

平成 30 年 5 月 28 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(B) (海外学術調査)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H05298

研究課題名(和文) 中国に潜在する天然薬物の調査による新しい骨代謝治療薬の発掘

研究課題名(英文) Examination of new medicine for bone metabolism by investigation of potential natural drugs in China

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) 12,300,000円

研究成果の概要(和文)：骨粗鬆症は高齢者の人口増加に伴い、日本での患者数は急増している。現在使用されている骨粗鬆症治療薬のビスフォスフォネートは顎骨壊死などの副作用が非常に強いため、毒性の少ない薬物の開発が急務である。本研究の目的は、天然物の宝庫であり長寿村として知られている中国・吉林省の天然薬物から、毒性の少ない骨代謝治療薬を発掘することである。種々の解析の結果、Rutaecarpine と Dihydroartemisinin が毒性が少なく、強い破骨細胞抑制効果を持つことが明らかとなった。さらにその詳細な分子メカニズムについても解析した。

研究成果の概要(英文)：Osteoporosis is accompanied by an increase in the population of elderly people, the number of patients in Japan has been rapidly increasing. Since bisphosphonates, currently used osteoporosis drugs, have extremely strong side effects such as necrosis of the jaw, development of drugs with low toxicity is urgent. The purpose of this research is to find bone metabolism drugs with less toxicity from natural medicines in China and Jilin Province, which is a treasure house of natural products and is known as a longevity village. As a result of various analyzes, it was revealed that Rutaecarpine and Dihydroartemisinin are less toxic and have strong osteoclast inhibitory effects. Furthermore, the detailed molecular mechanisms were also analyzed.

研究分野：歯科薬理学

キーワード：天然薬物 骨代謝治療薬

1. 研究開始当初の背景

(1) 現在の骨粗鬆症治療薬は副作用が強い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。現在使用されている骨粗鬆症治療薬のビスフォスフォネートは顎骨壊死などの副作用がとて強い。他にもエストロゲン製剤、活性型ビタミンD製剤などがあるが、いずれもホルモン製剤であるため、副作用の懸念があり、骨粗鬆症治療薬として評価は高いものではない。そのため、副作用が比較的少ない天然物由来の予防薬・治療薬の探索が急務である。

(2) 現在使用している天然物由来の骨粗鬆症治療薬の有用性と欠点

副作用が少ない骨粗鬆症治療薬として、ビタミンK2製剤(一般名:メナテレン)がある。納豆などに含まれる成分であり、骨の形成を補助する薬物として使用される。しかし、血液凝固阻害薬であるワーファリンを服用している場合には用いることができないという欠点がある。従って、単なる補助薬として使用されるに留まっている。

(3) 我々は或るポリフェノールに強力な破骨細胞抑制活性を有することを発見

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、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

骨粗鬆症は高齢者の人口増加に伴い、日本での患者数は急増している。現在使用されている骨粗鬆症治療薬のビスフォスフォネートは顎骨壊死などの副作用が非常に強い、毒性の少ない薬物の開発が急務である。本研究の目的は、天然物の宝庫であり長寿村として知られている中国・吉林省の長白山区で未知の天然薬物から、毒性の少ない骨代謝治療薬を発掘することである。本研究の目指す骨粗鬆症薬は、抗肥満防止作用も同時に期待できるものであり、生活習慣病としても効果がある。我々の研究室では、中国・吉林大学と人的交流があり、共同研究が可能である。さらに、これまで様々なポリフェノールから骨代謝治療薬の候補物質を報告してきた実績がある。本提案は歯科領域で天然薬物の調査として海外研究で初めてという特徴がある。

3. 研究の方法

本研究の目的は、天然物の宝庫であり長寿村として知られている中国・吉林省の長白山区で未知の天然薬物から、毒性の少ない骨代謝治療薬を発掘することである。そのため、現地調査の内容と薬物の選定を行った。具体的には、民族が利用する生薬市場の調査、長白山区での伝承薬の聞き取り調査および薬用植物の採取、開業医に対する聞き取り調査を実施し、有効な薬物を入手する。その後、原料生薬の抽出と薬理的解析を実施する。薬理的解析は、破骨細胞抑制活性測定および骨芽細胞増殖活性測定を実行する。最終的にはマウス個体レベルでの骨代謝治療効果を判定する。

