

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 10 月 15 日現在

機関番号：15401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011 ～ 2011

課題番号：23890135

研究課題名（和文） 骨粗鬆症に対する大豆レシチンリポソーム化ラクトフェリンの効果に関する研究

研究課題名（英文） Effects of soy lecithin liposomal lactoferrin on osteoporosis

研究代表者

川添 亜希 (KAWAZOE AKI)

広島大学・病院・歯科診療医

研究者番号：80611962

研究成果の概要（和文）：

骨粗鬆症モデルマウスに対する大豆レシチンリポソーム化ラクトフェリン（SLbLF）経口投与の効果の研究を進める目的で、次のとおり実施した。

雌雄両性において両側性腺摘出術を施し骨粗鬆症モデルマウスとし、SLbLF を経口投与した群を SLbLF 群、bLF 非含有溶液（蒸留水）を経口投与させた群を非 SLbLF 群とした。また同日齢の偽手術群を対照群とした。性腺摘出術 8 週間後に大腿骨を摘出し、マイクロ CT にて海面骨量を計測した。

雌性骨粗鬆症モデルマウスにおいて、対照群と比較して、非 SLbLF 群では有意に骨量が減少しているのに対して、SLbLF 群では、骨量の減少が抑制されていた。したがって、SLbLF 経口投与は骨粗鬆症モデルマウスにおける骨量減少抑制効果がある可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

I carried out the following experiment about the effects of soy lecithin liposomal lactoferrin (SLbLF) on osteoporosis model mouse.

I made osteoporosis model mouse which was subjected to orchidectomy and oophorectomy. Then, osteoporosis model mouse was treated with either SLbLF (SLbLF group) or the vehicle in drinking water (non SLbLF group). Group which was not subjected to surgery was named control group. Mouse was killed after 8-week surgery, and I measured the femur volume using micro CT.

Non SLbLF group significantly reduced the femur volume compared to control group in female osteoporosis model mouse. On the other hand, SLbLF group inhibited the decrease of femur volume.

Therefore, it suggested that SLbLF have the potential of inhibitory effect on bone loss in osteoporosis model mouse.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,300,000	390,000	1,690,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：矯正・小児系歯学

キーワード：大豆レシチンリポソーム化ラクトフェリン、骨粗鬆症、大腿骨、海面骨密度

## 1. 研究開始当初の背景

我が国の高齢化社会は急激なスピードで進行しており、高齢期における慢性的疾患が増加している。これらの疾患の中でも著しく生活能力を低下させる疾患のひとつとして、骨粗鬆症が挙げられる。骨粗鬆症は多岐にわたる要因により発症するが、特に女性において発症率が高く、脊椎骨折や大腿骨骨折を併発することが多い。これらの併発症は日常生活動作（ADL）や生活の質（QOL）を著しく障害することが知られている。このように、現代の社会問題のひとつである骨粗鬆症は近年、様々な治療薬が開発されてきたが、副作用などの問題から未だ有効な治療薬は確立されていない。

一方、ウシラクトフェリン（bLF）は、抗菌作用、抗ウイルス作用、炎症性サイトカイン分泌抑制作用、腫瘍増殖抑制作用などの様々な活性を有する多機能タンパク質で、副作用のほとんどない安全性の高い食品由来物質として注目され、様々な食品に添加されたり、サプリメントとして服用されたりしている。しかしながら、bLF を経口摂取した場合、ペプシンやトリプシンのような消化酵素により約 80% 以上が胃で分解されるといわれており、小腸まで到達する bLF 量は激減し、bLF の抗炎症作用や免疫調節作用が十分に発揮されないとされている。そのため、胃での分解を抑制し、bLF を腸まで確実に到達させ、小腸における吸収量を増加させることを目的として、大豆レシチン二重構造膜の中に bLF を内包した、大豆レシチンリポソーム化 bLF (SLbLF) を作製した。我々はこれまでに、*in vivo* 実験系にて、ラットに経口摂取させた SLbLF が、リポポリサッカライド(LPS) の誘導する好中球遊走や破骨細胞性骨吸収

