



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Rosmarinic acid and arbutin suppress osteoclast differentiation by inhibiting superoxide and NFATc1 downregulation in RAW264.7 cells [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	大森, 晶奈
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第11265号
Issue Date	2014-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/56251
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Akina_Ohmori_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（歯学） 氏 名 大 森 晶 奈

学 位 論 文 題 名

Rosmarinic acid and arbutin suppress osteoclast differentiation by inhibiting superoxide and NFATc1 downregulation in RAW264.7 cells
(ロスマリン酸とアルブチンはスーパーオキシド除去作用と NFATc1 の発現抑制によって RAW264.7 細胞において破骨細胞分化を抑制する)

【緒言】 ポリフェノールは植物に含まれる色素や苦み成分であり、分子内に複数のフェノール性水酸基を有している。この構造は活性酸素種(ROS)の不対電子と反応することから活性酸素除去作用を示す。近年ポリフェノールの有効性は、心臓病や動脈硬化症などの生活習慣病の改善や予防に加えて、骨疾患にも有効であることが報告されている。それは骨粗鬆症モデルマウスによる骨密度の増加や、*in vitro* での破骨細胞の抑制など多岐にわたる。破骨細胞分化過程における RANKL 誘導性の ROS の発生はシグナル伝達に重要な役割をしており、破骨細胞の分化および骨吸収活性を誘導することが明らかになっている。そこで、本研究ではポリフェノールの抗酸化性に着目し、シソ科植物に多く含まれるロスマリン酸とコケモモなどに多く含まれるアルブチンというポリフェノールを用いて、破骨細胞の分化誘導系に与える影響を検討した。

【材料と方法】 RANKL (50 ng/ml) 含有培養液を用いて、実験群には種々濃度のロスマリン酸もしくはアルブチンを添加し、マウス由来単球/マクロファージ様細胞である RAW264.7 (RAW) 細胞を培養した。TRAP 陽性多核破骨細胞数は、6 日間培養後、TRAP 染色にて破骨細胞 (2 核以上) 数および巨大破骨細胞 (8 核以上) 数を測定した。続いて、破骨細胞への作用がロスマリン酸もしくはアルブチンの RAW 細胞への細胞毒性によるものかを調べるために細胞毒性試験を行った。また、細胞内外のスーパーオキシド量ならびにスーパーオキシドディスムターゼ (SOD) 活性を各種キットを用いて測定した。破骨細胞関連遺伝子の mRNA 発現量の変化をリアルタイム PCR にて定量した。さらに破骨細胞の骨吸収活性に与える影響を pit assay を用いて観察した。

【結果】 ロスマリン酸もしくはアルブチンを作用させた群では、コントロール群と比較して、TRAP 陽性破骨細胞数ならびに巨大破骨細胞数は濃度依存的に減少した。ロスマリン酸

では $2\mu\text{M}$ までは破骨細胞数に変化はなく、 20 、 40 、 $60\mu\text{M}$ と濃度依存的に減少し、 $100\mu\text{M}$ の濃度で破骨細胞を認めなかった。アルブチンでは、 $1\mu\text{M}$ までは破骨細胞数に変化はなく、 25 、 50 、 75 、 $100\mu\text{M}$ と濃度依存的に減少し、 $200\mu\text{M}$ の濃度で破骨細胞を認めなかった。巨大破骨細胞数は、ロスマリン酸では $20\mu\text{M}$ まで変化はなく、 40 、 $60\mu\text{M}$ と濃度依存的に減少し、 $100\mu\text{M}$ の濃度では巨大破骨細胞を認めなかった。アルブチンでは $25\mu\text{M}$ まで変化はなく、 50 、 $75\mu\text{M}$ と濃度依存的に減少し、 $100\mu\text{M}$ の濃度で巨大破骨細胞を認めなかった。また、破骨細胞を抑制できる濃度において、ロスマリン酸ならびにアルブチンは破骨細胞前駆細胞である RAW 細胞の生存率には影響はなかった。スーパーオキシドの産生量および細胞内スーパーオキシド量は顕著な減少ではなかったが、ロスマリン酸は 20 、 40 、 $60\mu\text{M}$ と濃度依存的に有意に減少し、アルブチンでは 50 、 75 、 $100\mu\text{M}$ と濃度依存的に有意に減少した。また、両群ともスーパーオキシドを測定した同様の濃度のロスマリン酸とアルブチンにおいて SOD 活性は有意な差を認めなかった。ロスマリン酸ならびにアルブチンは破骨細胞のマスター遺伝子である NFATc1、破骨細胞関連遺伝子である TRAP、MMP-9 および cathepsin K の mRNA 発現量を有意に減少した。また、pit assay において、ロスマリン酸ではコントロールと比較して、 20 、 $60\mu\text{M}$ と濃度依存的に吸収面積の減少を認め、 $100\mu\text{M}$ の濃度では吸収を認めなかった。アルブチンではコントロールと比較して、 25 、 $75\mu\text{M}$ と濃度依存的に吸収面積の減少を認め、 $200\mu\text{M}$ の濃度では吸収を認めなかった。

