



# HOKKAIDO UNIVERSITY

|                     |                                                                                                 |
|---------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title               | エダラボンは破骨細胞の分化誘導を抑制する                                                                            |
| Author(s)           | 大西, 香織                                                                                          |
| Degree Grantor      | 北海道大学                                                                                           |
| Degree Name         | 博士(歯学)                                                                                          |
| Dissertation Number | 甲第13859号                                                                                        |
| Issue Date          | 2020-03-25                                                                                      |
| DOI                 | <a href="https://doi.org/10.14943/doctoral.k13859">https://doi.org/10.14943/doctoral.k13859</a> |
| Doc URL             | <a href="https://hdl.handle.net/2115/78201">https://hdl.handle.net/2115/78201</a>               |
| Type                | doctoral thesis                                                                                 |
| File Information    | Kaori_Onishi.pdf                                                                                |



博 士 論 文

---

エダラボンは破骨細胞の分化誘導を抑制する

---

令和 2 年 3 月申請

北海道大学  
大学院歯学研究科口腔医学専攻

大 西 香 織



# 目 次

|       |      |
|-------|------|
| 抄録    | 1 頁  |
| 緒言    | 2 頁  |
| 材料と方法 | 5 頁  |
| 結果    | 9 頁  |
| 考察    | 40 頁 |
| 結論    | 45 頁 |
| 謝辞    | 46 頁 |
| 利益相反  | 47 頁 |
| 参考文献  | 48 頁 |

## 抄 録

近年，超高齢社会となり高齢者の Quality of life (QOL) を低下させ得る骨粗鬆症による骨折が多くなってきているが，骨粗鬆症に関係する破骨細胞の分化誘導系に対し，重大な副作用なく効果を示す新しい薬物が望まれている．本研究では，RAW264.7 破骨細胞前駆細胞を用いて既に急性期の脳梗塞に対して臨床応用されているエダラボンが，RANKL 誘導性の破骨細胞分化誘導系に与える影響について検証した．RANKL 添加日を 1 日目とした場合，エダラボンの添加を 1 日目と 3 日目の両日 (A 群)，1 日目のみ (B 群)，3 日目のみ (C 群) と場合分けした時の総破骨細胞数，核数別破骨細胞数の計測を行った．また，Real-time-PCR 法によりエダラボン添加後の 3，6，12，24，48 時間後の破骨細胞関連遺伝子の mRNA 発現量を計測した．50  $\mu$ M エダラボンの添加により，総破骨細胞数は A，B 群では対照群と比較し約 45%減少し，C 群では約 15%減少した．核数別の破骨細胞数は少数核の破骨細胞でも巨大破骨細胞でも有意な減少を認めた．Real-time-PCR 法による破骨細胞関連遺伝子の mRNA 発現量は，RANK，NFATc1，TRAP，Cathepsin K，OC-STAMP において一時的な減少を認めた．以上からエダラボンの添加により破骨細胞分化関連因子が抑制されることにより，破骨細胞の分化誘導が抑制される可能性が示唆された．

## 緒 言

超高齢社会となった現在、骨粗鬆症による骨密度の低下が原因で惹起される骨折を予防することが、高齢者の健康寿命を延伸し Quality of life (QOL) を高めると考えられる。近年、骨粗鬆症の治療薬としてビスフォスフォネート (BP) 製剤が使用されている。2003 年、Marx による zoledronate や pamidronate などの BP 製剤による治療を受けた患者において、歯科治療後に顎骨壊死を認めたとの報告以降、ビスフォスフォネート関連顎骨壊死 (BRONJ) が問題視されるようになった<sup>1)</sup>。現在では BRONJ と同様な顎骨壊死を引き起こす可能性があるデノスマブや血管新生阻害作用を持つ抗がん剤も注目されており、薬剤関連顎骨壊死 (MRONJ) と呼ばれている。抜歯などの観血的処置に際し、MRONJ の発症に関連する危険因子には、ステロイド製剤、免疫抑制剤、生物学的製剤や抗がん剤の投与、糖尿病の既往、Oral hygiene などが挙げられる<sup>2-4)</sup>。また、*in vivo* で上皮損傷が骨壊死を誘発すると報告されたことから、不適合義歯も MRONJ 発症のリスクとなりうる<sup>5)</sup>。

骨粗鬆症は骨形成と骨吸収のバランスが不均衡となり、相対的に骨吸収が加速された結果であるが、その骨のリモデリングに関与している細胞の 1 つが破骨細胞である<sup>6-8)</sup>。破骨細胞前駆細胞から破骨細胞へと分化誘導する機序は、骨

芽細胞および骨細胞などがマクロファージコロニー刺激因子である M-CSF と細胞膜上に発現している RANKL を提供し、一方、単球・マクロファージ系である破骨細胞前駆細胞が M-CSF の受容体である c-Fms および、RANKL の受容体である RANK を発現する。これらが相互作用することにより、単核の前破骨細胞へと分化する。前破骨細胞は融合因子である DC-STAMP と OC-STAMP を発現し、それらを介して融合することにより多核の破骨細胞へと分化誘導される<sup>9-</sup>  
<sup>11)</sup>。副作用なく破骨細胞の分化誘導を制御することが出来れば、より安全に骨粗鬆症を予防することが可能となる。

破骨細胞の分化誘導の抑制には抗酸化作用を示す白金ナノ粒子が有効であるとの報告がある<sup>12)</sup>。しかし、白金ナノ粒子は高価であるとの問題がある。そこで急性期の脳梗塞に対し既に臨床応用されているエダラボンに注目した。2018年にエダラボンが急性期の脳梗塞の治療薬となると報告され、エダラボンは点滴静注される世界初の脳保護剤として使用されている<sup>13-16)</sup>。エダラボンは脳梗塞の急性期に投与すると酸化される対象が脳神経ではなく、エダラボンとなることで脳神経を間接的に保護する抗酸化物質である。しかし、エダラボンの破骨細胞の分化誘導に与える影響についての報告はない。本研究は RAW264.7 細胞 (RAW 細胞) を用いて破骨細胞分化誘導系に対するエダラボンの作用を明らかにするとともに、それが破骨細胞の分化誘導過程のどの時期に作用するのかを

検証した.

## 材料と方法

### 1. 細胞の培養

マウス白血病ウイルスによって誘導され、マウス腫瘍細胞から樹立された単球マクロファージである RAW 細胞 (ATCC no.TIB-71<sup>TM</sup> ; Manassas, VA, USA) を破骨細胞の前駆細胞として使用した。RAW 細胞は 10% 牛胎児血清 (HyClone Laboratories, UT, USA) , 66.7  $\mu\text{g/ml}$  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 industries, Osaka, Japan) を用いて, 100 mm スタンダードディッシュ (ED Falcon, Franklin Lakes, NJ, USA) 上の培地の中で, 37°C, 5%CO<sub>2</sub>の気相下で一晩, 前培養を行った。その後, 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, 細胞を回収した。10%牛胎児血清, 284  $\mu\text{M}$  L-アスコルビン酸 2-リン酸 (Sigma-Aldrich, MO, USA), および 2 mM L-アラニル-L-グルタミン (Sigma-Aldrich) 含有  $\alpha$ -minimum essential 培地 ( $\alpha$ -MEM : Wako pure chemical industries) を用いて RAW 細胞を播種した。破骨細胞への分化誘導には, 50 ng/ml RANKL (Oriental Yeast Corp, Tokyo, Japan) を使用した。50 ng/ml RANKL を RAW 細胞培養液に添加した日を 1 日目とし, 48 時間毎に細胞培養液を交換した。

## 2. エダラボンの添加

エダラボンの粉末 (Tocris Bioscience, Bristol, UK) をエタノールで溶解して 60 mM とし、これをストック溶液とした。エダラボンの最終濃度が 10, 25, 50, 75, 100  $\mu$ M となるように培養液に添加した。Control 群は無添加とし、Vehicle 群はエタノールを添加した。

## 3. 細胞内 ATP 量の測定

RAW 細胞に各濃度のエダラボン (10, 25, 50, 75, 100  $\mu$ M) を添加した際の生存細胞数を調べるために、Via Light Plus Kit (Lonza, ME, USA) を用いて細胞内 ATP 量を測定した。生存細胞には生命を維持するために ATP が含まれており、この ATP の生物発光を計測することに基づいているため、細胞数を直接的に評価することができる。ATP とルシフェリンに触媒であるルシフェラーゼを添加した際に生じる化学反応の産物が生物発光である。この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

Control 群ならびにエダラボン投与群を各条件のもとで培養し、1 日目と 3 日目の両日にエダラボンを添加した場合 (A 群)、1 日目のみに添加した場合 (B

群), 3 日目のみに添加した場合 (C 群) と添加する日を場合分けした. 5 日目に 10% 中性ホルマリン溶液にて固定し, 破骨細胞を観察するために酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ (TRAP) 染色液 (pH: 5.0) は, Naphthol AS-MX phosphate (Sigma-Aldrich) と Fast red violet LB salt (Sigma-Aldrich) を加えた 0.1 M sodium acetate buffer 用いて TRAP 染色を行った. 光学顕微鏡にて 2 核から 7 核のものを核数別でそれぞれ TRAP 染色陽性破骨細胞数を計測し, 残りの多核の TRAP 染色陽性破骨細胞を 8 核以上の巨大破骨細胞<sup>12)</sup> として計測した.

## 5. Real-time-PCR

エダラボンを添加してから 3, 6, 12, 24, 48 時間後それぞれの時間において TRIzol (Invitrogen, MD, USA) を用いて RNA の抽出を行い, さらに Rever Tra Ace reverse transcriptase (Toyobo, Osaka, Japan) と Oligo d (T) primer を用いて逆転写反応を行い, cDNA を合成した. Real-time-PCR は ABI 7300 (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) を用いた. mRNA 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 (Applied Biosystems) は以下のものを使用した. RANK (Mm00437132\_ml), NFATc1 (Mm01265944\_ml), TRAP

(Mm00475698\_ml), Cathepsin K (Mm00484036\_ml), DC-STAMP

(Mm04209236\_ml), OC-STAMP (Mm00512445\_ml), Syncytin-A

(Mm02744887\_ml). 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、 $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法で計算した.

## 6. 統計学的分析

すべての結果は平均値±標準偏差 (S.D.) で示した. 2 群間における統計処理には Student's *t*-test を, 3 群以上の統計処理には Bonferroni 法を用いた.  $p < 0.05$  のときに統計的に有意差を認めると判断した.

## 結 果

### 1. 破骨細胞数の変化

50 ng/ml RANKL を添加した RAW 細胞を  $1 \times 10^4$  個/ウェル, 24 ウェル-マルチウェルプレートに播種した. 24 時間毎に 10% 中性ホルマリンで固定し, 総破骨細胞数と核数別の破骨細胞数を計測した. 50 ng/ml RANKL を添加した日を 1 日目とすると, 4 日目に細胞数が増加, 5 日目に総破骨細胞数が最大となり, その後減少した (図 1A). また, 核数別で細胞数を計測した場合も同様に, 4 日目から増加, 5 日目を最大としその後減少した (図 1B).

### 2. 生存細胞数の測定

RAW 細胞に RANKL 無添加にてエダラボンを添加し, 生存細胞数を検証した. エダラボンが 75  $\mu$ M 以下の濃度では発光輝度が低下せず, 生存細胞数に有意差を示さなかった (図 2).

### 3. エダラボン添加後の破骨細胞数の変化

Control 群と Vehicle 群に有意な差が認められなかったため (図 3), 以下の実験では Control 群と実験群を比較することとした. RANKL 添加培養液への 50,

75  $\mu$ M エダラボンの添加を 1 日目と 3 日目の両日 (A 群), 1 日目のみ (B 群), 3 日目のみ (C 群) と場合分けした時の総破骨細胞数, 核数別破骨細胞数の計測を行った. A, B, C 群の破骨細胞の写真を示す (図 4A, B, C). A, B, C 群ともに Control 群と比較し, 50, 75  $\mu$ M エダラボン添加群では 8 核以上の巨大破骨細胞数の減少が観察された.

総破骨細胞数は A (図 5A), B (図 5C), C (図 5E) 群ともに 50  $\mu$ M エダラボンにより Control 群と比較し有意に総破骨細胞数が減少した. B 群では 75  $\mu$ M エダラボンによっても総破骨細胞数の有意な減少を認めた (図 5C). また, 核数別の総破骨細胞数において, A 群では 50  $\mu$ M エダラボンにより, 2, 3, 5, 7 核の破骨細胞数, 巨大破骨細胞数に有意な減少を認めた (図 5B). 75  $\mu$ M エダラボンにより巨大破骨細胞数の有意な減少を認めた (図 5B). B 群では 50  $\mu$ M, 75  $\mu$ M エダラボンにより少数核の破骨細胞数, 巨大破骨細胞数の有意な減少を認めた (図 5D). C 群では巨大破骨細胞数でのみ有意な減少を認めた (図 5F).

これらエダラボン添加後の破骨細胞数の結果 (図 5A-F) から, エダラボンの濃度を 50  $\mu$ M に設定し, 以下の実験を行った. A, B, C 群間で 50  $\mu$ M エダラボン添加後の総破骨細胞数を比較すると Control 群と比較し A, B 群では有意に総破骨細胞数が減少したが, C 群では有意差を認めなかった (図 5G).

#### 4. Real-time-PCR

Real-time-PCR 法で破骨細胞関連遺伝子である, RANK, NFATc1, TRAP, Cathepsin K, DC-STAMP, OC-STAMP, Syncytin-A の mRNA の発現量を測定した.