などの歯周組織変化に対して確実な抑制効果を発揮することを明らかにした。

さらに *in vitro* 実験系にて、LPS 刺激に伴う骨芽細胞による破骨細胞誘導に及ぼす bLF の影響について検討を行った結果、bLF は LPS の誘導する TNF- $\alpha$ 、RANKL 発現上昇を抑制した。

また、bLF による抗炎症作用の分子生物学的メカニズムについて検討したところ、bLF は骨芽細胞において LPS 刺激により活性化される NF- $\kappa$ B を特異的に抑制することで、RANKL 発現が抑制され、破骨細胞の分化・誘導が抑制されることが明らかとなった。

近年、NF- $\kappa$ B の活性化の制御は、骨粗鬆症をはじめとした骨吸収性疾患において非常に重要であることが明らかとなってきている。そこで本研究では、骨吸収抑制作用を有する bLF の骨粗鬆症に対する予防・治療薬となりうる可能性を検討することを目的とした。

## 2. 研究の目的

私はこれまでに、bLF は骨芽細胞を介した破骨細胞の分化・誘導を抑制することを明らかにした。そこで本研究では、破骨細胞を用い、まず破骨細胞に対する bLF の影響について検討し、bLF が破骨細胞に直接作用することによって分化・誘導が抑制されるのかどうかを明らかにする。さらに、bLF は骨芽細胞の増殖を促進するという報告 (Grey A. *et al.*) をもとに、本研究では bLF の骨再生・修復効果について検討する。さらに、骨粗鬆症モデルマウスにおける SLbLF 経口投与の骨量減少抑制効果について詳細に検討し、SLbLF の骨粗鬆症に対する予防・治療薬としての有用性を明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### 1. 骨粗鬆症モデルマウスに対する SLbLF 経口投与の骨量減少抑制効果の検討

- 1) 10 週齢 C57BL/6J マウスを実験動物とする。
- 2) 雌雄両性において両側性腺摘出術を施し、骨粗鬆症モデルマウスとする。また、同日齢の偽手術群を対照群とする。
- 3) 性腺摘出術と同時に SLbLF を経口投与した群を SLbLF 群、性腺摘出術と同時に bLF 非含有飲料（蒸留水）を経口投与した群を非 SLbLF 投与群とする。なお、対照群には bLF 非含有溶液（蒸留水）を経口投与させる。
- 4) 性腺摘出術後 8 週間後に通法に従い織を摘出する。観察部位は大腿骨とし、マイクロ CT にて骨量計測後、通法に従いパラフィン包埋し、マイクロトームを用いて経時的に組織縦断切片を作製する。
- 5) ヘマトキシリン・エオジン（HE）染色により大腿骨形態を観察し、骨梁幅計測を行う。また酒石酸耐性酸性フォスファターゼ（TRAP）染色を施し、光学顕微鏡下で TRAP 陽性の破骨細胞数を組織計測学的に算定する。さらに、アルカリフォスファターゼ染色を施し、光学顕微鏡下で骨芽細胞数を組織計測学的に算定する。
- 6) 大腿骨組織像中に発現する骨代謝因子を検討するために、RANKL, OPG, OCN, OPN などの免疫組織化学染色を施し、光学顕微鏡下で観察する。

#### 2. 破骨細胞の分化・誘導に対する bLF の抑制効果の検討

1) マクロファージ系細胞株である RAW264 細胞を使用する。

2) まず、破骨細胞を分化・誘導する実験系を用いて、bLF による破骨細胞の出現様相の変化を観察する。破骨細胞への分化・誘導には通法に従い、マウス M-CSF とマウス RANKL を用い、また bLF は 1, 10, 100  $\mu$ g/ml の各濃度で添加を行い、最終的な評価には TRAP 染色を用いて破骨細胞数を計測する。