【考察】ロスマリン酸とアルブチンは破骨細胞前駆細胞である RAW 細胞の生存率に影響を与えることなく、濃度依存的に破骨細胞数および巨大破骨細胞数を減少させた。これらの結果からロスマリン酸とアルブチンは破骨細胞への分化を抑制することが示唆された。破骨細胞の抑制的影響はロスマリン酸よりもアルブチンの方が低濃度で抑制されることが明らかになった。近年の論文により、この抑制における濃度の差異はマウスの上腸間膜動脈で発生した ROS の除去作用に対して、アルブチンよりもロスマリン酸の方が強いことが報告されており、抗酸化性の違いによることが示唆された。近年 ROS は破骨細胞分化のセカンドメッセンジャーとして分化過程において重要な役割をしていることが明らかになっている。一方、過剰な ROS の産生は破骨細胞の活性化を促し病的な骨代謝を招くと報告されている。また骨粗鬆症の骨組織における ROS の産生は、正常な骨組織より顕著に高いことも報告されている。ROS の発生は NADPH オキシダーゼによるスーパーオキシドの発生に

より、ヒドロキシラジカル、過酸化水素などの様々な ROS に変換される。そこで本研究では ROS の発生源であるスーパーオキシドに焦点を当て測定することとした。ロスマリン酸ならびにアルブチンは細胞内および培養液中に産生されたスーパーオキシド量を濃度依存的に減少させた。またスーパーオキシドの除去酵素である SOD 活性に影響を認めなかった。この結果はこれらのポリフェノールの水酸基により、スーパーオキシドの電子が還元された影響によるものであることが示唆された。破骨細胞関連遺伝子に与える影響において、ロスマリン酸ならびにアルブチンは破骨細胞のマスター遺伝子である NFATc1 の mRNA 発現量を抑制した。NFATc1 は、破骨細胞分化のマスタースイッチと言われるように破骨細胞分化に必須の転写因子であり、様々な破骨細胞関連遺伝子を制御している。従って、NFATc1 の下流に存在する破骨細胞のマーカー遺伝子である TRAP、骨吸収因子である MMP-9 ならびに cathepsin K の mRNA 発現量の減少は NFATc1 の抑制によることが示唆された。また MMP-9 ならびに cathepsin K の抑制によって、吸収活性を抑制し、濃度依存的にリン酸カルシウムの吸収面積を抑制したことが示唆された。

【結論】以上の結果から、破骨細胞分化誘導過程において、ロスマリン酸ならびにアルブチンは RANKL 誘導性の ROS の発生源であるスーパーオキシド除去作用により、破骨細胞への分化誘導および骨吸収を抑制することが示唆された。また RAW 細胞に対して毒性を与えず、破骨細胞数を減少させることから、ロスマリン酸ならびにアルブチンは副作用を伴うことなく骨粗鬆症のリスク軽減における補助的作用を有する可能性が示された。