

真菌二次代謝産物である(+)-terrein がマウス骨髄由来マクロファージにおいて

**RANKL 誘導性破骨細胞分化に及ぼす影響と標的分子の解明**

岡山大学 大学院医歯薬学総合研究科 病態制御科学専攻

病態機構学講座 歯周病態学分野

中川 沙紀

**The Effects of Fungal Secondary Metabolite, (+)-Terrein, on RANKL-Induced Osteoclast**

**Differentiation and Target Molecule in Mouse Bone Marrow-Derived Macrophages**

Department of Pathophysiology-Periodontal Science,

Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences

Saki NAKAGAWA

(平成 29 年 12 月 15 日受付)

## 緒言

超高齢社会を迎えた我が国において、「高齢者の健康寿命の延伸」が国家的命題の一つである。「食べること」は高齢者の日常の楽しみの一つであり、栄養摂取だけでなく、人としての尊厳を維持する上での精神的健康維持に大きく寄与する<sup>1)</sup>。したがって、口腔機能を良好に維持することは、非常に重要である。近年、8020運動を代表とする口腔衛生に対する意識向上の結果、80歳で20本以上の自分の歯を有する高齢者の割合が50%を超えた<sup>2)</sup>。しかしその一方で、現在歯数の増加に伴い、歯周炎に罹患する高齢者数の増加が報告されている<sup>3)</sup>。そのため、歯周炎の治療は超高齢社会における喫緊の課題の一つでもある。

歯周炎は成年期から高齢期にかけて歯の喪失の主な原因となりうる国民病であり、糖尿病や関節リウマチなどの全身疾患の発症と進展に関与する<sup>4)</sup>。その病態は歯周病原細菌が感染することによって発症する感染性疾患であると同時に<sup>5)</sup>、マクロファージなどの免疫担当細胞や炎症サイトカインによる過剰な免疫反応によって、自己組織の破壊、すなわち歯周組織（歯槽骨を含む）の破壊が引き起こされる炎症性疾患でもある<sup>6)</sup>。本来、生体内では破骨細胞と骨芽細胞によって、骨リモデリングと呼ばれる骨の再構築が常に行われており、健康な状態では、骨吸収と骨形成は均衡が保たれている<sup>7, 8)</sup>。しかし、歯周炎が進行すると、炎症性サイトカインが破骨細胞活性化因子

の分泌を促進し、破骨細胞が過剰に形成される。その結果、骨リモデリングの均衡が崩れ、歯槽骨破壊が進行する<sup>9)</sup>。破骨細胞の分化調節機構において、receptor activator for NF- $\kappa$ B ligand (RANKL) 誘導性シグナル経路が主要な経路であり<sup>10-12)</sup>、これまでの研究で骨芽細胞が産生する RANKL とマクロファージコロニー刺激因子 (macrophage colony stimulating factor : M-CSF) が破骨細胞の分化に必須な因子であることが明らかにされている<sup>13)</sup>。さらに、RANKL 誘導性シグナル経路による破骨細胞の形成が、*in vitro* および *in vivo* で再現可能となったことで、破骨前駆細胞における主要な転写因子や細胞内シグナル因子が数多く明らかとなっている<sup>14)</sup>。その中でも、nuclear factor of activated T-cell cytoplasmic 1 (NFATc1) の発現が破骨細胞の分化に必要な不可欠なマスター転写因子であることが報告されている<sup>15,16)</sup>。以上のことから、歯周炎を制御するためには、NFATc1 をはじめとした破骨細胞の分化機能を制御する必要がある。

現行の歯周治療では、まず物理的／化学的な感染源の除去によって歯周組織の治癒を促すが、治癒経過は宿主の生体反応性に依存しているのが現状である。したがって、破骨細胞の機能制御などによって生体の炎症反応を効果的に制御する治療法を見出すことが、歯周病治療を発展させる上で求められている。現在、破骨細胞をターゲットにした骨吸収抑制薬として、ビスホスフォネート (bisphosphonate : BP) 製剤が骨

粗鬆症や悪性腫瘍に対して臨床応用されている。しかし、重篤な副作用として抜歯後の顎骨炎症に伴う薬剤関連性顎骨壊死（medicine-related osteonecrosis of the jaw : MRONJ）が挙げられる<sup>17)</sup>。そのため、生体安全性に優れた骨吸収抑制薬の開発が急務である。

(+)-terreinは近年、抗菌作用<sup>18)</sup>、癌細胞におけるangiogenin産生抑制による抗癌作用<sup>19)</sup>、メラニン産生抑制<sup>20)</sup>、植物成長抑制<sup>21)</sup>、そして歯髄細胞における抗炎症作用<sup>22)</sup>など、様々な生理的作用が報告されている物質である。1935年にRaistrickとSmithによって、真菌の一種である*Aspergills terreus*から二次代謝産物として分離された化合物であり<sup>23)</sup>、現在では同様の物質を有機化学的に合成する経路も確立されている<sup>24)</sup>。所属する研究室の先行知見として、有機化学的合成によって得られた(+)-terreinが歯肉線維芽細胞 (human gingival fibroblasts: HGFs) におけるインターロイキン6 (interleukin-6: IL-6) 誘導性の血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor : VEGF) およびM-CSFを抑制することを報告した<sup>25, 26)</sup>。IL-6は炎症反応、免疫応答反応、そして炎症性骨吸収促進作用をはじめとした、多様な生理的作用を有するサイトカインであり<sup>27)</sup>、慢性歯周炎患者の歯肉溝滲出液中には健常者と比較すると多量のIL-6が存在するなど、慢性歯周炎の病態と深い関連性が報告されている<sup>28)</sup>。(+)-terreinは抗IL-6作用を有する抗炎症薬として応用できる可能性が示唆されているだけでなく、破骨細胞分化に必須な

M-CSFを抑制することから、(+)-terreinが破骨細胞の分化や機能制御に影響を及ぼす可能性が示唆されるも、未だ詳細は不明である。

以上の背景から、本研究は、(+)-terrein の RANKL 誘導性破骨細胞分化に及ぼす影響を検討するとともに、破骨細胞分化最終転写因子 NFATc1 への影響を検討することによって、(+)-terrein の骨代謝に及ぼす作用効果と作用機序の解明を図った。

