

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K18509

研究課題名（和文）低分子化合物terreinの炎症性骨破壊抑制機序解明に向けた免疫学的検討

研究課題名（英文）Immunological analysis of the effect of small molecule compound, terrein, on the mechanism of inflammatory bone destruction.

研究代表者

吉村 沙紀（中川沙紀）（Yoshimura, Saki）

岡山大学・歯学部・客員研究員

研究者番号：60814522

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では抗炎症作用を有する低分子化合物terreinに着目し、炎症性骨破壊病態に及ぼす影響を各種疾患マウスモデルを用いて解析し、terreinの骨破壊疾患治療薬としての可能性を検討した。その研究成果として、1) 卵巣摘出骨粗鬆症マウスモデルおよび絹糸結紮歯周炎マウスモデルの骨破壊を抑制すること、2) RANKLシグナル伝達系のPKC- α /betaIIのタンパク質リン酸化を抑制することを確認した。以上の結果から、低分子化合物terreinの骨破壊疾患治療薬としての候補化合物としての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

本研究結果において、terreinは既存の骨破壊抑制薬（ビスフォスフォネート製剤）とは異なる作用機序によって破骨細胞分化を抑制できる可能性が示唆された。Terreinは低分子化合物であることから、経口投与が可能といった幅広い創薬への応用が期待される。将来的には歯周炎を始めとする炎症性骨破壊疾患に対する治療薬への応用を検討し、健康長寿社会構築に貢献できる化合物になることが期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, I focused on terrein, a small molecule with anti-inflammatory properties, and analyzed its effects on inflammatory bone-destroying pathologies using various mouse disease models to investigate the potential of terrein as a therapeutic agent for bone-destroying diseases. The results of this study showed that 1) terrein inhibited bone destruction in mouse ovariectomized osteoporosis model and ligature-induced periodontitis model, and 2) terrein inhibited protein phosphorylation of PKC- α /beta II in the RANKL signaling pathway. These results suggest that terrein has potential as a drug candidate for the treatment of bone-destroying diseases.

研究分野：歯科保存学分野

キーワード：terrein 歯周病 骨粗鬆症

1. 研究開始当初の背景

超高齢社会を迎えた我が国において、「高齢者の健康寿命を維持する」ことは国家的命題の一つである。健康寿命の維持には、栄養を司る口腔機能を良好に維持することが重要である。近年、8020運動（日本歯科医師会）に代表される国民の口腔に対する意識向上の結果、8020達成者率が50%を超え、今後8020達成者率はさらに上昇することが予測される。一方、自身の歯が口腔内に残ることによって、歯周病や根尖性歯周炎等を罹患する高齢患者数は激増している。そして、高齢者に対する歯科保存的治療の実施が必要となる機会も急増している。しかし、高齢者特有の身体的背景（全身既往症の存在、多剤内服、唾液分泌能の低下、認知・身体機能の低下、易感染および誤嚥リスク等）から、通常の歯科治療を実施しにくい困難なケースも散見される。以上のような背景から、超高齢社会的背景を強く意識した安全・簡便に応用できる新たな歯科保存学的治療法の開発が社会から強く求められている。

本研究グループは、上記社会的背景を意識した口腔疾患に対する新規治療戦略を構築するにあたり、真菌である *Aspergillus terreus* が産生する二次代謝産物 *terrein* の抗炎症作用に着目して研究を進めている。その成果として、従来報告されていた *terrein* の有機化学的合成法 (Altenbach HJ, et al, 1990) を根本的に見直し、①効率的に有機化学合成する新たな手法を開発した(天然由来の収率 0.03% → 新規合成経路の収率 46%; Mandai H, et al, 2014)。さらに、②有機化学的に合成した *terrein* が炎症性サイトカイン interleukin-6 (IL-6) の細胞内シグナル伝達に関わる Janus activated kinase-1 (JAK1) のタンパク質リン酸化を抑制する効果(抗 IL-6 効果)を報告した (Yamamoto S, et al, 2018)。また、③*terrein* が炎症性骨破壊を担う receptor activator of nuclear factor κ B ligand (RANKL) 誘導性破骨細胞分化を強力に抑制する機序の一つとして、マスター分化因子である NFATc1 の発現を抑制する効果を発見した (Nakagawa S, et al, 2020)。

