

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462892

研究課題名(和文) Nrf2による破骨細胞制御機構の解明と分子標的に着目した天然物リガンドの探索

研究課題名(英文) Elucidation of molecular mechanisms of Nrf2-mediated osteoclastogenesis and search of natural products as molecular targets

研究代表者

坂井 詠子 (SAKAI, Eiko)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・助教

研究者番号：10176612

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：破骨細胞分化におけるNrf2/Keap1の役割を調べた。Keap1遺伝子欠損破骨細胞前駆細胞ではERK, p38MAPK, JNKのリン酸化阻害とNFATc1の発現抑制により破骨細胞分化が阻害された。一方、Nrf2遺伝子欠損破骨細胞前駆細胞では、ERK, p38 MAPK, JNKの活性化とNFATc1とc-Fosの核移行促進による破骨細胞分化促進が認められた。しかし大腿骨マイクロCTの結果や、大腿骨切片のヘマトキシリン・エオジン染色の結果からは、マウス間で顕著な差は認められなかった。さらにカフェストールとカウエオール、サンギンH-6と分解産物エラグ酸の破骨細胞分化阻害効果を比較した。

研究成果の概要(英文)：This study investigated the role of Keap1/Nrf2 axis in the differentiation of osteoclast using wild-type, Keap1-deficient, and Nrf2-deficient mice. Keap1-deficient osteoclast precursors showed defects in osteoclastogenesis through the inhibition of phosphorylation of ERK, P38 MAPK, and JNK. Furthermore, the protein expression of NFATc1 was significantly downregulated. In contrast, Nrf2-deficient osteoclast precursors underwent enhanced osteoclastogenesis through the activation of ERK, p38 MAPK, and JNK signaling. Moreover, nuclear translocation of NFATc1 and c-Fos was increased in Nrf2-deficient osteoclast precursors. However, microcomputed tomographic analyses and histological analyses of femurs with hematoxylin-eosin staining showed no significant defects among these mice. Furthermore, we compared the inhibitory effects of cafestol and kahweol, or sanguin H-6 and its degradation product, ellagic acid on osteoclast differentiation.

研究分野：歯科薬理学

キーワード：破骨細胞 酸化ストレス 天然物 Nrf2 骨代謝

1. 研究開始当初の背景

酸化ストレスは細胞にダメージを与え、細胞を死に向かわせるものとして考えられてきた。しかし近年、弱い酸化ストレスは細胞分化を促進することが報告され始めている。破骨細胞においても、2005年頃から酸化ストレスが分化促進的に働くことを示した論文を目にするようになった。我々は破骨細胞分化過程において、抗酸化酵素であるヘムオキシゲナーゼ1 (HO-1) の発現を上昇させると破骨細胞分化が阻害され、逆に HO-1 の発現を抑制すると分化が促進されることを明らかにした。HO-1 の発現は転写因子 Nrf2 と Nrf2 の制御分子である Keap1 によって制御されていることから、Nrf2/Keap1 による酸化ストレス制御システムが破骨細胞分化に影響を与えるのではないかと考えた。本研究開始当初、破骨細胞分化における Nrf2/Keap1 の役割はまだよく明らかにされていなかった。そこでまず Nrf2 を活性化することが知られていた *tert*-Butylhydroquinone (tBHQ) を添加したところ、破骨細胞分化が阻害されることを明らかにした。さらに tBHQ は Nrf2 の核移行を促進するが、破骨細胞分化に重要な転写因子である NFATc1 や c-Fos の核移行を阻害し破骨細胞分化を抑制することを見出した。しかしながら、Nrf2 が活性化することで、なぜ上記のような破骨細胞分化の阻害が認められるのか、その分子メカニズムはまだ明らかではなかった。

2. 研究の目的

Nrf2/Keap1 システムの破骨細胞分化における役割を解明する。さらに Nrf2 を活性化することができる天然物リガンドを探し、その化学構造と分化抑制効果の比較を行い、より有効な化学構造の同定を行う。

3. 研究の方法

- (1) 破骨細胞分化における Nrf2/Keap1 システムの役割を解明する。
Nrf2 遺伝子欠損マウス(Nrf2 KO)、Keap1 遺伝子欠損マウス(Keap1 KO)、野生型マウス(WT)の骨髄細胞または脾臓細胞から破骨細胞を形成し、分化を促進する転写因子と MAP キナーゼの活性化の程度と、その活性化に必要な細胞内活性酸素種(ROS) の産生量を比較する。

マイクロCT から骨形態計測を行う。

大腿骨切片の HE 染色と TRAP 染色を行い、*in vivo* における破骨細胞分化の差を観察する。

- (2) 天然物リガンドの中でも Nrf2 を活性化することを指標に、本研究で用いる天然物リガンドを選別し、化学構造と破骨細胞分化抑制効果の強さを比較検討する。