## 材料と方法

### 1. 試薬

(+)-terrein は, Mandai らの方法<sup>29)</sup>に従って L-酒石酸から合成したものを, リン酸緩衝生理食塩水 (phosphate buffer saline : PBS, pH 7.2, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) で希釈して 100 mM の濃度に調整して -80 °C 下で保存した。使用の際には, イーグル最小必須培地射α改変型培地 (minimum essential medium eagle, alpha modification : αMEM, Wako Pure Chemical Industries, Japan) で 10 μM に調整した。

破骨細胞分化因子 (receptor activator of NF-κB ligand : RANKL, Wako Pure Chemical Industries, Japan) は PBS で希釈し, 100 μg/mL の濃度に調整して -80 °C 下で保存した。

M-CSF はロイコプロール点滴静脈用 800 万単位 (Leukoprol, JCR Phamaceuticals Co., Ltd., Japan) を PBS で希釈し, 10 μg/mL の濃度に調整して -80 °C 下で保存した。

### 2. 細胞培養

細胞は, Tevlin らの方法<sup>30)</sup>に従って, 6 週齢のマウス (C57BL6/J, 日本クレア株式会社, 5 週齢, 雄) 大腿骨から骨髓を採取し, 24 時間培養した後, 浮遊細胞のみを分離・培養した。増殖した樹状様細胞をマウス骨髓由来マクロファージ様細胞 (bone

marraow-derived macrophage : BMMs) として用いた。本研究は、岡山大学動物実験委員会承認 (OKU-2016277) のもとで実験を行った。培養は、10%ウシ胎児血清 (fetal bovine serum : FBS, Thermo Fisher Scientific, Gibco, Canada) を含む Minimum Essential Eagle Alpha Modification (MEM $\alpha$  : Wako Pure Chemical, Japan) を用いて 37°C, 5%炭酸ガス下, 95%湿潤下で行った。細胞が 80%コンフルエントの細胞密度になった時点で実験に供した。細胞数の計測は、血球計算板 (NanoEntec, Seoul, Korea) を用いて計測した。

### 3. RANKL 誘導性破骨細胞分化誘導の方法

RANKL 誘導性破骨細胞分化は、Horibe らの方法<sup>31)</sup>に従って、BMMs を  $1.0 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup> の密度で播種し、同時に RANKL (100 ng/mL) および M-CSF (100 ng/mL) を添加することで誘導した。

### 4. (+)-terrein の細胞傷害性試験

(+)-terrein の BMMs への細胞傷害性は、CellTiter 96® Aqueous Assay (Promega, Madison, WI, USA) を用いて、3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS) 法<sup>32)</sup>によって調べた。BMMs 細胞播種と

同時に(+)-terrein (0.01-1,000  $\mu$ M) を添加し、24 時間培養した後、MTS の最終濃度が 0.5 mg/mL になるように添加して、2 時間後に生成されたホルマザリン色素の吸光度をマイクロプレートリーダー (SH-1000 Lab : コロナ電気株式会社, 茨城) を用いて 490 nm の波長で測定した。

## 5. (+)-terrein が破骨細胞分化に及ぼす影響の検討

(+)-terrein が RANKL 誘導性破骨細胞分化に及ぼす影響は、酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ (tartrate-resistant acid phosphatase : TRAP) 染色を用いて評価した<sup>33)</sup>。すなわち、BMMs を 96-well plate に前述の記載 (材料と方法 3 項) と同様に播種し、分化誘導開始と同時に(+)-terrein を添加した。そして細胞播種から 5 日後に 4 % パラフォルムアルデヒド液 (Wako) で 1 時間固定した。その後、0.1% Triton X-100 を含有する PBS 溶液で 10 分間定温放置した。その後、PBS 溶液で 2 回洗浄した。Naphthol AS-MX phosphate 1 mg (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), Fast Red LB Salt 5 mg (Sigma-Aldrich), 0.1 M 酢酸ナトリウム溶液 (pH 5.0) 9 mL および 0.5 M 酒石酸ナトリウム溶液 1 mL を混和し、染色液を作製した。各 well に染色液を 100  $\mu$ L ずつ添加し、10 分後に評価した。3 核以上有する破骨細胞を成熟破骨細胞とみなした。

## 6. (+)-terrein が破骨細胞の硬組織吸収能に及ぼす影響の検討



生体骨材料を模倣した無機結晶性リン酸カルシウムがコーティングされたオステオアッセイ 96-well plate (Corning, Corning, NY, USA) に BMMs を前述の記載 (材料と方法 3 項) と同様に播種し, 分化誘導開始と同時に (+)-terrein を添加した。そして細胞播種から 5 日後に培養液を除去し, 5% 次亜塩素酸ナトリウム溶液で洗浄した。画像解析ソフト Image J (version 1.46r, NIH, Bethesda, MD, USA) を用いて 1 well (0.35 cm<sup>2</sup>) あたりの吸収窩の面積を計測した。

## 7. (+)-terrein が NFATc1 の遺伝子発現に及ぼす影響の検討

(+)-terrein が NFATc1 の遺伝子発現に及ぼす影響は, リアルタイム PCR 法を用いて検討した。BMMs を 12-well plate に前述の記載と同様 (材料と方法 3 項) に播種し, 分化誘導開始と同時に (+)-terrein を添加した。そして細胞播種から 1 日後に全 RNA を RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) にて抽出した。RNA の濃度と純度は, NanoDrop2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を用いて 260 nm と 280 nm での吸光度とその比を用いて測定した。全ての RNA の純度は, A260/A280 値が 1.8~2.2 の間である事を確認した。RNA 抽出過程で RNase-Free DNase Set (Qiagen) を用いて混入した DNA を除去した。抽出した RNA の 1 µg をテンプレートとして, 50 µM oligo (dT) 12-18 Primer (Thermo Fisher Scientific) と 10 mM dNTP Mix (Thermo

