

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：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670906

研究課題名(和文)骨吸収抑制効果を持つポリフェノールの画期的な同定システムの開発と応用

研究課題名(英文)Development of detection systems for polyphenols that inhibit osteoclast formation and its applications

研究代表者

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：30264055

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文):骨の分解を行う破骨細胞の成熟過程には、ヘムオキシゲナーゼ1(HO-1)の発現減少が必須である。そのためにHO-1を発現誘導する抗酸化物を投与すると、破骨細胞の成熟・活性化を抑制できる事が考えられる。効率的にHO-1を誘導できる抗酸化物として、食物に含まれるポリフェノールが知られているが、未同定の物質が多く残されている。本研究では、破骨細胞を抑制できるポリフェノールを迅速かつ簡便に検出できるシステムを構築した。今後は同定されたポリフェノールに関して、骨吸収抑制メカニズムをさらに詳細に解明する。これらの結果を応用して、骨吸収を抑制するサプリメントや天然で副作用の少ない薬物の開発を試みる。

研究成果の概要(英文):Control of decreased expression levels of hemeoxygenase-1 (HO-1) is essential for the development of osteoclast formation. Addition of oxidants inducing HO-1 is thought to inhibit the osteoclast formation. One of the candidates is polyphenols in foods. However, numerous polyphenols remain to be identified. In this study, we constructed rapid and simple systems for detecting polyphenols that inhibit osteoclast formation. By the methods, we will analyze the identified polyphenols. Consequently, the drugs or supplements that prevent bone absorption by osteoclasts will be developed in future.

研究分野: 歯科薬理学

キーワード: 破骨細胞 ポリフェノール

1. 研究開始当初の背景

骨は造骨を担う骨芽細胞と溶骨を担う破骨細胞のバランスで成り立っている。このバランスの崩れが、骨代謝疾患である。代表的骨代謝疾患である骨粗鬆症は、現在の日本では高齢者の人口増加に伴い、急増している。厚生労働省の調査では、国内の骨粗鬆症患者は推計で 1100 万人を超すと推定されている。骨粗鬆症の予防や治療には、破骨細胞の成熟化・活性化を抑制するのが最も効率的である。

我々は独自の研究で、破骨細胞の成熟過程でヘムオキシゲナーゼ 1 (HO-1) の発現減少が必須であることを見出した。つまり、HO-1 発現誘導できる抗酸化物を投与すると、破骨細胞の成熟・活性化を抑制できると考えられる。事実、HO-1 を発現誘導できる抗酸化物質は、破骨細胞分化抑制できた。具体的には、ポリフェノールであるクルクミン、カウエオール、フィセチン、抗酸化薬物のデルタメトリン、酸化防止剤のブチルヒドロキノン は、すべて HO-1 の発現を増大する抗酸化物であり、破骨細胞形成の阻害作用が認められた。

2. 研究の目的

骨の分解を行う破骨細胞の成熟過程には、HO-1 の発現減少が必須であることを我々は見出した。すなわち、HO-1 を発現誘導する抗酸化物を投与すると、破骨細胞の成熟・活性化を抑制できる事が考えられる。効率的に HO-1 を誘導できる抗酸化物として、食物に含まれるポリフェノールが知られているが、未同定の物質が多く残されている。本研究では、破骨細胞を抑制できるポリフェノールを迅速かつ簡便に検出できるシステムを構築した。同定されたポリフェノールに関して、骨吸収抑制メカニズムをさらに詳細に解明する予定である。これらの結果を応用して、骨吸収を抑制するサプリメントや天然で副作用の少ない薬物の開発を試みる。

3. 研究の方法

まず、HO-1 のプロモーター領域を含む HO-1 遺伝子に蛍光タンパク質の GFP を融合させたハイブリッド遺伝子をプラスミドとして構築した。これを RAW-D 細胞に発現させ、RANKL 刺激を行い、破骨細胞に分化させた。この細胞に各種ポリフェノールを 0、5、50 μ M ずつ加えて培養した。蛍光プレートリーダーにて“光る”細胞とそのポリフェノールを同定した。

4. 研究成果

(1) 蛍光プラスミドの構築

マウス由来 HO-1 遺伝子のプロモーター領域を含む HO-1 遺伝子に蛍光タンパク質の GFP を融合させたハイブリッド遺伝子プラスミドとして構築した。HO-1 のプロモーターには、抗酸化剤応答配列が存在している。この領域

は酸化ストレスが起こると誘導される転写因子 NF-E2-related factor 2 (Nrf2) がこの部位に直接結合して HO-1 遺伝子の発現を調節している。すなわち、HO-1 は酸化ストレスが起きると誘導されてくる。誘導された HO-1 遺伝子の C 末端に発光タンパク質である GFP を融合させた遺伝子として構築すれば、HO-1 遺伝子が誘導されれば、発光する HO-1 タンパク質として産生されると考えた。