4. 研究成果

- (1) Nrf2 KO では、破骨細胞分化を促進する転写因子 NFATc1 と c-FOS の核移行の促進と、Erk、p38 MAPK、JNK などの MAP キナーゼの活性化がおり、顕著に破骨細胞形成が亢進したのに対し、Keap1 KO ではこれらの転写因子の核移行も MAP キナーゼの活性化もおこらず、破骨細胞が殆ど形成されないことを見出した。細胞内 ROS は Nrf2 KO > 野生型 > Keap1 KO の順で高く、酸化ストレスのレベルの違いが認められた。ROS はホスファターゼの活性を阻害して MAP キナーゼの活性化を維持することが知られている。そこで、ROS 消去剤である N-アセチルシステインを添加すると、Nrf2 KO で見られた MAP キナーゼの活性化は野生型レベルにまで減弱した。このことから、Nrf2 KO においては、細胞内 ROS が MAP キナーゼの活性化を促進し、その結果、破骨細胞分化が促進が促進したと考えられる。逆に、Keap1 KO の場合は、常に Nrf2 が活性化されているため、細胞内酸化ストレスは低く保たれており、MAP キナーゼの活性化が殆どおこらず、その結果、破骨細胞が形成されないことが明らかになった。

上記のように、*in vitro* においては Nrf2 KO で、顕著な破骨細胞分化の促進がおり、Keap1 KO では破骨細胞が殆ど形成されなかったのに対し、各マウスの大腿骨のマイクロCT像を比較し、骨形態計測を行ったところ、特に目立った大きな差は認められなかった。

大腿骨切片を TRAP 染色し、組織中の破骨細胞数を計測したが、野生型と Nrf2 KO では、著しい差は認められなかった。Keap1 KO では、破骨細胞数の減少が認められたが、*in vitro* で見られたような著しい破骨細胞分化の抑制は見られなかった。

- (2) 天然物リガンドの中でも、HO-1 の発現上昇を指標にして、Nrf2 を活性化する化合物を選び破骨細胞分化への影響を調べた。
リクイリチゲニンは甘草フラボノイド由来のアグリコンである。大豆イソフラボンもアグリコンに糖が結合した配糖体であるが、体内では腸内細菌で分解されてアグリコンの形で腸管から吸収される。大豆イソフラボンのアグリコン部分は女性ホルモンであるエストロゲンに良く似た化学構造をしている。甘草由来のリクイリチゲニンも、大豆イソフラボンのアグリコンと非常に類似の構造で、従ってエストロゲンとも良く似ている。本研究によって、リクイリチゲニンが、破骨細胞分化を抑制する濃度で、骨

芽細胞の分化を促進することが明らかになった。

以前、我々はコーヒー豆に含まれるジテルペン化合物であるカウエオールに強い破骨細胞分化抑制効果があることを報告していたが、本研究ではカウエオールの化学構造に非常に類似したカフェストールの破骨細胞分化抑制効果を明らかにすることができた。即ち、カウエオールとカフェストールは化学構造的には1本の2重結合の有るか無いかの違いだけであるが、以前、Keap1との結合能がカウエオールの方が強いと報告されているように、本研究の結果でもカウエオールの方が、HO-1やNQO1などの第2相抗酸化酵素群の発現を上昇させる能力が強く、カウエオールはKeap1との結合がより強く、Nrf2の活性化を強く促進するものと思われた。破骨細胞分化抑制効果もカウエオールの方が強く、それに比べるとカフェストールはマイルドに破骨細胞分化を抑制した。しかしながら、カフェストールは骨芽細胞分化を促進したので、カフェストールの方が、骨粗鬆症治療薬として期待できる。

苗代いちご抽出液主成分のサンギンH-6は加水分解タンニンに属し、本研究によって強い破骨細胞分化抑制効果があることが明らかになった。前述のリクイリチゲニンやカウエオール、カフェストールが10 micro M前後で阻害効果が見られるのに対し、サンギンH-6は1.5 micro Mでほぼ完全に破骨細胞分化を抑制した。IC₅₀は0.42 micro Mと非常に強い分化抑制効果を示した。また、炎症性サイトカインであるTNF- α をマウス頭部皮下に投与して破骨細胞を形成させる実験系で、サンギンH-6を投与することで、*in vivo*における破骨細胞形成を有意に抑制することができた。これより、サンギンH-6には炎症性骨破壊の抑制効果が期待できる。またサンギンH-6は水溶液中でエラグ酸に分解される。本研究によりエラグ酸にも破骨細胞分化抑制効果があることが明らかになった。エラグ酸のIC₅₀が1.43 micro Mであったことから、サンギンH-6はエラグ酸に分解されて破骨細胞分化抑制効果を示したものと考えられる。