このように低分子化合物 *terrein* には炎症性骨破壊を主病態とする歯周病や骨粗鬆症の進行を制御出来る可能性が示唆される。一方、近年、炎症性骨破壊の病態に免疫細胞が深く関与することが報告されている。特に IL-17 を産生する CD4 陽性 Th17 細胞が破骨細胞分化を強く誘導すること、さらに歯周組織局所に存在する制御性 T 細胞 (pTreg 細胞) が IL-6 の刺激によって Th17 細胞に分化 (exFoxp3Th 細胞) することによって、さらに強い破骨細胞分化促進作用を有することが報告されている (Tsukasaki M, et al, 2018)。本報告のように炎症性骨破壊の病態に抗 IL-6 効果を有する *terrein* が及ぼす薬理作用をさらに検討することができれば、*terrein* の炎症性骨破壊疾患に対する治療薬としての可能性を高めることができると考える。

2. 研究の目的

本研究では、炎症性骨破壊疾患（歯周病および骨粗鬆症）マウスモデルを用いて、*terrein* の投与が、①炎症性骨破壊病変周囲（歯周組織および大腿骨成長板）の宿主免疫担当細胞に及ぼす影響を解析する。そして、②標的となりうる免疫細胞に対する *terrein* の抗炎症性薬

理効果およびそのメカニズムを *in vitro* で検討する。すなわち、低分子化合物 *terrein* が副作用の少ない新たな炎症性骨破壊疾患治療薬として応用できる可能性を検討し、新たな歯科保存治療のエビデンス構築を目指す上での基礎的検討を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、歯周炎マウスモデル（絹糸結紮モデル, Abe T, et al, 2013）および骨粗鬆症マウスモデル（卵巣摘出モデル, Kalyanaraman H, et al, 2016）を用いて、低分子化合物 *terrein* の免疫細胞に対する作用ならびに骨破壊抑制効果を検証した。

歯周炎マウスモデルは、通報に従いマウス（C57BL/6, 雄性, 8-10 週齢）の上顎第二大臼歯に 5-0 絹糸を結紮し、歯周感染を惹起した。骨粗鬆症マウスモデルは、通法に従いマウス（C57BL/6, 雌性, 10 週齢）の卵巣を摘出して骨粗鬆症を誘導した。*Terrein* の投与方法は、本研究グループが報告した腹腔内に直接注射して投与方法（Shibata A, et al, 2016）を用いた。実験条件として、①*terrein* 投与群, ②PBS 投与群（コントロール）の 2 群に分けて検討を行った。

各種疾患を誘導開始と同時に試験薬（*terrein*, 10-30 mg/kg）を腹腔内投与（週 2 回）し、歯周炎マウスモデルは 2 週間後、骨粗鬆症マウスモデルは 8 週間後に安楽死させ、炎症性骨破壊が起きている骨組織および周囲組織を摘出した。摘出組織から、絹糸結紮周囲歯周組織および大腿骨成長板周囲軟組織を採取した後、骨破壊の程度はマイクロ CT で解析した。解析後、組織切片を作成して各種染色（H-E 染色, TRAP 染色, 免疫染色）を行い、組織学的評価を行った。さらに、*terrein* の破骨細胞分化に及ぼす影響を検討するため、マウス骨髄由来マクロファージ様細胞（mBMMs）を用いて、RANKL 刺激時のリン酸化タンパク質の検出は Western blotting 法で、破骨細胞分化関連遺伝子発現の定量は real time-PCR 法を用いて解析した。

4. 研究成果

本研究における研究成果は下記に挙げられる。

骨粗鬆症マウス群において、*terrein* を腹腔内投与すると、

- ① 大腿骨成長板下の骨密度, 骨量, 骨梁数, 骨梁空隙の減少を有意に抑制した。
- ② 大腿骨成長板下の TRAP 陽性細胞数, cathepsin-K 陽性細胞数を有意に抑制した。
- ③ Positive control として用いたアレドロン酸（ビスフォスフォネート製剤）を投与した群の血中では炎症性サイトカイン（TNF- α , IL-1 β , IL-6）の産生が有意に亢進していた。一方、*terrein* 投与群では炎症性サイトカインの産生亢進は確認されなかった。

mBMMs において、*terrein* を作用させると、

- ① RANKL 刺激時における PKC α/β II のタンパク質リン酸化を有意に抑制した。
- ② 破骨細胞分化関連因子（*OCstamp*, *DCstamp*, *Calcr*, *Atp6v0d2*, *Oscar*, *Acp5*, *cathepsin-K*, *Itg β 3*）の mRNA 発現を有意に抑制した。