RANK の mRNA 発現量は 3, 6 時間後に有意に減少した (図 6A). NFATc1 の mRNA 発現量はエダラボンの添加 3, 6, 12, 48 時間後に有意に減少した (図 6B). TRAP の mRNA 発現量は 3, 6 時間後に有意に減少しその後増加した (図 6C). Cathepsin K の mRNA 発現量はエダラボンの添加 6, 12, 24 時間で有意に減少した (図 6D). DC-STAMP の mRNA 発現量は Control 群と比較し, いずれの時間においても有意差は認められなかった (図 6E). OC-STAMP の mRNA 発現量はエダラボンの添加 6 時間後に有意に減少した (図 6F). Syncytin-A の mRNA 発現量はいずれの時間においても有意差は認められなかった (図 6G).

図 1A

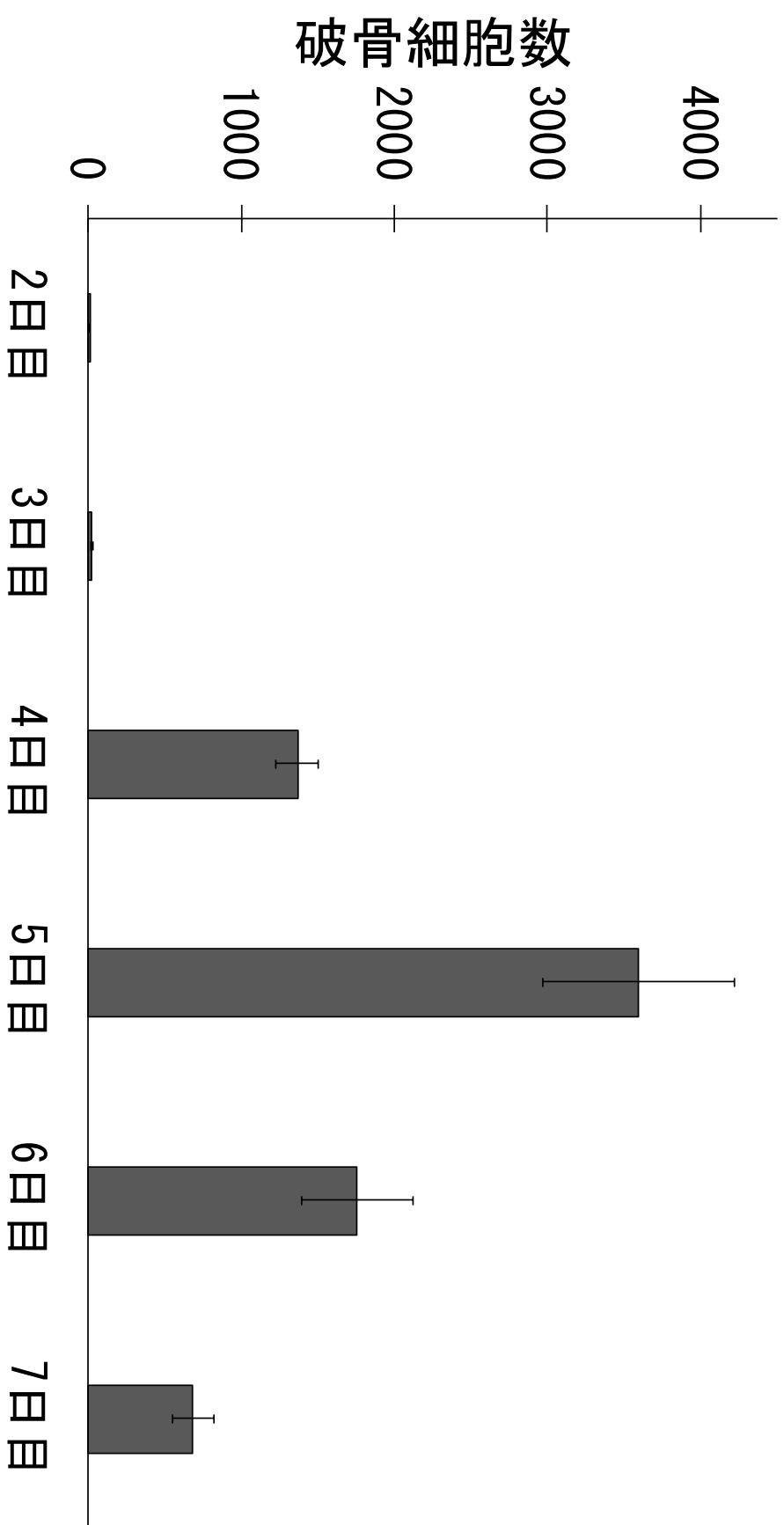


図 1

A : 培養日数毎の総破骨細胞数

50 ng/ml RANKL を添加した日を 1 日目とすると, 2, 3 日目に少量の破骨細胞が観察され, 4 日目に細胞数が顕著に増加, 5 日目に最大となり, その後減少した.

図 1B

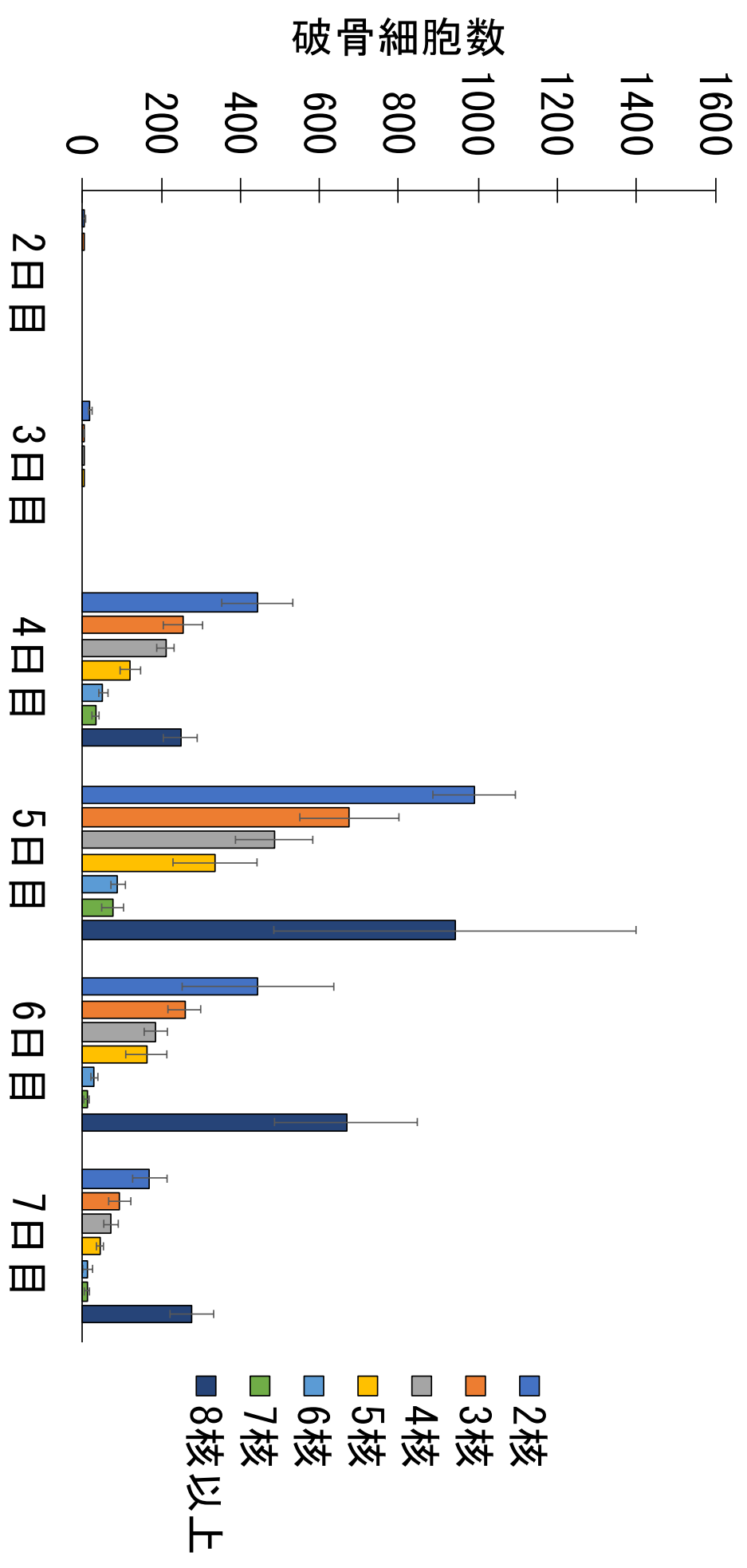
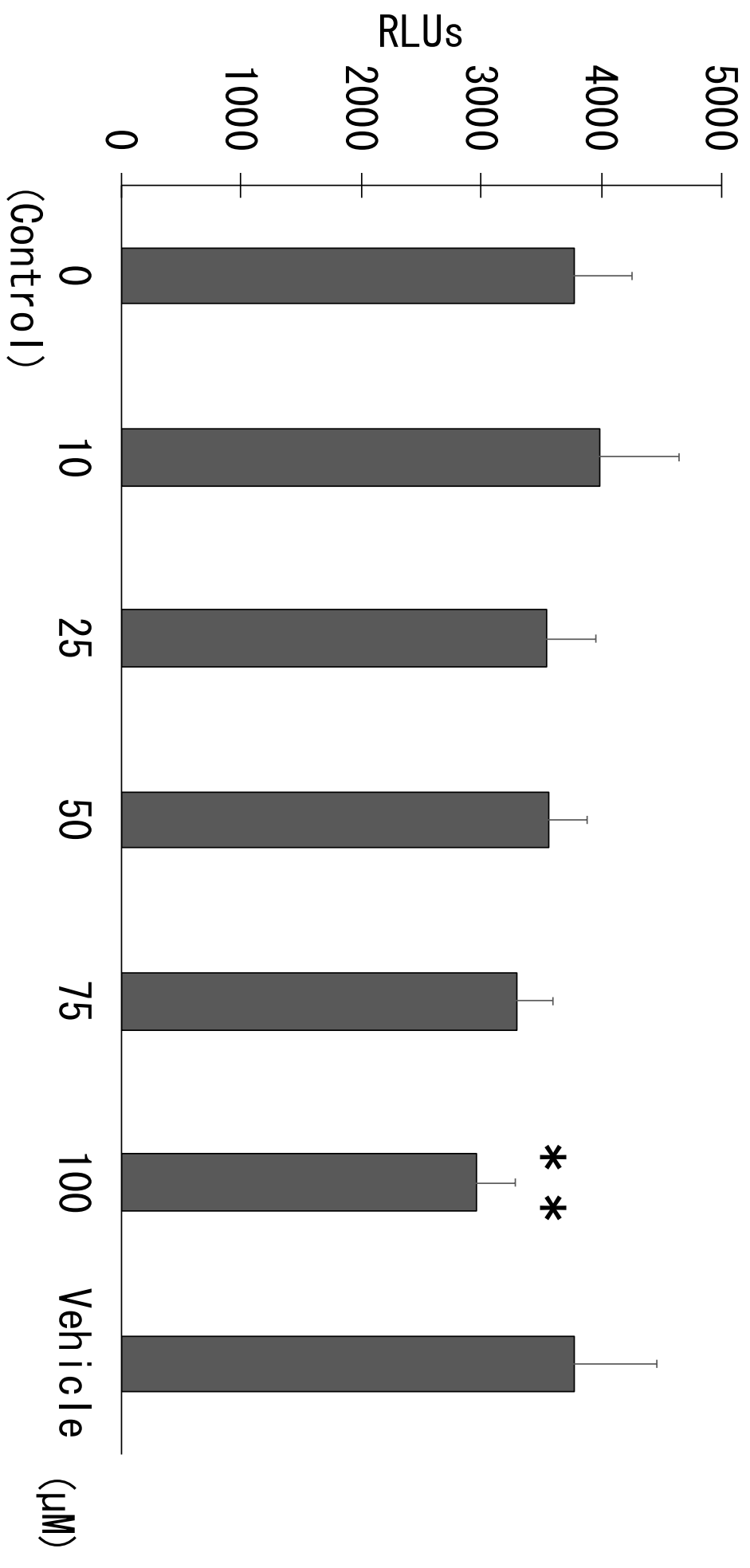


図 1

B：培養日数毎の核数別の破骨細胞数

50 ng/ml RANKL を添加した日を 1 日目とすると，2，3 日目から 2 核や 3 核の破骨細胞が観察され，その後，いずれの核数の破骨細胞も 4 日目から顕著に増加，5 日目を最大としその後減少した．

图 2



## 図 2 エ达拉ボン濃度毎の RAW 細胞の発光輝度

Control 群をエ达拉ボン無添加とし、エ达拉ボンの最終濃度が 10, 25, 50, 75, 100  $\mu\text{M}$  となるように培養液に添加した。溶媒であるエタノールを添加したものを Vehicle 群とした。エ达拉ボンが 75  $\mu\text{M}$  以下の濃度では RAW 細胞の発光輝度 (Relative Light Units: RLUs) が低下せず、生存細胞数の減少に有意差を示さなかった。

mean  $\pm$  SD, n=4,  $p < 0.01$  (\*\*)