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 7 件)

Sakai E., Aoki Y., Yoshimatsu M., Nishishita K., Iwatake M., Fukuma Y., Okamoto K., Tanaka T., Tsukuba T., Sanguin H-6, a

constituent of *Rubus parvifolius L.*, inhibits receptor activator of nuclear factor- κ B ligand-induced osteoclastogenesis and bone resorption *in vitro* and inhibits tumor necrosis factor- α -induced osteoclastogenesis *in vivo*, *Phytomedicine*, 査読有, 2016
DOI: 10.1016/j.phymed.2016.04.002

Yoneshima E., Okamoto K., Sakai E., Nishishita K., Yoshida N., Tsukuba T., The transcription factor EB (TFEB) regulates osteoblast differentiation through ATF4/CHOP-dependent pathway, *J. Cell Physiol.*, 査読有, 231 (6), 2016, pp. 1321-1333
DOI: 10.1002/jcp.25235

Uchino K., Okamoto K., Sakai E., Yoneshima E., Iwatake M., Fukuma Y., Nishishita K., Tsukuba T., Dual effects of liquiritigenin on the proliferation of bone cells: promotion of osteoblast differentiation and inhibition of osteoclast differentiation, *Phytother. Res.*, 査読有, 29(11), 2015, pp. 1714-1721
DOI: 10.1002/ptr.5416

Fukuma Y., Sakai E., Nishishita K., Okamoto K., Tsukuba T., Cafestol has a weaker inhibitory effect on osteoclastogenesis than kahweol and promotes osteoblast differentiation, *Biofactors*, 査読有, 41(4), 2015, pp. 222-231
DOI: 10.1002/biof.1218.

Yashima Y., Okamoto K., Sakai E., Iwatake M., Fukuma Y., Nishishita K., Tsukuba T., Cobalt protoporphyrin represses osteoclastogenesis through blocking multiple signaling pathways, *Biometals*, 査読有, 28(4), 2015, pp. 725-732
DOI: 10.1007/s10534-015-9861-9.

Shimada-Sugawara M., Sakai E., Okamoto K., Fukuda M., Izumi T., Yoshida N., Tsukuba T., Rab27A regulates transport of cell surface receptors modulating multinucleation and lysosome-related organelles in osteoclasts, *Sci Rep.* 査読有, 2015 Apr 16;5:9620
DOI: 10.1038/srep09620.

Yamaguchi Y., Sakai E., Sakamoto H., Fumimoto R., Fukuma Y., Nishishita K., Okamoto K., Tsukuba T., Inhibitory effects of tert-butylhydroquinone on osteoclast differentiation via up-regulation of heme oxygenase-1 and down-regulation of HMGB1 release and NFATc1 expression *J. Appl. Toxcol.*, 査読有, 34, 2014, pp. 49-56
DOI: 10.1002/jat.2827.

〔学会発表〕(計 17 件)

坂井詠子、福岡裕、山口優、西下一久、岡元邦彰、筑波隆幸：Keap1/Nrf2 の破骨細胞と骨芽細胞分化における役割、第 88 回日本生化学会大会、2015 年 12 月 1 日 4 日、神戸国際会議場（兵庫県・神戸市）

米嶋枝里香、岡元邦彰、坂井詠子、西下一久、筑波隆幸、吉田教明：リソソーム促進転写因子 TFEB の骨芽細胞分化における影響、第 74 回日本矯正歯科学会大会、2015 年 11 月 18 日 20 日、福岡国際会議場（福岡県・福岡市）

福岡裕、坂井詠子、西下一久、岡元邦彰、筑波隆幸：カフェストールは、カフェオールより破骨細胞分化阻害効果が弱く、骨芽細胞の成熟を促進する、第 57 回歯科基礎医学会、2015 年 9 月 11 日 - 13 日、朱鷺メッセ（新潟県・新潟市）

坂井詠子、福岡裕、西下一久、岡元邦彰、筑波隆幸：Keap1/Nrf2 の破骨細胞分化における役割、第 57 回歯科基礎医学会、2015 年 9 月 11 日 - 13 日、朱鷺メッセ（新潟県・新潟市）

Erika Yoneshima, Kuniaki Okamoto, Xiaobin Wang, Eiko Sakai, Kazuhisa Nishishita, Noriaki Yoshida, and Takayuki Tsukuba: Role of transcription factor EB (TFEB) in BMP-induced osteoblastogenesis., 第 88 回日本薬理学会年会、2015 年 3 月 18 日 20 日、名古屋国際会議場（愛知県・名古屋市）

