



|                  |   |
|------------------|---|
| Title            | スタチンは破骨細胞の分化誘導を抑制する   |
| Author(s)        | 蓑崎, 誠治; 吉村, 善隆; 飯村, 忠浩; 山崎, 裕   |
| Citation         | 北海道歯学雑誌, 40(2), 95-104  |
| Issue Date       | 2020-04   |
| Doc URL          | <a href="http://hdl.handle.net/2115/77613">http://hdl.handle.net/2115/77613</a> |
| Type             | article   |
| File Information | 40_02_04.pdf  |



[Instructions for use](#)

原 著

## スダチチンは破骨細胞の分化誘導を抑制する

藁崎 誠治<sup>1)</sup> 吉村 善隆<sup>2)</sup> 飯村 忠浩<sup>2)</sup> 山崎 裕<sup>3)</sup>

抄 録：近年、香酸柑橘類であるスダチの果皮から、ポリメトキシフラボノイドの一つであるスダチチンが発見された。そして、これまでに強力な抗酸化作用を始め、様々な生理活性があることが報告されている。本研究では、スダチチンが破骨細胞の分化誘導系のどの時期に作用しているかを検討するために、スダチチン投与後の破骨細胞数を核数別に測定し、破骨細胞の分化誘導系におけるスダチチンの影響を検討した。TRAP染色にて、総破骨細胞（2核以上）数、核数別の小型破骨細胞（2-7核）数および巨大破骨細胞（8核以上）数を測定した。スダチチンの最終濃度を7.5 $\mu$ Mとし、分化誘導培地にてスダチチンを培養1日目、3日目ともに投与したA群、スダチチンを培養1日目のみに投与したB群、スダチチンを培養3日目のみに投与したC群とスダチチンを投与する日数に場合分けを行い、5日後、同様に破骨細胞数を測定した。B群、C群と比較し、A群の方が破骨細胞の分化誘導を抑制した。B群とC群を比較すると、C群の方が8核以上の巨大破骨細胞の分化誘導を抑制した。次に、スダチチン投与1、3、6、12、24、96時間後の破骨細胞関連遺伝子の発現量をReal-time-PCR法で定量した。その結果、NFATc-1、RANK、CD47、TRAP、and OC-STAMPにおいては有意に発現量の減少が認められた。以上の結果から破骨細胞の分化誘導系においてスダチチンは、分化初期から後期にかけて抑制的に作用していることが示唆された。

キーワード：破骨細胞、ポリメトキシフラボノイド、スダチチン

### 緒 言

超高齢社会において、生活習慣病である骨粗鬆症や歯周病といった骨疾患の患者数は増加しており、骨折による寝たきりや歯の喪失による摂食障害などといったQuality of life (QOL) の低下が問題となっている<sup>1)</sup>。骨は破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成を繰り返し、骨の再構成（リモデリング）を営むことにより形態や機能を維持している。しかし、骨のリモデリングのバランスがホルモンや炎症誘起物質などの様々な因子が原因で崩れることにより、破骨細胞による骨吸収が骨芽細胞による骨形成を上回り、骨粗鬆症や歯周病といった骨量が減少する疾患へとつながる<sup>2-4)</sup>。そのため、破骨細胞は骨疾患の治療における標的細胞として注目されており、破骨細胞を抑制する機能を有する安全性の高い治療薬の開発が期待されている。

破骨細胞は造血幹細胞から分化した単球・マクロファージ系の骨の吸収能を持つ多核巨細胞であり、単核の破骨細

胞前駆細胞同士の融合により形成される<sup>5-8)</sup>。破骨細胞前駆細胞はmacrophage colony-stimulating factor (M-CSF) の受容体であるc-Fmsおよびreceptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand (RANKL) の受容体であるreceptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B (RANK) を発現し、骨芽細胞などからの刺激を受け、破骨細胞分化におけるマスター転写因子であるnuclear factor of activated T cells-cytoplasmic 1 (NFATc-1) の活性化などを通じ、単核の前破骨細胞へと分化する。さらに、前破骨細胞はdendritic cell-specific transmembrane protein (DC-STAMP) やosteoclast stimulatory transmembrane protein (OC-STAMP) などの融合因子を発現し、それらを介して前破骨細胞同士が融合し活性化した多核の成熟破骨細胞へと成長し、骨を吸収していく<sup>9-11)</sup>。最近の研究では、N-アセチルシステイン<sup>12)</sup>やプラチナナノ粒子<sup>13)</sup>などの抗酸化物質が破骨細胞形成を抑制することが報告され、抗酸化物質による破骨細胞への影響が注目されている。

<sup>1)</sup> 〒060-8586 札幌市北区北13条西7丁目  
北海道大学大学院歯学研究科 口腔健康科学講座 高齢者歯科学教室（主任：山崎 裕 教授）

<sup>2)</sup> 〒060-8586 札幌市北区北13条西7丁目  
北海道大学大学院歯学研究院 口腔病態学分野 薬理学教室（主任：飯村 忠浩 教授）

<sup>3)</sup> 〒060-8586 札幌市北区北13条西7丁目  
北海道大学大学院歯学研究院 口腔健康科学分野 高齢者歯科学教室（主任：山崎 裕 教授）

植物の天然有機化合物であるフラボノイドは植物の葉、莖、幹などに含まれ、抗酸化作用に加え、抗がん作用<sup>14)</sup>、老化防止作用<sup>15, 16)</sup>、抗炎症作用<sup>17)</sup>、など様々な効果があると報告され、その中でもフラボノイドの抗酸化能が破骨細胞形成や炎症性骨疾患などに及ぼす影響についても様々な報告がされてきた<sup>17-22)</sup>。

そして、近年、香酸柑橘類であるスダチの果皮から、ポリメトキシフラボノイドの一つであるスダチチンが発見された。スダチチンはこれまでに強力な抗酸化作用<sup>23)</sup>に加えて、骨格筋における糖代謝および脂質代謝を改善させる作用<sup>24)</sup>やBALB/cマウスにおいて抗原特異的な細胞性および体液性免疫応答を増強させる作用<sup>25)</sup>、歯周靭帯細胞におけるmatrix metalloproteinase-1 (MMP-1) およびMMP-3の産生を阻害する作用<sup>26)</sup>、さらにはRAW246.7細胞におけるリポ多糖誘発性炎症反応を抑制する作用<sup>27)</sup>などが報告された。しかし、破骨細胞の分化誘導系において破骨細胞の動態を確認した報告はない。本研究では、スダチチン投与後の破骨細胞数を核数別に測定することで、スダチチンが破骨細胞の分化誘導系に与える影響を検討することを目的とした。また、Real-time-PCRを用いて破骨細胞関連遺伝子の発現に対するスダチチンの影響を検討した。

