、国内外における有病者数の増加が懸念されており、予防法の確立は今後期待される急務の研究課題である。そこで、本研究は歯周病性骨吸収をはじめとする炎症性骨破壊に対するポリメトキシフラボノイドsudachitinを用いた予防法確立を目指して立案した。Sudachitinは破骨細胞前駆細胞に直接作用し、細胞内ROS産生を抑制するとともに破骨細胞形成を強力に抑制することが示唆された。一方、LPS投与マウスの頭蓋骨に観察された骨吸収像は、LPSとともにsudachitinを同時に投与するとLPSで誘導された炎症性骨吸収像を減少することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

炎症および骨吸収に対する効率的な動態が予測されるsudachitinは、創薬ターゲットとしてだけでなく、食品由来成分であるという特性からsudachitin配合サプリメントやタブレット錠として利活用、またsudachitin添加歯磨き用ペーストの開発など幅広い展開が期待され、その安全性の観点からも極めて魅力的である。一方、sudachitinが含有するスダチは年間収穫量の約半分が搾汁される。この搾汁時に多量に発生する残渣である果皮の処分方法が検討課題の一つとされていた。本研究を通じて、廃棄されていたスダチ果皮からsudachitinを用いた新たな産業や製品が開発されることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Periodontal disease, which is mainly caused by alveolar bone resorption, has a problem of increasing the number of prevalence in Japan and overseas. Therefore, the establishment of preventive measures is an urgent research topic expected in the future. The present study was planned with the aim of establishing a preventive method using a poly-methoxy flavonoids sudachitin to inflammatory bone destruction, including periodontal disease bone resorption. We suggest that suduchitin suppresses intracellular ROS production of osteoclast precursor cells and strongly suppresses osteoclast formation. On the other hand, bone resorption images were observed in the skull of LPS-administered mice. However, sudachitin revealed that LPS-induced inflammatory bone resorption was reduced.

研究分野：骨代謝学

キーワード：骨代謝 破骨細胞 炎症性骨破壊 スダチチン

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

急速な超高齢化および食の多様化が進む我が国では、運動や咀嚼機能と密接につながる硬組織の健康を維持し、全身の健康管理と QOL の維持向上への要求が高まっている。中でも歯槽骨吸収を主たる病態とする歯周病は、国内外における有病者数の増加が懸念されているだけでなく、慢性炎症という病態の基盤が糖尿病をはじめとする生活習慣病と共通していることもまた注目を集めており、予防法の確立は今以上に期待される急務の研究課題であることは論を俟たない。

歯周病による歯槽骨吸収をはじめとする炎症性骨破壊は『破骨細胞による直接的な骨破壊』だけでなく、『慢性炎症による免疫応答の亢進』という 2 つの病的現象からなる。申請者はこれまでに、LPS による炎症性骨破壊モデルマウスの骨破壊部位における破骨細胞形成が、炎症に惹起された骨芽細胞の酸化 LDL 受容体 LOX-1(Lectin-like oxidized LDL receptor-1)に依存した RANKL 発現により調節されていることを明らかにした。また骨芽細胞は活性酸素種(Reactive Oxygen Species; ROS)の代表種である過酸化水素により RANKL 発現が促進されることが報告されている (Bai et al. J Biol Chem.2005)。一方、興味深いことに炎症性骨破壊で見られる過剰な破骨細胞形成だけでなく、生理的破骨細胞形成においても NADPH oxidase 4 を介した内在性の ROS の産生が必須であることが示された (Goettsch et al. J Clin Invest. 2013.)。そこで、申請者は以上のことを踏まえて炎症性骨破壊、特に歯周病性歯槽骨吸収を安全かつ確実に制御できる ROS をターゲットとした新しい予防法の確立を考案することとした。