図 3

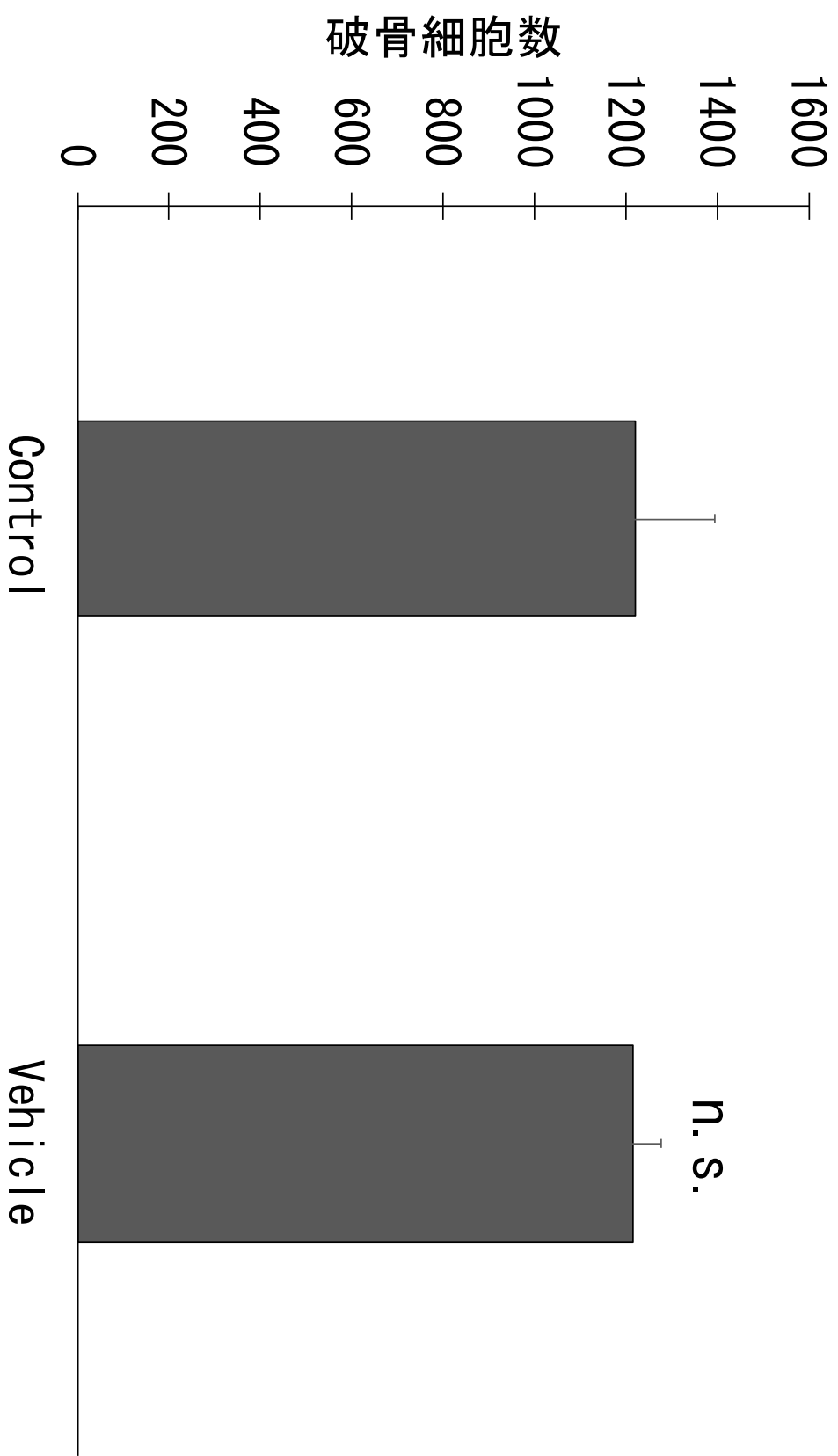
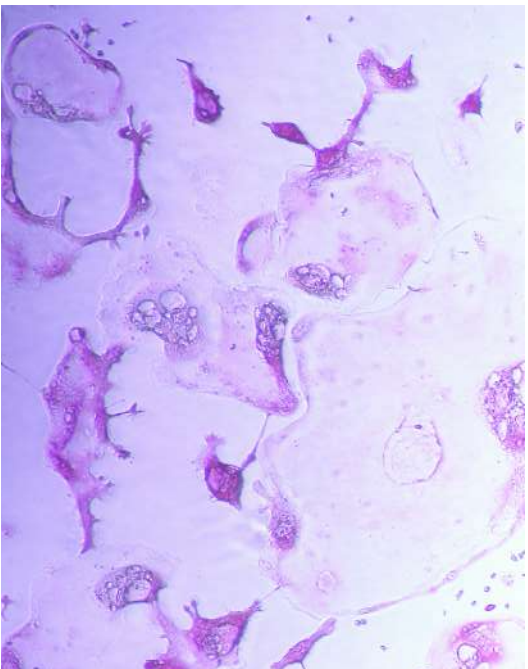


図 3 Control 群と Vehicle 群の総破骨細胞数

Control 群と Vehicle 群の総破骨細胞数に有意な差は認められなかった.

not significant; n.s.

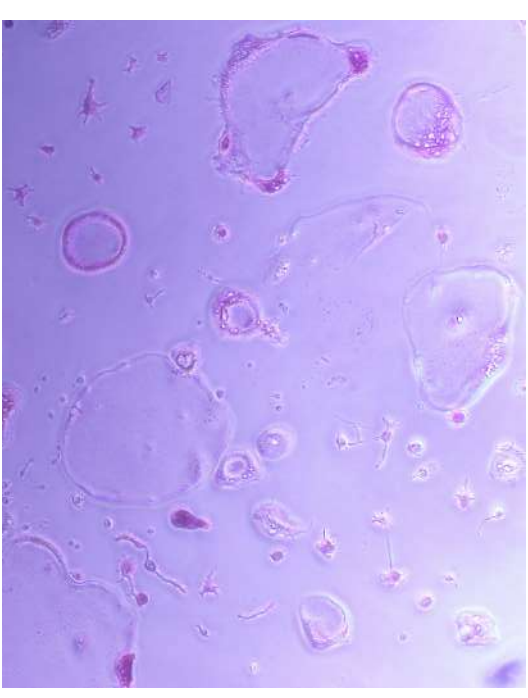
图 4A



Control

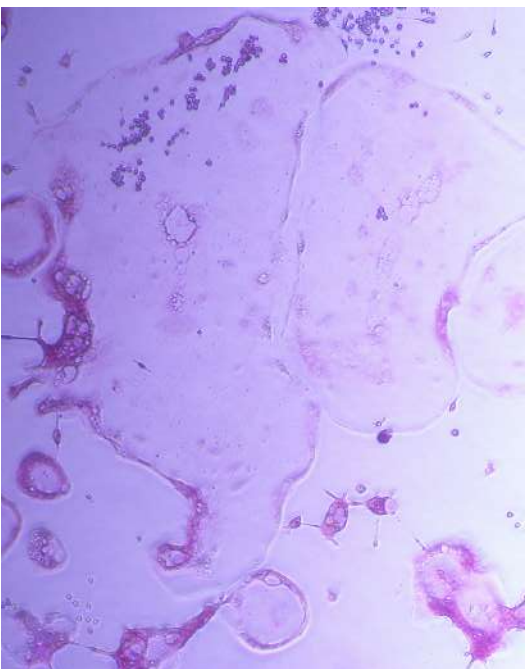


50  $\mu\text{M}$

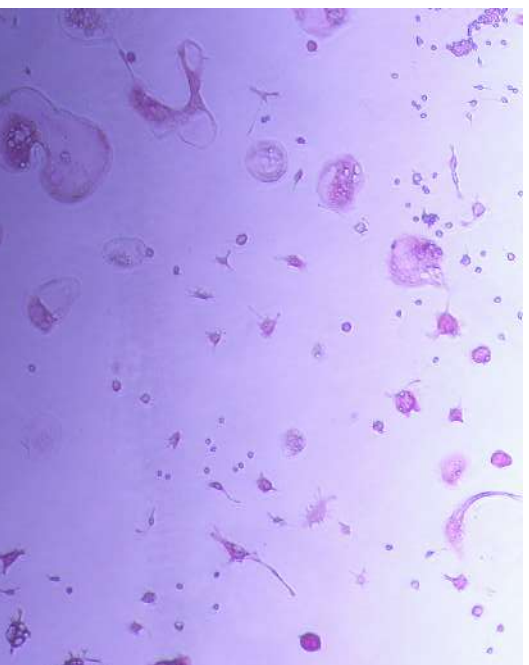


75  $\mu\text{M}$

图 4B



Control

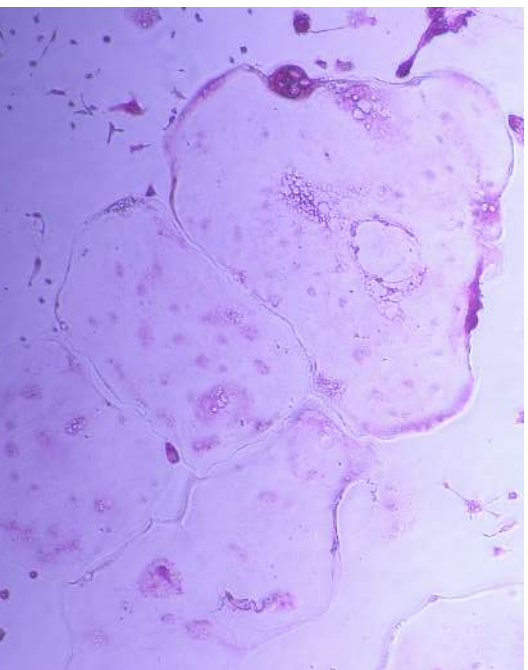


50  $\mu\text{M}$



75  $\mu\text{M}$

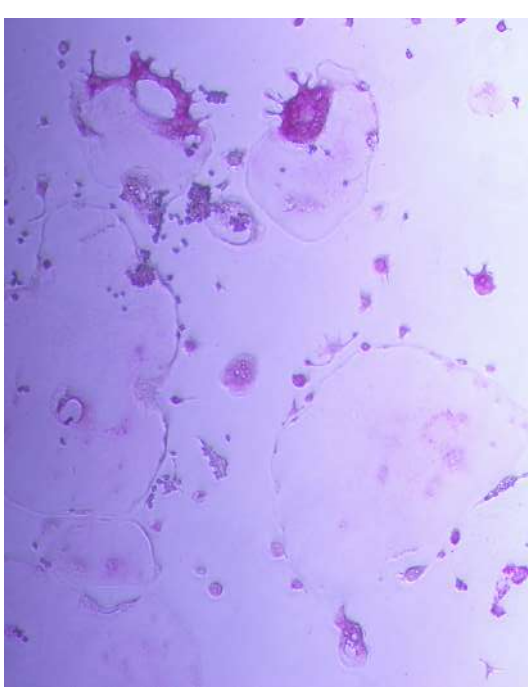
图 4C



Control



50  $\mu\text{M}$



75  $\mu\text{M}$

図 4 50, 75  $\mu\text{M}$  エダラボン添加後の TRAP 染色陽性破骨細胞像

A : A 群 (1 日目と 3 日目の両日添加)

B : B 群 (1 日目に添加)

C : C 群 (3 日目に添加)

倍率は 40 倍.

