

## 学位論文

# 骨粗鬆症モデルマウスにおける真菌二次代謝産物(+)-Terrein が 骨代謝に及ぼす影響

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

坂井田 京佑

## Effects of Fungal Metabolite (+)-Terrein on Bone Metabolism in Mouse Osteoporosis Model

Department of Pathophysiology - Periodontal Science,

Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, Okayama University

Kyosuke SAKAIDA

(令和2年11月20日受付)

## 緒言

現在，超高齢化社会の日本では1,300万人以上の人骨粗鬆症を患っており，深刻な問題となっている<sup>1)</sup>。その中でも患者数の多い閉経後骨粗鬆症は，女性ホルモンであるエストロゲンが不足し，破骨細胞と骨芽細胞の分化のバランスが崩れることで生じる。骨粗鬆症による重度の骨量減少は，病的な骨折を誘発し，日常生活の活動性や生活の質を低下させる<sup>2,3)</sup>。そのため，骨粗鬆症の予防は我が国の喫緊の課題の一つとなっている。

現在，骨粗鬆症の治療には主にビスフォスフォネート系薬剤が使用されている<sup>1)</sup>。しかし，抜歯や歯根面のルートプレーニングといった侵襲的な歯科治療後に発生する薬剤関連顎骨壊死（medication-related osteonecrosis of jaw : MRONJ）は，骨粗鬆症治療において大きな問題となっている<sup>4)</sup>。2017年に発表された顎骨壊死に関するポジションペーパーによれば，日本におけるMRONJの発生率は10万人／年あたり0.85人とされている<sup>5)</sup>。また，日本口腔外科学会の全国調査によれば，MRONJの発生率は約0.01～0.02%と推定されている<sup>6)</sup>。一方で，日本では8020年運動の結果，高齢者の現在歯数は増加し続けている<sup>7)</sup>。その結果，ビスフォスフォネート製剤やデノスマブといった抗receptor activator of NF-κB ligand（RANKL）抗体薬を投与中の高齢者に対する歯科治療機会は増加しており，MRONJ発症のリスクが年々高まっている。MRONJ

は患者の quality of life を著しく低下させるため、重篤な副作用のない新たな骨粗鬆症治療薬の開発が望まれている。

そこで、所属する研究室の研究グループは、自然界に存在する天然化合物の中から、骨吸収抑制効果を期待できる化合物として(+)-Terrein (図 1) に着眼した。(+)-Terrein は真菌 *Aspergillus terreus* から二次代謝産物として分離された分子量 154.16 の低分子化合物である<sup>8)</sup>。天然物の(+)-Terrein には、これまでにバイオフィーム形成抑制効果<sup>9)</sup>、前立腺癌細胞におけるアンジオゲニン分泌抑制効果<sup>10)</sup>、および歯髄炎症の抑制効果<sup>11)</sup>など多彩な生物学的効果を有することが報告されている。また、所属研究グループは、天然物の(+)-Terrein と同様の構造を有する化合物を有機化学的に合成する経路を確立した<sup>12)</sup>。さらに、この有機化学的に合成した(+)-Terrein は、ヒト歯肉線維芽細胞におけるインターロイキン (Interleukin : IL) -6 誘導性の血管内皮細胞増殖因子 (vascular endothelial growth factor : VEGF) 分泌の抑制効果<sup>12)</sup>、ヤヌスキナーゼ (Janus-activated kinase : JAK) 1 のリン酸化阻害による IL-6 誘導性マクロファージコロニー刺激因子 (macrophage colony stimulating factor : M-CSF) 分泌の抑制効果<sup>13)</sup>、さらに破骨細胞分化に必須である転写因子 nuclear factor of activated T cell c1 (NFATc1) 発現の抑制による RANKL 誘導性破骨細胞分化の抑制効果<sup>14)</sup>を有することを明らかにした。以上の *in vitro* での知見をもとに、(+)-Terrein の抗炎症作用と破骨細胞分化抑制作用が全

身的に作用することができれば、骨粗鬆症発症に伴う骨吸収を抑制できるのではないかと仮説を立てた。しかし、骨破壊に対する(+)-Terrein の *in vivo* での効果は未だ不明な点が多い。また、(+)-Terrein が RANKL 誘導性破骨細胞分化に必須な転写因子である NFATc1 の発現を抑制する機序も不明な点が多い。さらに、(+)-Terrein が骨代謝を担う骨芽細胞の分化に及ぼす影響も、未だ不明である。

そこで本研究では、卵巣摘出骨粗鬆症モデルマウス<sup>15)</sup>を用いて、(+)-Terrein が全身性の骨代謝に及ぼす影響を *in vivo* で評価した。また、マウス骨髄由来マクロファージ (mouse bone marrow-derived macrophages : mBMMs) を用いて、(+)-Terrein が RANKL 誘導性破骨細胞の分化において、RANKL-RANK シグナル伝達経路に及ぼす効果を評価した。さらに、マウス頭蓋冠由来細胞 (MC3T3-E1 細胞) を用いて、(+)-Terrein が骨芽細胞の分化に及ぼす影響を *in vitro* で評価した。

## 材料と方法

### 1. 試薬

(+)-Terrein は Mandai<sup>12)</sup>の方法に従って L-酒石酸から合成したものを，岡山大学大学院自然科学研究科合成プロセス化学研究室の菅誠治教授，萬代大樹助教（現岐阜医療科学大学薬学部薬学科准教授）から恵与を受け，リン酸緩衝生理食塩液（phosphate-buffered saline : PBS, pH 7.2, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA）で希釈して用いた。*In vitro* にて使用する際には，PBS で希釈して 100 mM の濃度に調整して -80 °C で保存したものをイーグル最小必須培地 $\alpha$ 改変型培地（minimum essential medium eagle, alpha modification: MEM $\alpha$ , 和光純薬，大阪，日本）で濃度を調整し，用いた。

破骨細胞分化因子（RANKL，和光純薬）は，PBS で希釈し，100  $\mu$ g/mL の濃度に調整して -80 °C で保存した。M-CSF は，ロイコプロール点滴静脈用 800 万単位（JCR ファーマ株式会社，兵庫，日本）を PBS で希釈し，10  $\mu$ g/mL の濃度に調整して -80 °C で保存した。

### 2. 卵巣摘出骨粗鬆症モデルマウスの作製（図 2）

モデルマウスの作製には生後 8 週齢の雌の C57BL/6J マウス（日本クレア株式会社，東京，日本）を用いた。ペントバルビタールナトリウム（60 mg/kg）を腹腔内注射し

全身麻酔下で両側卵巣摘出術（ovariectomy : OVX）を行った<sup>16,17)</sup>。卵巣摘出術を施行したマウスを無作為に、① OVX群、② OVX+(+)-Terrein (10 mg/kg) 投与群、③ OVX+(+)-Terrein (30 mg/kg) 投与群、そして④ OVX+ゾレドロン酸水和物 (ZOL, 0.1 mg/kg, Tokyo Chemical Industry, 東京, 日本) 投与群の4群に分けた（各群n=6-7）。また両側卵巣摘出術に対する陰性対照として、⑤ Sham群を設定して偽手術を行った。Sham群とOVX群は陰性対照としてPBSを等量投与し、OVX+(+)-Terrein群は10, 30 mg/kgの(+)-Terreinを、OVX+ZOL群は0.1 mg/kgのZOLを、それぞれ週2回、腹腔内投与した。なお、ZOLの投与濃度はヒトの骨粗鬆症治療における投与量に準じた。8週間後、全てのマウスを安楽死させ、マウスの大腿骨および血清を採取した。