### 2. 研究の目的

歯周病に罹患した歯周組織では炎症に伴い常に過剰な活性酸素種 (ROS) に曝される。この過剰な ROS の制御を目的とした歯周病の予防法および治療法は未だ確立されておらず、とりわけ歯槽骨吸収に対する天然由来抗酸化物質の効果に関する知見は十分ではない。そこで、本研究は有益な生理活性を示す物質として近年注目されているポリメトキシフラボノイド (PMF) に着眼し、スダチ果皮特有 PMF であるスダチチンを用いた歯周病性歯槽骨吸収の発症プロセスを合目的に制御できる新しい予防法の基盤を確立することを目指すことを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### 1) In vitro における破骨細胞形成系によるスダチチンの効果の検討

4~8 週齢のオスの野生型マウス (C57BL/6J) の大腿骨と脛骨を無菌的に取り出し、軟組織と骨端部を除去した後、シリンジを用いて骨髓細胞をフラッシュアウトした。骨髓細胞を単一細胞に懸濁した後、ペトリディッシュに播種し、37℃、5%CO<sub>2</sub> 下で 3 日間培養した。培養後、得られた M-CSF 依存性 monocytes/macrophages を破骨細胞の前駆細胞とした。

回収した破骨細胞前駆細胞に M-CSF/RANKL とともにスダチチンを添加し、破骨細胞形成に対するスダチチンの作用を評価した。破骨細胞のマーカー酵素である TRAP 活性を leukocyte acid phosphatase kit (Sigma-Aldrich)を用いて染色した。その後、3 核以上の TRAP 陽性の多核細胞 (MNCs)を破骨細胞と見なし、その数を顕微鏡下で測定し、sudachitin の破骨細胞形成に対する効果を検討した。

#### 2) LPS 投与によるマウス頭蓋骨炎症性骨吸収に対するスダチチンの効果の検討

8 週齢雄性の野生型マウスをソムノペンチルで麻酔し、頭頂部骨膜下に 1 mg/ml の大腸菌 (O55:B5) 由来 LPS を 100  $\mu$ l、1 日 1 回 5 日間連続投与した。最終投与の 24 時間後に頸椎脱臼により屍殺し、頭蓋骨を摘出した。6 日に摘出した頭頂骨をエタノール固定後、3 次元  $\mu$ CT を用いて骨破壊部位の骨形態解析を行った。また、頭蓋骨の骨片の一部を Buffer RLT Plus (Qiagen, Valencia, CA, USA)中でポリトロン PT3100 によって破碎し、上清中の total RNA を RNeasy Mini plus kit (Qiagen)を用いて抽出した。

#### 3) 定量性 real-time RT-PCR

In vitro での破骨細胞系細胞および In vivo での頭蓋骨骨片から抽出した total RNA から、cDNA を合成した。それぞれの cDNA は、Taqman probe/primer mixture を用い quantitative real-time PCR Gene Amp 5700 にて標的とする mRNA 量を定量的に評価した。内因性コントロールとして 18S rRNA を用いた。

#### 4) 細胞内 ROS の測定

細胞内 ROS の濃度測定は、OxiSelect™ Intracellular ROS 測定アッセイキットを用いて行った。DCFH-DA プローブを各ウェルに添加し 30 分 37℃ でインキュベーションした。その後 PBS で洗浄後、cell lysis buffer を加え、細胞を溶解した。その細胞溶解液中の DCF 濃度は励起光 480 nm/蛍光 530 nm を測定し、標準 DCF 溶液からの検量線をもとにして、定量化した。

5) マウス頭頂骨からの骨芽細胞の分離方法および分離骨芽細胞と破骨細胞前駆細胞との共存培養による破骨細胞形成

頭頂骨からの骨芽細胞の分離は Luben らの方法に準じて行った。生後 1 週間以内の野生型マウスの骨膜を残したままの頭頂骨を無菌的に摘出し、0.1% collagenase と 0.2% dispase II を含む培養液中で 37°C、120 rpm で振蕩し 15 分間インキュベートした。その後、液中に遊離した細胞を遠心分離によって回収した。残った頭頂骨に再び消化液を加え、37°C、120 rpm で振蕩し 15 分間インキュベートして同様に遊離細胞を回収した。この消化法をさらに 3 回繰り返し、回収した遊離細胞を分離骨芽細胞とし、-80 °C で凍結保存した。その凍結保存した分離骨芽細胞を実験に供した。