(2) プラスミド発現破骨細胞の樹立

これをマウス・マクロファージ由来の RAW-D 細胞に発現させた。この細胞に破骨細胞分化に必要な不可欠なサイトカインである RANKL および M-CSF による刺激を行い、破骨細胞に分化させた。

(3) 蛍光プレートリーダーにて“光る”細胞の検出

HO-1 誘導効果により、GFP により緑色蛍光を発するため、“光る細胞として”が同定できた。光る細胞を蛍光プレートリーダーで発現レベルを検出したところ、予想よりも弱い光しか発光しないことが分かった。GFP の発光強度は酸化還元条件に依存されるため、予想よりも弱い光になったと推定されている。そこで GFP よりも発光度が高い 3 XEGFP を融合させたハイブリッド遺伝子をプラスミドとして構築する実験を行った。現在この細胞に関して詳細な解析を行っている。この細胞が充分は発光強度が得られた場合には、フラボノイド系 42 種 (カテキン 7 種、アントシアニン 8 種、タンニン 10 種、ルチン 9 種、イソフラボン 8 種)、クロロゲン酸系 14 種、フェニルカルボン酸系 10 種、エラグ酸系 12 種、リグナン系 6 種、クルクミン系 8 種、クマリン系 8 種に関して解析を行う予定である。

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 11 件)

1. Kadowaki T, Kido MA, Hatakeyama J, Okamoto K, Tsukuba T, Yamamoto K.: Defective adipose tissue development associated with hepatomegaly in cathepsin E-deficient mice fed a high-fat diet. *Biochem Biophys Res Commun Mar*; 446(1):212-217, 2014 査読有
2. 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. *J Appl Toxicol Jan*; 34(1):49-56, 2014 査読有

3. Kawakubo T, Yasukochi A, Toyama T, Takahashi S, Okamoto K, Tsukuba T, Nakamura S, Ozaki Y, Nishigaki K, Yamashita H, Yamamoto K.: Repression of cathepsin E expression increases the risk of mammary carcinogenesis and links to poor prognosis in breast cancer. *Carcinogenesis* 35(3):714-726, 2014 査読有
4. Iwatake M, Okamoto K, Tanaka T, Tsukuba T.: Castalagin exerts inhibitory effects on osteoclastogenesis through blocking a broad range of signaling pathways with low cytotoxicity. *Phytother Res.* 29(6):917-924, 2015 査読有
5. 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.* 5:9620, 2015 査読有
6. Yashima Y, Okamoto K, Sakai E, Iwatake M, Fukuma Y, Nishishita K, Tsukuba T.: Cobalt protoporphyrin represses osteoclastogenesis through blocking multiple signaling pathways. *Biometals.* 28(4):725-732, 2015 査読有
7. Iwatake M, Okamoto K, Tanaka T, Tsukuba T.: Punicalagin attenuates osteoclast differentiation by impairing NFATc1 expression and blocking Akt- and JNK-dependent pathways. *Mol Cell Biochem.* 407(1-2):161-172, 2015 査読有
8. 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.* 41(4):222-231, 2015 査読有
9. 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.* 29(11):1714-1721, 2015 査読有
10. 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.* 231, 1321-1333, 2016 査読有
11. Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe

A,-- Tsukuba T -- Zughairer SM *et al.* :Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy* 12, 1-222, 2016 査読有

〔学会発表〕(計 19 件)