本動物実験は、日本学術会議動物実験適正化ガイドラインに準拠し、岡山大学動物実験委員会承認（OKU-2018756）の下で実施し、SPF 環境下で飼育を行い、実験期間中にマウスが死亡した場合は、実験結果から除外を行った。

### 3. Micro-computed tomography（マイクロCT）による画像解析

大腿骨の骨吸収を観察するために、前項の各群のマウスから採取した大腿骨を動物用マイクロCT撮影装置（Skyscan : Bruker, Kontich, Belgium）を用いて4 $\mu$ mのスライス幅で撮影し、撮像を付属の解析ソフトウェア（再構成ソフト, NRecon : Bruker）

を用いて立体的に再構成した。さらに付属の画像処理ソフトウェア（解析ソフト，CT-Analyzer: Bruker）を用いて，骨密度（BMD,  $\text{mg}/\text{cm}^3$ ），骨量（BV/TV, %），骨梁数（Tb.N,  $1/\mu\text{m}$ ），骨梁空隙（Tb.Sp,  $\mu\text{m}$ ）をそれぞれ測定した。

#### 4. 組織学的解析

①，②，③，④，そして⑤の各群から採取した大腿骨を，4%パラホルムアルデヒド溶液（pH 7.4：和光純薬）で1日間固定した。脱灰のためエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム（10% EDTA 2Na 溶液，pH 7.0，武藤化学株式会社，東京，日本）に10日間浸漬し，エタノール系列で脱水後にパラフィン包埋してブロックを作製し，4  $\mu\text{m}$  間隔で薄切を行い，パラフィン切片を作製した。その後，以下の染色方法を用いて組織学的解析を行った。

##### (1) ヘマトキシリン・エオジン（Hematoxylin-Eosin：HE）染色

作製したパラフィン切片を，通法に従って HE 染色を行った後，カバーガラスと Mount-Quick（大道産業株式会社，東京，日本）を用いて封入した。その後，光学顕微鏡下（BX-50：オリンパス，大阪，日本）にて組織像を観察した。

##### (2) 酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ（tartrate-resistant acid phosphatase：TRAP）染色

作製したパラフィン切片を、通法に従って TRAP 染色液（コスモ・バイオ株式会社，東京，日本）を用いて染色を行った後，カバーガラスと Mount-Quick を用いて封入した。その後，光学顕微鏡下にて組織像を観察した。成長板直下 3mm 以内に存在し，かつ 3 核以上を有する TRAP 陽性細胞を破骨細胞として，その細胞数を計測した。なお，各マウスから作製した切片を 1 匹につき無作為に 3 枚ずつ選択し，各群 3 匹，計 9 枚の切片から破骨細胞数を計測した。

### (3) 免疫組織化学（immunohistochemistry : IHC）染色

作製したパラフィン切片を，脱パラフィンと再水和を行い，アビジンビオチンペルオキシダーゼシステムを使用し，VECTASTAIN *Elite* ABC Mouse kit（Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA）を用いて IHC 染色を行った。組織切片は，0.3 %過酸化水素メタノール溶液に室温で 30 分間浸漬し，内因性ペルオキシダーゼ活性を除去し，トリプシン（Thermo Fisher Scientific）で 15 分間処理して抗原を賦活化した。正常ウサギ血清に浸漬して 15 分間ブロッキングした後，一次抗体を添加し，4°C で一晩反応させた。一次抗体は，破骨細胞の分化マーカーに特異的な抗体である抗 Cathepsin-K 抗体（Abcam, Cambridge, MA, USA）を 100 倍に PBS で希釈して使用した。なお Negative control としては PBS を添加した。PBS で洗浄し，ビオチン標識抗ラット二次抗体を PBS で 200 倍に希釈して添加し，25°C，30 分反応させた。アビジン-ビオチ

ン標識酵素複合体を添加し、30分反応させた後、0.01% 3,3'-diaminobenzidine (DAB ; ナカライテスク株式会社, 京都, 日本) を添加して室温で10分間ほど発色させた。最後に、Mayer's Hematoxylin (和光純薬) により細胞核を対比染色し、カバーガラスとMount-Quickを用いて封入後に観察を行い、陽性細胞数を計測した。

## 5. 血清中炎症性サイトカインの解析

①, ②, ③, ④, そして⑤の各群のマウスの心臓から新鮮血液を採取し、4°Cで10,000 × gにて15分間遠心分離を行い、血清を採取した。炎症性サイトカインである腫瘍壊死因子(tumor necrosis factor : TNF)- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 および M-CSF について、enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法を用いて血清中の炎症性サイトカインの解析を行った。ELISA MAX Deluxe (BioLegend, San Diego, CA, USA) を用い、マイクロプレート上の各穴に、各サイトカイン特異的な固相用抗体を、4°C, 16時間反応させた。PBS with Tween 20 (PBS-T : 和光純薬) で4回洗浄後、非特異的反応を防止するために、ブロッキングバッファーを加え、室温で1時間ブロッキングを行った。その後、PBS-Tで4回洗浄後に、採取した血清をPBSで10倍に希釈し、4.4, 15.6, 62.5, 250, および1,000 pg/mLに希釈したスタンダードとともに室温で2時間反応させた。そして、PBS-Tで4回洗浄後に、ビオチン標識された検出抗体を室温で1時間反応させた。

さらに、シグナル増幅を目的として、PBS-T で 4 回洗浄後にストレプトアビジンを室温で 30 分間反応させた。そして、PBS-T で 5 回洗浄後に、発色基質を室温で 15 分間反応させ、発色させた。発色反応の停止のため、2 N の硫酸を 100  $\mu$ L 添加し、マイクロプレートリーダーSH-1000 Lab（コロナ電気，ひたちなか，日本）を用いて 450 nm の波長における吸光度を測定した。すべての試験は一個体につき 2 穴を用いて行い、血清中 TNF- $\alpha$ ，IL-1 $\beta$ ，IL-6，M-CSF の濃度を定量し，検出限界以下の結果については，濃度を 0 とした。

## 6. 細胞培養

### (1) マウス骨髄由来マクロファージ (mBMMs)

細胞は，Tevlin らの方法<sup>18)</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) 大腿骨から骨髄を採取し，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 mBMMs として用いた。本研究は，岡山大学動物実験委員会の承認 (OKU-2016277) を得て行った。培養は，10 %ウシ胎児血清 (fetal bovine serum : FBS，Thermo Fisher Scientific，Waltham，MA，USA) を含む MEM $\alpha$ 培地を用いて 37 $^{\circ}$ C，5 %炭酸ガス，95 %湿度で行った。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。RANKL 誘導性破骨細胞の分化は, Horibe らの方法<sup>19)</sup>に従って, mBMMs 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。