4. 研究成果

胡錦萍氏(当時 当教室客員研究員)が2015年4~5月にかけて中国・吉林省の長春および述吉を訪問した。長春では吉林大学の陳霞教授(基礎医学院、薬理学)、徐雅娟教授(医中薬研究院、漢方薬)のご協力により、研究打ち合わせと系統的な現地調査を行った。また述吉や長白山では採取する薬物に関して調査した。解析した薬物は、これまで解析が進んでいない植物種を中心に調査・採取を行った。しかし、名古屋議定書の発行が始まり、他国の生物資源を自国に持ち込むことが困難になった。そのため、日本に薬物を持ち帰ることを断念し、薬物の抽出と同定は吉林大学で行うこととし、同定された情報を基に日本で薬物の薬理的解析を行うこととなった。現在まで同定された薬物は45種類にも上る。これは今後さらに増加する予定である。未だ解析中の薬物が多いが、既に解析を終了した以下の2種類に関して報告する。

(1) Rutaecarpineの破骨細胞抑制効果

Rutaecarpineはミカン科ゴシュユとその近縁種に含まれるアルカロイドの1種であり、抗がん作用、抗炎症作用、抗酸化作用などの薬理作用を持つことが知られている。しかし骨系細胞への影響は不明であった。破骨細胞抑制効果についてTRAP染色法を用いて解析した(図1)。

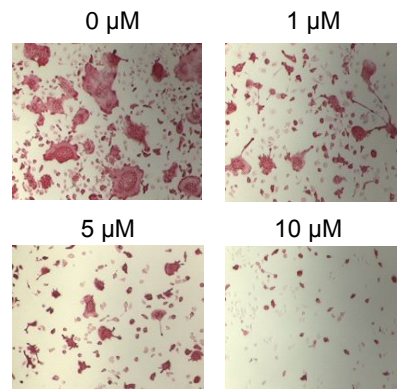


図1: TRAP染色によるRutaecarpineの効果

Rutaecarpine は濃度依存的に破骨細胞分化を抑制していた。しかし、細胞毒性は殆ど認められなかった。次に破骨細胞分化に関与する6つの分化経路 (NF- κ B, Akt, JNK, Erk, p38-MAPK, NFATc1) への影響を解析した。

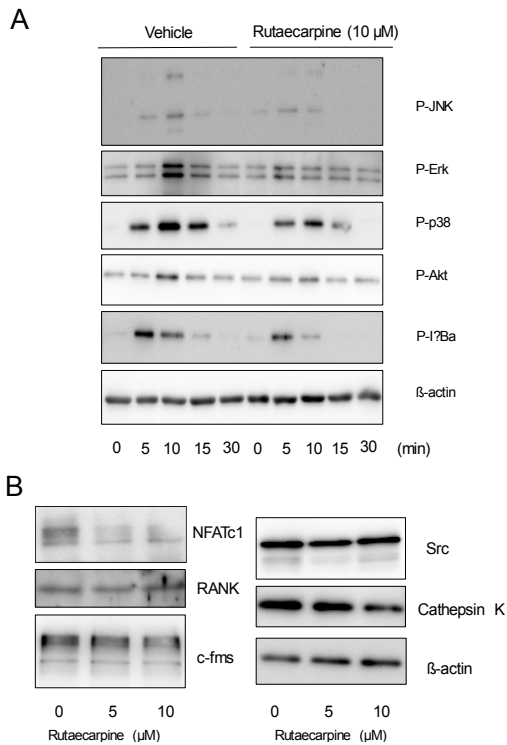


図2 : Rutaecarpine の分化シグナルへの効果

抑制効果は6つの分化経路の中で NFATc1 が最も抑制されている事が明らかとなった。以上の結果から、Rutaecarpine は毒性が少なく破骨細胞抑制効果がある薬物であることが明らかとなった。今後は更に骨芽細胞増殖活性測定を実行し、マウス個体レベルでの骨代謝治療効果を判定する予定である。

(2) Dihydroartemisinin の破骨細胞抑制効果

Artemisinin はヨモギ属の植物に多く含まれる成分であり、毒性が少なく抗マラリア効果がある。Artemisinin の抽出は不安定だったので、水溶性を高めた Dihydroartemisinin について破骨細胞抑制効果について TRAP 染色法を用いて解析した (図3)。

