

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：32404

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462898

研究課題名(和文)破骨細胞形成におけるリナカンチンCの抑制作用の分子メカニズム

研究課題名(英文)Inhibitory mechanism of rhinacanthin C on osteoclast formation

研究代表者

友村 美根子 (Tomomura, Mineko)

明海大学・歯学部・准教授

研究者番号：30217559

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)：骨代謝は骨形成を担う骨芽細胞と骨破壊を担う破骨細胞のバランスによって調節されている。骨粗鬆症にみられるように、骨吸収が促進した状態では骨折のリスクが高くなる。我々は白鶴霊芝から単離したリナカンチンCに強い破骨細胞分化抑制効果を見出した。リナカンチンCはRANKLによる破骨細胞の分化と、その分化に重要な転写因子NFATc1の発現誘導を阻害した。破骨細胞分化抑制効果は濃度依存的であり、且つ可逆的であった。リナカンチンCはLPS(細菌内毒素)による破骨細胞形成についても阻害した。さらにリナカンチンCはRANKLやLPSによるマウスの頭蓋骨の骨破壊を抑制し、骨破壊抑制効果を個体レベルでも確認できた。

研究成果の概要(英文)：Bone formation by osteoblasts and bone resorption by osteoclasts are balanced to maintain bone homeostasis. Enhanced bone resorption can lead to bone fracture seen in osteoporosis. We found that rhinacanthin C isolated from *R.nasutus* has a strong anti-osteoclast formation effect. Rhinacanthin C dose-dependently and reversibly suppressed RANKL-induced osteoclast differentiation and expression of NFATc1, which is an essential transcription factor for osteoclast differentiation. Rhinacanthin C also suppressed endotoxin LPS-stimulated osteoclastogenesis from cultured bone marrow cells. Furthermore, rhinacanthin C protected RANKL or LPS induced mouse calvarial osteolysis in vivo.

研究分野：生化学

キーワード：破骨細胞 骨吸収 骨粗鬆症 生薬

1. 研究開始当初の背景

破骨細胞はマクロファージ前駆細胞の受容体 RANK が骨芽細胞の RANKL と結合し、免疫グロブリン様受容体 (TREM-2/OSCAR) からの共刺激シグナルとともに分化が開始され成熟破骨細胞となる。TRAF6 を起点とした c-Fos, JNK, NF κ B の活性化とともに DAP12/FcR γ /Syk 複合体形成により PLC γ の活性化が促進される。PLC γ により発生したカルシウム振動で活性化されるカルシニューリンにより核移行した転写調節因子 NFATc1 と先に活性化した NF κ B, AP-1 によって破骨細胞の分化マーカーである酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ (TRAP) やカテプシン K、カルシトニン受容体などが誘導される。さらに TRAP 陽性単核細胞は細胞融合によって多核となった後、細胞内にアクチンリングを形成し、プロトンとカテプシン K を分泌し骨基質を溶解する。破骨細胞形成に RANKL による活性酸素 (ROS) 発生が PLC γ を活性化する経路も関与している。女性ホルモン 17 β E₂ は核内エストロゲン受容体 ER α 経路で Fas-L の発現を促進させアポトーシスを促進する経路と細胞膜 ER α が TRAF6 複合体形成を抑制する経路が報告されている。

ポリフェノールに骨代謝を改善する効果 (特に骨芽細胞分化促進) が多数報告されているが、破骨細胞における抑制機構の詳細なシグナル経路は明らかになっていない。例えば、カテキンは破骨細胞における RANKL による NF- κ B, c-Jun, c-Fos と NFATc1 の発現を抑制し、レスベラトロールは RANKL による ROS 産生を抑制して破骨細胞の分化を抑制した報告が散見される。ポリフェノールの受容体も大部分が明らかになっていない。植物エストロゲンであるゲニステインやダイゼインが骨芽細胞のエストロゲン受容体に結合するという報告やエピガロカテキンガレートが乳癌細胞のラミニン受容体に結合する報告が見られる。Rhinacanthin は

Rhinacanthus nasutus に多く含まれるナフトキノン誘導体で、Rhinacanthin A, B, C, D, G, N, Q がある。アポトーシス誘導、抗腫瘍作用、抗ウイルス作用、抗アレルギー作用・抗炎症作用などが報告されているが、骨代謝での報告は見られない。我々は Rhinacanthin C が破骨細胞の分化を抑制することを見出した。その分子メカニズムと有効性を検討することは、骨代謝疾患の理解と予防に有益と考えられる。