## (2) マウス頭蓋冠由来細胞 (MC3T3-E1 細胞)

骨芽細胞前駆細胞として MC3T3-E1 細胞 (ATCC, Manassas, VA, USA) を用いた。培養は, 10 % FBS (Thermo Fisher Scientific) と 0.2 mg/mL ゲンタマイシン (Gibco) を含む MEM $\alpha$ 培地を用いて 37°C, 5 %炭酸ガス, 95 %湿度で行った。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。骨芽細胞への分化は, MC3T3-E1 細胞を  $1.0 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup> の密度で播種し, 同時にアスコルビン酸 (50 mg/L), ハイドロコルチゾン (10 mg/L), そして $\beta$ -グリセロフォスフェート (10 mM : タカラバイオ株式会社, 滋賀, 日本) を培地に添加することで誘導した<sup>20)</sup>。

## 7. (+)-Terrein が protein kinase-C (PKC) のタンパク質リン酸化に及ぼす影響の検討

(+)-Terrein が PKC のタンパク質リン酸化に及ぼす影響について, ウェスタンブロットティング法を用いて検討した<sup>21)</sup>。mBMMs を 12 穴プレートに前述の記載 {材料と方法 6-(1)} と同様に播種し, 分化誘導開始と同時に(+)-Terrein を添加した。RANKL

(100 ng/mL) と M-CSF (100 ng/mL) で 10-30 分間処理した後、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 (EDTA), プロテアーゼインヒビターカクテル, 1% ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)} 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>22)</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®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 20 時間振とうして反応させた。その後, 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 時間振とうして反応させた。一次抗体は, ウサギ由来抗リン酸化 PKC $\alpha$ / $\beta$ IIモノクローナル抗体 (1:1,000, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), ウサギ由来抗リン酸化 PKC $\delta$  モノクローナル抗体 (1:1,000, Cell Signaling Technology), あるいはウサギ由来抗マウス PKC $\alpha$  モノクローナル抗体 (1:1,000, Cell Signaling Technology) を用い, 二次抗体は, 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, Enhanced chemiluminescence 法 (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> Westrn 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 (1:1,000, 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 (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)を用いて黒化度を数値化し、RANKL 無添加で(+)-Terrein 無添加時の黒化度を基準とした相対黒化度とした。

## 8. (+)-Terrein が破骨細胞分化因子の遺伝子発現に及ぼす影響の検討

(+)-Terrein が破骨細胞分化因子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。mBMMs を 12 穴プレートに前述の記載と同様{材料と方法 6-(1)}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) 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 µL の溶液を、65°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°C でアニーリングした。さらに 4 µL の 5 × First Strand, 各 1 µL の 0.1 µM dithiothreitol, SuperScript III Reverse

Transcriptase (全て Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), および RNase-free Water (Qiagen) を追加することで最終濃度を 20  $\mu$ L の溶液とし, 50°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°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  $\mu$ M), 2  $\times$  Power SYBR Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific), および RNase-free Water と混合し, 95°C で 10 分間の 2 本鎖 DNA の変性後, 95°C で 15 秒の熱変性, 60°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。それぞれの mRNA 発現量は  $\beta$ -actin の mRNA 量を内部対照として, 比較 threshold cycle 法 (比較 Ct 法) にて定量し, 相対発現量として示した。なお, それぞれのプライマーは, 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 (表 1)。

## 9. (+)-Terrein が骨芽細胞の分化に及ぼす影響の検討

MC3T3-E1 細胞を 48 穴プレートに前述の記載 {材料と方法 6- (2)} と同様に播種し、分化誘導開始と同時に(+)-Terrein を添加した。3 日ごとに培地交換を行い、21 日間培養した。染色に先立ち、全細胞を PBS で洗浄し、4% パラホルムアルデヒド溶液で固定した。その後、石灰化評価キット (コスモ・バイオ株式会社) および骨形成マーカーであるアルカリホスファターゼ (ALP) 染色キット (富士フィルム株式会社, 東京, 日本) を用いて、それぞれの添付文書に記載の方法で細胞を染色した<sup>20)</sup>。染色後、活性測定のためマイクロプレートリーダー SH-1000 Lab を用いて 450 nm の波長における吸光度を測定した。また、OVX マウスにおける(+)-Terrein の骨芽細胞分化に対する影響を調べるため、前述の記載 (材料と方法 4) で作成した組織切片を用いて、IHC 染色を前述の記載 (材料と方法 4-(3)) と同様に実施した。一次抗体にはマウス抗 ALP 抗体 (1:100, Abcam) を用いた。

## 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) を用いて多重比較検定を行った。さらに、Tukey-Kramer test を用いて群間比較を行った。2 群間の差の検定は、Student's *t*-test を用いて群間比較を行った。各々の統計処理には、統計解析ソフト JMP (Ver. 9.0.2: SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) を用い、*p* 値が

0.05 未満の場合を有意差ありと判定した。

## 結果

### 1. マイクロ CT による大腿骨吸収の評価

PBS を投与した OVX マウスでは、PBS を投与した Sham マウスと比較して、骨密度 (BMD) は 16 %、骨量 (BV/TV) は 80 %、骨梁数 (Tb.N) は 78 %減少したが、骨梁空隙 (Tb/Sp) は 64 %増加した (図 3AB, n=5-6, \*\*p <0.01, \*p <0.05)。一方、(+)-Terrein (30 mg/kg) を投与した OVX マウスでは、PBS を投与した OVX マウスと比較して、骨密度、骨量、骨梁数はそれぞれ 7 %、239 %、130 %増加したが、骨梁空隙は 17 %減少した (図 3AB, n=5-6, \*\*p <0.01, \*p <0.05)。すなわち、OVX マウスにおいて(+)-Terrein は大腿骨吸収を有意に抑制した。また、ZOL 投与群においては、PBS を投与した Sham マウスと比較して、過度な骨量の増加を確認した (図 3A, n=4-6)。

### 2. 破骨細胞分化の評価

HE 染色において、(+)-Terrein を投与した OVX マウスでは、大腿骨組織に炎症像は観察されなかった (図 4A, OVX+TER)。PBS を投与した OVX マウスでは、PBS を投与した Sham マウスに対して、成長板直下の大腿骨吸収が観察された (図 4A, Sham, OVX)。(+)-Terrein (30 mg/kg) を投与した OVX マウスでは、PBS を投与した OVX マ

ウスに対して、大腿骨吸収が抑制される像を観察した (図 4A, OVX, OVX+TER)。

TRAP 染色において、PBS を投与した OVX マウスでは、PBS を投与した Sham マウスに対して、破骨細胞数が有意に増加した (図 4BD, n=3, \*\*p<0.01)。 (+)-Terrein を投与した OVX マウスでは、PBS を投与した OVX マウスに対して、破骨細胞数が有意に減少した (図 4BD, n=3, \*\*p<0.01)。 IHC 染色において、PBS を投与した OVX マウスでは、PBS を投与した非 OVX マウスに対して、Cathepsin-K 陽性細胞数が有意に増加した (図 4CD, n=3, \*p <0.05)。一方、 (+)-Terrein を投与した OVX マウスでは、PBS を投与した OVX マウスに対して、Cathepsin-K 陽性細胞数が有意に減少した (図 4CD, n=3, \*p <0.05)。なお、Negative control においては発色しなかった。