Fisher Scientific) を 1:1 で混合した 13  $\mu\text{L}$  の溶液を, 65 $^{\circ}\text{C}$  で 5 分間熱処理して RNA のステム構造を破壊した後に氷上で 1 分間急冷反応させた後, プライマーを 60 $^{\circ}\text{C}$  でアニールした。さらに 4  $\mu\text{L}$  の 5  $\times$  First Strand, 各 1  $\mu\text{L}$  の 0.1  $\mu\text{M}$  dithiothreitol, SuperScript III Reverse Transcriptase (全て Invitrogen), および RNase-free Water (Qiagen) を追加することで最終濃度を 20  $\mu\text{L}$  の溶液とし, 50  $^{\circ}\text{C}$  で 1 時間の逆転写反応を行って cDNA を合成した。その後, 70 $^{\circ}\text{C}$ , 15 分間の熱処理によって逆転写酵素を不活化した。合成した cDNA の溶液を 10 倍希釈した溶液を, 合成したセンスおよびアンチセンス PCR プライマーで (10  $\mu\text{M}$ ), 2  $\times$  Power SYBR Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific), および RNase-free Water と混合し, 95 $^{\circ}\text{C}$  で 10 分間の 2 本鎖 DNA の変性後, 95 $^{\circ}\text{C}$  で 15 秒の熱変性, 60 $^{\circ}\text{C}$  で 1 分のアニーリングと伸長反応のステップを 40 サイクル行った。この反応は 7300 Fast Real-time PCR System (Thermo Fisher Scientific) を用いて行い, その際に PCR 産物が発する蛍光量を SDS v1.X.with RQ Software (Thermo Fischer Scientific) にて測定した。NFATc1 の mRNA 発現量は  $\beta$ -actin の mRNA 量を内部対照として, 比較 Ct 法にて定量し, 相対発現量として示した。なお, NFATc1 および  $\beta$ -actin のプライマーは, Primer3 Plus (<http://primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi>) を用いて合成し, NCBI primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) を用いて目的遺伝子に理論上特異的であることを確認した。

## 8. (+)-terrein が NFATc1 のタンパク質産生に及ぼす影響の検討

(+)-terrein が NFATc1 のタンパク質産生に及ぼす影響は、ウエスタンブロッティング法を用いて検討した<sup>34)</sup>。BMMs を 12-well plate に前述の記載（材料と方法 3 項）と同様に播種し、分化誘導開始と同時に(+)-terrein を添加した。そして細胞播種から 2 日後に、氷冷した cell lysis buffer {50 mM 塩化ナトリウム (NaCl), 10 mM トリスヒドロキシメチルアミノメタン塩酸バッファー (Tris-HCl, pH 7.2), 1% ノニデット P-40, 5 mM エチレンジアミン四酢酸ナトリウム, 1% ドデシル硫酸ナトリウム (SDS), プロテアーゼインヒビターカクテル (Sigma)} にて 10 分間細胞を溶解し、4°C で 10 分間、12,000 × g にて遠心分離を行い、その上清をタンパク質として回収した。タンパク質濃度はウシ血清アルブミン (bovine serum albumin : BSA) を対照に、Bradford 法<sup>35)</sup>にて測定した。細胞溶解物 (30 µg) に SDS サンプルバッファー {1% (w/v) SDS, 45 mM Tris-HCl (pH 6.8), 15% (v/v) グリセリン, 144 mM 2-メルカプトエタノール, 0.002% フロモフェノールブルー} を加え、95°C で 5 分間煮沸して還元状態にした。なお、還元状態になるまでの試料は全て氷上で操作を行った。還元状態にした試料を泳動緩衝液 (25 mM Tris-HCl, 200 mM glycine, 35 mM SDS) を用いたポリアクリルアミドゲル {アクリルアミド濃度 7.5% (v/v) : NFATc1} 電気泳動にて分離した。(室

温, 150 V 定電圧条件)。その後分離したタンパク質を, 湿式転写装置 (MINI PROTEAN<sup>®</sup> II : Bio-Rad laboratories, Hercules, CA, USA) を用いて転写用バッファー (1.8 mM Tris-HCl, 190 mM glycine, 20% methanol) 中で 60 分間, polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜 (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) へ転写した (4 °C, 100 V 定電圧条件)。転写後の PVDF 膜は, 5 %スキムミルク (BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ, USA) を含有するトリス緩衝食塩水 (TBS : 10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.4) に浸漬し, 室温にて 1 時間のブロッキング操作を施した。その後, 1 次抗体を 5 %BSA 含有 TBS で希釈した溶液中で PVDF 膜を 4 °C で 12 時間振とうした。反応後, 0.1 % Tween-20 含有 TBS (T-TBS) で洗浄し, 二次抗体を 5%スキムミルク含有 TBS で希釈した溶液中に PVDF 膜を浸漬し, 4 °C で 1 時間振とうさせた。一次抗体としてヒト由来抗マウス NFATc1 モノクローナル抗体 (1:1,000, Santa Cruz, Santa Cruz, CA, USA) を用い, 二次抗体として, horseradish peroxidase (HRP) 標識抗マウス IgG 抗体 (1:2,000, GE Healthcare UK Ltd, Buckinghamshire, UK) を用いた。反応タンパク質の検出は, 高感度ケミルミネッセンス法 (enhanced chemiluminescence : ECL 法, Super Signal<sup>®</sup> West Dura Extended Duration Substrate : Thermo Fisher Scientific) を用いて行った。使用した PVDF 膜は抗体除去バッファー (Restone<sup>™</sup> Western Blot Stripping Buffer : Thermo Fisher Scientific) 中で室温にて 30 分間振とうして抗体を除去した後,

上記に記載したブロッキング操作と同様の操作を行い、マウス由来抗 $\beta$ -actin ポリクローナル抗体 (1:10,000, Sigma) を用いて検出を行うことで、ゲルの各レーンのタンパク質が等量であることを確認した。標的タンパク質に相対するバンドの強度は、画像解析ソフト Image J を用いて黒化度を数値化し、RANKL 無添加で(+)-terreirin 無添加時の黒化度を基準とした相対黒化度とした。