2. 研究の目的

骨組織は破骨細胞による骨吸収機能と骨芽細胞による骨形成機能の平衡関係で維持されている。この関係が破綻すると骨粗鬆症となり超高齢化社会を迎える日本の大きな課題となっている。また、成人の大部分が罹患する歯周疾患においても歯槽骨吸収の阻止が課題であり、骨吸収抑制因子の探索が行われてきた。白鶴霊芝は肝炎、糖尿病、高血圧、癌、感染症などの治療薬として東南アジアで古くから用いられてきた。我々はこの抽出液に破骨細胞分化抑制作用を見出し、さらに精製を進めた結果、ナフトキノン誘導体である Rhinacanthin C が破骨細胞分化抑制効果の本体であることを初めて明らかにした。本研究では、Rhinacanthin C が破骨細胞形成過程を抑制するメカニズムを解明するために、Rhinacanthin C の抑制シグナル伝達経路を明らかにする。さらに in vivo レベルでの有効性について検討し、骨の老化の予防・治療をターゲットにした創薬の基盤研究を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) in vitro: 培養細胞を用いた破骨細胞分化における Rhinacanthin C の作用機序

マクロファージ形成能は単離したマウスの骨髄細胞を MethoCult (メチルセルロース) で M-CSF 存在下で 7 日間培養し、マクロファ

ージコロニー数をカウントした。マクロファージ貪食能は蛍光標識した zymosan A の取り込みから測定した。

破骨細胞の分化は単離したマウス骨髄細胞を M-CSF で 3 日間培養後、さらに RANKL を加えて培養した。Rhinacanthin C は RANKL と同時に添加した。破骨細胞の分化と骨吸収機能は酒石酸耐性酸ホスファターゼ (TRAP) 活性と TRAP 染色および pit アッセイ法で検討した。細胞毒性については cell proliferation assay kit (Promega) を用いて検討した。

破骨細胞分化シグナリングはウエスタンブロット法と免疫沈降法を用いて検討した。

(2) in vivo: マウス個体を用いた骨破壊実験における Rhinacanthin C の保護効果

マウス頭蓋骨頂部骨膜下に RANKL または LPS をリナカンチン共存/非共存下で連日注射した。5 日目に頭蓋骨を取り出し、TRAP 染色とマイクロ X 線 CT を用いて骨構造について解析を行った。

4. 研究成果

Rhinacanthin C は単離初代培養骨髄細胞の M-CSF によるマクロファージや破骨前駆細胞の形成頻度を抑えないが、RANKL によるマクロファージ・破骨前駆細胞からの破骨細胞への分化のステップを濃度依存的 (0.25-2.0 μ M) に抑えた。この抑制効果は可逆的で、Rhinacanthin C を培地から取り除くと分化能は回復した。Rhinacanthin C を添加すると RANKL による c-Fos 及び破骨細胞分化のマスター転写因子である NFATc1 の発現誘導が抑制された。Rhinacanthin C は p38 を除く ERK, JNK および NF- κ B のリン酸化を抑制し、その上流にある TRAF6-TAK1 の複合体形成を抑えた。従って Rhinacanthin C の破骨細胞形成抑制作用機序として RANKL による TRAF6-TAK1 の複合体形成を抑えることによ

り、MAKP キナーゼ, NF- κ B のリン酸化が起こらず NFATc1 の発現が不十分となり破骨細胞の分化に至らないと考えられた。さらに Rhinacanthin C の抗破骨作用を検証するために、In vivo 実験を行った。RANKL をマウスの頭蓋冠骨膜下に 5 日間投与すると頭蓋骨吸収が観察されるが、Rhinacanthin C 同時投与により頭蓋骨吸収および破骨細胞産生数が低下した。また Rhinacanthin C は LPS 誘導性の上記 in vitro および in vivo の系における破骨細胞形成、および骨吸収作用も抑えた。以上のことから Rhinacanthin C は、骨粗鬆症や炎症性骨吸収の治療薬のリード化合物として応用できる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① [Tomomura M](#), Tomomura A, Caldecrin: A pancreas-derived hypocalcemic factor, regulates osteoclast formation and function. World J Biol Chem, 2015, 6(4), 358-365, DOI: 10.4331/wjbc.v6.i4.358.
- ② [Tomomura M](#), [Suzuki R](#), [Shirataki Y](#), Sakagami H, Tamura N, Tomomura A, Rhinacanthin C Inhibits Osteoclast Differentiation and Bone Resorption: Roles of TRAF6/TAK1/MAPKs/NF- κ B/NFATc1 Signaling. PLoS One, 2015, 10(6), e0130174, DOI: 10.1371/journal.pone.0130174.
- ③ Watanabe M, [Suzuki R](#), [Tomomura M](#), Sakagami H, Tomomura A, [Shirataki Y](#), Constituents of the Leaves of Odontioda Marie Noel 'Velano' with Inhibitory Activity on RANKL-induced Osteoclast Differentiation.