1. 岩竹真弓, 岡元邦彰, 筑波隆幸: 破骨細胞における細胞骨格を制御するタンパク質の同定と機能の解明, 第 19 回日本病態プロテアーゼ学会, 千里ライフサイエンスセンター(大阪府、豊中市), 2014 年 8 月 5~6 日
2. 財津有末, 岩竹真弓, 坂井詠子, 岡元邦彰, 佐藤啓子, 中山浩次, 筑波隆幸: 歯周病細菌によるヒト肝細胞株への細胞侵入と脂肪滴形成への影響, 第 19 回日本病態プロテアーゼ学会, 千里ライフサイエンスセンター(大阪府、豊中市), 2014 年 8 月 5~6 日
3. 八島由佳, 岡元邦彰, 坂井詠子, 西下一久, 筑波隆幸: コバルトプロトポルフィリンの破骨細胞分化および活性化に対する影響 Effects of cobalt protoporphyrin on osteoclastogenesis, 第 56 回歯科基礎医学会学術大会, 福岡国際会議場(福岡県、福岡市), 2014 年 9 月 25~27 日
4. 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 Oxidative stress and osteoclastogenesis in Nrf2-deficient mice, 第 56 回歯科基礎医学会学術大会, 福岡国際会議場(福岡県、福岡市), 2014 年 9 月 25~27 日
5. 岩竹真弓, 坂井詠子, 西下一久, 岡元邦彰, 筑波隆幸: 破骨細胞の分化抑制に関するエラジタンニン類の作用メカニズムの解明 Clarification of inhibitory mechanisms of ellagitannins in osteoclastogenesis, 第 56 回歯科基礎医学会学術大会, 福岡国際会議場(福岡県、福岡市), 2014 年 9 月 25~27 日
6. 岩竹真弓, 岡元邦彰, 筑波隆幸: 破骨細胞におけるポドソームの形成に関与するタンパク質の同定とその機能解析 Identification and functional analysis of a protein regulating podosomal formation in osteoclasts, 第 56 回歯科基礎医学会学術大会, 福岡国際会議場(福岡県、福岡市), 2014 年 9 月 25~27 日
7. 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 Identification of a rab protein regulating multinucleation and lysosomal function in osteoclasts, 第 56 回歯科基礎医学会学術大会, 福岡国際会議場(福岡県、福岡

- 市), 2014年9月25~27日
8. 菅原めぐみ, 坂井詠子, 福間裕, 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合同大会, 京都国際会館(京都府、京都市), 2014年10月15~18日
 9. 坂井詠子, 山口優, 福間裕, 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 Oxidative stress and bone metabolism in Nrf2-deficient mice 第87回日本生化学会大会合同大会, 京都国際会館(京都府、京都市), 2014年10月15~18日
 10. 岩竹真弓, 岡元邦彰, 筑波隆幸: 破骨細胞における膜動態と細胞骨格制御に関するタンパク質の解析 Functional analysis of a protein regulating membrane dynamics and cytoskeleton in osteoclasts 第87回日本生化学会大会合同大会, 京都国際会館(京都府、京都市), 2014年10月15~18日
 11. Yoneshima E, Okamoto K, Wang X, Sakai E, Nishishita K, Yoshida N, Tsukuba T: Role of transcription factor EB (TFEB) in BMP-induced osteoblastogenesis. 第88回日本薬理学会, 名古屋国際会議場(愛知県、名古屋市), 2015年3月18~20日
 12. Okamoto K, Uchino K, Yoneshima E, Sakai E, Nishishita K, Tsukuba T: Effects of liquiritigenin on differentiation of bone cells. 第88回日本薬理学会, 名古屋国際会議場(愛知県、名古屋市), 2015年3月18~20日
 13. 山下健太郎, 岩竹真弓, 岡元邦彰, 山田慎一, 梅田正博, 筑波隆幸: 口腔扁平上皮癌におけるカテプシン K の浸潤突起形成での役割 第20回日本病態プロテアーゼ学会学術集会, ANA クラウンプラザホテルグランコート名古屋(愛知県、名古屋市), 2015年8月21~22日
 14. 筑波隆幸: 骨系細胞におけるリソソームの新しい機能, サテライトシンポジウム「内膜系オルガネラの形成・輸送機構」, 第57回歯科基礎医学会, 朱鷺メッセ(新潟県、新潟市), 2015年9月11日~13日
 15. 福間裕, 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 Cafestol has a weaker inhibitory effect on osteoclastogenesis than kahweol and promotes osteoblast maturation. 第57回歯科基礎医学会, 朱鷺メッセ(新潟県、新潟市), 2015年9月11日~13日
 16. 坂井詠子, 福間裕, 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 The role of Keap1/Nrf2 axis in the differentiation of osteoclast. 第57回歯科基礎医学会, 朱鷺メッセ(新潟県、新潟市), 2015年9月11日~13日

17. 岩竹真弓, 岡元邦彰, 筑波隆幸: 骨吸収におけるリソソーム小胞輸送に関するタンパク質の同定とその機能解析 Identification and analysis of a protein regulating vesicle trafficking of lysosomes in osteoclasts. 第57回歯科基礎医学会, 朱鷺メッセ(新潟県、新潟市), 2015年9月11日~13日
18. 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, 福岡国際会議場(福岡県、福岡市), 2015年11月18~20日
19. 坂井詠子, 福間裕, 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 The roles of Keap1/Nrf2 axis in the differentiation of osteoclasts and osteoblasts. 第88回日本生化学会大会, 神戸ポートアイランド・神戸国際会議場(兵庫県、神戸市), 2015年12月1~4日

〔その他〕

ホームページ等

http://www.de.nagasaki-u.ac.jp/education/dept_op.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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: 30264055

(2) 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: 10311846

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