## 材料と方法

### 1. 細胞の培養

BALB/cマウス腹水由来の単球マクロファージ細胞株であるRAW246.7細胞 (RAW細胞: ATCC no. TIB-71TM; Manassas, VA, USA) を破骨細胞の前駆細胞として使用した。RAW細胞はRANKを発現しており、M-CSFの刺激を受けなくてもRANKLの刺激のみで破骨細胞に分化する特徴がある<sup>28)</sup>。10%牛胎児血清 (Hyclone Laboratories, UT, USA) と66.7 μg/ml 硫酸カナマイシン (Meiji Seika, Tokyo, Japan) を含むDulbecco's modified Eagle's 培地 (D-MEM: Wako Pure Chemical, Osaka, Japan) を用いて培養した。細胞は100 mmスタンダードディッシュ (BD Falcon, Franklin Lakes, NJ, USA) 上の培地の中で、37°C、5%CO<sub>2</sub>-95%気相下にて1日培養し、0.48 mM EDTA含有Dulbecco's phosphate-buffered saline (Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> 不含) で洗浄後、ラバースクレーパーを用いて細胞を回収した。24ウェル-マルチウェルプレート (BD Falcon, Franklin Lakes, NJ, USA) のうち、4ウェルに1ウェルあたり1.0×10<sup>4</sup>個の細胞密度で播種した。破骨細胞を誘導するために、細胞を10%牛胎児血清、2 mM L-アラニン-L-グルタミン (Wako Pure Chemical)、284 μM L-アスコルビン酸 2-リン酸 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) を含むα-minimum essential 培地 (α-MEM; Wako Pure Chemical) を用いて37°C、5%CO<sub>2</sub>-95%気相下にて培養した。破骨細胞の分化誘導には、50 ng/ml RANKL

(Oriental Yeast Corp, Tokyo, Japan) を添加した。プレートにRAW細胞を播種した日を培養1日目とし、7日目まで培養を行った後、10%中性ホルマリン溶液にて固定した。また、培養液は培養2日毎に交換した。

### 2. スダチチンの添加

スダチチンの粉末 (Wako Pure Chemical) をエタノールで溶解して2 mMとし、これをストック溶液とした。スダチチンの最終濃度が2.5, 5, 7.5, 10 μMとなるように培養液に添加した。また、スダチチン無添加でエタノールを添加したものをControl群とした。

### 3. 生存細胞数の測定

RAW細胞におけるRANKL無添加での生存細胞数を調べるために、RAW細胞にスダチチンを投与後、Via Light Plus Kit (LONZA, ME, USA) を用いて細胞内ATP (アデノシン三リン酸) の生物発光を検出した。生物発光の検出にはWallac 1420 ARVOsx (Perkin Elmer, MA, USA) を使用した。

### 4. 破骨細胞数の計測

RAW細胞から誘導された破骨細胞の動態を調べるために、24ウェル-マルチウェルプレート上でRAW細胞をRANKL添加培養液を用いて培養した。分化誘導培地にて培養を開始した日から7日目までの間、24時間おきに破骨細胞を10%中性ホルマリンで固定した。破骨細胞を観察するためにfast red violet (Sigma-Aldrich) を用いて酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ (TRAP) 染色を行った。光学顕微鏡にて、総破骨細胞 (2核以上) 数、小型破骨細胞 (2-7核) 数および巨大破骨細胞 (8核以上) 数を測定した。次にスダチチン濃度を7.5 μMに設定し、RANKL添加培養液に投与した。分化誘導培地にてスダチチンを培養1日目、3日目ともに投与したA群 (S, + +)、スダチチンを培養1日目のみに投与したB群 (S, + -)、スダチチンを培養3日目のみに投与したC群 (S, - +) とスダチチンを投与する日数に場合分けを行い (表1)、同様に破骨細胞数を測定した。

### 5. Real-time-PCR

破骨細胞関連遺伝子の発現に対するスダチチンの影響を調査するためにReal-time-PCR法を行った。スダチチン濃度を7.5 μMに設定し、RANKL添加培養液に投与してから1, 3, 6, 12, 24時間後、および96時間後にRNAを回収し、Control群とスダチチンを投与した群の破骨細胞関連遺伝子の発現量を比較した。RNA抽出には, Trizol (Invitrogen, MD, USA) を用いた。逆転写反応にはReverTra Ace reverse transcripase (Toyobo, Osaka, Japan) とOligod (T) primerを用い、cDNAを合成した。Real-time

|     |   |     |               |               |               |
|-----|---|-----|---------------|---------------|---------------|
| 1日目 | RANKL投与<br>A, B<br>スダチチン投与              |     | A<br>(S, + +) | B<br>(S, + -) | C<br>(S, - +) |
| 3日目 | Medium 交換<br>RANKL投与<br>A, C<br>スダチチン投与 | 1日目 | +             | +             | -             |
| 5日目 | Fix : Plate A, B, C                     | 3日目 | +             | -             | +             |

(S, + -)  
S : スダチチン  
+ : スダチチン投与有り  
- : スダチチン投与無し

表1 培養日程

培養1日目, 3日目ともに投与したA群 (S, + +), スダチチンを培養1日目のみに投与したB群 (S, + -), スダチチンを培養3日目のみに投与したC群 (S, - +) とスダチチンを投与する日数に場合分けを行った.