## 9. (+)terreirin が破骨細胞の分化に影響を及ぼす時期の検討

(+)-terreirin の添加時期は、BMMs を 96-well plate に前述の記載 (材料と方法 3 項) と同様に播種し、(+)-terreirin を、分化誘導開始と同時に添加した系 (時期①)、分化誘導開始後 24 時間後に添加した系 (時期②)、分化誘導開始後 48 時間後に添加した系 (時期③) において、細胞播種から 5 日後に TRAP 染色を用いて評価した。また、時期①と時期②に添加した(+)-terreirin が NFATc1 に及ぼす影響は、前述の記載 (材料と方法 8 項) と同様にウエスタンブロッティング法を用いて検討した。

## 10. 統計解析

各実験系における統計解析は、one-way analysis of variance (one-way ANOVA) を用い、さらに多重比較検定を Tukey/Kramer test で行った。2 群間の差の検定には Student's

*t*-test を用いた。各々の統計処理には、JMP (Ver. 9.0.2 : SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) を用いて検定を行い、*p* 値が 0.05 未満の場合を有意差ありと判定した。

## 結果

### 1. BMMs における(+)-terrein の細胞傷害性

BMMs における(+)-terrein の細胞傷害性を MTS assay にて検討した結果, (+)-terrien は 10  $\mu$ M 以下では細胞障害性がみられなかった (図 1)。一方, 100  $\mu$ M 以上の濃度で (+)-terrein を添加すると, 細胞傷害性がみられた (図 1 :  $p < 0.05$ )。

### 2. (+)-terrein が破骨細胞分化に及ぼす影響

結果 1 で細胞傷害性のない濃度範囲内で, 破骨細胞分化に及ぼす影響を評価した。すなわち, (+)-terrein を各濃度 (0.01-10  $\mu$ M) で分化誘導開始と同時に添加し, TRAP 染色を用いて評価した。その結果, (+)-terrein は濃度依存的に TRAP 陽性破骨細胞への分化を抑制し (図 2A), 10  $\mu$ M の(+)-terrein を作用させると破骨細胞への分化を有意に抑制した (図 2B :  $p < 0.05$ )。次に, 無機結晶性リン酸カルシウムをコーティングしたアパタイトプレートを用いて, (+)-terrein (10  $\mu$ M) が硬組織吸収能に及ぼす影響を評価した。その結果, (+)-terrein (10  $\mu$ M) は, RANKL によって誘導される BMMs の硬組織吸収能を抑制した (図 3 :  $p < 0.05$ )。

### 3. (+)-terrein が NFATc1 に及ぼす影響

(+)-terrein (10  $\mu$ M) を分化誘導開始と同時に添加し、NFATc1 の遺伝子発現量をリアルタイム PCR 法にて (図 4), NFATc1 のタンパク質産生量をウエスタンブロッティング法にて (図 5) 検討した。その結果, (+)-terrein を添加すると NFATc1 の遺伝子発現およびタンパク質産生は抑制された。(図 4, 5 :  $p < 0.05$ )

#### 4. (+)-terrein の作用時期が破骨細胞分化誘導に及ぼす影響

(+)-terrein (10  $\mu$ M) を, 分化誘導開始と同時に添加した系 (時期①) に加え, 分化誘導開始 24 時間後に添加した系 (時期②), および分化誘導開始 48 時間後に添加した系 (時期③) を設定し, 上記 3 つの条件下で 120 時間後における(+)-terrein の破骨細胞分化に及ぼす影響を検討した。その結果, (+)-terrein を時期①だけではなく, 時期②, 時期③に添加した場合においても破骨細胞分化は抑制された (図 6 :  $p < 0.05$ )。

また, 時期①と時期②の条件下で 48 時間後における NFATc1 のタンパク質産生に及ぼす影響を検討した。その結果, NFATc1 のタンパク質産生は抑制された (図 7 :  $p < 0.05$ )。



## 考察

本研究では、真菌由来二次代謝産物である(+)-terrein が破骨細胞分化に及ぼす作用効果と作用機序の解明を試みた。具体的には、(+)-terrein が BMMs における RANKL 誘導性破骨細胞分化に及ぼす影響と、RANKL 誘導性シグナル経路における標的分子の解明を図り、さらに(+)-terrein が破骨細胞の分化に影響を及ぼす投与時期の検討をした。本研究で得られた結果は次の 3 点である。BMMs において、1) (+)-terrein は RANKL 誘導性破骨細胞分化を抑制した。また、2) (+)-terrein は RANKL 誘導性シグナル経路のマスター転写因子である NFATc1 を抑制した。さらに、3) (+)-terrein は破骨細胞分化への誘導開始から 24 時間、および 48 時間後に添加した場合においても、破骨細胞への分化を抑制した。

本研究では、(+)-terrein が BMMs において RANKL 誘導性破骨細胞分化に及ぼす影響を、TRAP 染色と硬組織吸収能という 2 つの側面から検討した。(+)-terrein の効果の検証に先立ち、BMMs における(+)-terrein の細胞傷害性を MTS assay で確認したところ、10  $\mu$ M 以下の濃度では細胞傷害性を示さなかった。これまでの知見で、(+)-terrein は、HGFs やヒト歯髄細胞においても同様の濃度依存的な細胞傷害性を示しており、10  $\mu$ M 以下の濃度では細胞傷害性を示さなかった<sup>21,25)</sup>。以上の結果をふまえ、BMMs における(+)-terrein の細胞傷害性実験の結果は信頼に足ると捉え、以後の実験系にて

用いる(+)-terrein の濃度を 10  $\mu\text{M}$  に設定した。10  $\mu\text{M}$  の(+)-terrein は RANKL 誘導性の破骨細胞分化を有意に抑制し、さらに硬組織吸収能も有意に抑制した (図 2B, 3)。