Shoyakugaku Zasshi. 2015, 69(1): 20-21,
<http://www.jsphcg.or.jp/>

- ④ Horii H, Suzuki R, Sakagami H, Tomomura M, Tomomura A, Shirataki Y, New biological activities of Rhinacanthins from the root of *Rhinacanthus nasutus*. *Anticancer Res*, 2013, 33(2), 453-459, <http://ar.iarjournals.org/>

[学会発表] (計 11件)

- ① 友村美根子. 血清カルシウム降下因子 (カルデクリン) と骨代謝, 第130回日本薬理学会関東部会, ランチョンセミナー, 2015年7月, 千葉
- ② Tomomura M, Suzuki R, Shirataki Y, Sakagami H, Tamura N and Tomomura A. Anti-osteoclastic activity of rhinacanthin C, 第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学会大会、合同大会, 2015年12月, 神戸
- ③ 坂東健次郎、田村暢章、川口祥子、友村美根子、友村明人, LPSにより誘導される破骨細胞分化に対する Caldecrin の影響, 第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学会大会、合同大会, 2015年12月, 神戸
- ④ 田村暢章, 友村美根子, 川口祥子, 嶋田淳, 細菌内毒素による破骨細胞分化誘導に対するカルデクリンの抑制効果, 第33回日本骨代謝学会. 2015年7月, 東京
- ⑤ Tomomura M, Suzuki R, Shirataki Y, Sakagami H, Tomomura A. Geranyl-geraniol enhances osteoblast

differentiation, while it suppresses osteoclast differentiation, 第37回日本分子生物学会年会、2014年11月, 横浜

- ⑥ 友村明人, 長谷川紘也, 田村暢章, 須田直人, 友村美根子. 血清カルシウム降下因子カルデクリンはRANKLによる細胞膜ラフト画分のFynの活性化を抑制して破骨細胞の分化を抑制する. 第87回日本生化学会大会, 2014年10月, 京都
- ⑦ 友村美根子, 鈴木龍一郎, 渡部美緒, 白瀧義明, 坂上宏, 友村明人. リナカンチンCはRANKLによるTRAF6-TAK1複合体形成を阻害し、破骨細胞の分化を抑制する. 第87回日本生化学会大会, 2014年10月, 京都
- ⑧ Tomomura A, Tomomura M. Serum calcium-decreasing factor, caldecrin, suppresses osteoclastogenesis by regulation for the RANKL-mediated Src family kinase. 36th Annual Meeting The American Society for Bone and Mineral Research, 2014年9月, Houston, USA
- ⑨ Tomomura M, Suzuki R, Shirataki Y, Sakagami H, Tomomura A. Rhinacathin C inhibits RANKL-induced Osteoclast differentiation by suppressing MAPKs/NF-kB/NFATc1 pathways through preventing TRAF6- TAK1 formation. 36th Annual Meeting The American Society for Bone and Mineral Research, 2014年9月, Houston, USA
- ⑩ Tomomura A, Hasegawa H, Suda N, Sakagami H, Tomomura M. Serum Calcium-decreasing Factor, Caldecrin,

Inhibits RANKL- mediated Ca²⁺ Signaling and Actin Ring Formation in Mature Osteoclasts via Suppression of the Src Signaling Pathway. 35th Annual Meeting The American Society for Bone and Mineral Research, 2013 年 10 月, Minneapolis, USA

- ⑪ 友村明人, 坂上宏, 友村美根子. 血清カルシウム降下因子カルデクリンは RANKL による Src family kinase を介する破骨細胞の分化を抑制する. 第 86 回日本生化学会大会, 2013 年 9 月, 横浜

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

(1) 研究代表者

友村 美根子 (Tomomura, Mineko)

明海大学・歯学部・准教授

研究者番号 : 30217559

(2) 研究分担者

白瀧 義明 (Shirataki, Yoshiaki)

城西大学・薬学部・教授

研究者番号 : 60077980

(3) 研究分担者

鈴木 龍一郎 (Suzuki Ryuichiro)

城西大学・薬学部・助教

研究者番号 : 20415201