

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 5 月 22 日現在

機関番号：33602

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592378

研究課題名（和文） 抗癌剤アルクチゲニンの新しい骨吸収抑制機構の解明

研究課題名（英文） Elucidation of the novel inhibitory mechanism of anti-tumor drug arctigenin on bone resorption

研究代表者

山下 照仁（YAMASHITA TERUHITO）

松本歯科大学・総合歯科医学研究所・講師

研究者番号：90302893

研究成果の概要（和文）：抗癌作用を持つ漢方成分アルクチゲニンは、破骨細胞の分化と機能を抑制する新規天然化合物であることを見出した。RANKL シグナルによって誘導される破骨細胞分化において、アルクチゲニンは NFATc1 の転写機能の活性化を抑制した。本研究によって、これまで知られていた核移行の阻害による NFATc1 の機能抑制とは異なる、新しい NFATc1 転写活性化の制御機構が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Arctigenin, an anti-tumor compound, is a plant-derived natural molecule. We find that arctigenin inhibits osteoclast formation and function. In RANKL-induced osteoclastogenesis arctigenin markedly represses the transcriptional activity of NFATc1. Our results suggest that a novel mechanism of NFATc1 in its transcriptional regulation, that is different from a known inhibitory mechanism by which NFATc1 is retained in the cytosol.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：破骨細胞、骨吸収、天然有機化合物

1. 研究開始当初の背景

炎症や癌による骨破壊は骨粗鬆症と並んで重大な骨減少疾患である。これらの骨減少は破骨細胞の過剰な機能亢進による。骨吸収を抑制する化合物が臨床的にも使われているが、顎骨壊死を誘導するビスホスホネート製剤、感染抵抗性を低下させる TNF 抗体製剤、骨形成抑制も起こす免疫抑制剤サイクロスポリンなど、いずれも重篤な副作用とのバランスの上で使用されている。骨吸収特異的

に抑制しうる抗 RANKL 抗体などの生物製剤も上市されつつあるが非常に高価である。これら副作用などの点から、骨吸収に対し特異性の高い抑制効果を持つ安全性の高い化合物が求められている。

我々は、漢方由来成分のスクリーニングにおいて、抗癌作用を持つアルクチゲニンが破骨細胞の分化特に機能を抑制することを見出した。

2. 研究の目的

癌細胞の増殖抑制を指標にして同定された漢方薬由来の低分子化合物アルクチゲニンは、破骨細胞の分化や機能を抑制する新規化合物であることを見出した。本研究では、破骨細胞におけるアルクチゲニンの標的分子を同定し、骨吸収に対する抑制作用機序を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 破骨細胞前駆細胞を用いた細胞増殖と破骨細胞分化に対するアルクチゲニンの作用の解析

①マウス骨髄マクロファージの増殖をアラマブルーアッセイ法で定量した。②マウス骨髄マクロファージを M-CSF と RANKL で破骨細胞分化を誘導し、TRAP 染色によって多核破骨細胞の形成を定量化した。③マウス頭蓋冠由来骨芽細胞とマウス骨髄細胞の共存培養を活性型ビタミン D で破骨細胞分化を誘導し、TRAP 染色によって多核破骨細胞の形成を定量化した。

(2) 成熟破骨細胞を用いた骨吸収活性とアクチンリング形成に対するアルクチゲニンの作用の解析

コラーゲンコートしたディッシュ上でマウス頭蓋冠由来骨芽細胞とマウス骨髄細胞を活性型ビタミン D 存在下で共存培養し破骨細胞を調製した。調製した破骨細胞を象牙切片上で培養し①骨吸収窩の形成を定量化、②ローダミン結合ファロイジンでアクチン染色を行いリング形成を定量化した。

(3) RANKL が誘導する分化シグナルに対するアルクチゲニンの抑制作用の解析

①MAP キナーゼ経路に対する作用、NFκB 経路に対する作用、Akt 経路に対する作用を、それぞれ抗リン酸化抗体を用いたウェスタンブロット法で解析した。②破骨細胞マーカー遺伝子の発現を経時的に定量的 RT-PCR 法で定量した。

(4) NFATc1 シグナルにおけるアルクチゲニンの作用の解析

①骨髄マクロファージを用いた RANKL 誘導破骨細胞分化において経時的に抗 NFATc1 抗体で蛋白発現量をウェスタンブロット法で定量化した。②破骨細胞の細胞質画分と核画分を分離して、NFATc1 の核移行をウェスタンブロット法で定量化した。③クロマチン免疫沈降法で NFATc1 の DNA 標的部位への結合能を調べた。④骨髄マクロファージを用いたルシフェラーズアッセイ法で NFATc1 の転写活性を定量した。

(5) 動物を用いた骨吸収モデルにおけるアルクチゲニンの作用の解析

①卵巣摘出による閉経後骨吸収モデルにおける骨減少抑制効果②活性型ビタミン D を用いた急性骨吸収モデルにおける骨減少抑制効果それぞれを、小動物用マイクロ CT を用いて骨量の定量、血清カルシウム濃度の測定を行なって調べた。