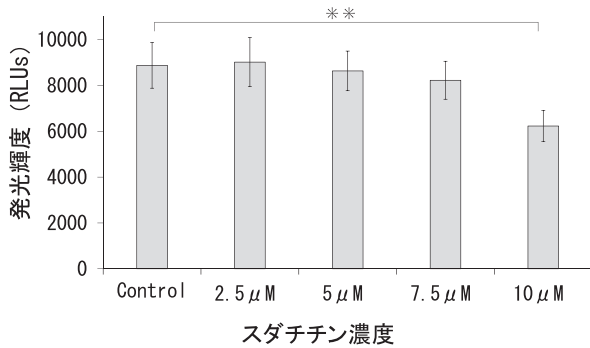


図1 生存細胞数の検出

スダチチンの濃度を2.5, 5, 7.5, 10 μMに設定し, Via Light Plus Kitを用いて細胞内ATPの生物発光を検出した. 生物発光の検出にはWallac 1420 ARVOsxを使用した. スダチチン濃度が10 μM以上の場合, 有意に生存細胞数は低下したため, スダチチンの濃度を7.5 μMに設定した.  
mean ± SD, n = 4, p < 0.01 (\*\*)

-PCRはABI7300 (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA)を用いて増幅産物を測定した. 破骨細胞関連遺伝子の発現量は, Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNAの発現量を用いて標準化した. プライマーは以下のTaq-man® gene expression assay (Applied Biosystems)を使用した. NFATc-1 (Mm01265944\_m1), RANK (Mm00437132\_m1), TRAP (Mm00475698\_m1), CD47 (Mm00495011\_m1), DC-STAMP (Mm04209236\_m1), OC-STAMP (Mm00512445\_m1), およびglyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (Mm99999915\_g1)である. 各サンプルの遺伝子の発現量はGAPDHの発現量を用いて標準化して $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法にて計算した.

## 6. 統計学的分析

Control群とスダチチンを投与した群の2群間における統計処理にはStudent's-t testを用い, 有意水準を $p < 0.05$ とした. また, 3群間以上はBonferroniの多重比較検定により多重比較を行い, 有意水準を $p < 0.05$ とした. グラフは平均値 ± 標準偏差 (S.D.) で示した.

## 結 果

### 1. 生存細胞数の検出

スダチチンの濃度を2.5, 5, 7.5, 10 μMに設定し, Via Light Plus Kitを用いてRAW細胞の細胞内ATPの生物発光を検出した. 生物発光の検出にはWallac 1420 ARVOsxを使用した. スダチチン濃度が10 μM以上の場合, 有意に生存細胞数は低下したため, スダチチンの濃度を7.5 μMに設定した (図1).

### 2. 破骨細胞数の変化

RAW細胞から誘導された破骨細胞の動態を調べるために, 24ウェル-マルチウェルプレート上でRAW細胞をRANKL添加培養液を用いて分化誘導させた. 分化誘導

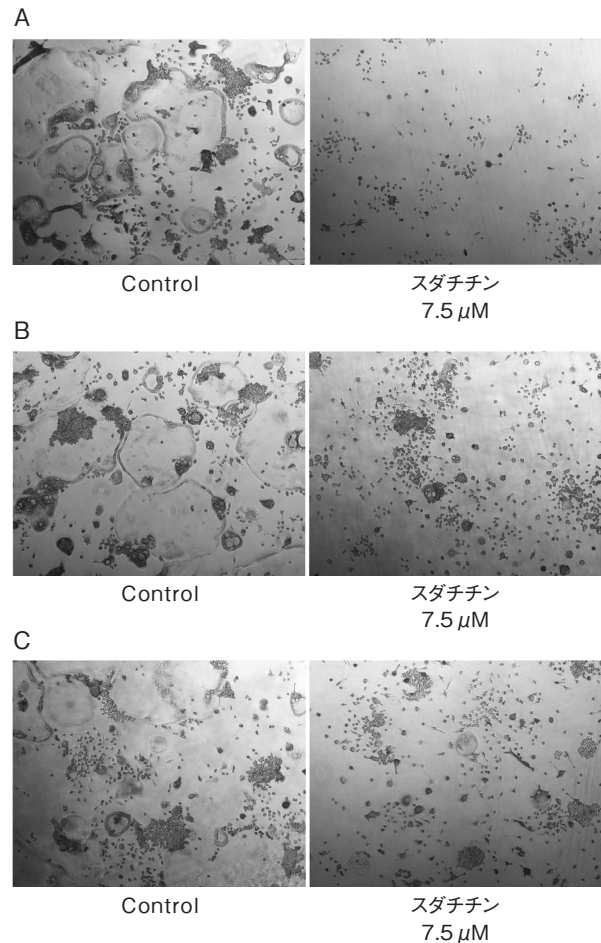


図2 スダチチン添加後の破骨細胞TRAP染色像

- A. スダチチンを1日目, 3日目ともに投与したA群 (S, + +) では, Control群と比較し, スダチチンを投与した方が破骨細胞は少なく観察された.  
B. スダチチンを1日目のみに投与したB群 (S, + -) では, Control群と比較し, 多核の破骨細胞は少なく観察された.  
C. スダチチンを3日目のみに投与したC群 (S, - +) では, Control群と比較し, B群と同様に多核の破骨細胞は少なく観察された.

倍率は40倍

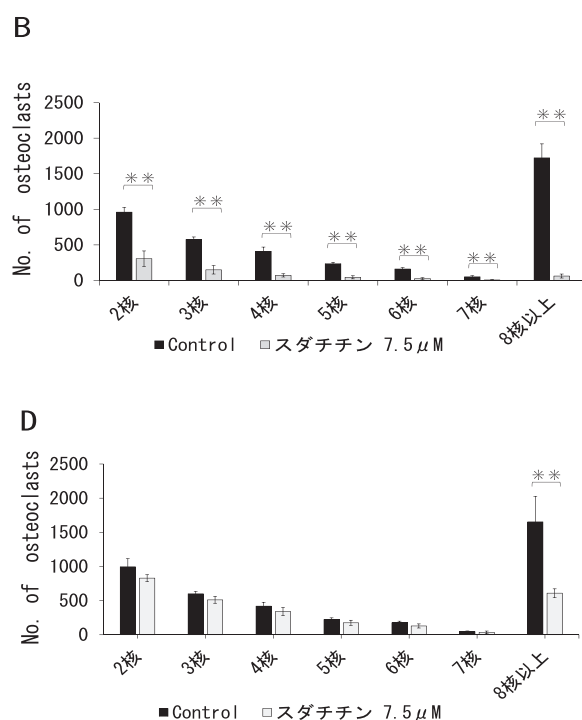
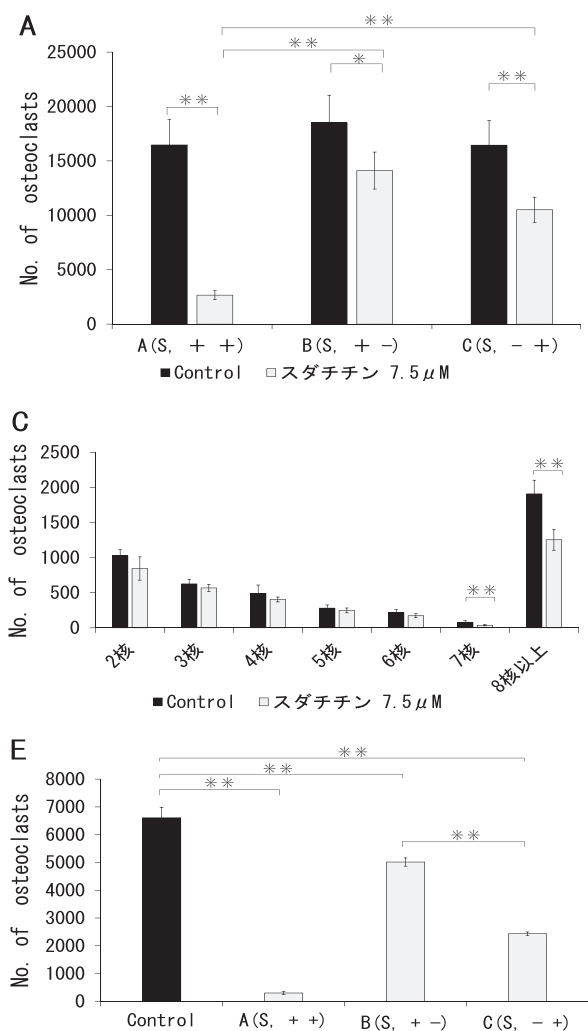