図 5A

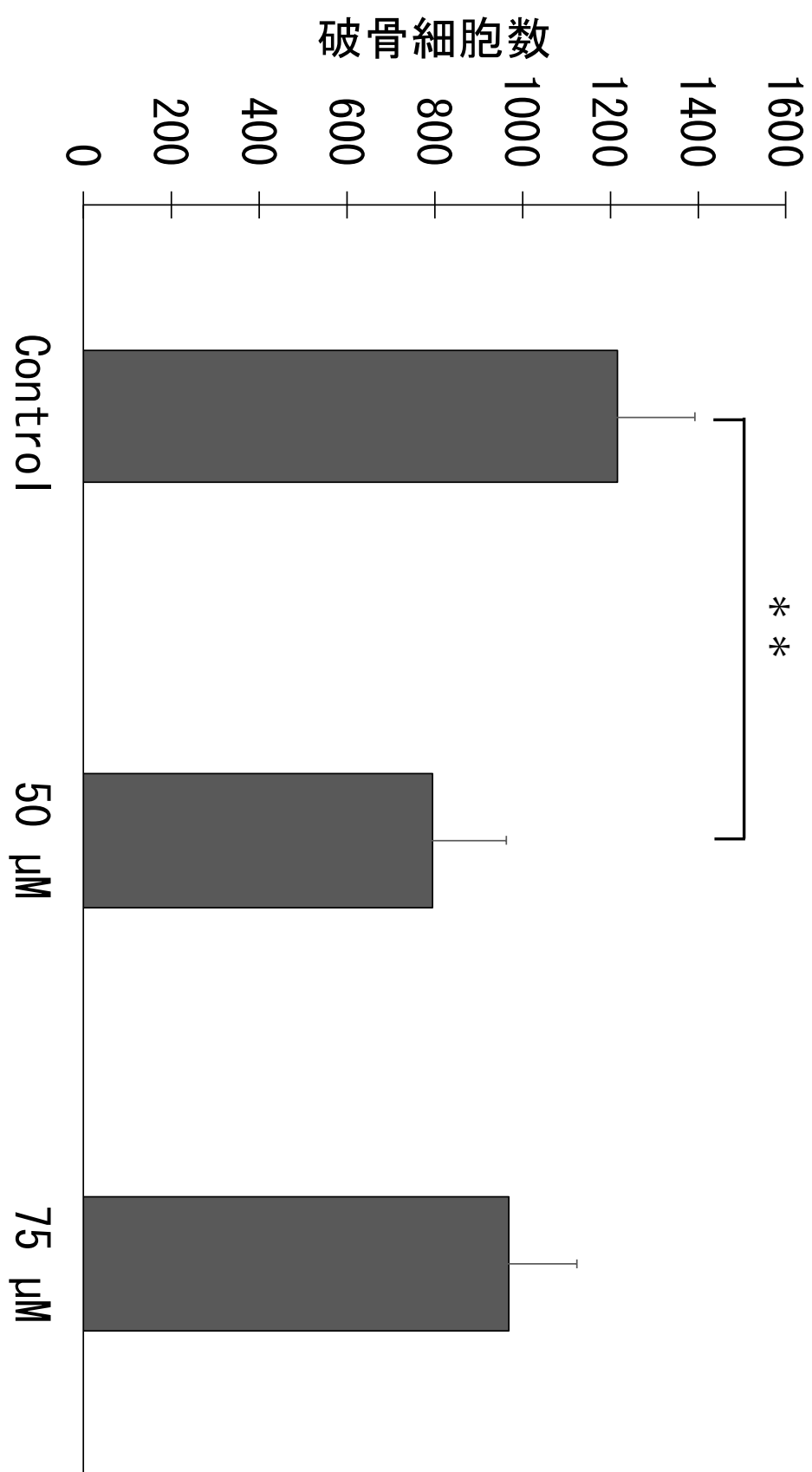


図 5B

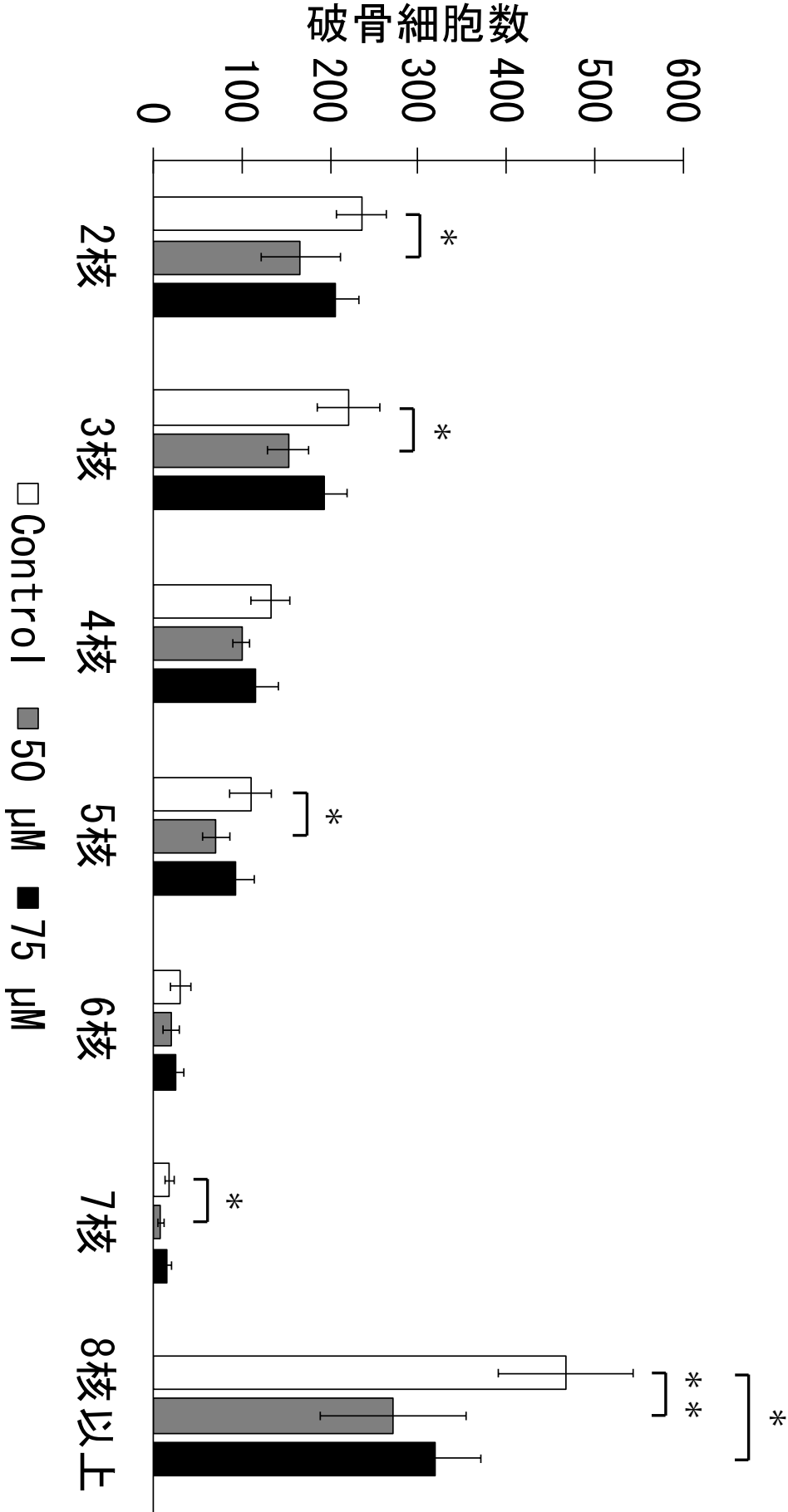


図 5C

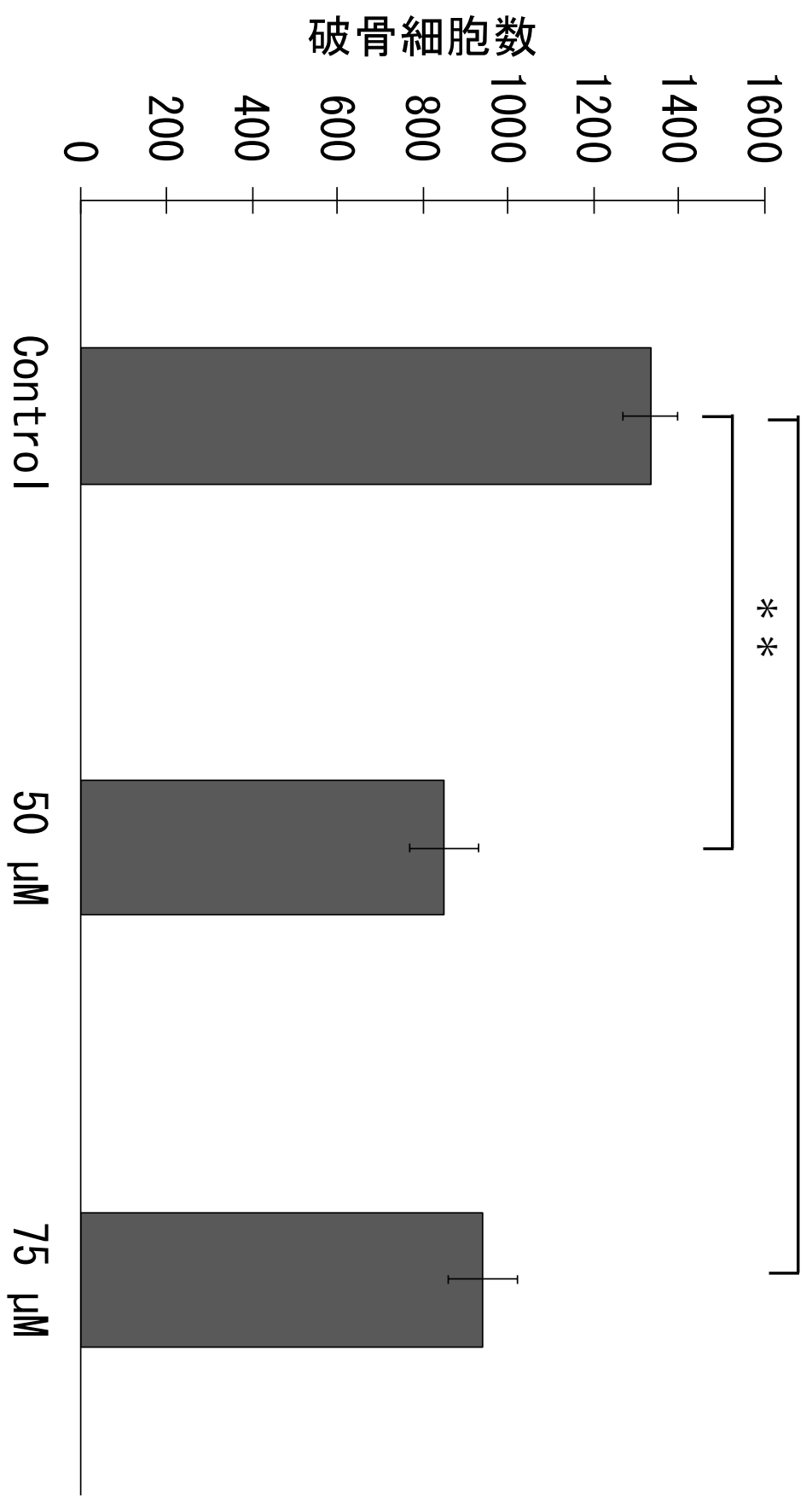


図 5D

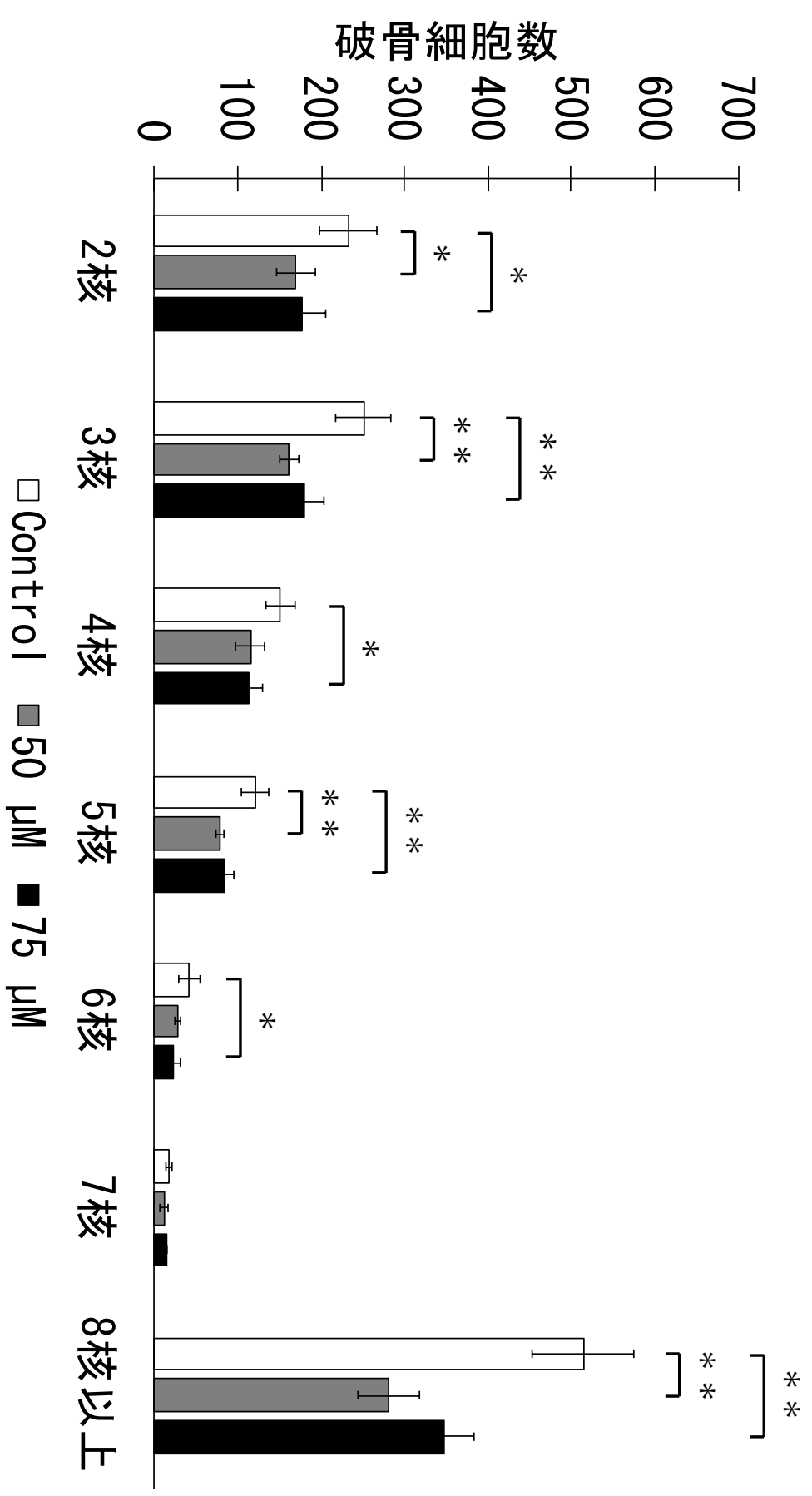


图 5E

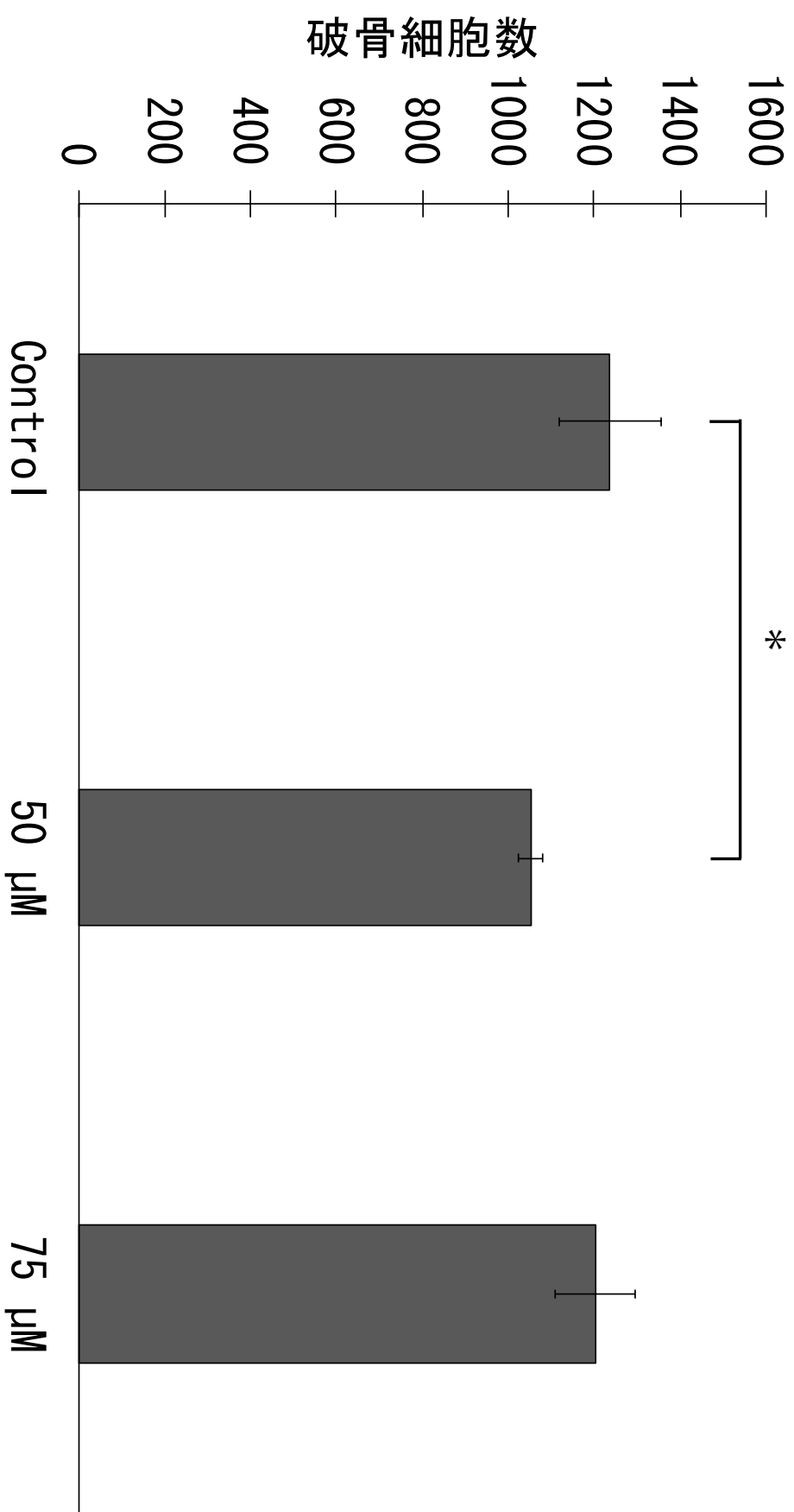


図 5F

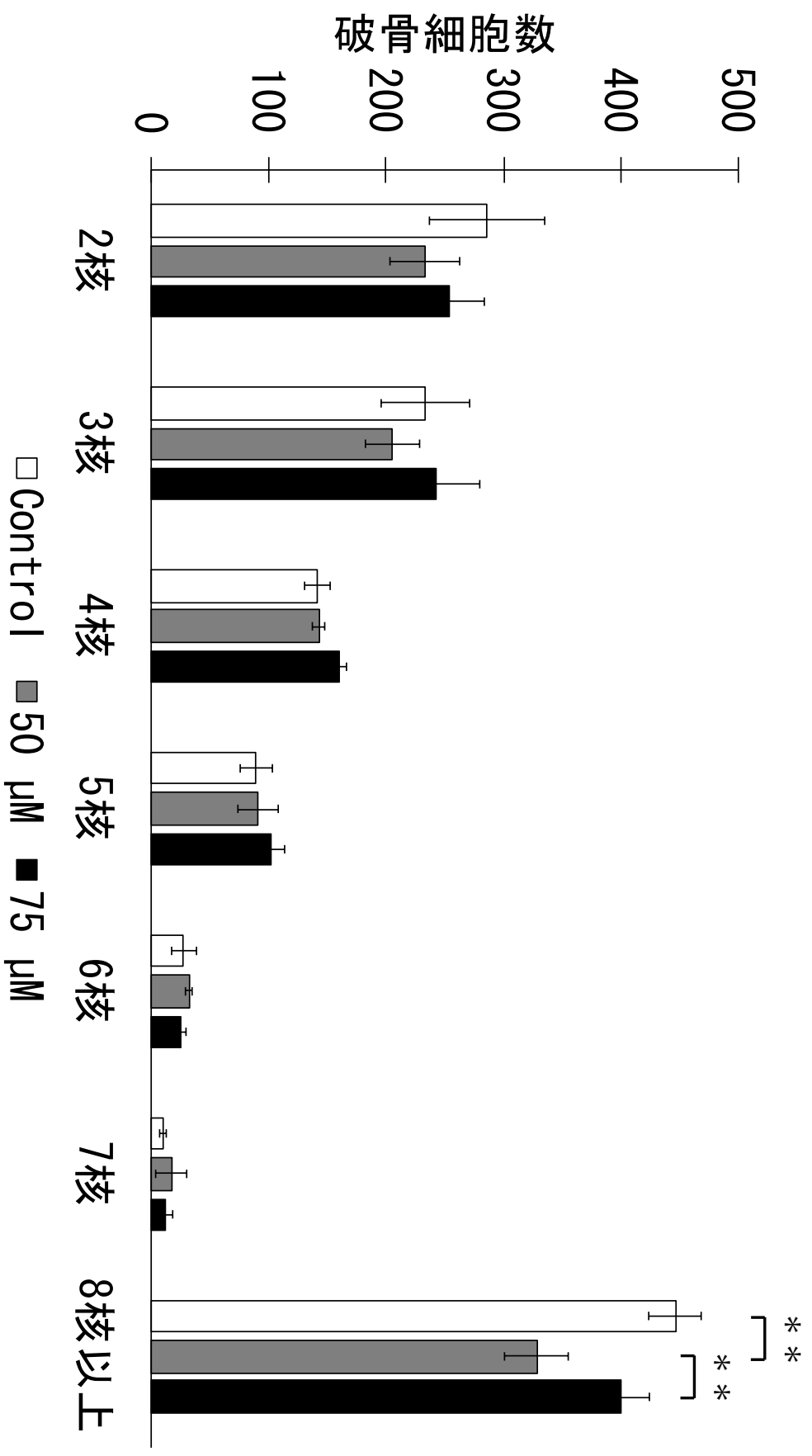


图 5G