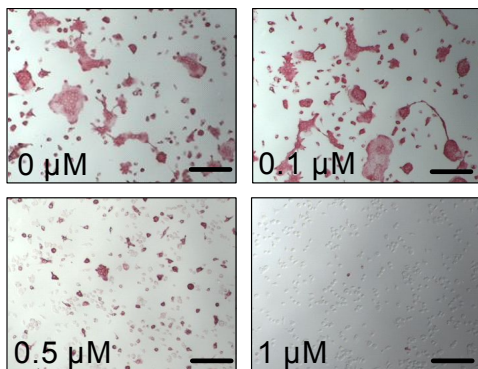


図3 : TRAP 染色による Dihydroartemisinin

の効果

Dihydroartemisinin も濃度依存的に破骨細胞分化を抑制していた。細胞毒性は殆ど認められなかった。

次に主要な6つの破骨細胞分化シグナルに関して解析したところ、NFATc1 抑制と I κ B のシグナル系を抑制した (図4)。

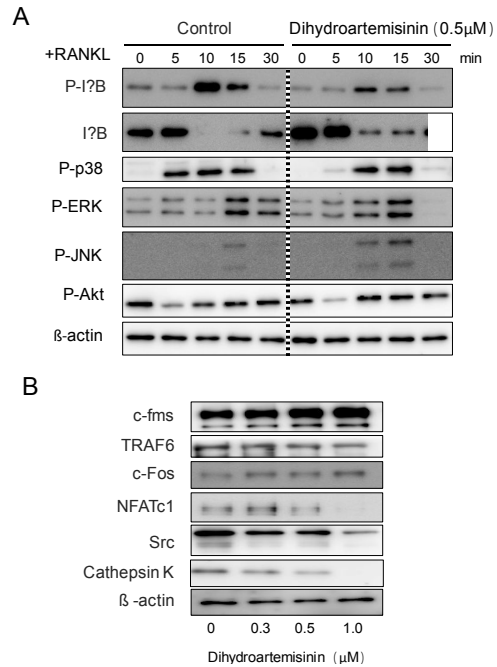


図4 : Dihydroartemisinin の分化シグナルへの効果

以上の結果から、Dihydroartemisinin は毒性が少なく破骨細胞抑制効果がある薬物であることが分かった。今後は更に骨芽細胞増殖活性測定を行い、マウス個体レベルでの骨代謝治療効果を判定する予定である。

本研究を遂行するために吉林大学の陳霞教授と徐雅娟教授にご協力いただいた。さらに Rutaecarpine と Dihydroartemisinin の薬理学効果の解析には福間裕氏 (長崎大学・技術専門職員) と小巻俊介氏 (長崎大学・歯学部・卒業生) に行っていただいた。以上の方々に深く感謝いたします。

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21件)

1. Yamaguchi Y, Sakai E, Okamoto K, Kajiya H, Okabe K, Naito M, Kadowaki T, Tsukuba T: Rab44, a novel large Rab GTPase, negatively regulates osteoclast differentiation by modulating intracellular calcium levels followed by NFATc1 activation. *Cell Mol. Life Sci.* 75(1):33-48 2018 査読有