### 3. OVX マウスの体重変動および血清中炎症性サイトカイン濃度の評価

PBS, (+)-Terrein, そして ZOL の投与期間中の 10 週齢時, 13 週齢時, そして 16 週齢時 (それぞれ投与開始時, 投与開始後 3 週, 投与開始後 6 週に相当) において, 各群の体重変動を確認した。各群間で体重に有意な差はなかった (図 5A)。続いて, 各群から採取した血清を用いて, (+)-Terrein または ZOL の投与が炎症性サイトカインである TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, M-CSF の血清中炎症性サイトカイン濃度に及ぼす影響を ELISA 法にて解析した。 (+)-Terrein (30 mg/kg) を投与した OVX マウスと, PBS を投

与した OVX マウスとの間には TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , M-CSF の血清中濃度に差はなかった。

なお, ZOL を投与した OVX マウスでは, PBS を投与した OVX マウスに対して, TNF- $\alpha$ , IL-1  $\beta$ , M-CSF の血清中濃度が有意に増加した。統計学的な有意差はないものの, IL-6 の血清中濃度も増加する傾向を示した (図 5B-E, n=4-7, \*p <0.05)。

#### 4. (+)-Terrein がリン酸化 PKC $\alpha/\beta$ II の発現に及ぼす影響

mBMMs に RANKL を添加すると, 添加 30 分後に PKC $\alpha/\beta$  II タンパク質のリン酸化が強く誘導された (図 6A)。一方, (+)-Terrein (10 mM) 投与群では PKC $\alpha/\beta$  II タンパク質のリン酸化が有意に抑制されることを確認した (図 6AB, n=3, \*p <0.05)。なお, (+)-Terrein は PKC $\alpha$  のタンパク質発現には影響を及ぼさず, PKC $\delta$  のタンパク質リン酸化にも影響を及ぼさなかった。

#### 5. (+)-Terrein が破骨細胞分化因子の発現に及ぼす影響

(+)-Terrein を添加した mBMMs では, *Ocstamp*, *Dcstamp*, *Calcr*, *Atp6v0d2*, *Oscar*, そして *Itgb3* の mRNA 発現が有意に抑制され, 統計学的な有意差はないものの *c-Fos* の発現も抑制される傾向を示した (図 7, n=3, \*\*p <0.01)。

## 6. (+)-Terrein が骨芽細胞の分化に及ぼす影響

(+)-Terrein が骨芽細胞の分化に及ぼす影響について、MC3T3-E1 細胞を用いて検討した。石灰化評価のためアリザリンレッド染色を、骨形成マーカーであるアルカリホスファターゼ活性を評価するため ALP 染色をそれぞれ実施し、解析した。培養した MC3T3-E1 細胞に(+)-Terrein を投与したところ、石灰化の指標となるアリザリンレッド染色では、非投与群と比較して発色に大きな差はなく、また、ALP による活性染色も促進しなかった。(図 8AB)。一方、陽性対照として用いた Bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) 投与群では、アリザリンレッド染色と ALP 染色ともに、非投与群と比較して強く発色し、活性が促進した。(図 8AB, n=3, \*\*p<0.01)。また、OVX マウスから摘出したサンプルから作製した組織切片を用いて ALP 抗体による免疫組織染色を行い観察したところ、各群の ALP 陽性細胞数について、いずれも統計学的な有意差はなかった (図 8C, n=3)。

## 考察

本研究の結果から、(+)-Terrein が、mBMMs において、RANKL 誘導性の PKC $\alpha$ / $\beta$ II のタンパク質リン酸化および破骨細胞分化因子である *Ocstamp*, *Dcstamp*, *Calcr*, *Atp6v0d2*, *Oscar*, そして *Itg $\beta$ 3* の mRNA 発現を抑制することが明らかとなった。また、OVX マウスモデルにおいて、破骨細胞の分化を抑制し、大腿骨吸収抑制作用を有することが明らかになった。さらに、(+)-Terrein は骨芽細胞の分化に影響を及ぼさないことも明らかになった。

骨の恒常性は、骨芽細胞による骨形成と破骨細胞による骨吸収の連続的な進行によって維持されている<sup>23,24</sup>。破骨細胞の過剰な活性によって、閉経性骨粗鬆症、関節リウマチ、Paget 病、さらには歯周炎など多くの病理学的疾患や骨破壊疾患を引き起こす可能性が示唆されている<sup>25-27</sup>。特に閉経性骨粗鬆症では、女性ホルモンであるエストロゲンの欠乏が破骨細胞分化因子である RANKL の発現亢進、IL-6 や TNF- $\alpha$  を含む炎症性サイトカインの産生亢進をもたらすことが報告されている<sup>28</sup>。また、RANKL シグナル伝達経路の過剰な活性は RANK/TRAF6 の活性化を誘発し、その結果、破骨細胞の分化を促進する<sup>29</sup>。すなわち、RANKL シグナル伝達経路を阻害することが骨破壊疾患治療における主標的となりうる。

今回の *in vivo* 試験において、(+)-Terrein を腹腔内に投与することによって、OVX

マウスの骨密度、骨量、骨梁数が維持されることを確認した (図 3)。また, (+)-Terrein 投与マウス群と非投与マウス群との間で体重変化に大きな差が無いことを確認した (図 5A)。一方, 血清中の炎症性サイトカイン量は, 既存のビスフォスフォネート製剤の一つである ZOL を投与すると, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , そして M-CSF の産生が有意に亢進したが, (+)-Terrein を投与しても血清中の炎症性サイトカインの産生は亢進しなかった (図 5B)。すなわち, (+)-Terrein は, ZOL に比べて, 生体に対する毒性という観点から安全性が高い可能性が示唆される。

NFATc1 は RANKL 誘導性破骨細胞分化に不可欠な役割を果たす因子である<sup>30)</sup>。NFATc1 は NF- $\kappa$ B, MAPKs (ERK1/2, p38MAPK), さらに Ca<sup>2+</sup>/カルシニューリンシグナル伝達経路の下流で機能し<sup>31-34)</sup>, NFATc1 の活性化は, 破骨細胞分化における関連遺伝子である *Atp6v0d2* (V-ATPase-d2), *Itgb3* (Integrin  $\beta$ 3), *Acp5* (TRAP), そして *Ctsk* (Cathepsin-K) の発現を制御することが知られている<sup>35)</sup>。所属研究グループは, (+)-Terrein が NFATc1 とその下流の骨吸収関連遺伝子の発現を阻害することで, RANKL 誘導性破骨細胞分化ならびに骨吸収を抑制することを明らかにした<sup>14)</sup>。その一方で, (+)-Terrein は RANKL による NF- $\kappa$ B と MAPKs (ERK1/2 および p38MAPK) のリン酸化を抑制しないことも明らかにしている<sup>14)</sup>。本研究では, (+)-Terrein が RANKL によって誘導される Ca<sup>2+</sup>/カルシニューリンシグナル伝達経路に存在する古典的な PKC 経