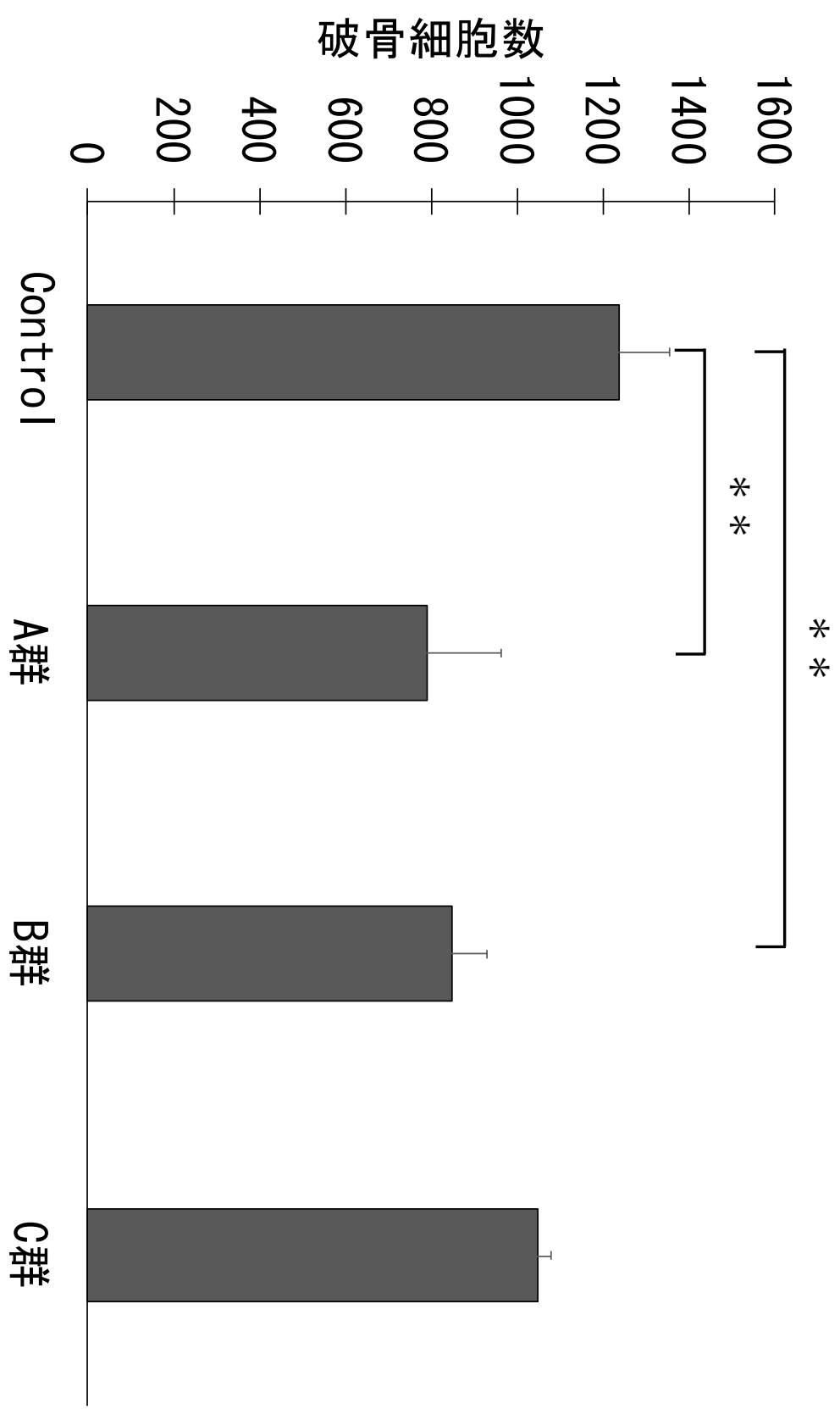


図 5 エダラボン添加後の総破骨細胞数および核数別の破骨細胞数

A : A 群 (1 日目, 3 日目両日に添加) におけるエダラボン濃度毎の総破骨細胞数

B : A 群 (1 日目, 3 日目両日に添加) におけるエダラボン濃度毎の核数別の破骨細胞数

C : B 群 (1 日目に添加) におけるエダラボン濃度毎の総破骨細胞数

D : B 群 (1 日目に添加) におけるエダラボン濃度毎の核数別の破骨細胞数

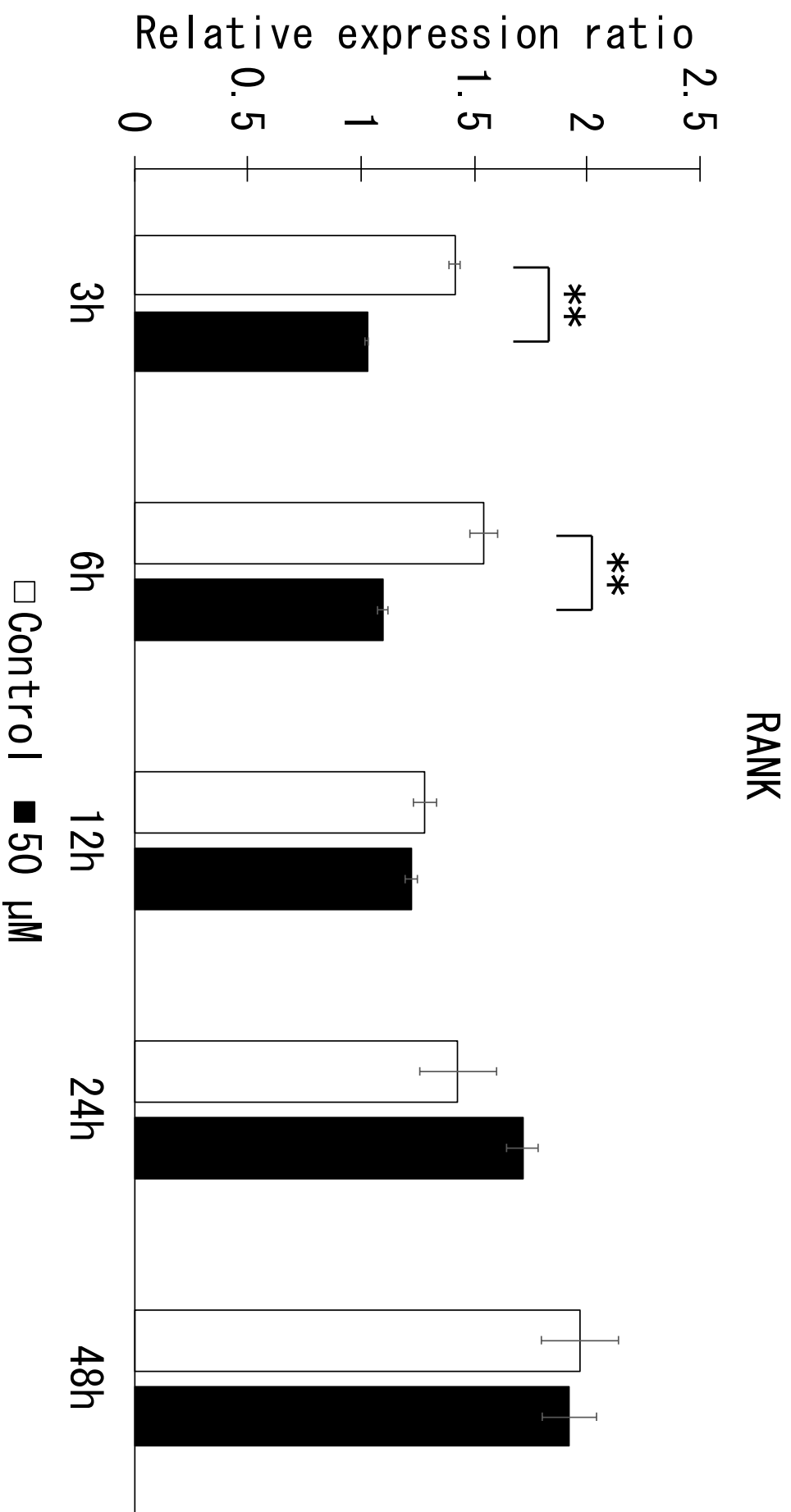
E : C 群 (3 日目に添加) におけるエダラボン濃度毎の総破骨細胞数