破骨細胞分化の主要な調節機構である RANKL 誘導性シグナル経路において、NFATc1 は破骨細胞分化のマスター転写因子であることが明らかにされている<sup>14, 15</sup>)。RANKL が、受容体である RANK に結合すると、その下流で様々なシグナルが活性化され、NFATc1 の転写が亢進する。NFATc1 は、RANK とは異なる膜タンパク質の共刺激による細胞内のカルシウム濃度の上昇によって核内に移行し<sup>10</sup>)、自己増幅を起こすことが報告されている<sup>36</sup>)。また、NFATc1 が活性化すると、破骨細胞の機能に必要なカテプシン K<sup>37</sup>)や成熟破骨細胞の誘導に関わる dendric cell-specific transmembrane protein (DC-STAMP)<sup>38</sup>) の転写および発現を促進し、破骨細胞への分化が進行する。したがって、NFATc1 を制御することは破骨細胞分化調節において非常に重要であると考えられる。本研究では、BMMs において(+)-terrein が NFATc1 に及ぼす影響をリアルタイム PCR 法とウエスタンブロッティング法にて検討した。その結果、(+)-terrein は NFATc1 の遺伝子発現およびタンパク質産生を有意に抑制した (図 4, 5)。(+)-terrein は低分子化合物であることから、受容体を介さず細胞膜を通過して細胞内に侵入することが可能と推察される。すなわち、(+)-terrein が NFATc1 に直接、もしくはその上流のシグナル因子に作用し、破骨細胞分化抑制効果を発揮する可能性が示唆される。

現在、NFATc1 の核内移行の抑制を標的とする治療薬として、免疫抑制剤シクロスポリン A、およびタクロリムスがある。これらの薬剤はタンパク質脱リン酸化酵素カルシニューリン (calcineurin : CN) を標的とする。その薬理効果として、CN の活性を抑制し、T 細胞抗原受容体刺激等によって惹起される細胞内カルシウム依存性シグナルを阻害することで、NFATc1 の核内移行を抑制する。そのため、シクロスポリン A やタクロリムスは CN-NFAT 系阻害剤とも呼ばれている<sup>39)</sup>。CN-NFAT 系阻害剤は免疫抑制剤として臨床応用される一方で、副作用としての腎障害や耐糖機能障害などが報告されている<sup>40,41)</sup>。(+)terrein が CN-NFAT 系阻害剤とは異なる作用機序で NFATc1 の発現抑制効果を示すのであれば、これら既存の NFATc1 阻害剤に代わる新たな治療薬の候補になりうる。興味深いことに、(+)terrein は、時期①だけでなく、時期②、③においても RANKL 誘導性破骨細胞への分化を抑制した (図 6)。また、時期①、②においては、NFATc1 のタンパク質産生を抑制した (図 7)。破骨細胞は分化誘導開始後 72 時間以内に成熟すると言われており、誘導開始 24 時間前後の分化中の細胞は、極めて特異的な形質をもつと言われている<sup>42)</sup>。また、RANKL 誘導下で NFATc1 の mRNA 発現量が誘導開始 24 時間後に有意に増加したという報告がある<sup>16)</sup>。これらの知見から、(+)terrein が一度活性化された NFATc1 の増幅を抑制する可能性が考えられる。あるいは、NFATc1 によって活性化される他の破骨細胞分化誘導シグナル因子に作用す

る可能性も示唆される。CN-NFAT 系阻害剤以外にも、炎症性骨吸収抑制薬として、BP 製剤、カルシトニン製剤、そして抗 RANKL 抗体による抗体医薬品などが挙げられる。我が国は超高齢社会を迎え、多くの高齢者が骨粗鬆症や関節リウマチなどの治療のために、炎症性骨吸収抑制薬を内服しており、今後も内服患者数は増加し続けることが予想される。一方で、同治療薬を内服することに伴い、MRONJ を始めとする重篤な副作用の増加が危惧される<sup>19)</sup>。そのため、MRONJ 等を発症させない新たな治療薬の開発が求められている。

(+)-terrein は有機化学的に合成可能であり<sup>24)</sup>、その構造を自由に変化させることが可能である。そのため、破骨細胞分化抑制能を維持したまま新たな誘導体を合成することも可能であるため、より副作用の少ない治療薬の開発につながられる。また、(+)-terrein は、経口投与が可能な低分子化合物である<sup>43)</sup>ことから、高齢者への応用を考慮すると非常に有用である。現在、低分子医薬品の開発よりも抗体医薬品をはじめとするバイオ医薬品の研究が活発であるが、現在の医療経済環境を考えると、より安価で簡便に服用可能な薬剤の開発が求められる。高齢者の長期服用を考慮すると、低分子医薬品になり得る(+)-terrein を応用した治療薬を開発することは非常に意義が高いと考える。

(+)-terrein の治療薬としての応用を検討する上で、作用機序のさらなる説明が必須

である。RANKL 誘導性シグナル経路における(+)-terrein の標的因子の同定を進めることで、分子レベルでの作用メカニズムの解明が今後必要である。また、実験動物を用いた *in vivo* における(+)-terrein の作用効果および重篤な副作用発症の有無の検討が必要である。超高齢社会が求める、より副作用の少ない、新たな骨吸収抑制薬として(+)-terrein の可能性を今後さらに検討することが望まれる。

## 結論

(+)-terrein は、BMMs において、RANKL 誘導性破骨細胞分化を抑制し、RANKL 誘導性破骨細胞分化シグナル経路の最終転写因子である NFATc1 の発現を抑制する可能性が示唆された。

## 謝辞

稿を終えるにあたり，終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜った岡山大学大学院医歯薬学総合研究科病態制御科学専攻病態機構学講座歯周病態学分野の高柴正悟教授に深甚なる謝意を表します。また，様々な面にわたり，終始御指導賜り，貴重な御助言と御協力を下さいました岡山大学病院歯周科の大森一弘講師，岡山大学大学院医歯薬学総合研究科社会環境生命科学専攻国際環境科学講座口腔微生物学分野の中山真彰助教，ならびに岡山大学歯学部先端領域研究センター（ARCOCS）専任助教の青山絵理子専任助教，ならびに歯周病態学分野の諸先生に厚く御礼申し上げます。

## 表題脚注

岡山大学 大学院医歯薬学総合研究科 病態制御科学専攻 病態機構学講座 歯周

病態学分野

(指導：高柴正悟教授)