路<sup>36)</sup>の一つである PKC $\alpha$ / $\beta$ II のタンパク質リン酸化を抑制することが明らかになった (図 6)。すなわち, (+)-Terrein は NF- $\kappa$ B や MAPKs のタンパク質リン酸化は抑制しないが, PKC $\alpha$ / $\beta$ II のタンパク質リン酸化を抑制することで破骨細胞の分化を阻害する可能性が示唆され, Ca<sup>2+</sup>の動態に着目する新たな破骨細胞分化阻害メカニズムの解明につながる可能性がある。

また, 骨粗鬆症の病態を考慮すると, 骨量を維持するために重要な骨芽細胞に対する影響も検討する必要がある。本研究では, (+)-Terrein の骨芽細胞の分化に対する影響を *in vitro* および *in vivo* において検討したところ, (+)-Terrein は骨芽細胞の分化に影響しないことが明らかとなった (図 8)。すなわち, (+)-Terrein は骨芽細胞の石灰化 (分化) には影響を示さず, 破骨細胞のみに影響して骨代謝を制御する可能性が示唆された。

今後, (+)-Terrein の骨吸収疾患への治療薬として応用するためには, ビスフォスフォネート製剤などの既存の骨粗鬆症治療薬と比較して, (+)-Terrein の有効性を証明する必要がある。ビスフォスフォネート製剤の半減期の長さは, 骨粗鬆症治療における問題点の一つである。また, 骨硬化を過度に増加させると, 逆に骨折のリスクが高まる。(+)Terrein は低分子であるため, ビスフォスフォネート製剤よりも半減期が短い可能性が考えられる。そのため, 初期の骨粗鬆症患者に対しては, 骨硬化を過度に増

加させるリスクがあるビスフォスフォネート製剤を投与するのではなく、適度に骨吸収抑制効果が期待される(+)-Terrein を投与するといった新たな治療戦略への応用が期待される。今後は、実用化を検討する上で、(+)-Terrein の代謝を含めた安全性の検証がさらに必要である。

## 結論

本研究では、(+)-Terrein が RANKL 誘導性の PKC $\alpha$ / $\beta$ II のタンパク質リン酸化を抑制することによって破骨細胞分化を抑制し、骨芽細胞の代謝に影響することなく、卵巣摘出骨粗鬆症モデルマウスにおける大腿骨骨量の減少を抑制することを明らかにした。本研究結果は、骨粗鬆症を含む骨吸収疾患の治療における抗骨吸収治療薬としての(+)-Terrein の可能性について新たな知見を提供するものである。

## 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、終始ご指導賜り、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、(+)-Terrein を恵与下さった岡山大学大学院自然科学研究科合成プロセス化学研究室の菅誠治教授、萬代大樹助教（現岐阜医療科学大学薬学部薬学科准教授）、ならびに歯周病態学分野の諸先生方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 62 回日本歯周病学会秋季学術大会（2019 年 11 月，北九州）
- ・ 第 153 回日本歯科保存学会秋季学術大会（2020 年 11 月，web 開催）

## 参考文献

- 1) 骨粗鬆症の予防と治療ガイドライン作成委員会. 骨粗鬆症の予防と治療ガイドライン 2015 年版. [http://www.josteo.com/ja/guideline/doc/15\\_1](http://www.josteo.com/ja/guideline/doc/15_1) (accessed 2017.10.20)
- 2) Rachner TD, Khosla S, Hofbauer LC. New horizons in osteoporosis. *Lancet* **377**: 1276-87, 2011.
- 3) Schroder K. NADPH oxidases in bone homeostasis and osteoporosis. *Free Radic Biol Med* **132**: 67-72, 2019.
- 4) Shibahara T, Morikawa T, Yago K, Kishimoto H, Imai Y, Kurita K. National survey on bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws in Japan. *J Oral Maxillofac Surg* **76**: 2105-2112, 2018.
- 5) Yoneda T, Hagino H, Sugimoto T, Ohta H, Takahashi S, Soen S, Taguchi A, Nagata T, Urade M, Shibahara T, Toyosawa S. Antiresorptive agent-related osteonecrosis of the jaw: Position Paper 2017 of the Japanese Allied Committee on Osteonecrosis of the Jaw. *J Bone Miner Metab* **35**: 6-19, 2017.
- 6) Yoneda T, Hagino H, Sugimoto T, Ohta H, Takahashi S, Soen S, Taguchi A, Toyosawa S, Nagata T, Urade M. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: position paper from the allied task force committee of Japanese Society for Bone and Mineral Research, Japan

- Osteoporosis Society, Japanese Society of Periodontology, Japanese Society for Oral and Maxillofacial Radiology, and Japanese Society of Oral and Maxillofacial Surgeons. *J Bone Miner Metab* **28**: 365-83, 2010.
- 7) Nasu I, Nakamura T. An age-period-cohort analysis of the number of permanent teeth among Japanese population based on the surveys of dental diseases. *老年歯医* **31**: 39-50, 2016.
  - 8) Raistrick H, Smith G. Studies in the biochemistry of micro-organisms. *Biochem. J.* **29**: 606-11, 1935.
  - 9) Kim B, Park JS, Choi HY, Yoon SS, Kim WG. Terrein is an inhibitor of quorum sensing and c-di-GMP in *Pseudomonas aeruginosa*: a connection between quorum sensing and c-di-GMP. *Sci Rep* **8**: 8617, 2018.
  - 10) Arakawa M, Someno T, Kawada M, Ikeda D. A new terrein glucoside, a novel inhibitor of angiogenin secretion in tumor angiogenesis. *J Antibiot (Tokyo)* **61**: 442-8, 2008.
  - 11) Lee JC, Yu MK, Lee R, Lee YH, Jeon JG, Lee MH, Jhee EC, Yoo ID, Yi HK. Terrein reduces pulpal inflammation in human dental pulp cells. *J Endod* **34**: 433-7, 2008.
  - 12) Mandai H, Omori K, Yamamoto D, Tsumura T, Murota K, Yamamoto S, Mitsudo K, Ibaragi S, Sasaki A, Maeda H, Takashiba S, 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**: 5338-44, 2014.
- 13) Yamamoto S, Omori K, Mandai H, Nakayama M, Nakagawa S, Kobayashi H, Kunimine T, Yoshimura H, Sakaida K, Sako H, Ibaragi S, Yamamoto T, Maeda H, Suga S, Takashiba S. Fungal metabolite (+)-terrein suppresses IL-6/sIL-6R-induced CSF1 secretion by inhibiting JAK1 phosphorylation in human gingival fibroblasts. *Heliyon* **4**: 11, 2018.
- 14) Nakagawa S, Omori K, Nakayama M, Mandai H, Yamamoto S, Kobayashi H, Sakaida K, Sako H, Yoshimura H, Ishii S, Ibaragi S, Hirai K, Yamashiro K, Yamamoto T, Suga S, Takashiba S. The fungal metabolite (+)-terrein abrogates osteoclast differentiation via suppression of the RANKL signaling pathway through NFATc1. *Int Immunopharmacol* **83**: 106429, 2020.
- 15) Thompson DD, Simmons HA, Pirie CM, Ke HZ. FDA Guidelines and animal models for osteoporosis. *Bone* **17**: 125-133, 1995.
- 16) Xu L, Zhang L, Wang Z, Li C, Li S, Li L, Fan Q, Zheng L. Melatonin suppresses estrogen deficiency-induced osteoporosis and promotes osteoblastogenesis by inactivating the NLRP3 Inflammasome. *Calcif Tissue Int* 2018.