図3 スタチチン添加後の総破骨細胞数および核数別の破骨細胞数  
 A. 培養5日目の総破骨細胞数では、A, B, C群のいずれもControl群と比較し、破骨細胞の分化誘導を有意に抑制した。またA群は、B, C群と比較し、破骨細胞の分化誘導を有意に抑制した。  
 B. スタチチンを1日目、3日目ともに投与したA群(S, + +)における核数別破骨細胞数では、Control群と比較し、すべての核において破骨細胞の分化誘導を有意に抑制した。  
 C. スタチチンを1日目のみに投与したB群(S, + -)における核数別破骨細胞数では、Control群と比較し、8核以上の場合のみ破骨細胞の分化誘導を有意に抑制した。  
 D. スタチチンを3日目のみに投与したC群(S, - +)における核数別破骨細胞数では、Control群と比較し、8核以上の場合のみ破骨細胞の分化誘導を有意に抑制した。  
 E. A, B, C群の培養5日目の8核以上の総破骨細胞数では、Control群と比較すると、B群よりもC群の方が有意に抑制した。

mean ± SD, n=4, p<0.01 (\*\*), p<0.05 (\*)

培地にて培養7日目までの間、24時間おきに破骨細胞を10%中性ホルマリンで固定して、総破骨細胞数および核数別の破骨細胞数を計測した。24ウェル-マルチウェルプレートにRAW細胞を播種した日を培養1日目とした。

スタチチン無添加でRANKLを添加した分化誘導培地を用いて培養した破骨細胞は、2, 3日目から少量観察されるようになり、5日目には全ての核数において最大となり6, 7日目の間に減少傾向を示した。そのため、本実験系においては培養5日目を上限とし実験を行った。また、培養1, 2日目を分化初期, 3, 4日目を分化中期, 5日目を分化後期とした。

次に、スタチチン濃度を7.5 μMに設定し、RANKL添加培養液に投与後、RAW細胞の破骨細胞への分化誘導過程を観察し、分化誘導培地にてスタチチンを培養1日目、3日目ともに投与したA群(S, + +)(図2 A)、スタチチンを培養1日目のみに投与したB群(S, + -)(図2 B)、スタチチンを培養3日目のみに投与したC群(S, - +)(図2 C)、とスタチチンを添加する日数に場合分けを行い、総破骨細胞数(図3 A)および核数別の破骨細胞数(図3 B-D)

を計測した。総破骨細胞数では、A, B, C群のいずれもControl群と比較し、破骨細胞の分化誘導を有意に抑制した。また、A群はB, C群と比較し、破骨細胞の分化誘導を有意に抑制した。核数別の破骨細胞数では、A群はControl群と比較し、すべての核において破骨細胞の分化誘導を有意に抑制した。また、B, C群ではControl群と比較すると、8核以上ではどちらも破骨細胞の分化誘導を有意に抑制した。さらに、8核以上ではB群と比較しC群の方が有意に抑制した(図3 E)。