本論文の一部は、以下の学会において発表した。

- ・ 第 143 回日本歯科保存学会秋季学術大会 (2015 年 11 月, 東京)
- ・ 第 146 回日本歯科保存学会春季学術大会 (2017 年 6 月, 青森)



## 参考文献

- 1) Breslow, L., and Breslow, N.: Health practices and disability: some evidence from Alameda County. *Prev. Med.*, **22**, 86-95, 1993.
- 2) 厚生労働省：平成23年歯科疾患実態調査「20本以上の歯を有する者の割合の年次推移」（「<http://www.mhlw.go.jp/toukei/list/62-23.html>」 2011年11月現在）
- 3) 厚生労働省：中央社会保険医療協議会総会（第301回）「歯周病罹患率（4mm以上の歯周ポケットを有する者）の経年比較」（「<http://www.mhlw.go.jp/file/05-Shingikai-12404000-Hokenkyoku-Iryouka/0000092345.pdf>」 2015年7月22日現在）
- 4) Cullinan, M.P., and Seymour, G.J.: Periodontal disease and systemic illness: will the evidence ever be enough?. *Periodontol.*, 2000, **62**, 271-286, 2013.
- 5) Armitage, G.C.: Periodontal diagnoses and classification of periodontal diseases. *Periodontol.*, 2000, **34**, 9-21, 2004.
- 6) Lamont, R.J., and Hajishengallis, G.: Polymicrobial synergy and dysbiosis in inflammatory disease. *Trends Mol. Med.*, **21**, 172-183, 2014.
- 7) Nakashima, T., Hayashi, M., and Takayanagi, H.: New insights into osteoclastogenic signaling mechanisms. *Trends Endocrinol. Metab.*, **23**, 582-590, 2012.

- 8) Zhao, R.: Immune regulation of osteoclast function in postmenopausal osteoporosis: a critical interdisciplinary perspective. *Int. J. Med. Sci.*, **9**, 825-832, 2012.
- 9) 臼井通彦, 花谷智哉, 森谷友貴, 佐野孝太郎, 有吉渉, 西原達次, 中島啓介 : 歯周病における骨破壊メカニズム～破骨細胞を形成・活性化する因子～. 日本歯周病学会会誌, **57**, 120-125, 2015.
- 10) Takayanagi, H.: Osteoimmunology: shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. *Nat. Rev. Immunol.*, **7**, 292-304, 2007.
- 11) Suda, T., Takahashi, N., Udagawa, N., Jimi, E., Gillespie, M.T., and Martin, T.J.: Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr. Rev.*, **20**, 345-57, 1999.
- 12) Nakashima, T., Hayashi, M., Fukunaga, T., Kurata, K., Oh-Hora, M., Feng, J.Q., Bonewald, L.F., Kodama, T., Wutz, A., Wagner, E.F., Penninger, J.M., and Takayanagi, H.: Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression. *Nat. Med.*, **17**, 1231-1234, 2011.
- 13) Boyle, W.J., Simonet, W.S., and Lacey, D.L.: Osteoclast differentiation and activation. *Nature*, **423**, 337-342, 2003.
- 14) Asagiri, M., and Takayanagi, H.: The molecular understanding of osteoclast

- differentiation. *Bone*, **40**, 251-264, 2007.
- 15) Ishida, N., Hayashi, K., Hoshijima, M., Ogawa, T., Koga, S., Miyatake, Y., Kumegawa, M., Kimura, T., and Takeya, T.: Large scale gene expression analysis of osteoclastogenesis in vitro and elucidation of NFAT2 as a key regulator. *J. Biol. Chem.*, **277**, 41147-41156, 2002.
- 16) Takayanagi, H., Kim, S., Koga, T., Nishina, H., Isshiki, M., Yoshida, H., Saiura, A., Isobe, M., Yokochi, T., Inoue, J., Wagner, E.F., Mak, T.W., Kodama, T., and Taniguchi, T.: Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts. *Dev. Cell*, **3**, 889-901, 2002.
- 17) McGowan, K., McGowan, T., and Ivanovski, S.: Risk factors for medication-related osteonecrosis of the jaws: A systematic review. *Oral Dis.*, 2017.
- 18) Qureshi, I., Begum, T., and Noorani, R.: Isolation and identification of the metabolic products of *Aspergillus pulvinus* kwon and fennel. Comparative studies of production of terrein and ergosterol in different media. *J. Sci. Industr. Res.*, **19**, 120-122, 1976.
- 19) Arakawa, M., Someno, T., Kawada, M., and Ikeda, D.: A new terrein glucoside, a novel inhibitor of angiogenin secretion in tumor angiogenesis. *J. Antibiot.(Tokyo)*, **61**, 442-448, 2008.

- 20) Park, S.H., Kim, D.S., Kim, W.G., Ryoo, I.J., Lee, D.H., Huh, C.H., Youn, S.W., Yoo, I.D., and Park, K.C.: Terrein: a new melanogenesis inhibitor and its mechanism. *Cell. Mol. Life Sci.*, **61**, 2878-2885, 2004.
- 21) Kamata, S., Sakai, H., and Hirota, A.: Isolation of acetylaranotin, bisdethiodi(methylthio)-acetylaranotin and terrein as plant growth inhibitors from a strain of *Aspergillus terreus*. *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 2637-2638, 1983.
- 22) Lee, J.C., Yu, M.K., Lee, R., Lee, Y.H., Jeon, J.G., Lee, M.H., Jhee, E.C., Yoo, I.D., and Yi, H.K.: Terrein reduces pulpal inflammation in human dental pulp cells. *J. Endod.*, **34**, 433-437, 2008.
- 23) Raistrick, H., and Smith, G.: Studies in the biochemistry of micro-organisms. *Biochem. J.*, **29**, 606-611, 1935.
- 24) Altenbach, H.J., and Holzappel, W.: Synthesis of (+)-Terrein from L-tartaric acid. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **29**, 67-68, 1990.
- 25) 山本総司：真菌二次代謝産物である(+)-terreinがヒト歯肉繊維芽細胞における interleukin-6誘導性タンパク質の産生に及ぼす影響とその標的分子の解明. 岡山歯誌, **36**, 学位論文, 2017.
- 26) 山本大介：ヒト歯肉繊維芽細胞におけるIL-6および可溶性IL-6受容体誘導性