- 17) Xiao Z, He J, Su G, Chen M, Hou Y, Chen S, Lin D. Osteoporosis of the vertebra and osteochondral remodeling of the endplate causes intervertebral disc degeneration in ovariectomized mice. *Arthritis Res Ther* **20**: 207, 2018.
- 18) Tevlin R, McArdle A, Chan CK, Pluvinage J, Walmsley GG, Wearda T, Marecic O, Hu MS, Paik KJ, Kshemendra SY, Atashroo DA, Zielins ER, Wan DC, Weissman IL, Longaker MT. Osteoclast derivation from mouse bone marrow. *J Vis Exp* **6**: 2014.
- 19) Horibe K, Nakamichi Y, Uehara S, Nakamura M, Koide M, Kobayashi Y, Takahashi N, Udagawa N. Roles of cathelicidin-related antimicrobial peptide in murine osteoclastogenesis. *Immunology* **140**: 344-351, 2013.
- 20) Schindeler A, Morse A, Peacock L, Mikulec K, Yu NYC, Liu R, Kijumnuayporn S, McDonald MM, Baldock PA, Ruys AJ, Little DG. Rapid cell culture and pre-clinical screening of a transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) inhibitor for orthopaedics. *BMC Musculoskelet Disord* **11**: 105, 2010.
- 21) Omori K, Naruishi K, Nishimura F, Yamada-Naruishi H, 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

- 22) Bradford MM. 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.
- 23) Matsuo K, Irie N. Osteoclast–osteoblast communication. *Arch Biochem Biophys* **473**: 201-209, 2008.
- 24) Matsuoka K, Park K, Ito M, Ikeda K, Takeshita S. Osteoclast - derived complement component 3a stimulates osteoblast differentiation. *J Bone Miner Res* **29**: 1522-1530, 2014.
- 25) Wakchoure S, Swain TM, Hentunen TA, Bauskin AR, Brown DA, Breit SN, Vuopala KS, Harris KW, Selander KS. Expression of macrophage inhibitory cytokine-1 in prostate cancer bone metastases induces osteoclast activation and weight loss. *Prostate* **69**: 652-661, 2009.
- 26) Kumar RA, Li Y, Dang Q, Yang F. Monocytes in rheumatoid arthritis: Circulating precursors of macrophages and osteoclasts and, their heterogeneity and plasticity role in RA pathogenesis. *Int Immunopharmacol* **65**: 348-359, 2018.
- 27) Zaidi M. Skeletal remodeling in health and disease. *Nat Med* **13**: 791-801, 2007.
- 28) Lin H, Wang X, Mo Y, Lin C, Xu N, Huang F, Chen Y. Acupuncture for primary osteoporosis: evidence, potential treatment prescriptions, and mechanisms. *Evid Based Complement Alternat Med*: 2019.

- 29) Chen X, Li X, Zhai X, Zhi X, Cao L, Qin L, Su J. Shikimic acid inhibits osteoclastogenesis in vivo and in vitro by blocking RANK/TRAF6 association and suppressing NF- $\kappa$ B and MAPK signaling pathways. *Cell Physiol Biochem* **51**: 2858-2871, 2018.
- 30) Asagiri M, Takayanagi H. The molecular understanding of osteoclast differentiation. *Bone* **40**: 251-64, 2007.
- 31) Takayanagi H, Kim S, Koga T, Nishina H, Isshiki M, Yoshida H, Saiura A, Isobe M, Yokochi T, Inoue J, Wagner EF, Mak TW, 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.
- 32) Liu Y, Shepherd EG, Nelin LD. MAPK phosphatases—regulating the immune response. *Nat Rev Immunol* **7**: 202-12, 2007.
- 33) Miyazaki T, Katagiri H, Kanegae Y, Takayanagi H, Sawada Y, Yamamoto A, Pando MP, Asano T, Verma IM, Oda H, Nakamura K, and Tanaka S. Reciprocal role of ERK and NF- $\kappa$ B pathways in survival and activation of osteoclasts. *J Cell Biol* **148**: 333-42, 2000.
- 34) Negishi-Koga T, Takayanagi H. Ca<sup>2+</sup>-NFATc1 signaling is an essential axis of osteoclast differentiation. *Immunol Rev* **231**: 241-56, 2009.

- 35) Crotti TN, Sharma SM, Fleming JD, Flannery MR, Ostrowski MC, Goldring SR, Mchugh KP. PU.1 and NFATc1 mediate osteoclastic induction of the mouse beta3 integrin promoter. *J Cell Physiol* **215**: 636-44, 2008.
- 36) Yao J, Li J, Zhou L, Cheng J, Chim SM, Zhang G, Quinn JMW, Tickner J, Zhao J, Xu J. Protein kinase C inhibitor, GF109203X attenuates osteoclastogenesis, bone resorption and RANKL-Induced NF- $\kappa$ B and NFAT activity. *J Cell Physiol* **230**: 1235-1242, 2015.

## 表の説明

表 1. 本研究で用いたプライマー

標的遺伝子	塩基配列	増幅 DNA 長 (bp)
<i>Ocstamp</i>	F: 5'-TTACCCACTGTCCCAATCACAC-3'	113
	R: 5'-ATGGAGGCAAACACGCTCTC-3'	
<i>Dcstamp</i>	F: 5'-TGTGGACTATCTGCTGTATCGG-3'	122
	R: 5'-AATCATGGACGACTCCTTGGG-3'	
<i>Calcr</i>	F: 5'-TGCAGACAACCTTTGGTTGG-3'	194
	R: 5'-TCGGTTTCTTCTCCTCTGGA-3'	
<i>Atp6v0d2</i>	F: 5'-TCAGATCTCTTCAAGGCTGTGCTG-3'	248
	R: 5'-GTGCCAAATGAGTTCAGAGTGATG-3'	
<i>Oscar</i>	F: 5'-CTGCTGGTAACGGATCAGCTCCCCAGA-3'	310
	R: 5'-CCAAGGAGCCAGAACCTTCGAAACT-3'	
<i>Trap (Acp5)</i>	F: 5'-ATGCCAGCGACAAGAGGTTC-3'	94
	R: 5'-TGGTTTCCAGCCAGCACATAC-3'	
<i>Cathepsin-K</i>	F: 5'-TGACCACTGCCTTCCAATACG-3'	120
	R: 5'-TGCATTTAGCTGCCTTTGCC-3'	
<i>Itgb3</i>	F: 5'-TGTGTGCCTGGTGCTCAGA-3'	70
	R: 5'-AGCAGGTTCTCCTTCAGGTTACA-3'	
<i>c-Fos</i>	F: 5'-CCAGTCAAGAGCATCAGCAA-3'	247
	R: 5'-AAGTAGTGCAGCCCGGAGTA-3'	
<i>β-actin</i>	F: 5'-GGCTGTATTCCCCTCCATCG-3'	154
	R: 5'-CCAGTTGGTAACAATGCCATGT-3'	