### 3. 破骨細胞関連遺伝子の発現

破骨細胞関連遺伝子の発現に対するスタチチンの影響を

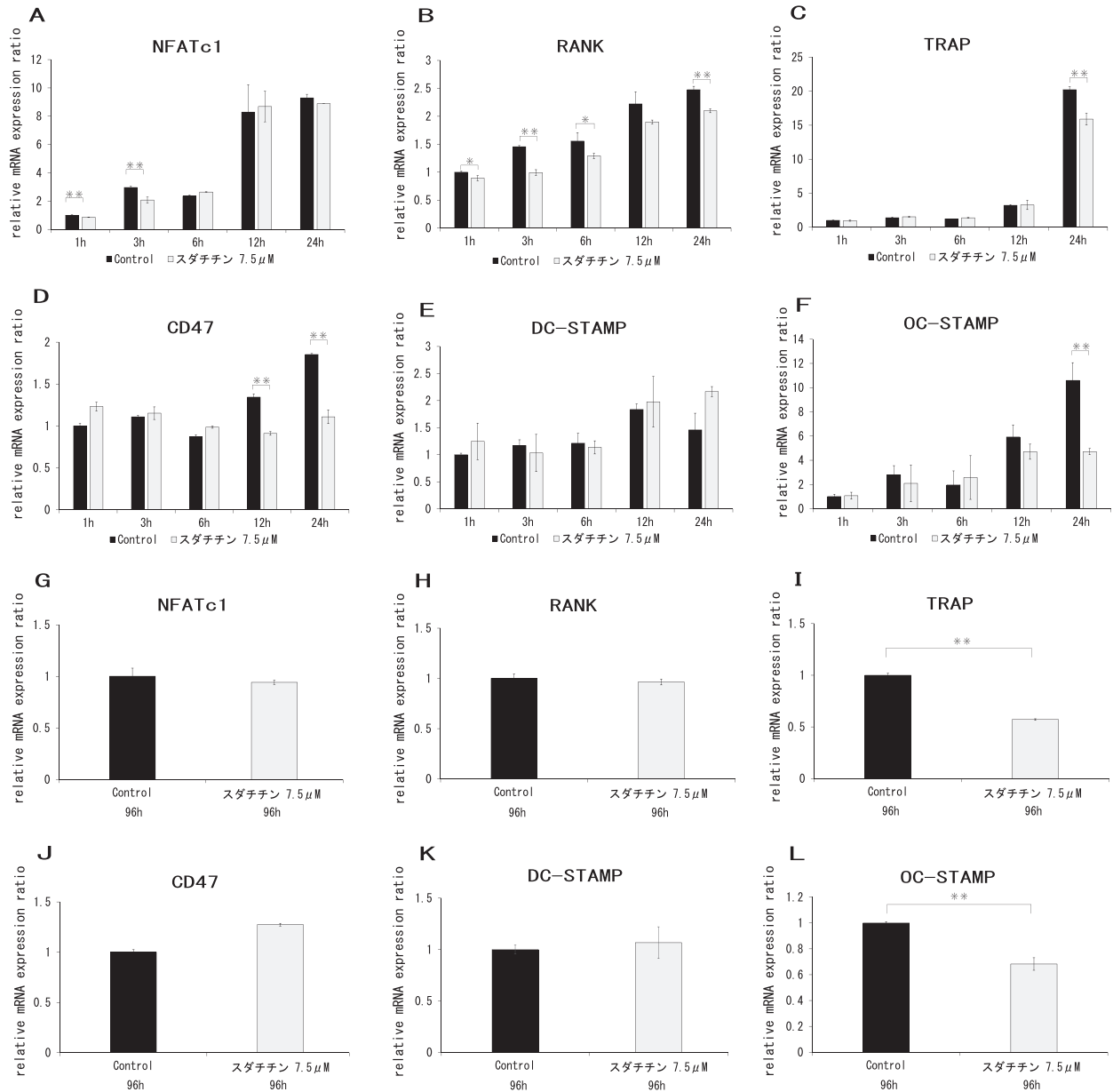


図4 破骨細胞関連遺伝子の発現量の変化

スダチチンをRANKL添加培養液に投与してから1, 3, 6, 12, 24時間(1, 3, 6, 12, 24h)後, および96時間(96h)後にRNAを回収して比較した。1-24hの場合, DC-STAMP(E)以外の破骨細胞関連遺伝子(A-D, F)はいずれかの時間で発現量の減少を認めた。96hの場合, TRAP(I) およびOC-STAMP(L)のみ発現量の減少を認めた。

A-F : mean  $\pm$  SD, n = 4, p < 0.01 (\*\*), p < 0.05 (\*)

G-L : mean  $\pm$  SD, n = 3, p < 0.01 (\*\*)

検討するためにReal-time-PCR法を行った。スダチチン濃度を7.5  $\mu$ Mに設定し, RANKL添加培養液に投与してから1, 3, 6, 12, 24時間後, 及び96時間後にRNAを回収し, Control群とスダチチンを投与した群の破骨細胞関連遺伝子の発現量を比較した。破骨細胞関連遺伝子の中でも, NFATc-1, RANK, TRAP, CD47, DC-STAMP, OC-STAMPについて検討した。NFATc-1はControl群と比較し, スダチチン添加後1時間後, 3時間後の場合, 有意に発現量の減少を認めた(図4 A, G)。RANKはControl

群と比較し, スダチチン投与1時間後, 3時間後, 6時間後, 24時間後の場合, 有意に発現量の減少を認めた(図4 B, H)。TRAPは, Control群と比較し, スダチチン投与24時間後, 96時間後の場合, 有意に発現量の減少を認めた(図4 C, I)。CD47はControl群と比較し, スダチチン投与12時間後, 24時間後の場合, 有意に発現量の減少を認めた(図4 D, J)。DC-STAMPは, Control群と比較し, いずれの時間でも有意差を認めなかった(図4 E, K)。OC-STAMPは, Control群と比較し, スダチチン投与24時間後,

96時間後の場合、有意に発現量の減少を認めた(図4 F, L).

## 考 察

本研究では、スタチチン添加後の破骨細胞数を核数別に測定することにより破骨細胞の動態について観察した。また、破骨細胞関連遺伝子の発現に対するスタチチンの影響を検討した。

まず、スタチチン無添加でRAW細胞をRANKL添加培養液を用いて分化誘導させた。破骨細胞は、3日目から少量観察されるようになり、5日目には全ての核数において最大となり6、7日目の間に減少傾向を示した。破骨細胞は最終分化・融合が完了するとその後はアポトーシスし消滅することが報告されている<sup>29, 30)</sup>。つまり、6、7日目の間に減少傾向を示したことは、破骨細胞の分化・融合とアポトーシスとの関係が5日目をピークとシアポトーシスが有意になったことが示唆された。そのため、本実験系では5日目を上限とした。

次に、スタチチン添加後のRAW細胞の生存細胞数を調べた。本実験系においてスタチチン濃度が10 μMの場合、Control群と比較して生存細胞数は有意に低下したため、スタチチンの濃度を7.5 μMに設定した(図1)。スタチチン投与の濃度を7.5 μMとした場合、スタチチンが破骨細胞の分化誘導のどの時期で作用するか比較検討するために、分化誘導培地にてスタチチンを培養1日目、3日目ともに投与したA群(S, + +)、スタチチンを培養1日目のみに投与したB群(S, + -)、スタチチンを培養3日目のみに投与したC群(S, - +)とスタチチンを投与する日数に場合分けを行い、破骨細胞数を測定した。総破骨細胞数(図3 A)では、A, B, C群のいずれもControl群と比較し、破骨細胞の分化誘導を有意に抑制した。また、A群はB, C群と比較し、破骨細胞の分化誘導を有意に抑制した。核数別の破骨細胞数(図3 B-D)では、A群はControl群と比較し、すべての核において破骨細胞の分化誘導を有意に抑制した。さらに、A, B, C群はControl群と比較し、8核以上では全て破骨細胞の分化誘導を有意に抑制したが、B群と比較しC群の方が有意に抑制した(図3 E)。このことから、スタチチンは破骨細胞の分化誘導過程において特に48時間(3日目)以降に作用していることが示唆された。また、核数別に比較すると8核以上の破骨細胞が顕著に抑制されていたことからスタチチンは破骨細胞の多核化を主に抑制していることが示唆された。