歯周炎マウス群において、**terrein** を腹腔内投与すると、

- ① 破骨細胞の分化を抑制することによって歯槽骨破壊を有意に抑制した。
- ② 血清中の TNF- α 産生を有意に抑制した。

一連の研究成果は、低分子化合物 **terrein** の骨破壊抑制効果を証明したものである。既存の骨破壊抑制薬であるビスフォスフォネート製剤に比べ、生体為害作用は低いことが予測されることから代謝機能が低下する高齢者にとって優しい骨破壊抑制薬として用いることが可能になることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Sako Hidefumi, Omori Kazuhiro, Nakayama Masaaki, Mandai Hiroki, Ideguchi Hidetaka, Yoshimura-Nakagawa Saki, Sakaida Kyosuke, Nagata-Kamei Chiaki, Kobayashi Hiroya, Ishii Satoki, Ono Mitsuaki, Ibaragi Soichiro, Yamamoto Tadashi, Suga Seiji, Takashiba Shogo	4. 巻 9
2. 論文標題 The Fungal Metabolite (+)-Terrein Abrogates Inflammatory Bone Resorption via the Suppression of TNF- Production in a Ligature-Induced Periodontitis Mouse Model	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Fungi	6. 最初と最後の頁 314 ~ 314
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jof9030314	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 -

1. 著者名 Sakaida Kyosuke, Omori Kazuhiro, Nakayama Masaaki, Mandai Hiroki, Nakagawa Saki, Sako Hidefumi, Kamei Chiaki, Yamamoto Satoshi, Kobayashi Hiroya, Ishii Satoki, Ono Mitsuaki, Ibaragi Soichiro, Yamashiro Keisuke, Yamamoto Tadashi, Suga Seiji, Takashiba Shogo	4. 巻 12
2. 論文標題 The Fungal Metabolite (+)-Terrein Abrogates Ovariectomy-Induced Bone Loss and Receptor Activator of Nuclear Factor- B Ligand?Induced Osteoclastogenesis by Suppressing Protein Kinase-C / II Phosphorylation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Pharmacology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fphar.2021.674366	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 -

1. 著者名 Nakagawa Saki, Omori Kazuhiro, Nakayama Masaaki, Mandai Hiroki, Yamamoto Satoshi, Kobayashi Hiroya, Sako Hidefumi, Sakaida Kyosuke, Yoshimura Hiroshi, Ishii Satoki, Ibaragi Soichiro, Hirai Kimito, Yamashiro Keisuke, Yamamoto Tadashi, Suga Seiji, Takashiba Shogo	4. 巻 83
2. 論文標題 The fungal metabolite (+)-terrein abrogates osteoclast differentiation via suppression of the RANKL signaling pathway through NFATc1	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Immunopharmacology	6. 最初と最後の頁 106429 ~ 106429
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.intimp.2020.106429	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 坂井田 京佑, 大森 一弘, 中川 沙紀, 佐光 秀文, 亀井 千晶, 山本 総司, 小林 寛也, 山城 圭介, 山本 直史, 高柴 正悟
2. 発表標題 真菌代謝産物(+)-terreinがマウス骨粗鬆症モデルにおける骨代謝に及ぼす影響
3. 学会等名 日本歯科保存学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐光 秀文, 大森 一弘, 中川 沙紀, 亀井 千晶, 坂井田 京佑, 山本 総司, 井手口 英隆, 小林 寛也, 山城 圭介, 山本 直史, 高柴 正悟
2. 発表標題 真菌二次代謝産物(+)-terreinはTNF- の発現を抑制し歯周炎マウスモデルにおける歯槽骨吸収を抑制する
3. 学会等名 日本歯周病学会
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------