F : C 群 (3 日目に添加) におけるエダラボン濃度毎の核数別の破骨細胞数

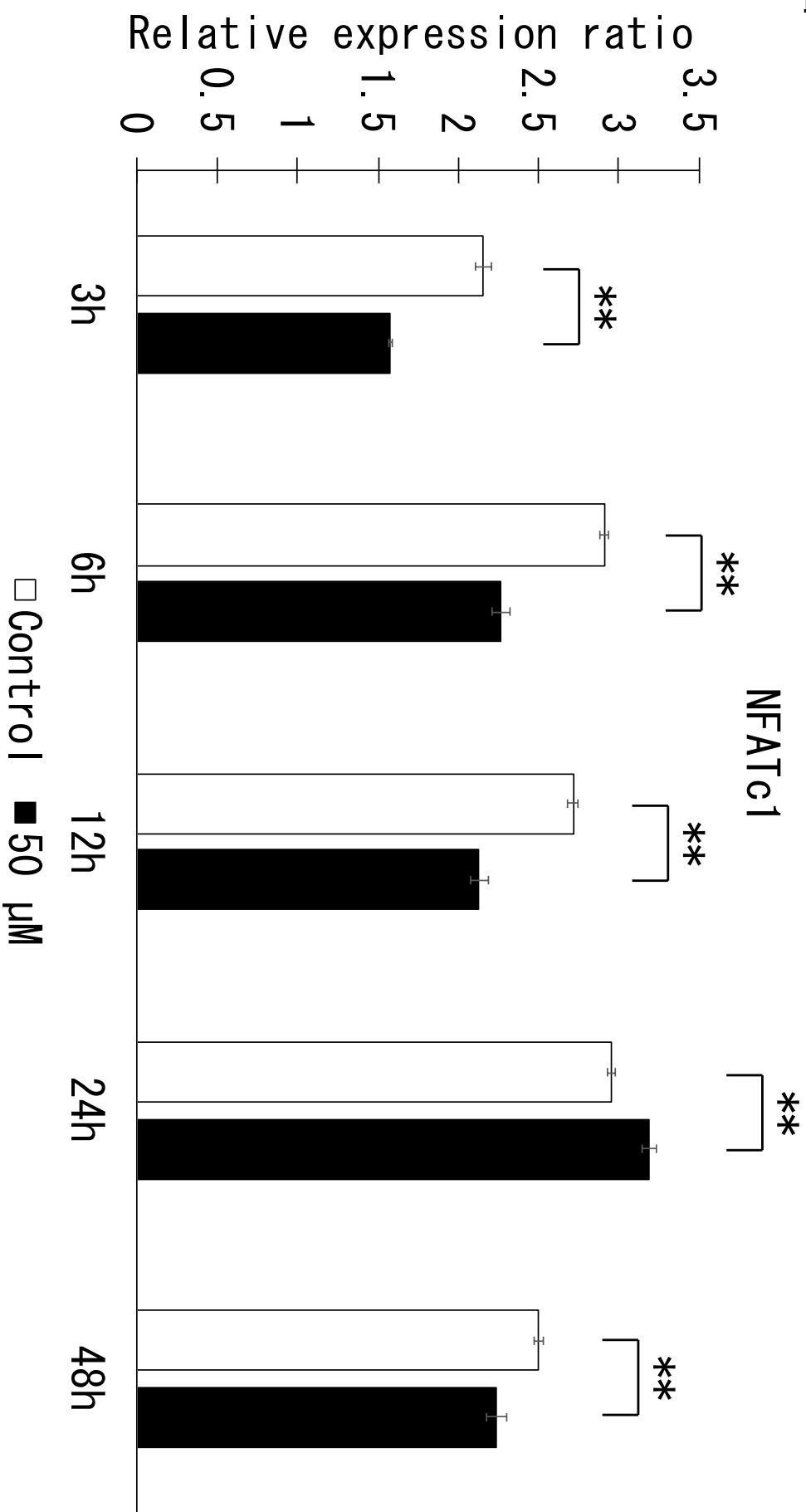
G : 50  $\mu$ M エダラボン添加後の A, B, C 群間における総破骨細胞数の比較

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

图 6A



6B 図



6C

TRAP

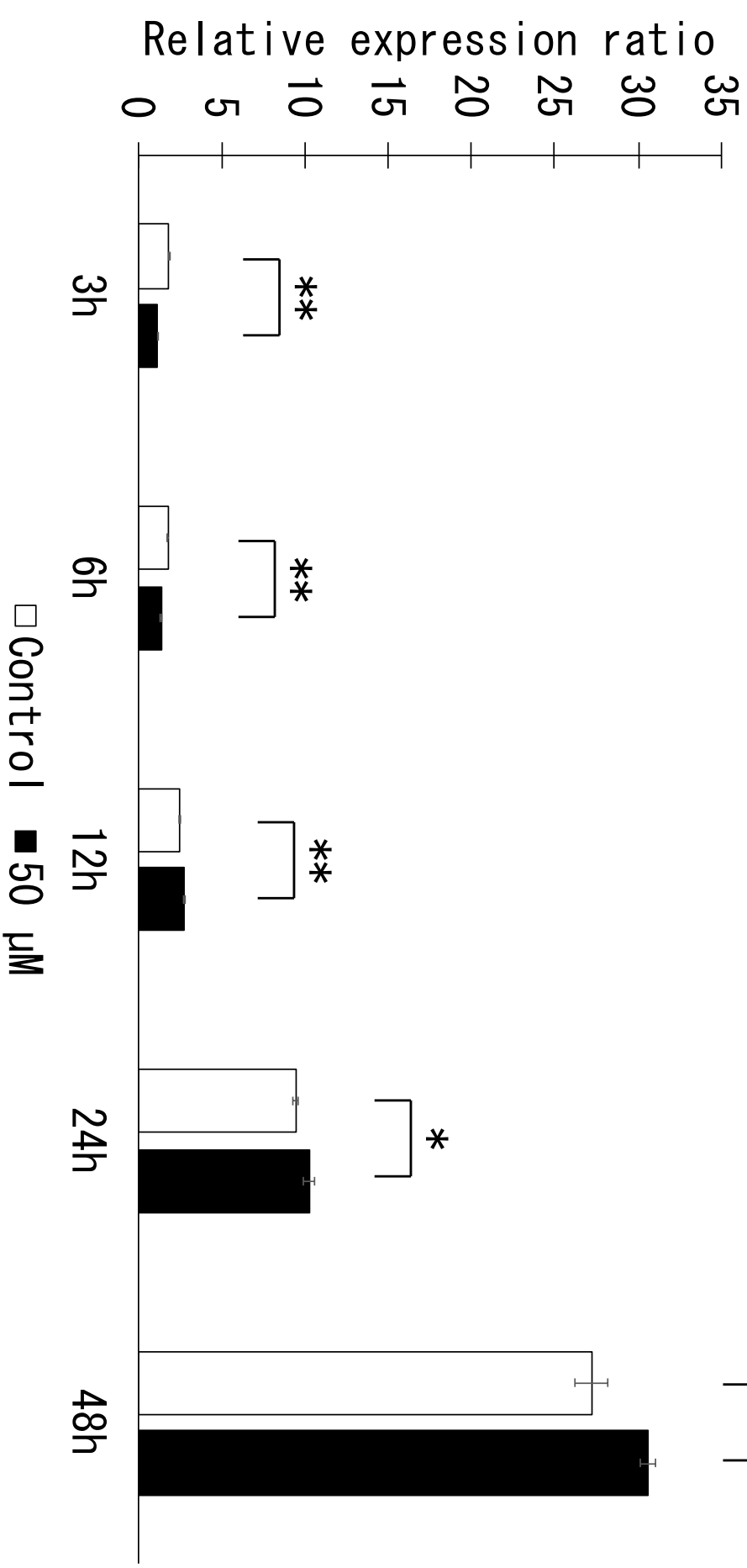
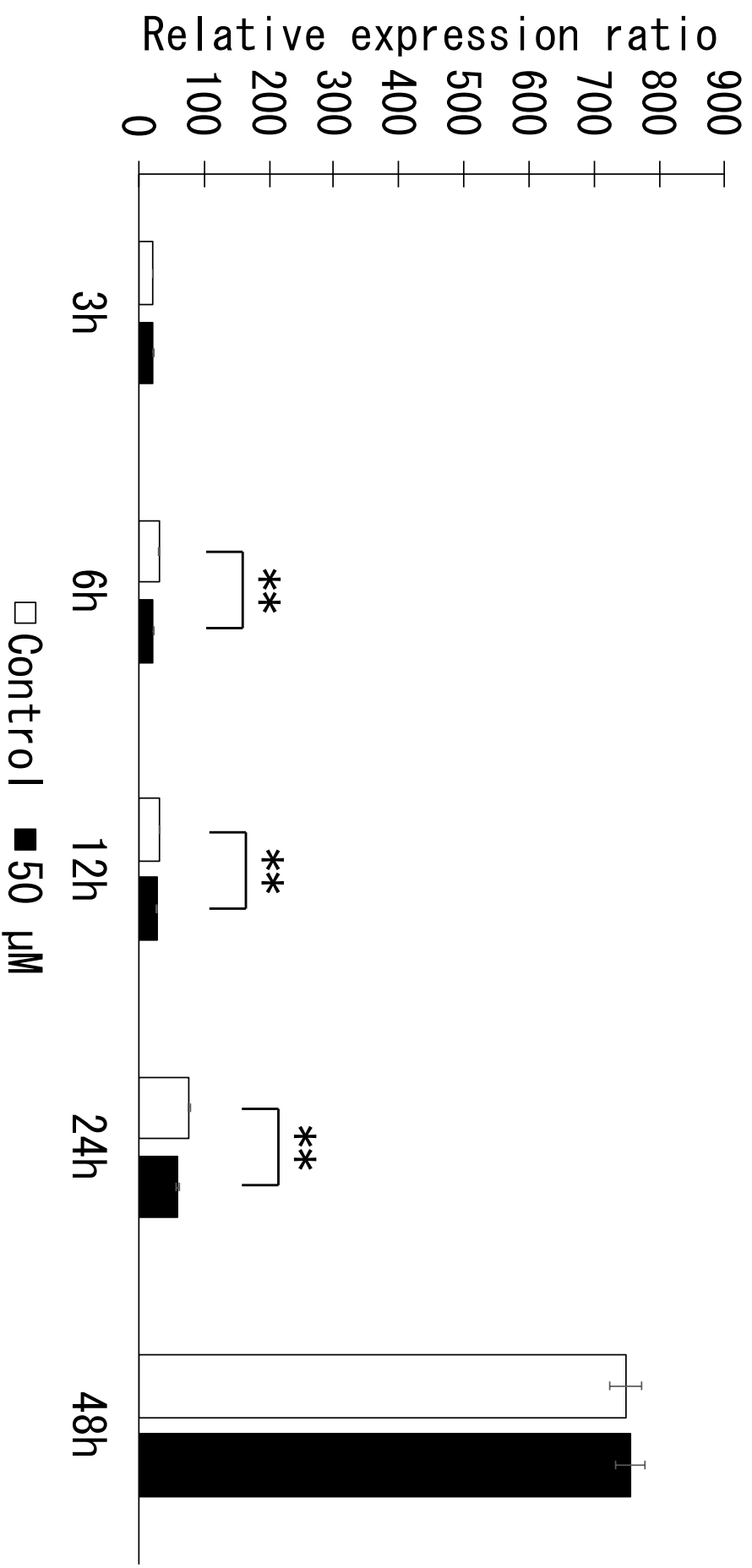