分離骨芽細胞と破骨細胞前駆細胞との共存培養による破骨細胞形成は、分離骨芽細胞とマウス骨髄細胞を 3 日間 M-CSF で処理し得られた破骨細胞前駆細胞とをそれぞれ 96-wells plate の各ウェルに 4000 cells および 8000 cells 播種した。その後、prostaglandin E2 (PGE2, 10 μM) + interleukin-1 (IL-1, 10 ng/ml) および各種濃度の sudachitin を添加し 5 日間培養した。培養終了後に、細胞を 10%ホルマリンで固定し、leukocyte acid phosphatase kit を用いて、分離骨芽細胞と破骨細胞前駆細胞との共存培養で形成された破骨細胞を染色し、3 核以上の TRAP 陽性で多核の破骨細胞数を顕微鏡下で測定し、骨芽細胞の破骨細胞形成に対する sudachitin の影響を検討した。

#### 4. 研究成果

##### 1) LPS によって誘導される炎症性骨破壊に対する sudachitin の作用

われわれは炎症性骨破壊に対する sudachitin の作用を評価するため、マウスの頭頂骨骨膜下に 1 日 1 回、100 μg の LPS を 5 日間連続投与し炎症を誘発させ μCT 解析を行った。LPS 投与開始 6 日目のマウス頭蓋骨には矢状縫合に沿った両側の頭頂骨に大きな骨吸収を示す領域が観察された。しかし、LPS とともに 10 μM、または 50 μM の sudachitin を LPS と同時に投与すると LPS で誘導された炎症性骨吸収が減少し、PBS 投与の対照群と同様に吸収窩が認められない骨吸収像を示した。10 μM と 50 μM sudachitin の単独投与では骨吸収像に変化は認められなかった(図 1A)。

この μCT 解析と一致して、LPS 投与で炎症性骨破壊を誘導された頭頂骨中の破骨細胞の骨吸収に必須な酒石酸耐性酸ホスファターゼ (TRAP, Acp5) および cathepsin K (CtsK) の mRNA レベルは、LPS 投与によって大きく上昇した。そして、その上昇レベルは 10 μM、および 50 μM の sudachitin によって減少した(図 1B)。これらの結果から、sudachitin は炎症性骨破壊を抑制する作用のあることが示唆された。

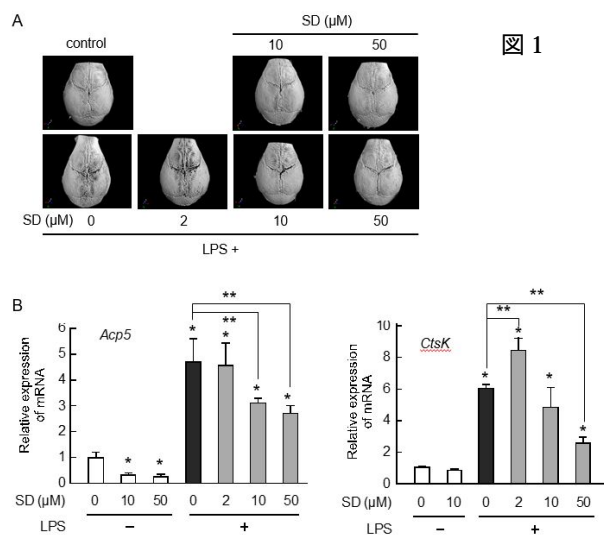


図 1

##### 2) 破骨細胞形成に対する sudachitin の作用

次に破骨細胞分化への sudachitin の直接作用を M-CSF と sRANKL によって誘導される破骨細胞前駆細胞からの破骨細胞形成に対する sudachitin の作用を検討した。種々の濃度の sudachitin を M-CSF と sRANKL と共に破骨細胞前駆細胞に加え、3 日間培養した。経時的に細胞を TRAP 染色し、その染色像を Fig. 5 に示す。培養開始後 1.5 日から TRAP 陽性細胞が出現し TRAP 陽性の多核細胞形成は 3 日目で最大に達した。そして、sudachitin は濃度依存的に破骨細胞形成を減少させた。その抑制作用は培養開始 1.5 日ですでに現れ 3 日まで持続した。(図 2)