そこで、破骨細胞関連遺伝子の発現に対するスタチチンの影響を検討するために破骨細胞関連遺伝子の発現量をReal-time-PCR法にて定量した。破骨細胞関連遺伝子の中でも、NFATc-1, RANK, TRAP, CD47, DC-STAMP, OC-STAMPについて検討した(図4)。破骨細胞の分化の起点となり、マスター遺伝子といわれているNFATc-1<sup>31)</sup>

はControl群と比較し、スタチチン添加後1時間後、3時間後の場合、有意に発現量の減少を認めたが、それ以降は減少に有意差は認められなかった(図4 A, G)。これはNFATc-1が破骨細胞分化初期にRANKシグナルによって発現レベルが上昇するためと示唆された。破骨細胞前駆細胞が発現するRANKはControl群と比較し、スタチチン投与1時間後、3時間後、6時間後、24時間後と分化初期に有意に発現量の減少を認めた(図4 B, H)。RANKLがRANKに結合するとRANK/RANKLのシグナルが細胞内に伝達され、破骨細胞への分化が強く誘導される<sup>32)</sup>。破骨細胞前駆細胞は分化後期には少なく、相対的にRANKは分化初期に発現量が多いことが示唆される。よってRANKの発現量が減少したことは、スタチチンが破骨細胞の分化初期に作用していることが示唆された。TRAPは、Control群と比較し、スタチチン投与24時間後、96時間後と分化初期から後期にかけて有意に発現量の減少を認めた(図4 C, I)。TRAPは破骨細胞のマーカー遺伝子であり、破骨細胞の増減に関与している。CD47はControl群と比較し、スタチチン投与12時間後、24時間後と分化初期の場合、有意に発現量の減少を認めた(図4 D, J)。LundbergらはCD47欠損マウスにおいて大腿骨破骨細胞は有意に減少したことから、CD47は破骨細胞の融合に関与していると報告している<sup>33)</sup>。また、CD47は単核の前破骨細胞を含む細胞融合を促進すると報告されているため<sup>34)</sup>、今回の結果においても分化初期に発現量が減少したと示唆される。抗酸化物質はROSの生成と破骨細胞形成を抑制することが報告されており、抗酸化物質による破骨細胞への影響が注目されている。破骨細胞の形成や機能にはROSが不可欠であり、RANKL刺激により破骨細胞前駆細胞内ROS濃度は上昇し、ROSは破骨細胞分化を制御すると報告されている<sup>12, 13, 35)</sup>。このことから抗酸化物質であるスタチチンはROS濃度を低下させて破骨細胞分化初期にも作用していることが考えられる。

細胞融合に関与しているDC-STAMP<sup>36)</sup>においては、Control群と比較し、いずれの時間でも今回は有意差を認めなかった(図4 E, K)。逆にOC-STAMPは、Control群と比較し、スタチチン投与24時間後、96時間後と分化初期から後期にかけても有意に発現量の減少を認めた(図4 F, L)。OC-STAMPは破骨細胞の多数核の融合に関与していることが報告されている<sup>37, 38)</sup>。そのため、スタチチンは破骨細胞融合における多核化も有意に抑制していることが示唆された。DC-STAMPおよびOC-STAMPはRANKL刺激によって誘導され、NFATc1によって制御されており、破骨細胞の形成と分化を促進している。どちらも7回膜貫通型タンパク質であり構造上非常に似ていることが報告されている。しかし、DC-STAMPはOC-STAMP欠損単核破骨細胞でも発現し、逆にOC-STAMPはDC-STAMP欠損単核破骨細胞でも通常発現する。つまりDC-STAMPお

よびOC-STAMPは互いの発現を調節しないことが報告されている<sup>39-42)</sup>。今回、スダチチンは破骨細胞の分化誘導系においてDC-STAMPには作用せず、OC-STAMPのみに作用したと示唆されるが、その機序においては今後の研究課題である。

以上の遺伝子発現解析からスダチチンは破骨細胞の分化誘導系の初期から後期にかけて作用するが、破骨細胞数測定の結果から特に中期（3日目以降）から後期にかけて8核以上の巨大破骨細胞の分化・融合を抑制していることが示唆された。

## 結 語

破骨細胞の分化誘導系においてスダチチンは、分化初期から後期にかけて抑制的に作用するが、特に中期から後期にかけて8核以上の巨大破骨細胞数を減少させた。

## 謝 辞

本稿を終えるにあたり、本研究に御援助、御協力いただきました北海道大学大学院歯学研究院口腔健康科学分野高齢者歯科学教室ならびに口腔病態学分野薬理学教室の教室員各位に厚く御礼申し上げます。