\* *Ocstamp*: osteoclast stimulatory transmembrane protein, *Dcstamp*: dendritic cell-specific transmembrane protein, *Calcr*: calcitonin receptor, *Atp6v0d2*: v-type protein ATPase subunit d2, *Oscar*: osteoclast-associated receptor, *Trap*: tartrate-resistant acid phosphatase, *Itgb3*: integrin β3. F : forward primer, R : Reverse primer

## 図の説明

### 図 1. (+)-Terrein の構造式

Me : メチル基。

### 図 2. 動物実験のタイムスケジュール

8 週齢の C57BL/6 野生型雌性マウスに卵巣摘出術を施行し、無作為に 4 群に分けた。卵巣摘出術の 2 週間後（10 週齢時）に、それぞれ① (+)-Terrein（10 mg/kg）、② (+)-Terrein（30 mg/kg）、③ PBS（陰性対照）、④ ゴレドロン酸（ZOL, 0.1 mg/kg, 陽性対照）を投与した。また、両側卵巣摘出術に対する陰性対照として、⑤ Sham（偽手術）群を設定した。ゴレドロン酸の投与量は骨粗鬆症患者に対するヒト投与量をマウスの体重に換算し決定した。それぞれを週 2 回腹腔内投与した。卵巣摘出から 8 週間後、マウスを安楽死させ、大腿骨および血清を採取し解析を行った。

### 図 3. 閉経性骨粗鬆症による大腿骨吸収のマイクロ CT 像

#### (A) 大腿骨の 3D モデル（冠状断）

撮影したマイクロ CT 画像から、成長板（大腿骨骨折の好発部位）の直下 3 mm の範囲で 3D モデルを作製した。各群における代表的な骨吸収像（n=3-4）を示

す。Sham : PBS を投与した非骨粗鬆症（偽手術）マウス群，OVX : PBS を投与した骨粗鬆症マウス群，OVX+TER : (+)-Terrein (30 mg/kg) を投与した骨粗鬆症マウス群，OVX+ZOL : ズレドロン酸を投与した骨粗鬆症マウス群。

PBS を投与した OVX マウスでは，PBS を投与した sham マウスに対して大腿骨吸収の亢進が確認された。(+)Terrein を投与した OVX マウスは，PBS を投与した OVX マウスに対して，大腿骨の吸収が抑制された像がみられた。ズレドロン酸を投与した OVX マウスでは，過度な骨量増加を確認した。

## (B) 3D モデル解析結果

3D モデルをもとに骨密度 (BMD, mg/cm<sup>3</sup>)，骨量 (BV/TV, %)，骨梁数 (Tb.N, 1/μm)，骨梁空隙 (Tb.Sp., μm) を測定した。エラーバー：標準偏差。Sham : PBS を投与した非骨粗鬆症（偽手術）マウス群，OVX : PBS を投与した骨粗鬆症マウス群，OVX+TER : (+)-Terrein (10, 30 mg/kg) を投与した骨粗鬆症マウス群。

PBS を投与した OVX マウスでは，PBS を投与した sham マウスに対して大腿骨の骨密度，骨量，骨梁数が有意に減少し，骨梁空隙は増加した。(+)Terrein を投与した OVX マウスは，PBS を投与した OVX マウスに対して大腿骨の骨密度，骨量，骨梁数が有意に維持された (n=6-7, \*\*p<0.01, \*p<0.05, ANOVA/Tukey-

Kramer Test)。

#### 図 4. 大腿骨組織像および破骨細胞数

##### (A-C) 卵巣摘出後 8 週 (16 週齢時) の組織像

各群における (A) HE 染色像, (B) TRAP (破骨細胞) 染色像, および (C) IHC 染色像 (抗 cathepsin-K 抗体: 破骨細胞の分化マーカー) (n=3) の代表例を示す。染色像の黒線枠内で囲んだ部位の拡大像を下段に示す。画像横の数字: 拡大率, スケールバー: 100  $\mu\text{m}$  (拡大率 200 倍時)。Sham: PBS を投与した非骨粗鬆症 (偽手術) マウス群, OVX: PBS を投与した骨粗鬆症マウス群, OVX + TER: (+)-Terrein (30 mg/kg) を投与した骨粗鬆症マウス群, OVX + ZOL: ゼロドロン酸を投与した骨粗鬆症マウス群。

HE 染色において, PBS を投与した sham マウス群, PBS を投与した OVX マウス群, (+)-Terrein (30 mg/kg) を投与した OVX マウス群では, 骨組織に炎症像は観察されなかった。PBS を投与した OVX マウスでは, PBS を投与した sham マウスに対して, 成長板直下の骨吸収が観察された。(+)-Terrein を投与した OVX マウスでは, PBS を投与した OVX マウスに対して, 成長板直下の骨吸収が抑制された。TRAP 染色において, PBS を投与した OVX マウスでは, PBS を

投与した sham マウスに対して、破骨細胞数が増加した。(+)Terrein を投与した OVX マウスでは、PBS を投与した OVX マウスに対して、破骨細胞数が減少した像がみられた。IHC 染色において、PBS を投与した OVX マウスでは、PBS を投与した sham マウスに対して、Cathepsin-K 陽性細胞数が増加した。(+)Terrein を投与した OVX マウスでは、PBS を投与した OVX マウスに対して、Cathepsin-K 陽性細胞数が減少した。

#### (D) 破骨細胞数の比較

TRAP 染色陽性かつ 3 核以上を有する細胞を破骨細胞と定義し、成長板の直下 3mm の範囲の破骨細胞数を計測した (n=3, 平均 ± 標準偏差)。エラーバー：標準偏差。Sham : PBS を投与した非骨粗鬆症 (偽手術) マウス群, OVX : PBS を投与した骨粗鬆症マウス群, OVX+TER : (+)-Terrein (30 mg/kg) を投与した骨粗鬆症マウス群。

PBS を投与した OVX マウスでは、PBS を投与した sham マウスと (+)-Terrein を投与した sham マウスに対して、破骨細胞数が有意に増加した。(+)Terrein を投与した OVX マウスでは、PBS を投与した OVX マウスに対して、破骨細胞数が有意に減少した。 (\*\*p < 0.01, ANOVA/Tukey-Kramer test)

#### (E) Cathepsin-K 陽性細胞数の比較

IHC 染色（抗 Cathepsin-K 抗体：破骨細胞の分化マーカー）陽性かつ核周囲が濃染されている細胞を Cathepsin-K 陽性細胞と定義し，成長板（大腿骨骨折の好発部位）の直下 3mm の範囲の Cathepsin-K 陽性細胞数を計測した（n=3，平均 ± 標準偏差）。エラーバー：標準偏差。Sham：PBS を投与した非骨粗鬆症（偽手術）マウス群，OVX：PBS を投与した骨粗鬆症マウス群，OVX+TER：(+)-Terrein（30 mg/kg）を投与した骨粗鬆症マウス群。