- angiogenin産生に血管新生阻害物質terreinが及ぼす効果に関する研究. 岡山歯誌, **32**, 学位論文, 2013.
- 27) Kishimoto, T.: Interleukin-6: discovery of a pleiotropic cytokine. *Arthritis Res. Ther.*, **8**, 2006.
- 28) Naruishi, K., Takashiba, S., Nishimura, F., Chou, H.H., Arai, H., Yamada, H., and Murayama, Y.: Impairment of gingival fibroblast adherence by IL-6/sIL-6R. *J. Dent. Res.*, **80**, 1421-1424, 2001.
- 29) Mandai, H., Omori, K., Yamamoto, D., Tsumura, T., Murota, K., Yamamoto, S., Mitsudo, K., Ibaragi, S., Sasaki, A., Maeda, H., Takashiba, S., and Suga, S.: Synthetic (+)-terrein suppresses interleukin-6/soluble interleukin-6 receptor induced-secretion of vascular endothelial growth factor in human gingival fibroblasts. *Bioorg. Med. Chem.*, **22**, 5338-5344, 2014.
- 30) Tevlin, R., McArdle, A., Chan, C.K., Pluvinage, J., Walmsley, G.G., Wearda, T., Marecic, O., Hu, M.S., Paik, K.J., Kshemendra, S.Y., Atashroo, D.A., Zielins, E.R., Wan, D.C., Weissman, I.L., and Longaker, M.T.: Osteoclast derivation from mouse bone marrow. *J. Vis. Exp.*, **6**, 2014.
- 31) Horibe, K., Nakamichi, Y., Uehara, S., Nakamura, M., Koide, M., Kobayashi, Y.,

- Takahashi, N., and Udagawa, N.: Roles of cathelicidin-related antimicrobial peptide in murine osteoclastogenesis. *Immunology*, **140**, 344-351, 2013.
- 32) Buttke T.M., McCubrey J.A., and Owen T.C.: Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay to measure viability and proliferation of lymphokine-dependent cell lines. *J. Immunol. Methods*, **157**, 233-240, 1993.
- 33) Kawatani, M., Okumura, H., Honda, K., Kanoh, N., Muroi, M., Dohmae, N., Takami, M., Kitagawa, M., Futamura, Y., Imoto, M., and Osada, H.: The identification of an osteoclastogenesis inhibitor through the inhibition of glyoxalase I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **105**, 11691-11696, 2008.
- 34) Omori, K., Naruishi, K., Nishimura, F., Yamada-Naruishi, H., and Takashiba, S.: High glucose enhances interleukin-6-induced vascular endothelial growth factor 165 expression via activation of gp130-mediated p44/42 MAPK-CCAAT/enhancer binding protein signaling in gingival fibroblasts. *J. Biol. Chem.*, **279**, 6643-6649, 2004.
- 35) Bradford, M.M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254, 1976.
- 36) Asagiri, M., Sato, K., Usami, T., Ochi, S., Nishina, H., Yoshida, H., Morita, I., Wagner,

- E.F., Mak, T.W., Serfling, E., and Takayanagi, H.: Autoamplification of NFATc1 expression determines its essential role in bone homeostasis. *J. Exp. Med.*, **202**, 1261-1269, 2005.
- 37) Saftig, P., Hunziker, E., Wehmeyer, O., Jones, S., Boyde, A., Rommerskirch, W., Moritz, J.D., Schu, P., von, and Figura, K.: Impaired osteoclastic bone resorption leads to osteopetrosis in cathepsin-K-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **95**, 13453-13458, 1998.
- 38) Chiu, Y.H., and Ritchlin, C.T.: DC-STAMP: A Key Regulator in Osteoclast Differentiation. *J. Cell. Physiol.*, **231**, 2402-2407, 2016.
- 39) 天崎吉晴：カルシニューリン・NFAT系とその阻害剤。日本臨床免疫学会会誌，**33**，249-261，2010。
- 40) Tedesco, D., Haragsim, L.: Cyclosporine: a review. *J Transplant.*, **10**, 1155-1162, 2012.
- 41) Lawrence, M.C., Bhatt, H.S., Watterson, J.M., and Eason, R.A.: Regulation of insulin gene transcription by a Ca(2+)-responsive pathway involving calcineurin and nuclear factor of activated T cells. *Mol Endocrinol.*, **15**, 1758-1767, 2001.
- 42) 高見正道：破骨細胞分化と機能-免疫と骨代謝の接点-。埼玉医科大学雑誌，**33**，80-81，2006。

- 43) Zhang, F., Mijiti, M., Ding, W., Song, J., Yin, Y., Sun, W., Li, Z.: (+)-Terrein inhibits human hepatoma Bel-7402 proliferation through cell cycle arrest. *Oncol. Rep.*, **33**, 1191-1200, 2015.



## 図の説明

### 図 1. (+)-terrein の細胞傷害性試験

BMMs は  $1.0 \times 10^5$  cells/ cm<sup>2</sup> の細胞密度で播種し, (+)-terrein (0.01-1,000  $\mu$ M) を細胞播種と同時に添加して, 24 時間後に MTS 法を用いて細胞傷害性を検討した。グラフは 1 匹のマウス由来の BMMs を用いて, 同一の 6 回の実験の平均値を示し, エラーバーは標準偏差を示す。各濃度における細胞傷害性 (吸光度) は, Student's *t*-test を用いて検定した。\* :  $p < 0.05$  ((+)-terrein 0  $\mu$ M 群との比較)

### 図 2. (+)-terrein が破骨細胞分化に及ぼす影響

BMMs は  $1.0 \times 10^5$  cells/ cm<sup>2</sup> の細胞密度で播種し, 分化誘導開始と同時に (+)-terrein (0.01-10  $\mu$ M) を添加した。分化誘導開始 5 日後に TRAP 染色を行った。