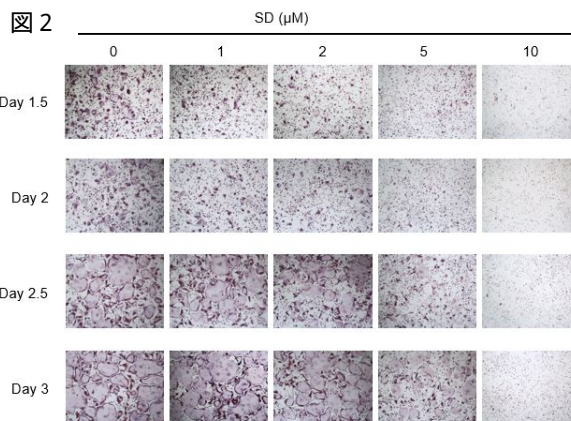
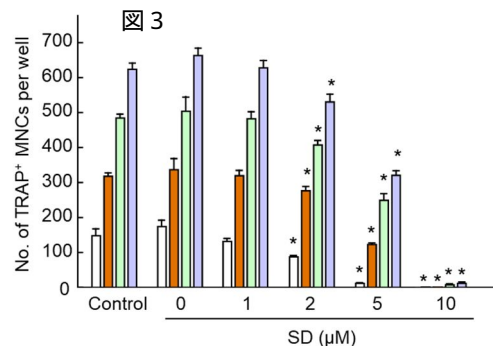


図 2

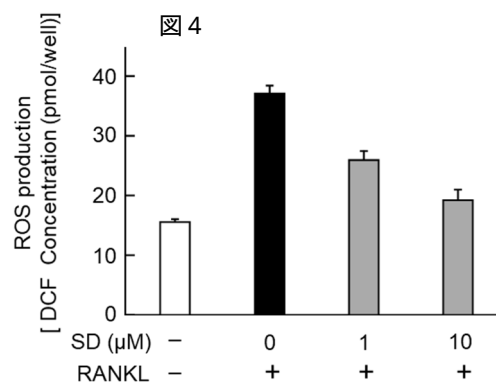
この sudachitin の直接的な破骨細胞分化抑制作用を、TRAP 陽性破骨細胞数を経時的に測定することによって評価した(図 3)。その結果、2 μM の sudachitin から破骨細胞形成は有意に減少し、10 μM sudachitin では大きく減少した。10 μM の sudachitin ではほとんど破骨細胞形成が認められなかったと同時に、培養中の細胞数の減少が顕微鏡観察で認められた(data not shown)。

そこで、破骨細胞前駆細胞から破骨細胞への分化過程での生存率及び細胞数を測定した。その結果、10  $\mu\text{M}$  までの sudachitin は、破骨細胞前駆細胞からの細胞数に対して、sudachitin を含まない対照群の同等の細胞数を示した。以上の結果から、10  $\mu\text{M}$  以下の sudachitin の破骨細胞形成抑制作用は細胞増殖もしくは生存率とは関係なく、直接、破骨細胞の分化を減少することによってもたらされることが示された。



### 3) 破骨細胞前駆細胞における ROS 産生に対する sudachitin の作用

破骨細胞分化が細胞内の ROS 産生と密接な関連のあることが *in vivo* 及び *in vitro* の研究から示されている。また、sudachitin の抗酸化作用と合わせて、sudachitin の破骨細胞形成抑制作用と細胞内 ROS 産生への作用に関連性があるかを検討するため、破骨細胞前駆細胞を sRANKL と同時に sudachitin 存在下で培養した時の細胞内 ROS の濃度を測定した (図 4)。M-CSF 単独処理群と比較して、sRANKL を M-CSF に加え、破骨細胞分化を誘導した群において、細胞内 ROS の濃度は大きく上昇した。しかし、sRANKL + M-CSF に sudachitin を加えた群では、sudachitin の濃度に依存して細胞内 ROS 濃度が有意に減少し、10  $\mu\text{M}$  sudachitin 添加群では、M-CSF 単独添加群と変わらない細胞内 ROS 濃度までに減少した。