图 6D

Gathepsin K



# DC-STAMP

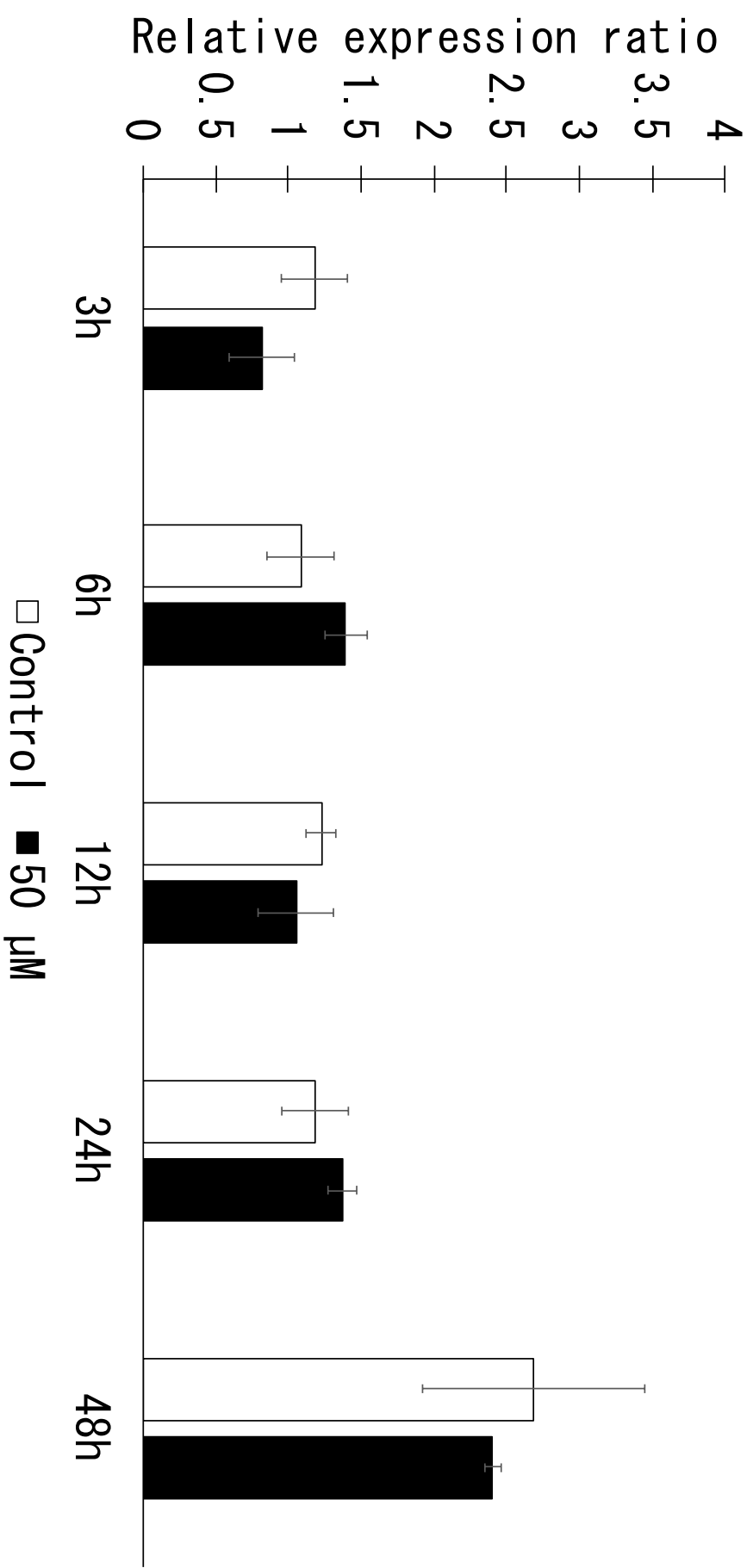


图 6F

OC-STAMP

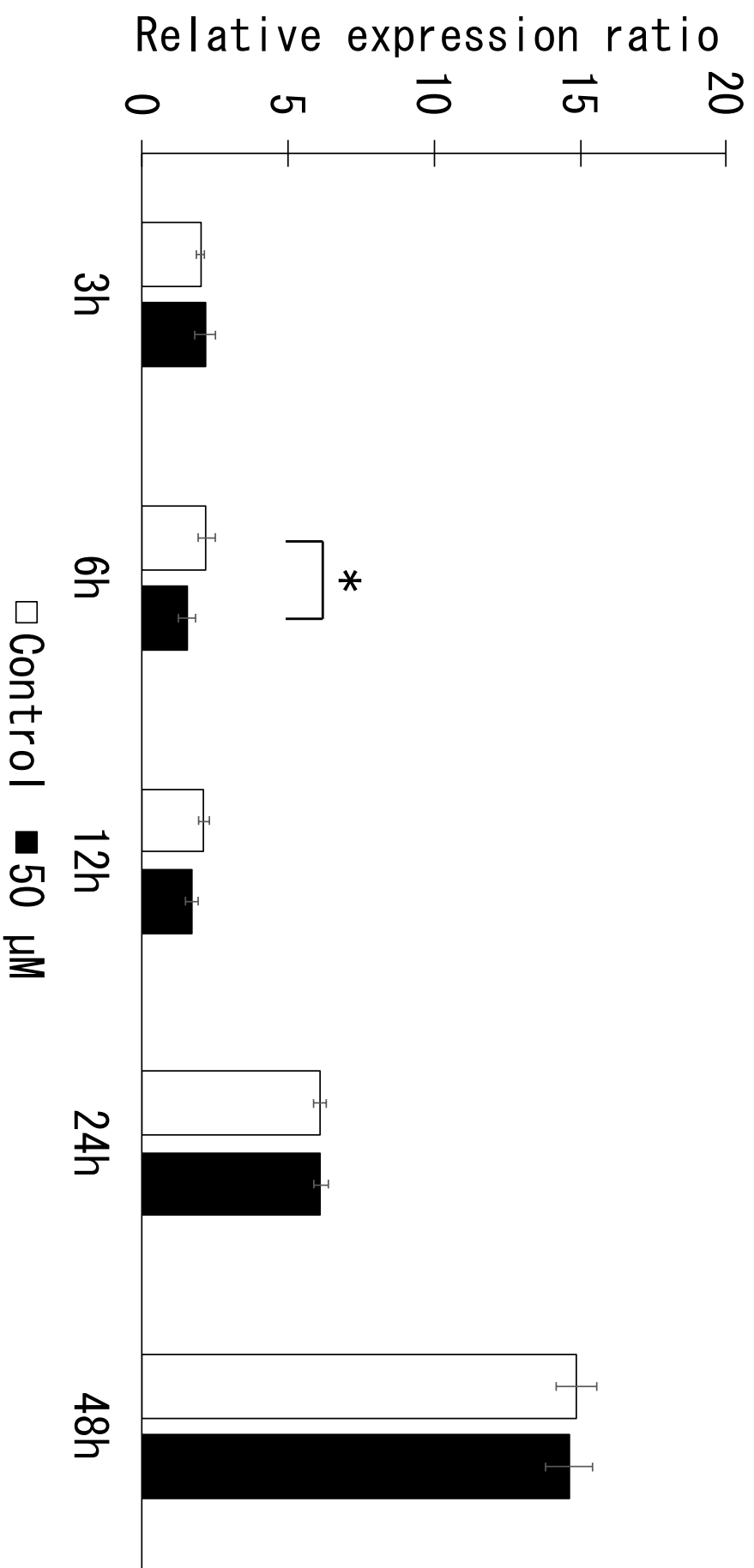
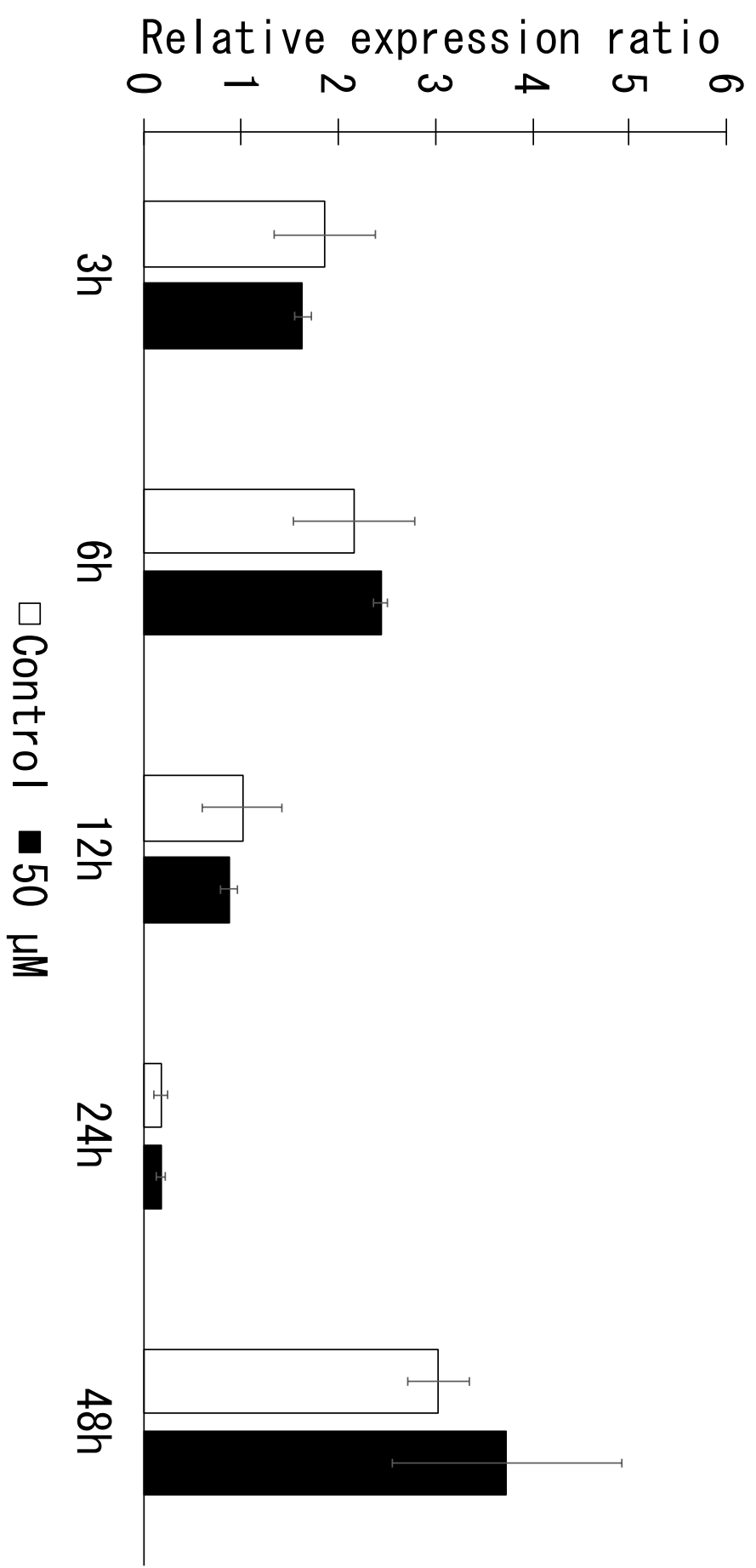


图 6G

Syncytin-A



## 図 6 破骨細胞関連遺伝子の mRNA 発現量の変化

エダラボンを RANKL 添加培養液に投与した 3, 6, 12, 24, 48 時間後の RNA を回収し, その mRNA 発現量を比較した.

A : RANK の mRNA 発現量は 3, 6 時間後に有意に減少した.

B : NFATc1 の mRNA 発現量はエダラボンの添加 3, 6, 12, 48 時間後に有意に減少した.

C : TRAP の mRNA 発現量は 3, 6 時間後に有意に減少しその後増加した.

D : Cathepsin K の mRNA 発現量はエダラボンの添加 6, 12, 24 時間で有意に減少した.

E : DC-STAMP の mRNA 発現量は Control 群と比較し, いずれの時間においても有意差は認められなかった.

F : OC-STAMP の mRNA 発現量はエダラボンの添加 6 時間後に有意に減少した.

G : Syncytin-A の mRNA 発現量はいずれの時間においても有意差は認められなかった.