3) bLF による破骨細胞分化・誘導抑制効果が認められた場合は、さらにそのメカニズムについて、Western blotting 法を用いて RANKL 刺激により活性化される NF- $\kappa$ B 経路を中心に解析を進める。

#### 3. 骨芽細胞に対する bLF の骨再生・修復効果の検討

1) 骨芽細胞様細胞株である MC3T3-E1 細胞を使用する。

2) まず、 $\beta$ グリセロリン酸やアスコルビン酸を含有した石灰化物形成誘導培地に bLF を添加して培養を行い、石灰化物形成能への bLF の促進効果について bLF 非添加群と比較する。石灰化物形成能の評価には、アリザリンレッド染色を用いて石灰化物を可視化し、比較検討を行う。

3) さらに、骨芽細胞の分化に対する bLF の影響については、bLF 添加後、経時的にオステオカルシン、ボーンシアロプロテイン、アルカリフォスファターゼ、タイプ I コラーゲンなどの骨芽細胞の分化関連マーカーの発現変化を、real time RT-PCR 法を用いて定量解析する。

4) bLF による骨芽細胞の分化に対する促進効果が認められた場合は、LF 受容体である LRP1 受容体を中心としたメカニズムの検討

を進める。

5) また、骨芽細胞の増殖に対する bLF の影響については、bLF 添加後、経時的に骨芽細胞数を計測し、比較検討する。

#### 4. 研究成果

図 1 雌性対照群における大腿骨水平断

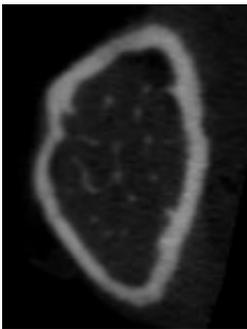


図 2 雌性非 SLbLF 群における大腿骨水平断

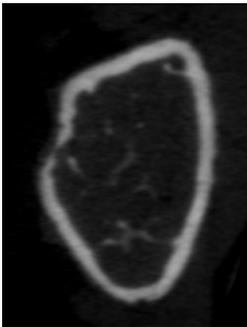
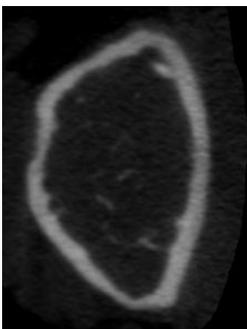


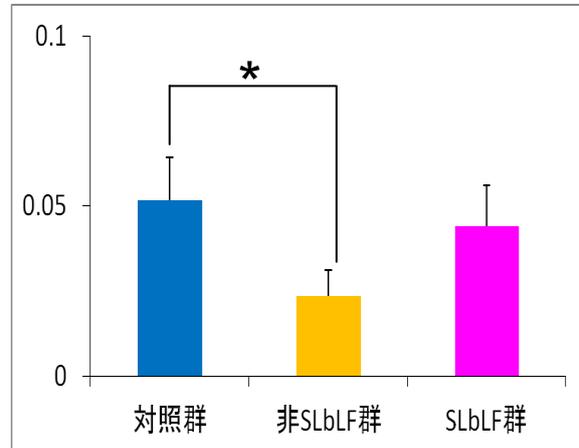
図 3 雌性 SLbLF 群における大腿骨水平断



対照群の皮質骨と比較して、非 SLbLF 群の皮質骨は薄く脆弱であるように見える。一方、SLbLF 群の皮質骨は、対照群とほぼ同じ厚みを呈している。海面骨の状態は、もう少し解像度をあげて比

較検討する予定である。

Figure 4 雌性骨粗鬆症モデルマウスにおける大腿骨量



\* P<0.05  
(n=5)

対照群と比較して、非 SLbLF 群では有意に骨量が減少しているのに対して (P<0.05)、SLbLF 群では、骨量の減少が抑制されていた。

#### 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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

川添 亜希 (KAWAZOE AKI)

広島大学・病院・歯科診療医

研究者番号：80611962

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：