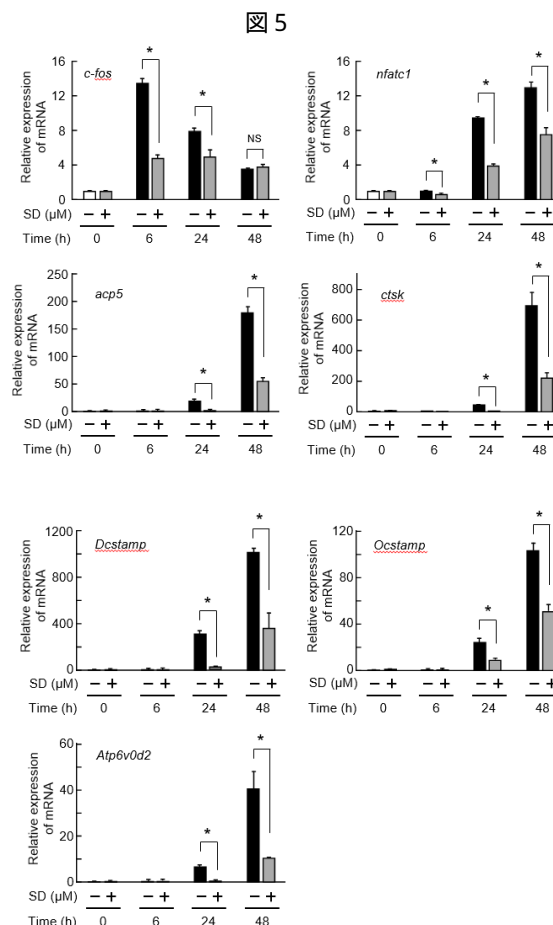
### 4) 破骨細胞分化関連分子の発現に対する sudachitin の作用

破骨細胞分化に関連したタンパク質の発現に対する sudachitin の作用を、mRNA レベルで検討した。(図 5)

破骨細胞の初期分化に必要な転写因子である *c-fos* および破骨細胞分化のマスター遺伝子である NFATc1 の mRNA の発現量を調べたところ、sudachitin 非添加群では sRANKL 添加から 6 時間目で *c-fos* mRNA 量が大きく増加し、24 時間目、48 時間目と徐々に減少した。一方、sudachitin 添加群では、sRANKL による *c-fos* mRNA の発現上昇が大きく減少した。さらに、sRANKL による *Nfatc1* mRNA の発現上昇も sudachitin 添加によって減少した。

これらの転写因子の発現減少に呼応して、破骨細胞の機能タンパク質である TRAP (*acp5*) mRNA と cathepsin K (*Ctsk*) mRNA の sRANKL による発現増加も sudachitin 添加によって有意に減少した。さらに、破骨細胞の細胞融合タンパク質である DC-STAMP (*Dcstamp*)、OC-STAMP (*Ocstamp*) そして *Atp6v0d2* (*Atp6v0d2*) の mRNA 発現量も sudachitin によって 50%以下に減少した。

以上の破骨細胞分化関連タンパク質の mRNA 発現に対する sudachitin の抑制作用と一致して、sRANKL による *c-fos*、NFATc1、cathepsin K、DC-STAMP および *Atp6v0d2* のタンパク質量の増加も sudachitin の同時添加によって大きく減少した。