PBS を投与した OVX マウスでは，PBS を投与した sham マウスと(+)-Terrein を投与した sham マウスに対して，Cathepsin-K 陽性細胞数が有意に増加した。(+)Terrein を投与した OVX マウスでは，PBS を投与した OVX マウスに対して，Cathepsin-K 陽性細胞数が有意に減少した（\*p < 0.05, ANOVA/Tukey-Kramer test）。

## 図 5. (+)- Terrein の生体安全性

### (A) 体重への影響

各マウス群における，実験開始から 7 日後および 14 日後までの体重変化を観察した（n=4-7，平均 ± 標準偏差）。エラーバー：標準偏差。Sham：PBS を投与した非骨粗鬆症（偽手術）マウス群，OVX：PBS を投与した骨粗鬆症マウス群，OVX+TER：(+)-Terrein（10, 30 mg/kg）を投与した骨粗鬆症マウス群，OVX

+ZOL：ゾレドロン酸を投与した骨粗鬆症マウス群。

(+)-Terrein 投与マウスは，PBS 投与マウスと比較して，実験開始 2，5，8 週後に明らかな体重の変化はみられなかった。

#### (B-E) 血清中の炎症性サイトカイン濃度への影響

血清中の炎症性サイトカイン濃度を ELISA 法で定量した (n=3-4, 平均 ± 標準偏差)。エラーバー：標準偏差。Sham：PBS を投与した非骨粗鬆症 (偽手術) マウス群，OVX：PBS を投与した骨粗鬆症マウス群，OVX+TER：(+)-Terrein (10, 30 mg/kg) を投与した骨粗鬆症マウス群，OVX+ZOL：ゾレドロン酸を投与した骨粗鬆症マウス群。

PBS を投与した sham マウス，PBS を投与した sham マウス，(+)-Terrein を投与した sham マウスを比較すると，血清中の (B) TNF- $\alpha$ ，(C) IL-1 $\beta$ ，(D) IL-6，(E) M-CSF の濃度に有意差は確認されなかった。また，ゾレドロン酸を投与した OVX マウス群では，PBS を投与した sham マウス，PBS を投与した OVX マウス，(+)-Terrein を投与した OVX マウスに対して，血清中 TNF- $\alpha$ ，IL-1 $\beta$ ，M-CSF の濃度は有意に上昇した (それぞれ \*p < 0.05, ANOVA/Tukey-Kramer test)。統計学的な有意差がなかったものの，血清中 IL-6 の濃度についても上昇する傾向が確認された。

## 図 6. (+)-Terrein がリン酸化 PKC $\alpha$ / $\beta$ II のタンパク質産生に及ぼす影響

mBMMs は  $1.0 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup> の細胞密度で播種し, (+)-Terrein (10  $\mu$ M) を分化誘導開始と同時に添加した。細胞播種し 10-30 分後に回収したタンパク質中のリン酸化 PKC $\alpha$ / $\beta$ II, リン酸化 PKC $\delta$ および PKC $\alpha$ の産生量はウエスタンブロット法で検討した。

(A) リン酸化 PKC $\alpha$ / $\beta$ II, リン酸化 PKC $\delta$ , PKC $\alpha$ のウエスタンブロッティング像

(B) 相対黒化度で示したリン酸化 PKC $\alpha$ / $\beta$ II およびリン酸化 PKC $\delta$ の産生量

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 mBMMs を用いた独立した 3 回の実験の平均値を示す。エラーバー: 標準偏差。

RANKL を添加し, 30 分後の時点で PKC $\alpha$ / $\beta$ II のリン酸化が強く誘導されるのに対し, (+)-Terrein (10  $\mu$ M) を添加すると, PKC $\alpha$ / $\beta$ II のリン酸化が有意に抑制された。PKC $\delta$ のリン酸化は抑制されなかった (\* $p$  < 0.05, ANOVA/Tukey-Kramer test)。

## 図 7. (+)-Terrein が破骨細胞分化因子の遺伝子発現に及ぼす影響

mBMMs は  $1.0 \times 10^5$  cells/ cm<sup>2</sup> の細胞密度で播種し, (+)-Terrein (10 μM) 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 mRNA を用いて, 破骨細胞分化因子である (A) *Ocstamp*, (B) *Dcstamp*, (C) *Calcr*, (D) *Atp6v0d2*, (E) *Oscar*, (F) *Trap (Acp5)*, (G) *Cathepsin-K*, (H) *Itgb3*, (I) *C-Fos* 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β-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 mBMMs を用いた独立した 3 回の実験の平均値を示す。エラーバー : 標準偏差。

RANKL を添加し破骨細胞分化を誘導すると, それぞれの遺伝子発現が強く誘導されるのに対し, RANKL を添加と同時に(+)-Terrein を添加すると, *Ocstamp*, *Dcstamp*, *Calcr*, *Atp6v0d2*, *Oscar*, *Trap (Acp5)*, *Cathepsin-K*, *Itgb3* の遺伝子発現は有意に抑制された。*C-Fos* の発現量に有意差はなかったものの, 同様の傾向を示した (\*\*p < 0.01, ANOVA/Tukey-Kramer test)。

#### 図 8. (+)-Terrein が骨芽細胞分化に及ぼす影響

MC3T3-E1 細胞は  $1.0 \times 10^5$  cells/ cm<sup>2</sup> の細胞密度で播種し, (+)-Terrein (10 μM) を分化誘導開始と同時に添加した。添加 21 日後にアリザリンレッド染色および ALP 染色を実施した。

### (A) 骨芽細胞染色像

アリザリンレッド：アリザリンレッド染色像，ALP：アルカリホスファターゼ染色像。

いずれも BMP-2 投与群（陽性対照）で強く発色した。(+)Terrein の添加は発色に影響を及ぼさなかった。

### (B) 石灰化および ALP 活性評価

吸光度を測定し活性をそれぞれ評価した。Alizarin Red：アリザリンレッド活性，ALP：アルカリホスファターゼ活性。

アリザリンレッド染色において，BMP-2 投与群（陽性対照）では有意にカルシウムの沈着を確認した。また ALP 染色において，BMP-2 投与群（陽性対照）では有意に活性の増加を確認した。(+)Terrein の添加は石灰化および活性に影響を及ぼさなかった。

### (C) 大腿骨における ALP 活性評価

各群における IHC 染色像（抗 ALP 抗体：骨形成マーカー）（n=3-4）の代表例を示す。染色像の黒線枠内で囲んだ部位の拡大像を下段に示す。画像横の数字：拡大率，スケールバー：100  $\mu\text{m}$ （拡大率 200 倍時）。Sham：PBS を投与した非骨粗鬆症（偽手術）マウス群，OVX：PBS を投与した骨粗鬆症マウス群，OVX

+TER : (+)-Terrein (30 mg/kg) を投与した骨粗鬆症マウス群。

PBS を投与した sham マウス, PBS を投与した OVX マウス, (+)-Terrein を投与した OVX マウスを比較したところ, ALP 陽性細胞数に差はなかった。