2. Sakamoto H, Yamashita K, Okamoto K,

- Kadowaki T, Sakai E, Umeda M, Tsukuba T.: Transcription factor EB influences invasion and migration in oral squamous cell carcinomas. **Oral Dis**. 印刷中 2018 査読有
3. Takii R, Kadowaki T, Tsukuba T, Yamamoto K.: Inhibition of gingipains prevents *Porphyromonas gingivalis*-induced preterm birth and fetal death in pregnant mice. **Eur J Pharmacol**. 824:48-56 2018. 査読有
4. Fukuma Y, Sakai E, Komaki S, Nishishita K, Okamoto K, Tsukuba T.: Rutaecarpine attenuates osteoclastogenesis by impairing M-CSF and RANKL-stimulated signaling pathways. **Clin Exp Pharmacol Physiol**. 印刷中 2018 査読有
5. Narahara H, Sakai E, Yamaguchi Y, Narahara S, Iwatake M, Okamoto K, Yoshida N, Tsukuba T: Actin binding LIM1 (abLIM1) negatively controls osteoclastogenesis by regulating cell migration and fusion. **J Cell Physiol**. 印刷中 2018 査読有
6. Komaki S, Sakai E, Fukuma Y, Nishishita K, Okamoto K, Tsukuba T: Dihydroartemisinin represses osteoclastogenesis of bone marrow macrophages through reduced NFATc1 expression and impaired phosphorylation of I B . **Biomed Res** 印刷中 2018 査読有
7. Yamashita K, Iwatake M, Okamoto K, Yamada SI, Umeda M, Tsukuba T.: Cathepsin K modulates invasion, migration and adhesion of oral squamous cell carcinomas in vitro. **Oral Dis**. 23(4): 518-525, 2017. 査読有
8. Inamitsu H, Okamoto K, Sakai E, Nishishita K, Murata H, Tsukuba T.: The dental resin monomers HEMA and TEGDMA have inhibitory effects on osteoclast differentiation with low cytotoxicity. **J Appl Toxicol**. 37(7): 817-824 2017. 査読有
9. Sakai E, Morita M, Ohuchi M, Kido MA, Fukuma Y, Nishishita K, Okamoto K, Itoh K, Yamamoto M, Tsukuba T. Effects of deficiency of Kelch-like ECH-associated protein 1 on skeletal organization: a mechanism for diminished nuclear factor of activated T cells cytoplasmic 1 during osteoclastogenesis. **FASEB J**. 31(9):4011-4022 2017. 査読有
10. Iwatake M, Nishishita K, Okamoto K, Tsukuba T.: The Rho-specific guanine nucleotide exchange factor Plekhg5 modulates cell polarity, adhesion, migration, and podosome organization in macrophages and osteoclasts. **Exp Cell Res**. 359(2):415-430 2017. 査読有
11. Tsukuba T, Sakai E, Nishishita K, Kadowaki T, Okamoto K: New functions of lysosomes in bone cells **J Oral Biosci** 59, 92-95 2017. 査読有
12. 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(6): 1321-33, 2016 査読有
13. Zaitu Y, Iwatake M, Sato K, Tsukuba T: Lipid droplets affect elimination of *Porphyromonas gingivalis* in HepG2 cells by altering the autophagy-lysosome system. **Microbes Infect**. 18(9): 565-71, 2016 査読有
14. 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- B ligand-induced osteoclastogenesis and bone resorption in vitro and prevents tumor necrosis factor- induced osteoclast formation in vivo. **Phytomedicine** 23(8): 828-37, 2016 査読有
15. Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A, Abedin MJ,--- Tsukuba T (2005 番目),--- Zorzano A, Zughaier SM (他 2325 名) : Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). **Autophagy**. 12(1):1-222, 2016 査読有
16. 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
17. 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
18. 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
19. 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
20. 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
21. 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

〔学会発表〕(計 28 件)

1. 山口優, 坂井詠子, 岡元邦彰, 鍛冶屋浩, 岡部幸司, 門脇知子, 筑波隆幸: 新規高分子量 G タンパク質 Rab44 は Ca²⁺流入及び NFATc1 経路を介して破骨細胞分化を負に制御する 第90回日本生化学会大会, 神戸, 12月, 2017
2. 坂元裕, 山下健太郎, 岡元邦彰, 門脇知子, 梅田正博, 筑波隆幸: 扁平上皮癌細胞の増殖能・浸潤能・転移能における転写因子 TFEB の役割 第90回日本生化学会大会, 神戸, 12月, 2017
3. 坂井詠子, 福間裕, 西下一久, 岡元邦彰, 筑波隆幸: Keap1 遺伝子欠損は Nrf2 の活性化を介して破骨細胞分化を抑制する 第90回日本生化学会大会, 神戸, 12月, 2017
4. 榎原峻, 坂井詠子, 山口優, 榎原春菜, 門脇知子, 岡元邦彰, 朝比奈泉, 筑波隆幸: 破骨細胞分化を負に制御する新規 Kelch タンパク質の同定と機能解析 第90回日本生化学会大会, 神戸, 12月, 2017
5. 岡元邦彰, 坂井詠子, 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 メタルバイオサイエンス研究会 2017, 岡山, 10月, 2017
6. 坂井詠子, 岡元邦彰, 筑波隆幸: ヘムオキシゲナーゼ 1 の発現抑制はカスパーゼ 3 の活性化、HMGB1 の細胞外遊離と破骨細胞分化に必要である (シンポジウム) 第59回日本歯科基礎医学会, 松本, 9月, 2017
7. 山口優, 坂井詠子, 岡元邦彰, 鍛冶屋浩, 岡部幸司, 門脇知子, 筑波隆幸: 破骨細胞分化を制御する新規 Rab タンパク質の同定と機能解析 第59回日本歯科基礎医学会, 松本, 9月, 2017
8. 坂井詠子, 福間裕, 西下一久, 岡元邦彰, 筑波隆幸: Keap1 遺伝子欠損は Irf8 と MafB の発現上昇を介して破骨細胞分化を抑制する 第59回日本歯科基礎医学会, 松本, 9月, 2017
9. 榎原春菜, 坂井詠子, 岡元邦彰, 吉田教明, 筑波隆幸: Actin-Binding LIM protein 1 は破骨細胞における細胞骨格形成と細胞機能を制御する 第59回日本歯科基礎医学会, 松本, 9月, 2017
10. 山口優, 坂井詠子, 岡元邦彰, 門脇知子, 筑波隆幸: 破骨細胞分化を制御する新規 Rab タンパク質の同定と解析 第22回日本病態プロテアーゼ学会学術集会, 大阪, 8月,