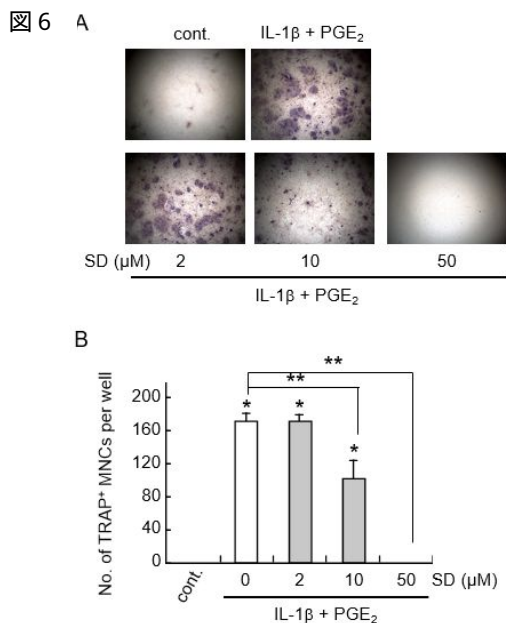
### 5) 頭蓋骨から単離した骨芽細胞と骨髄からの破骨細胞前駆細胞との共存培養系における破骨細胞形成に対する sudachitin の作用



炎症性骨破壊部位における破骨細胞の活性化には、骨形成細胞である骨芽細胞及び免疫細胞であるT細胞の炎症に呼応したRANKLの発現が重要であることが示されている。しかし、我々の先行研究は、頭頂骨へのLPS投与によって惹起される炎症性骨破壊に対しては、T細胞よりも骨芽細胞による破骨細胞誘導の方が重要であることを示している。そこで、炎症性骨破壊に対する sudachitin の抑制作用が骨芽細胞を介したものであるのかを検討するため、マウス頭蓋骨から分離した骨芽細胞と骨髄からの破骨細胞前駆細胞とを共存培養し、炎症性サイトカインである IL-1 および PGE2 処理による破骨細胞形成に及ぼす sudachitin の作用を評価した(図6)。

図6Aは分離骨芽細胞と破骨細胞前駆細胞の共存培養に IL-1 と PGE2 を加え、5日間処理した後の TRAP 染色像である。IL-1 + PGE2 処理によって、TRAP陽性の破骨細胞が多く形成されていることが確認できた。しかし、10  $\mu$ M および 50  $\mu$ M の sudachitin を加えると、その共存培養系における破骨細胞形成が大きく減少した。

この共存培養系における破骨細胞形成を定量化した(図6B)。IL-1 と PGE2 が含まない対照群においては、破骨細胞は全く形成されなかったが、IL-1 + PGE2 処理群では大きく破骨細胞の形成が促進した。しかし、IL-1 + PGE2 と共に 10  $\mu$ M sudachitin を加えると、破骨細胞形成は有意に減少した。また、50  $\mu$ M sudachitin を加えた群では全く形成されなかった。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ohyama Yoko, Ito Junta, Kitano Victor J., Shimada Jun, Hakeda Yoshiyuki	4. 巻 13
2. 論文標題 The polymethoxy flavonoid sudachitin suppresses inflammatory bone destruction by directly inhibiting osteoclastogenesis due to reduced ROS production and MAPK activation in osteoclast precursors	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0191192
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0191192	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 伊東順太	4. 巻 34
2. 論文標題 スダチ果皮特有フラボノイドsudachitinの炎症性骨破壊に対する抑制効果	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bio Clinica	6. 最初と最後の頁 41-47
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 伊東順太	4. 巻 2
2. 論文標題 炎症性骨破壊に対するスダチ果皮特有フラボノイドsudachitinの抑制効果	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Precision Medicine	6. 最初と最後の頁 96-102
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Junta Ito	4. 巻 June
2. 論文標題 Reducing reactive oxygen species (ROS) in gum disease	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Impact	6. 最初と最後の頁 71-73
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 伊東順太、大山洋子、Jose Kitano Flores Victor, 林田千代美、佐藤卓也、羽毛田慈之
2. 発表標題 スダチ果皮特有ポリメトキシフラボノイドsudachitinは破骨細胞形成およびLPS誘導炎症性骨破壊を抑制する
3. 学会等名 第34回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----