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

## 考 察

本研究は抗酸化作用を示すエダラボンが破骨細胞の分化誘導へ作用するかどうか、また作用する場合、それが分化誘導のどの時期に作用しているのかを検証した。また、破骨細胞関連遺伝子の mRNA 発現に対するエダラボンの影響を検証した。

まず、エダラボン無添加で破骨細胞数の変化を観察した。50 ng/ml RANKL を添加した RAW 細胞は破骨細胞へ分化誘導され、RANKL 添加日を 1 日目とした場合、2, 3 日目から少数核の破骨細胞が少数観察されるようになり、その後、総破骨細胞数、核数別の総破骨細胞数とも 4 日目から顕著に増加、5 日目を最大とし、その後減少した (図 1A, B)。したがって、破骨細胞の分化・融合が最大となった 5 日目を本実験では上限とした。破骨細胞は分化・融合が完了した後はアポトーシスにより消滅することが報告されている<sup>17-19)</sup>。

次に、RANKL 無添加の RAW 細胞に各濃度のエダラボン (10, 25, 50, 75, 100  $\mu$ M) を添加し、生存細胞数の測定を行った。エダラボンが 75  $\mu$ M 以下の濃度では Control 群と比較し RAW 細胞の生存細胞数に有意差を示さなかった (図 2)。したがって、本実験ではエダラボンの濃度を 50  $\mu$ M, 75  $\mu$ M に設定し実験を進めた。また、破骨細胞分化誘導系のどの時期にエダラボンを添加すると、より

高い効果が得られるかを検証するために、RANKL 添加日を 1 日目とした場合、エダラボンの添加を 1 日目と 3 日目の両日 (A 群), 1 日目のみ (B 群), 3 日目のみ (C 群) と日程を場合分けした。A, B, C 群ともに 50  $\mu$ M エダラボン添加により Control 群と比較し有意に総破骨細胞数が減少した (図 5A, C, E)。A 群では 75  $\mu$ M エダラボンの添加により、総破骨細胞数の減少に有意差が認められなかった。特に少数核 (2~7 核) の破骨細胞に有意差が認められなかった。これは 50  $\mu$ M エダラボンが破骨細胞の分化誘導を抑制する最適濃度であり, 75  $\mu$ M エダラボンでは 8 核以上の巨大破骨細胞数が減少したが, 2~7 核の破骨細胞数は減少しなかったので, 破骨細胞の分化誘導抑制に最適な条件範囲を逸脱し, 分化誘導が抑制されなかった可能性が考えられる。また, A, B, C 群間で 50  $\mu$ M エダラボン添加後の総破骨細胞数を比較すると Control 群と比較し A, B 群では有意に総破骨細胞数が減少したが, C 群では有意差を認めなかった (図 5G)。したがって, RANKL 添加後, 48 時間以内にエダラボンを添加することで, より大きな作用が得られることが示唆された。核数別の破骨細胞数の計測においては, A, B 群では 2~7 核の少数核の破骨細胞数と 8 核以上の巨大破骨細胞数ともに有意な減少を認め, C 群では 8 核以上の巨大破骨細胞数においてのみ有意な減少を認めた。これにより, RANKL 添加後, 48 時間以内にエダラボンを作用させた場合, より大きな作用が得られるとともに, 破骨細胞分化誘導過程の初期から

後期にかけて分化誘導の抑制作用が発現していること、エダラボンの添加が RANKL 添加後の 48 時間以降であった場合には、すでに分化誘導されつつある破骨細胞の巨大化を抑制することが示唆された。

Real-time-PCR 法による破骨細胞関連遺伝子の mRNA 発現量の検証においては、エダラボンを添加して 3, 6, 12, 24, 48 時間後の DC-STAMP, OC-STAMP, NFATc1, Cathepsin K, RANK, TRAP, Syncytin-A の mRNA 発現量を検証した。RANKL はその受容体であり、破骨細胞特有のマーカーでもある RANK<sup>20)</sup> と特異的に結合すると、NF- $\kappa$ B や MAPKs などの様々なシグナル伝達を刺激し、これらの経路が破骨細胞の分化誘導過程のマスタースイッチである NFATc1<sup>21)</sup> と相互作用する。NFATc1 は破骨細胞特有のマーカーである TRAP や Cathepsin K<sup>22-24)</sup> の表出を制御しており、また破骨細胞融合因子であり破骨細胞の形成や分化を促進させるタンパク質である DC-STAMP や OC-STAMP<sup>25-29)</sup> による破骨細胞の多核化にも関与している<sup>30)</sup>。RANKL の添加により発現した RANK は Control 群と比較しエダラボンの添加 3, 6 時間後に有意に減少した (図 6A)。破骨細胞のマスター遺伝子である NFATc1 は Control 群と比較しエダラボンの添加 3, 6, 12, 48 時間後に有意に減少した (図 6B)。破骨細胞関連遺伝子である TRAP は Control 群と比較しエダラボンの添加 3, 6 時間後に有意に減少し、その後増加した (図 6C)。TRAP と同様に破骨細胞関連遺伝子である Cathepsin K は Control 群と比較しエ

ダラボンの添加 6, 12, 24 時間で有意に減少した (図 6D). 破骨細胞融合因子である DC-STAMP はいずれの時間においても有意差を認めなかった一方で, 同様に破骨細胞融合因子である OC-STAMP は Control 群と比較しエダラボンの添加 6 時間後に有意に減少した (図 6E, F). 多核の破骨細胞同士の融合に関連する Syncytin-A はいずれの時間においても有意差を認めなかった (図 6G). Syncytin-A はマウスに, Syncytin-1 はヒトに特有であり, 同様の働きをする<sup>31)</sup>,<sup>32)</sup>. 図 5B, 5D, および 5F の結果より, エダラボンの添加により多核の破骨細胞同士の融合は抑制されたことから, エダラボンは DC-STAMP, OC-STAMP, Syncytin-A 以外の因子により多核の破骨細胞同士の融合を抑制していることが示唆された.

エダラボンは最も強力な酸化力を有するフリーラジカル種であるヒドロキシルラジカル ( $\cdot\text{OH}$ ) のみならず, 酸化力の強い他のフリーラジカルも消去し, 幅広い抗酸化活性を有することが示唆されている<sup>13)</sup>. アラキドン酸代謝系や一酸化窒素合成酵素などのフリーラジカル産生系が脳内に存在すること, また脳虚血もしくは脳血流再開通時に活性化したフリーラジカルが産生され, 脳神経の酸化障害が引き起こされることが報告されている<sup>14)</sup>. このフリーラジカルスキャベンジャーであるエダラボンの抗酸化活性により, 破骨細胞内のフリーラジカルが捕捉されたことにより分化誘導が抑制されたのではないかと考えら

れる．以上より，エ达拉ボンの添加により破骨細胞分化関連因子が抑制される  
ことにより，破骨細胞の分化誘導が抑制されることが示唆された．

## 結 論

エダラボンの投与が RANKL 添加後，48 時間以内であった場合，エダラボンにより破骨細胞分化関連因子が抑制されることにより，破骨細胞の分化誘導が分化初期から後期にかけて抑制される可能性が示唆された．

## 謝 辞

本稿を終えるに当たり，数々のご援助ならびにご協力を賜り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，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．

## 利益相反

開示すべき利益相反状態はない。

## 参考文献

- 1) Marx RE : Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic. J Oral Maxillofac Surg 61: 1115-1117, 2003.
- 2) 山崎 裕, 佐藤 淳, 大賀則孝, 宮腰昌明, 秦 浩信, 浅香卓哉, 足利雄一, 鄭 漢忠, 北川義政 : 3 年以上の経口ビスフォスフォネート製剤服用患者における抜歯後治癒経過に関する後ろ向き調査研究. 日口外誌 60: 514-521, 2014.
- 3) Krimmel M, Ripperger J, Hairass M, Hoefert S, Kluba S, Reinert S: Does dental and oral health influence the development and course of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws (BRONJ)? Oral Maxillofac Surg 18: 213-218, 2014.
- 4) 谷口 透, 有地淑子, 渡 邊裕之, 栗田賢一 : ビスフォスフォネート製剤投与骨粗鬆症患者の抜歯に関連した危険因子について. 愛院大歯誌 56 (1): 9-23, 2018.
- 5) Zandi M, Dehghan A, Janbaz P, Malekzadeh H, Amini P: The starting point for bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw: alveolar bone or oral mucosa? a randomized, controlled experimental study. J Craniomaxillofac Surg 45 (1): 157-

161, 2017.

- 6) Hienz SA, Paliwal S, Ivanovski S: Mechanisms of Bone Resorption in Periodontitis. *J Immunol Res* 2015: Article ID 615486, 2015.
- 7) Feng X, McDonald JM: Disorders of Bone Remodeling. *Annu Rev Pathol* 6: 121-145, 2011.
- 8) Unnanuntana A, Rebolledo BJ, Khair MM, DiCarlo EF, Lane JM: Diseases Affecting Bone Quality: Beyond Osteoporosis. *Clin Orthop Relat Res* 469: 2194-2206, 2011.
- 9) Asagiri M, Takayanagi H: The molecular understanding of osteoclast differentiation. *Bone* 40: 251-264, 2007.
- 10) Yavropoulou MP, Yovos JG: Osteoclastogenesis-Current knowledge and future perspectives. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 8 (3): 204-216, 2008.
- 11) Sokos D, Everts V, de Vries TJ: Role of Periodontal ligament fibroblasts in osteoclastogenesis: a review. *J Periodontal Res* 50: 152-159, 2015.
- 12) Nomura M, Yoshimura Y, Kikuri T, Hasegawa T, Taniguchi Y, Deyama Y, Koshiro K, Sano H, Suzuki K, Inoue N: Platinum Nanoparticles Suppress Osteoclastogenesis Through Scavenging of Reactive Oxygen Species Produced in RAW264.7 Cells. *J Pharmacol Sci* 117: 243-252, 2011.

- 13) 渡辺俊明, 田中正彦, 渡邊和俊, 高松康雄, 戸部昭広: 脳保護剤 (フリーラジカル消去剤) エダラボンの研究開発. 薬学雑誌 124 (3): 99-111, 2004.
- 14) Okuyama S, Morita M, Sawamoto A, Terugo T, Nakajima M, Furukawa Y: Edaravone Enhances Brain-Derived Neurotrophic Factor Production in the Ischemic Mouse Brain. *Pharmaceuticals* 8: 176-185, 2015.
- 15) Watanabe K, Tanaka M, Yuki S, Hirai M, Yamamoto Y: How is edaravone effective against acute ischemic stroke and amyotrophic lateral sclerosis? *J Clin Biochem Nutr* 62 (1): 20-38, 2018.
- 16) Li C, Mo Z, Lei J, Li H, Fu R, Huang Y, Luo S, Zhang L: Edaravone attenuates neuronal apoptosis in hypoxic-ischemic brain damage rat model via suppression of TRAIL signaling pathway. *int J Biochem Cell Biol* 99: 169-177, 2018.
- 17) Wu X, McKenna MA, Feng X, Nagy TR, McDonald JM: Osteoclast Apoptosis: The Role of Fas in Vivo and Vitro. *Endocrinology* 144: 5545-5555, 2003.
- 18) 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.
- 19) 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.

- 20) Park JH, Lee NK, Lee SY: Current Understanding of Rank Signaling in Osteoclast Differentiation and Maturation, *Mol Cells* 40 (10): 706-713, 2017.
- 21) Song MK, Park C, Lee YD, Kim H, Kim MK, Kwon JO, Koo JH, Joo MS, Kim SG, Kim HH:  $\alpha$ 12 regulates osteoclastogenesis by modulationg NFATc1 expression. *J Cell Mol Med* 22 (2): 849-860, 2018.
- 22) Nakagawa N, Kinoshita M, Yamaguchi K, Shima N, Yasuda H, Yano K, Morinaga T, Higashino K: RANK Is the Essential Signaling Receptor for Osteoclast Differentiation Factor in Osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 253: 395-400, 1998.
- 23) Morko J, Kiviranta R, Mulari MT, Ivaska KK, Väänänen HK, Vuorio E, Laitala-Leinonen T: Overexpression of cathepsin K accelerates the resorption cycle and osteoblast differentiation *in vitro*. *Bone* 44: 717-728, 2009.
- 24) Siddiqi MH, Siddiqi MZ, Kang S, Noh HY, Ahn S, Simu SY, Aziz MA, Sathishkumar N, Jiménez Pérez ZE, Yang DC: Inhibition of Osteoclast Differentiation by Ginsenoside Rg3 in RAW264.7 Cells via RANKL, JNK and p38 MAPK Pathways Through a Modulation of Cathepsin K: An *In Silico* and

*In Vitro* Study. *Phytother Res* 29: 1286-1294, 2015.

- 25) Witwicka H, Hwang SY, Reyes-Gutierrez P, Jia H, Odgren PE, Donahue LR, Birnbaum MJ, Odgren PR: Studies of OC-STAMP Fusion: A New Knockout Mouse Model, Rescue of Cell Fusion, and Transmembrane Topology. *PLoS ONE* 10 (6): e0128275, 2015.
- 26) Chiu YH, Ritchlin CT: DC-STAMP: A Key Regulator in Osteoclast Differentiation. *J Cell Physiol* 231: 2402-2407, 2016.
- 27) Chiu YH, Schwarz E, Li D, Xu Y, Sheu TR, Li J, de Mesy Bentley KL, Feng C, Wang B, Wang JC, Albertorio-Saez L, Wood R, Kim M, Wang W, Ritchlin CT: Dendritic Cell-Specific Transmembrane Protein (DC-STAMP) Regulates Osteoclast Differentiation via the  $Ca^{2+}$ /NFATc1 Axis. *J Cell Physiol* 232: 2538-2549, 2017.
- 28) Wisitrasameewong W, Kajiya M, Movila A, Rittling S, Ishii T, Suzuki M, Matsuda S, Mazda Y, Torruella MR, Azuma MM, Egashira K, Freire MO, Sasaki H, Wang CY, Han X, Taubman MA, Kawai T: DC-STAMP Is an Osteoclast Fusogen Engaged in Periodontal Bone Resorption. *J Dent Res* 96 (6): 685-693, 2017.
- 29) Ishii T, Ruiz-Torruella M, Ikeda A, Shindo S, Movila A, Mawardi H, Albassam A,

- Kayal RA, Al-Dharrab AA, Egashira K, Wisitrasameewong W, Yamamoto K, Misa AI, Sueishi K, Han X, Taubman MA, Miyamoto T, Kawai T: OC-STAMP promotes osteoclast fusion for pathogenic bone resorption in periodontitis *via* up-regulation of permissive fusogen CD9. FASEB J 32: 4016-4030, 2018.
- 30) Takagi T, Inoue H, Takahashi N, Katsumata-Tsuboi R, Uehara M: Sulforaphane inhibits osteoclast differentiation by suppressing the cell-cell fusion molecules DC-STAMP and OC-STAMP. Biochem Biophys Res Commun 483: 718-724, 2017.
- 31) S e K, Andersen TL, Hobolt-Pedersen AS, Bjerregaard B, Larsson LI, Delaiss  JM: Involvement of human endogenous retroviral syncytin-1 in human osteoclast fusion. Bone 48: 837-846, 2011.
- 32) 加藤 結香, 吉村 善隆, 上村光太郎, 南川 元, 鈴木 邦明, 飯田順一郎 : 間歇的な機械的刺激は RAW264.7 細胞において破骨細胞分化を抑制する. 北海道歯誌 40 : 5-12, 2019.