## 参 考 文 献

- 寺岡加代, 永井晴美, 柴田 博, 岡田 昭五郎, 竹内孝仁 : 高齢者における摂食機能の身体活動への影響. 口腔衛生学会雑誌 Journal of Dental Health 42 : 2-6, 1992.
- Kameyama, Y : Histopathologic and autoradiographic studies of the changes in the rat periodontium in experimental traumatic occlusion. Bull Tokyo Med Dent Univ 15 : 339-357, 1968.
- 今村 實 : 咬合性外傷の発現から修復までの病理組織学的並びに組織化学的研究 - 骨吸収における化学的仲介物質の役割について -. 九州歯会誌 39 : 131-150, 1985.
- 岩本 潤 : 高齢者のバイオメカニズム - 骨の老化 -. バイオメカニズム学会誌 27 : 15-17, 2003.
- Kurihara N, Suda T, Miura Y, Nakauchi H, Kodama H, Hiura K, Hakeda Y, Kumegawa M : Generation of osteoclasts from isolated hematopoietic progenitor cells. Blood 74 : 1295-1302, 1989.
- Boyl WJ, Simonet WS, Lacey DL : Osteoclast differentiation and activation. Nature 423 : 337-342, 2003.
- Teitelbaum SL, Ross FP : Genetic regulation of osteoclast development and function. Nat Rev Genet 4 : 638-649, 2003.
- Vaananen HK, Latitala-Leinonen T : Osteoclast lineage and function. Arch Biophys 473 : 132-138, 2008.
- Yagi M, Miyamoto T, Sawatani Y, Iwamoto K, Hosogane N, Fujita N, Morita K, Ninomiya K, Suzuki T, Miyamoto K, Oike Y, Takeya M, Toyama Y, Suda T : DC-STAMP is essential for cell-cell fusion in osteoclasts and foreign body giant cells. J Exp Med 202 : 345-351, 2005.
- Yang M, Birnbaum MJ, Mackay CA, Mason-Savas A, Thompson B, Odgren PR : Osteoclast stimulatory transmembrane protein (OC-STAMP), a novel protein induced by RANKL that promotes osteoclast differentiation. J Cell Physiol 215 : 497-505, 2008.
- Kukita T, Wada N, Kukita A, Kakimoto T, Sandra F, Toh K, Nagata K, Iijima T, Horiuchi M, Matsusaki H, Hieshima K, Yoshie O, Nomiyama H : RANKL-induced DC-STAMP is essential for osteoclastogenesis. J Exp Med 200 : 941-946, 2004.
- Lee NK, Choi YG, Baik JY, Han SY, Jeong DW, Bae YS : A crucial role for reactive oxygen species in RANKL-induced osteoclast differentiation. Blood 106 : 852-859, 2005.
- Nomura M, Yoshimura Y, Kikuri T, Hasegawa T, Taniguchi Y, Deyama Y, Koshuri K, Sano H, Suzuki K, Inoue N : Platinum Nanoparticles Suppress Osteoclastogenesis Through Scavenging of Reactive Oxygen Nanoparticles Suppress RAW264.7 Cells. J Pharmacol Sci 117 : 243-252, 2011.
- Beltz LA, Bayer DK, Moss AL, Simet IM : Mechanisms of cancer prevention by green and black tea polyphenols. Anticancer Agents Med Chem 6 : 389-406, 2006.
- Akaishi T, Morimoto T, Shibao M, Watanabe S, Sakai-kato K, Utsunomiya-Tate N, Abe K : Structural requirements for the flavonoid fisetin in inhibiting fibril formation of amyloid beta protein. Neurosci Lett 444 : 280-285, 2008.
- Andres-Lacueva C, Shukitt-Hale B, Galli RL, Jauregui O, Lamuela-Raventos RM, Joseph JA : Anthocyanins in aged blueberry-fed rats are found centrally and may enhance memory. Nutr Neurosci 8 : 111-120, 2005.
- Yang EJ, Lee J, Lee SY, Kim EK, Moon YM, Jung YO : EGCG attenuates autoimmune arthritis by inhibition of STAT3 and HIF-1 $\alpha$  with Th17/Treg control. PLoS One 9 : e86062, 2014.
- Lee JH, Jin H, Shim HE, Kim HN, Ha H, Lee ZH :



- Epigallocatechin-3-gallate inhibits osteoclastogenesis by down-regulating c-Fos expression and suppressing the nuclear factor-kappaB signal. *Mol Pharmacol* 77 : 17-25, 2010.
- 19) Lee JH, Kim HN, Yang D, Jung K, Kim HH : Trolox prevents osteoclastogenesis by suppressing RANKL expression and signaling. *J Biol Chem* 284 : 13725-13734, 2009.
- 20) Tadaishi M, Nishide Y, Tousen Y, Marlina C. K, Ishimi Y : Cooperative effects of soy isoflavones and carotenoids on osteoclast formation. *J Clin Nutr* 54 : 109-115, 2014
- 21) Ito S, Ohmi A, Sakamiya A, Yano T, Okamura K, Nishimura N, Kagotani K : Ginger hexane extract suppresses RANKL-induced osteoclast differentiation. *Biosci Biotechnol Biochem* 80 : 779-785, 2016.
- 22) Tominari T, Hirata M, Masumoto C, Inada M, Miyaura C : Polymethoxy flavonoids, nobiletin and tangeretin, prevent lipopolysaccharide-induced inflammatory bone loss in an experimental model for periodontitis. *J Pharmacol Sci* 119 : 390-394, 2012
- 23) 新居 佳孝, 岡久 修己, 高田 次郎, 三野 幸人, 敷島 康普 : スタチ果皮抽出物のスタチン量と抗酸化活性. 徳島県立工業技術センター研究報告 23 : 15-19, 2014
- 24) Tsutsumi R, Yoshida T, Nii Y, Okahisa N, Iwata S, Tsukayama M, Hashimoto R, Taniguchi Y, Sakaue H, Hosaka T, Shuto E, Sakai T : Sudachitin, a polymethoxylated flavone, improves glucose and lipid metabolism by increasing mitochondrial biogenesis in skeletal muscle. *Nutr metab* : 32, 2014.
- 25) Mitani M, Minatogawa Y, Nakamoto A, Nakamoto A, Shuto E, Nii Y, Sakai T : Sudachitin, polymethoxyflavone from Citrus sudachi, enhances antigen-specific cellular and humoral immune responses in BALB/c mice. *J Clin Biochem Nutr* 64 : 158-163, 2018.
- 26) Hosokawa Y, Hosokawa I, Ozaki K, Matsuo T : Sudachitin Inhibits Matrix Metalloproteinase-1 and -3 Production in Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ -Stimulated Human Periodontal Ligament Cells. *Inflammation* 42 : 1456-1462, 2019.
- 27) Yuasa K, Tada K, Harita G, Fujimoto T, Tsukayama M, Tsuji A : Sudachitin, a polymethoxyflavone from Citrus sudachi, suppresses lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in mouse macrophage-like RAW264 cells. *Biosci Biotechnol Biochem* 76 : 598-600, 2012.
- 28) Suzuki N, Yoshimura Y, Deyama Y, Suzuki K, Kitagawa Y : Mechanical stress directly suppresses osteoclast differentiation in RAW264.7 cells. *Int J Mol Med* 21 : 291-296, 2008.
- 29) Wu X, McKenna MA, Feng X, Nagy TR, McDonald JM : Osteoclast Apoptosis: The Role of Fas in Vivo and in Vitro. *Endocrinology* 144 : 5545-5555, 2003.
- 30) Wang L, Lis S, Zhao Y, Liu D, Liu Y, Chen C, Karray S, Shi S, Jin Y : Osteoblast-induced osteoclast apoptosis by fas ligand/FAS pathway is required for maintenance of bone mass. *Cell Death Differentiation* 22 : 1654-1664, 2015.
- 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, Taniguchi : Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts. *Dev Cell* 3 : 889-901, 2002.
- 32) Martin TJ, Sims NA : Osteoclast-derived activity in the coupling of bone formation to resorption. *Trends in Mol Med* 11 : 76-81, 2005.
- 33) Lundberg P, Koskinen C, Baldock PA, Lothgren H, Stenberg A, Lerner UH, Oldenborg PA : Osteoclast formation is strongly reduced both in vivo and in vitro in the absence of CD47/SIRP  $\alpha$ -interaction. *Biochem Biophys Res Commun* 352 : 444-448, 2007.
- 34) Anais M, Julie M, Jean MD, Kent S : Osteoclast Fusion: Time-Lapse Reveals Involvement of CD47 and Syncytin-1 at Different Stages of Nuclearity. *J cell Physiol* 232 : 1396-1403, 2017.
- 35) Ha H, Kwak HB, Lee SW, Jin HM, Kim HM, Kim HH : Reactive oxygen species mediate RANK signaling in osteoclasts. *Exp Cell Res* 301 : 119-127, 2004.
- 36) Yagi M, Miyamoto T, Sawatani Y, Iwamoto K, Hosogane N, Fujita N, Morita K, Ninomiya K, Suzuki T, Miyamoto K, Oike Y, Takeya M, Toyama Y, Suda T : DC-STAMP is essential for cell-cell fusion in osteoclasts and foreign body giant cells. *J Exp Med* 202 : 345-351, 2005.
- 37) Yang M, Birnbaum MJ, MacKay CA, Mason-Savas A, Thompson B, Odgren PR : Osteoclast stimulatory transmembrane protein (OC-STAMP), a novel protein induced by RANKL that promotes osteoclast differentiation. *J Cell Physiol* 215 : 497-505, 2008.
- 38) Miyamoto M, Suzuki T, Miyauchi Y, Iwasaki R, Kobayashi T, Sato Y, Miyamoto K, Hoshi H, Hashimoto K, Yoshida S, Hao W, Mori T, Kanagawa H, Katsuyama E, Fujie A, Morioka H, Matsumoto M,