(6) 炎症応答におけるアルクチゲニンの作用の解析

①骨髄マクロファージにおける LPS 応答性に対する作用をウェスタンブロット法を用いてシグナル蛋白のリン酸化を調べた。②T 細胞の活性化における抑制作用を脾臓由来細胞をイオノマイシンおよび TPA で刺激して T 細胞マーカー遺伝子の発現を定量的 RT-PCR 法で定量した。

4. 研究成果

(1) ①アルクチゲニン 10μM 存在下でも骨髄マクロファージは正常に増殖した (図 1)。②1μM のアルクチゲニンは骨髄マクロファージからの破骨細胞分化を強く抑制した。③共存培養による破骨細胞分化も同様に強く抑制した。以上より、アルクチゲニンは細胞毒性によらずに破骨細胞分化を抑制する新規化合物であることが明らかになった。

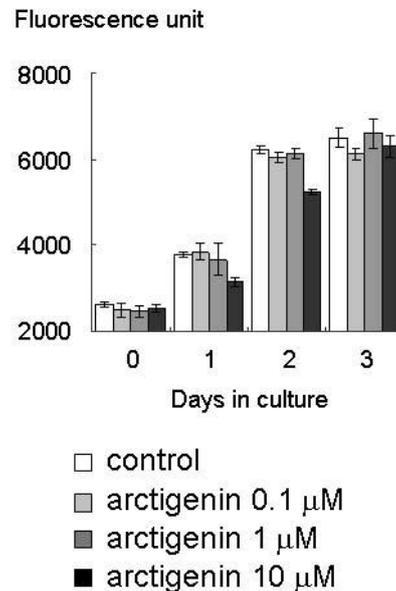


図1 骨髄マクロファージの増殖

(2) ①骨吸収窩の形成は 0.1μM のアルクチゲニンで有意に抑制された。②アクチンリング形成は 1μM のアルクチゲニン存在下でも維持されていた。以上より、アルクチゲニンはカルシトニンと異なり、アクチンリングの破壊を経ずに吸収機能を抑制することが示唆された。

(3) ①破骨細胞の分化・機能を抑制する濃

度でのアルクチゲニン は MAP キナーゼの p38、ERK、JNK いずれのリン酸化も抑制しなかった。また、NFκBp65 や IκB のリン酸化や、IκB の一時的な分解も抑制しなかった。生存や増殖に関わる Akt のリン酸化も正常であった。以上より、RANKL 刺激による初期の活性化経路に対するアルクチゲニンの影響は無いことが明らかとなった。②破骨細胞のマーカー遺伝子 TRAP、カテプシン K、カルシトニン受容体、OSCAR、DC-STAMP いずれもアルクチゲニンにより発現が抑制された。一方、Fos、RANK の発現には影響しなかった (図 2)。以上から、破骨細胞の分化マーカー遺伝子の発現はアルクチゲニンにより抑制されることが明らかとなった。

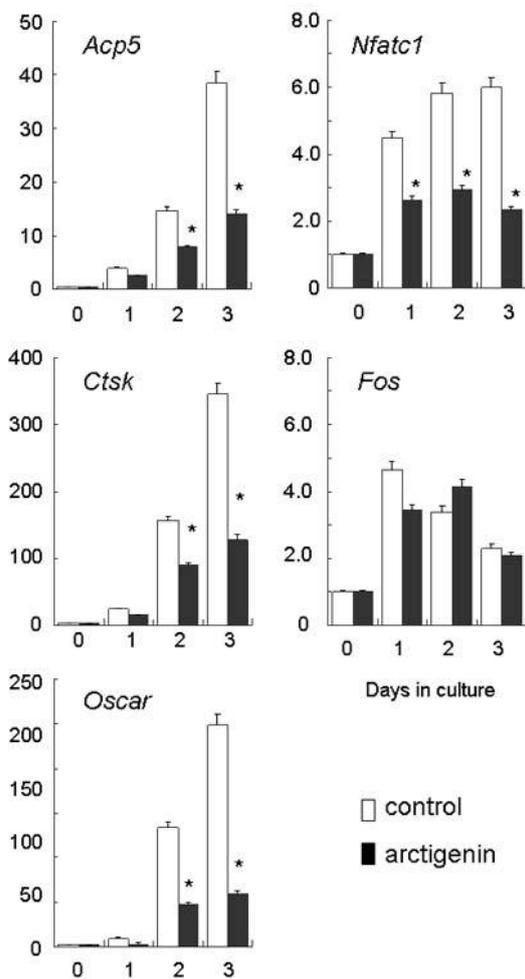
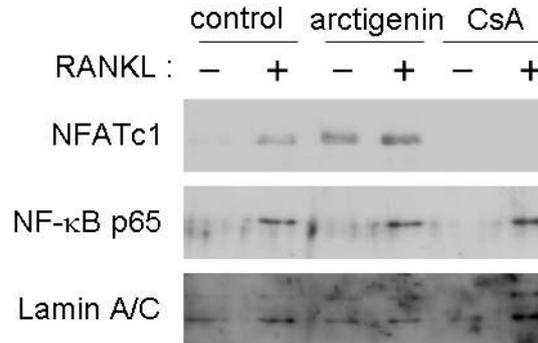