2017

11. 筑波隆幸: エンドソーム・リソソーム機能と骨細胞 (シンポジウム) 第90回日本薬理学会年会, 長崎, 3月, 2017
12. 坂井詠子, 福間裕, 西下一久, 岡元邦彰, 筑波隆幸: Keap1 遺伝子欠損は in vivo および in vitro において骨の細胞分化を抑制する 第90回日本薬理学会年会, 長崎, 3月, 2017
13. 福間裕, 坂井詠子, 小巻俊介, 西下一久, 岡元邦彰, 筑波隆幸: Rutaecarpine の破骨細胞分化抑制効果 第90回日本薬理学会年会, 長崎, 3月, 2017
14. 山下健太郎, 岩竹真弓, 山田慎一, 岡元邦彰, 梅田正博, 筑波隆幸: カテプシン K は口腔扁平上皮癌の転移、遊走、接着を制御する 第90回日本薬理学会年会, 長崎, 3月, 2017
15. 稲光宏之, 岡元邦彰, 坂井詠子, 西下一久, 村田比呂司, 筑波隆幸: 歯科レジモノマー-HEMA 及び TEGDMA は低い細胞毒性で破骨細胞抑制活性を持つ 第90回日本薬理学会年会, 長崎, 3月, 2017
16. 小巻俊介, 坂井詠子, 福間裕, 西下一久, 岡元邦彰, 筑波隆幸: Dihydroartemisinin の破骨細胞分化抑制効果 第90回日本薬理学会年会, 長崎, 3月, 2017
17. 坂井詠子, 山口優, 福間裕, 西下一久, 岡元邦彰, 筑波隆幸: tert-Butylhydroquinone による Irf8 と MafB の発現増加を介した破骨細胞分化抑制機構 第89回日本生化学会大会, 仙台, 9月, 2016
18. 岡元邦彰, 坂井詠子, 西下一久, 筑波隆幸: 骨芽細胞分化における転写因子 TFEB の関与 第58回日本歯科基礎医学会, 札幌, 8月, 2016
19. 坂井詠子, 福間裕, 西下一久, 岡元邦彰, 筑波隆幸: Keap1 遺伝子欠損は Irf8 の発現上昇を介して破骨細胞分化を抑制する 第58回日本歯科基礎医学会, 札幌, 8月, 2016
20. 岩竹真弓, 岡元邦彰, 筑波隆幸: 破骨細胞におけるリソソーム/エンドソームに關与するタンパク質の同定とその機能解析 第21回日本病態プロテアーゼ学会, 豊中市, 8月, 2016
21. 財津有未, 岩竹真弓, 佐藤啓子, 筑波隆幸: ヒト肝細胞内での脂肪滴はオートファジー リソソームシステムによる歯周病細菌排除に影響する 第21回日本病態プロテアーゼ学会, 豊中市, 8月, 2016
22. 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

23. 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 TFE3 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

24. 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

25. 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

26. 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

27. 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

28. 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

〔図書〕(計 1 件)

大谷啓一 監修、鈴木 邦明・戸苅 彰史・青木 和広・兼松 隆・筑波 隆幸 編 医歯薬出版、現代歯科薬理学(第 6 版)pp425 (p44-55, p159-163, p265-277) 2018

〔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)
岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号: 10311846

西下 一久 (NISHISHITA, Kazushisa)
長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・助教
研究者番号: 20237697

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

胡 錦萍 (Hu, Jin-Ping)
長崎大学・熱帯医学研究所・助教
研究者番号: 30420631