- Chiba K, Takeya M, Toyama Y, Miyamoto T : OC-STAMP and DC-STAMP cooperatively modulate cell-cell fusion to form osteoclasts and foreign body giant cells. *J Bone Miner Res* 27 : 1289-1297, 2012.
- 39) Yang M, Birnbaum MJ, MacKay CA, Mason-Savas A, Thompson B, Odgren PR : Osteoclast stimulatory trans-membrane protein (OC-STAMP), a novel protein induced by RANKL that promotes osteoclast differentiation. *J Cell Physiol* 215 : 497-505, 2008.
- 40) Miyamoto H, Suzuki T, Miyauchi Y, Iwasaki R, Kobayashi T, Sato Y, Miyamoto K, Hoshi H, Hashimoto K, Yoshida S, Hao W, Mori T, Kanagawa H, Katsuyama E, Fujie A, Morioka H, Matsumoto M, Chiba K, Takeya M, Toyama Y, Miyamoto T : OC-STAMP and DC-STAMP cooperatively modulate cell-cell fusion to form osteoclasts and foreign body giant cells. *J Bone Miner Res* 27 : 1289-1297, 2012.
- 41) Witwicka H, Hwang SY, Reyes-Gutierrez P, Jia H, Odgren PE, Donahue LR, Birnbaum MJ, Odgren PR : Studies of OC-STAMP in Osteoclast Fusion: A New Knockout Mouse Model, Rescue of Cell Fusion, and Transmembrane Topology. *PLoS One* 10: e0128275, 2015.
- 42) Chiu YH, Ritchlin CT : DC-STAMP: A Key Regulator in Osteoclast Differentiation. *J Cell Physiol* 231 : 2402-2407, 2016.

## ORIGINAL

## Sudachitin suppresses osteoclastogenesis

Seiji Hegozaki<sup>1)</sup>, Yoshitaka Yosimura<sup>2)</sup>, Tadahiro Iimura<sup>2)</sup> and Yutaka Yamazaki<sup>3)</sup>

**ABSTRACT** : Sudachitin is a recently discovered polymethoxyflavonoid in the peel of the citrus fruit, sudachi. It is reported to exhibit various physiological characteristics, including strong antioxidant activity. We counted the number of osteoclasts after the administration of sudachitin related to the number of nuclei to investigate the mechanism of sudachitin in the osteoclast-differentiation induction system. Osteoclasts were stained with tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP), and the total number of osteoclasts (>2 nuclei), small osteoclasts (2–7 nuclei), and giant osteoclasts (≥8) were measured. We set the final concentration of sudachitin to 7.5  $\mu$ M. In Group A, B and C, we added sudachitin on the first and third days, only on the first day, and only on the third day of the culture, respectively. On the fifth day of the culture, the number of osteoclasts were counted. As opposed to group B and group C, group A showed a suppressed induction of osteoclast differentiation. In the case of ≥8 nuclei, group C showed a suppressed giant-osteoclast-differentiation induction which was more prevalent than group B. Next, osteoclast-related gene mRNA expression levels at 1, 3, 6, 12, 24, and 96 h after addition of sudachitin were quantified by a real-time polymerase chain reaction analysis. The results showed significantly decreased expression levels in NFATc-1, RANK, CD47, TRAP, and OC-STAMP. These results suggest that sudachitin acts in an osteoclast-differentiation induction system from early to late stages of differentiation.

**Key Words** : osteoclast, polymethoxyflavonoid, sudachitin

---

<sup>1)</sup> Department of Gerodontology, Division of Oral Health Science, Graduate School of Dental Medicine, Hokkaido University (Chief : Prof. Yutaka Yamazaki), Kita 13, Nishi 7, Kita-ku, Sapporo, 060-8586, Japan.

<sup>2)</sup> Department of Pharmacology, Faculty of Dental Medicine and Graduate School of Dental Medicine, Hokkaido University (Chief : Prof. Tadahiro Iimura), Kita 13, Nishi 7, Kita-ku, Sapporo, 060-8586, Japan.

<sup>3)</sup> Department of Gerodontology, Faculty of Dental Medicine and Graduate School of Dental Medicine, Hokkaido University (Chief : Prof. Yutaka Yamazaki), Kita 13, Nishi 7, Kita-ku, Sapporo, 060-8586, Japan.