坂井詠子、山口優、福岡裕、菅原めぐみ、西下一久、岡元邦彰、筑波隆幸：Nrf2 遺伝子欠損マウスにおける酸化ストレスと骨代謝、第 87 回日本生化学会大会、2014 年 10 月 15-18 日、国立京都国際会館（京都府・京都市）

菅原めぐみ、坂井詠子、福岡裕、西下一久、岡元邦彰、福田光則、泉哲郎、吉田教明、筑波隆幸：Rab27A は破骨細胞の多核化とリソソーム機能を制御する、第 87 回日本生化学会大会、2014 年 10 月 15-18 日、国立京都国際会館（京都府・京都市）

坂井詠子、福岡裕、菅原めぐみ、西下一久、岡元邦彰、筑波隆幸：Nrf2 遺伝子欠損マウスにおける酸化ストレスと破骨細胞分化、第 56 回歯科基礎医学会、2014 年 9 月 25 日 27 日、福岡国際会議

場（福岡県・福岡市）

菅原めぐみ、坂井詠子、福岡裕、西下一久、岡元邦彰、吉田教明、筑波隆幸：破骨細胞の多核化とリソソーム機能を制御する rab タンパク質の同定、第 56 回歯科基礎医学会、2014 年 9 月 25 日 27 日、福岡国際会議場（福岡県・福岡市）

八島由佳、岡元邦彰、坂井詠子、西下一久、筑波隆幸：コバルトプロトボルフィリンは I B のリン酸化を抑制し破骨細胞分化を阻害する、第 87 回日本薬理学会年会、2014 年 3 月 19 日 21 日、仙台国際センター（宮城県・仙台市）

坂井詠子、岩竹真弓、福岡裕、西下一久、岡元邦彰、田中隆、筑波隆幸：Sanguisorba officinalis 由来化学成分は破骨細胞分化を抑制する、第 87 回日本薬理学会年会、2014 年 3 月 19 日 21 日、仙台国際センター（宮城県・仙台市）

福岡裕、坂井詠子、菅原めぐみ、西下一久、岡元邦彰、筑波隆幸：カフェストールによる破骨細胞分化抑制作用、第 66 回日本薬理学会 西南部会、2013 年 11 月 16 日、福岡大学（福岡県・福岡市）

内野加穂、岡元邦彰、坂井詠子、福岡裕、岩竹真弓、西下一久、筑波隆幸：リクイリチゲニンの破骨細胞形成への効果、第 55 回歯科基礎医学会学術大会、2013 年 9 月 20 日 22 日、岡山コンベンションセンター（岡山県・岡山市）

坂井詠子、岩竹真弓、西下一久、福岡裕、岡元邦彰、筑波隆幸：Sanguisorba officinalis 由来化学成分の破骨細胞分化に対する影響、第 55 回歯科基礎医学会学術大会、2013 年 9 月 20 日 22 日、岡山コンベンションセンター（岡山県・岡山市）

岩竹真弓、坂井詠子、西下一久、岡元邦彰、筑波隆幸：Sanguisorba officinalis 由来化学成分の破骨細胞分化に対する影響、第 55 回歯科基礎医学会学術大会、2013 年 9 月 20 日 22 日、岡山コンベンションセンター（岡山県・岡山市）

坂井詠子、福岡裕、菅原めぐみ、西下一久、岡元邦彰、筑波隆幸：Nrf2 欠損は破骨細胞分化を促進する、第 86 回日本生化学会大会、2013 年 9 月 11-13 日、パシフィコ横浜（神奈川県・横浜市）

岩竹真弓、坂井詠子、岡元邦彰、米嶋枝里香、財津由未、田中隆、筑波隆幸：

Suppressive effects of an oak extract on osteoclast formation and bone resorption, 第86回日本生化学会大会、2013年9月11-13日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

〔図書〕(計 1 件)

Coffee and bone metabolism: kahweol and osteoclastogenesis. Sakai E., Tsukuba T. In “Coffee in Health and Disease prevention”, Elsevier, Chapter 96, pp.869-874, 2014.

6. 研究組織

(1)研究代表者

坂井 詠子 (SAKAI, Eiko)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・
助教

研究者番号： 1 0 1 7 6 6 1 2

(2)研究分担者

筑波 隆幸 (TSUKUBA, Takayuki)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・
教授

研究者番号： 3 0 2 6 4 0 5 5

(3)研究分担者

岡元 邦彰 (OKAMOTO, Kuniaki)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・
准教授

研究者番号： 1 0 3 1 1 8 4 6

(4)研究分担者

西下 一久 (NISHISHITA, Kazuhisa)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・
助教

研究者番号： 2 0 2 3 7 6 9 7