図2 破骨細胞マーカー遺伝子の発現

(4) ①破骨細胞分化における NFATc1 の発現はアルクチゲニン存在下でも見られるが、強い発現亢進が起こらなかった。②RANKL で誘導される NFATc1 の核移行はアルクチゲニン存在下でも観察されたが、アルクチゲニン単独処理でも NFATc1 は核に移行した (図 3)。③RANKL 刺激によって NFATc1 は

OSCAR のプロモータ領域に結合したが、アルクチゲニンの存在下では結合が見られなかった。④アルクチゲニンは NFAT レポータ活性の亢進を強く抑制した。以上より、アルクチゲニンは NFATc1 の核移行を促進するが、転写活性化機能を阻害することが分かった。



Nuclear extract

図3 NFATc1 の核移行

(5) ①卵巣摘出マウスに対し抗癌作用を示したアルクチゲニン 50ug/マウスの腹腔内投与を 4 週間行なったが骨量の減少を抑えることが出来なかった。②アルクチゲニン 1mg/マウスの投与は活性型ビタミンアナログ 2 日間投与による血清カルシウム濃度の亢進を抑制する傾向が見られたが、骨量の変化には差が無かった。以上より、骨量減少に対するアルクチゲニンによる抑制には in vitro から予想される濃度では効果的でないことが示唆された。

(6) ①骨髄マクロファージにおける LPS 応答性の MAP キナーゼの p38、ERK、JNK いずれのリン酸化もアルクチゲニンは抑制しなかった。②T 細胞の活性化による IL-12 や GM-CSF の遺伝子発現はアルクチゲニンによって抑制されなかった。以上より、アルクチゲニンの抑制作用の破骨細胞特異性が示唆された。

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 3 件)

- ①Nakayama T, Mizoguchi T, Uehara S, Yamashita T, Kawahara I, Kobayashi Y, Moriyama Y, Kurihara S, Sahara N, Ozawa H, Udagawa N, Takahashi N: Polarized osteoclasts put marks of tartrate-resistant acid phosphatase on dentin slices - A simple method for identifying polarized osteoclasts. Bone

49(6):1331-1339, 2011. (査読有)
doi:10.1016/j.bone.2011.09.045

②Koide M, Kinugawa S, Ninomiya T, Mizoguchi T, Yamashita T, Maeda K, Yasuda H, Kobayashi Y, Nakamura H, Takahashi N, Udagawa N: Diphenylhydantoin inhibits osteoclast differentiation and function through suppression of NFATc1 signaling. *Journal of Bone and Mineral Research* 24(8):1469-1480, 2009. (査読有)
doi:10.1359/jbmr.090302

③Mizoguchi T, Muto A, Udagawa N, Arai A, Yamashita T, Hosoya A, Ninomiya T, Nakamura H, Yamamoto Y, Kinugawa S, Nakamura M, Nakamichi Y, Kobayashi Y, Nagasawa S, Oda K, Tanaka H, Tagaya M, Penninger JM, Ito M, Takahashi N: Identification of cell cycle-arrested quiescent osteoclast precursors in vivo. *Journal of Cell Biology* 184(4):541-54, 2009. (査読有)
doi:10.1083/jcb.200806139

[学会発表] (計 2 件)

- ①山下照仁、漢方牛蒡子由来のアルクチゲニン
は破骨細胞の分化と機能を抑制する、日本
骨代謝学会、2010年7月21日、京王プ
ラザホテル (東京都)
- ②山下照仁、アルクチゲニンは NFATc1 の核
移行を促進するが転写活性を抑制する、日
本骨代謝学会、2011年7月30日、大阪国
際会議場 (大阪市)

[図書] (計 1 件)

- ①Udagawa N, Yamashita T, Kobayashi Y, Takahashi N: Identification of osteoclasts in culture. In *Embryonic Stem Cell Therapy for Osteo-Degenerative Diseases* (ed. by zur Nieden NI) Series Methods in Molecular Biology (series ed. by Walker JM) Humana Press, 690:273-284, 2011.
doi:10.1007/978-1-60761-962-8_18

[その他]

松本歯科大学総合歯科医学研究所ホーム
ページ
http://www.mdu.ac.jp/laboratory/top_05/index.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山下 照仁 (YAMASHITA TERUHITO)
松本歯科大学・総合歯科医学研究所・講師
研究者番号：90302893

(2) 研究分担者

高橋 直之 (TAKAHASHI NAOYUKI)
松本歯科大学・総合歯科医学研究所・教授
研究者番号：90119222

二宮 禎 (NINOMIYA TADASHI)
松本歯科大学・総合歯科医学研究所・講師
研究者番号：00360222