A : 破骨細胞分化状態に及ぼす(+)-terrein の影響を定性的に検討した。スケールバー : 100  $\mu$ m

B : 3 核以上有する破骨細胞を成熟破骨細胞とみなし, 1 well (0.35 cm<sup>2</sup>) あたりの成熟破骨細胞数を計測した。グラフは 3 匹のマウスから得た BMMs を用いた独立した 3 回の実験の平均値を示し, エラーバーは標準偏差を示す。それぞれの成熟破骨細胞数の違いは ANOVA/Tukey-Kramer test を用いて検定した。\* :  $p < 0.05$  (RANKL 添加

あり, (+)-terrein 添加なし群との比較), スケールバー : 100  $\mu\text{m}$

### 図 3. (+)-terrein が破骨細胞分化の吸収能に及ぼす影響

無機結晶性リン酸カルシウムでコーティングしたオステオアッセイプレート上に BMMs を  $1.0 \times 10^5$  cells/  $\text{cm}^2$  の細胞密度で播種し, 分化誘導開始と同時に(+)-terrein (10  $\mu\text{M}$ ) を添加した。分化誘導開始 5 日後に, 1 well (0.35  $\text{cm}^2$ ) あたりの吸収窩の面積を比較して, (+)-terrein の硬組織吸収能に及ぼす影響を評価した。グラフは 3 匹のマウスから得た BMMs を用いた独立した 3 回の実験の平均値を示し, エラーバーは標準偏差を示す。それぞれの硬組織吸収窩の面積の違いは ANOVA/Tukey-Kramer test を用いて検定した。\* :  $p < 0.05$  (RANKL 添加あり, (+)-terrein 添加なし群との比較), スケールバー : 10  $\mu\text{m}$

### 図 4. (+)-terrein が NFATc1 の遺伝子発現に及ぼす影響

BMMs は  $1.0 \times 10^5$  cells/  $\text{cm}^2$  の細胞密度で播種し, (+)-terrein (10  $\mu\text{M}$ ) を分化誘導開始と同時に添加した。細胞播種 1 日後に回収した mRNA を用いて, NFATc1 の遺伝子発現量をリアルタイム PCR 法で検討した。mRNA 発現量は  $\beta$ -actin の mRNA 量を内部対照として比較 Ct 法で定量し, 相対発現量として示した。グラフはそれぞれ別の

マウスから得た BMMs を用いた独立した 3 回の実験の平均値を示し、エラーバーは標準偏差を示す。それぞれの発現量の違いは、ANOVA/Tukey-Kramer test を用いて検定した。\* :  $p < 0.05$  (RANKL 添加あり, (+)-terrein 添加なし群との比較), スケールバー :  $100 \mu\text{m}$

### 図 5. (+)-terrein が NFATc1 のタンパク質産生に及ぼす影響

BMMs は  $1.0 \times 10^5 \text{ cells/cm}^2$  の細胞密度で播種し, (+)-terrein ( $10 \mu\text{M}$ ) を分化誘導開始と同時に添加した。細胞播種 2 日後に回収したサンプル中の NFATc1 の産生量をウエスタンブロット法で検討した。

#### ・ NFATc1 のウエスタンブロット像

$\beta$ -actin のウエスタンブロッティング像はゲルの各レーンのタンパク質が等量であることを確認したものである。

#### ・ 相対黒化度で示した NFATc1 産生量

検出されたバンドの強度は、Image J を用いて黒化度を数値化し、RANKL 無添加でかつ(+)-terrein 無添加を 1.0 とした比率で相対黒化度を算出した。

グラフはそれぞれ別のマウスから得た BMMs を用いた独立した 3 回の実験の平均値を示し、エラーバーは標準偏差を示す。それぞれの産生量の違いは、

ANOVA/Tukey-Kramer test を用いて検定した。\* :  $p < 0.05$  (RANKL 添加あり,

(+)-terrein 添加なし群との比較), スケールバー :  $100 \mu\text{m}$

#### 図 6. (+)-terrein の添加時期の違いによる破骨細胞分化に及ぼす影響の検討

BMMs は  $1.0 \times 10^5 \text{ cells/cm}^2$  の細胞密度で播種し, ①分化誘導開始と同時に(+)-terrein (10  $\mu\text{M}$ ) 添加, ②分化誘導開始 24 時間後に(+)-terrein を添加, ③分化誘導開始 48 時間後に(+)-terrein を添加, の 3 つの系を用いて, (+)-terrein が破骨細胞分化に及ぼす影響を検討した。分化誘導開始 5 日後に TRAP 染色を行い, 3 核以上有する破骨細胞を成熟破骨細胞とみなし, 1 well ( $0.35 \text{ cm}^2$ ) あたりの成熟破骨細胞数を数えた。

グラフは 3 匹のマウスから得た BMMs を用いた独立した 3 回の実験の平均値を示し, エラーバーは標準偏差を示す。それぞれの成熟破骨細胞数の違いは ANOVA/Tukey-Kramer test を用いて検定した。\* :  $p < 0.05$  (RANKL 添加あり, (+)-terrein 添加なし群との比較), スケールバー :  $100 \mu\text{m}$

#### 図 7. (+)-terrein の添加時期の違いによる NFATc1 発現に及ぼす影響の検討

前述の記載 (図 6) と同様の 3 つの実験系に対して, 分化誘導開始 2 日後に回収したタンパク質中の NFATc1 の産生量をウエスタンブロット法で検討した。

- NFATc1 のウエスタンブロット像

$\beta$ -actin のウエスタンブロッティング像はゲルの各レーンのタンパク質が等量であることを確認したものである。

- 相対黒化度で示した NFATc1 産生量

検出されたバンドの強度は、Image J を用いて黒化度を数値化し、RANKL 無添加でかつ(+)-terrein 無添加を 1.0 とした比率で相対黒化度を算出した。

グラフはそれぞれ別のマウスから得た BMMs を用いた独立した 3 回の実験の平均値を示し、エラーバーは標準偏差を示す。それぞれの産生量の違いは ANOVA/Tukey-Kramer test を用いて検定した。\* :  $p < 0.05$  (RANKL 添加あり, (+)-terrein 添加なし群との比較), スケールバー : 100  $\mu\text{m}$