

報 文**ケルセチンによる破骨細胞の分化および機能抑制**

禹 済泰, 李 鍵炯, 永井 和夫

中部大学 応用生物学部

序論

骨の量と機能は、骨芽細胞による骨形成と、破骨細胞による骨吸収（骨破壊）のバランスによって維持されている。高齢社会の中で患者数が急速に増加しつつある骨粗鬆症は、破骨細胞による過剰な骨吸収により骨代謝のバランスが破綻し、骨量が減少する疾患である。破骨細胞の分化や機能を阻害する物質は、骨吸収抑制剤として骨粗鬆症やリウマチ性骨疾患を含む代謝性骨疾患の予防や治療に応用できる。しかしながら、このような性質を有する既存の薬剤には副作用、効果、投与方法と期間などで問題点が指摘され、新規薬剤や発症を予防する健康食品の開発が望まれている。

動物実験でパセリや玉ねぎなどの成分が骨粗鬆症などの骨疾患に有効であるという報告が注目を集めている（Muhlbauer et al., 1999）。玉ねぎ抽出物は、高PTH（副甲状腺ホルモン）血症ラットにおける海綿骨の減少を抑制することも知られている（Ingold et al., 1998）。最近、玉ねぎのフラボノイドであるrutinが卵巣摘出ラットにおいて著しい骨吸収抑制活性を有することが報告されている（Horcajada-Moleteni et al., 2000）。

このような背景から食品成分の中には骨粗鬆症の発症予防効果をもつ成分の存在が期待される。我々は代謝性骨疾患に臨床応用可能な骨吸収抑制剤あるいは発症予防効果をもつ食品成分を得る目的で、破骨細胞の分化及び機能に作用する活性物質を植物代謝産物中から探索してきた。

材料と方法**試薬および細胞**

Minimum Essential Medium Alpha Medium (α -MEM) は Invitrogen corporation から購入した。可溶性破骨細胞分化因子 (soluble Receptor

Activator of NF- κ B Ligand ; sRANKL) は Pepro Tech inc. から購入した。PD98059 は Calbiochem から購入した。 α -MEM は ポアサイズ $0.22 \mu\text{m}$ の滅菌フィルターを用いて濾過した。さらに非働化 (56°C , 30分) した牛胎児血清 (Fetal Bovine Serum ; FBS, IWAKI) を 10% 加え、培養液とした。RAW264細胞は Riken cell bank より購入し、10 cm ϕ dish 上にて 10% FBS を含む α -MEM で増殖させ、96 well plate に 0.4×10^4 cells/well の細胞密度で播種した。

RAW264細胞から破骨細胞への分化

破骨細胞の分化誘導は、RAW264細胞株を、sRANKL を 50 ng/ml 添加した 10% FBS α -MEM で 3日間、 37°C で培養し多核破骨細胞を得た (Wani et al., 1999)。酒石酸耐性酸ホスファターゼ (Tartrate Resistant Acid Phosphatase ; TRAP) は破骨細胞に特徴的な酵素として知られており、この酵素活性を利用して破骨細胞を選択的に染色することが出来る。

共存培養による破骨細胞の形成

破骨細胞は、マウスの脛骨及び大腿骨より採取した骨髓細胞をマウス新生児の頭頂骨より採取した骨芽細胞と culture dish 上で 7日間共存培養をすることにより調製した。この時、破骨細胞の分化誘導のために培養系に活性型ビタミン D₃ (10 nM) を添加した。ケルセチンの活性評価は、TRAP に対する染色 (TRAP 染色) を行った後、顕微鏡観察により判定した。

TRAP 活性測定法

10 mM 酒石酸ナトリウムを含む 50 mM クエン酸緩衝液 (pH 4.6) 1 mL 当たり 1.36 mg の *p*-Nitrophenyl phosphate disodium crystalline (SIGMA) を混合し、基質溶液とした (Takahashi et al., 1988)。この反応液は使用直前に調製した。

培養後, 培養液を除去し, 10%ホルマリンを含むPBSで細胞を15分間固定し, さらにエタノールで1分再固定した。固定液を除去し風乾後, TRAP反応液 (100 μ l/well) を加え室温で30分間反応させた。0.1 N NaOH (100 μ l/well) を加えることにより反応を停止させ, 波長405 nmにおける吸光度をTRAP活性の指標とした。

TRAP染色法

基質5 mg (Naphtol AS-MX phosphate) を *N,N*-Dimethylformamide 500 μ lに溶解し, さらに色素30 mg (Fast red violet LB salt) と共に50 mM 酒石酸ナトリウム含有0.1 M酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) 50 mlに溶解することによりTRAP染色液を調製した。

培養後, 培養液を除去し10%ホルマリンを含むPBSで細胞を15分間固定し, さらにエタノールで1分再固定した。固定液を除去し風乾後, TRAP染色液 (50 μ l/well) を加え室温で30分間染色した。染色後, 蒸留水によって洗浄し, 赤色に染色された細胞を破骨細胞とした。

MTTアッセイ

RAW264細胞に対する化合物の毒性は3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) (Dojindo) によって評価した。細胞はMTT (50 μ g/well) で処理して4時間反応させ570 nmにおける吸光度を測定した。

破骨細胞のアクチンリング染色

RAW264細胞をRANKLとPD98059存在下で4-5日間培養してリング状のアクチンフィラメント構造 (アクチンリング) を示す成熟破骨細胞を調製した (Hotokezaka et al., 2002)。破骨細胞のアクチンリングは, ケルセチン存在下で24時間処理した後Rhodamine-phalloidinでアクチンフィラメントを蛍光染色し, 蛍光顕微鏡で観察した。

骨吸収活性

破骨細胞の骨吸収活性は, 活性型ビタミンD₃存在下でマウス骨髄細胞とST2細胞の共存培養から調製した成熟破骨細胞を用いて行った。破骨細胞を象牙切片上に播いた後24時間培養し

Mayer's hematoxylin溶液で形成されたピットを染色し, その数を数えた。

結 果

ケルセチンは破骨細胞の分化を阻害する

RAW264細胞をRANKLの存在下で培養すると, 培養3日目で破骨細胞のマーカーであるTRAP活性が上昇する。ケルセチンはRANKLによるTRAP活性の上昇を濃度依存的に阻害し, IC₅₀値は約2 μ Mであった (図1)。

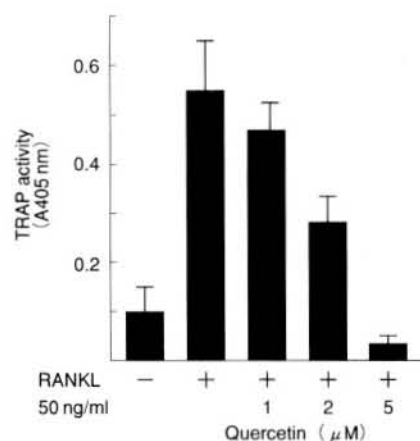


図1 RAW細胞株におけるRANKLによるTRAP活性上昇に対するQuercetinの効果

破骨細胞のTRAP活性の上昇を阻害する濃度でRAW264細胞の増殖阻害や非特異的な毒性は認められなかった。また, ケルセチンは, RANKLおよびM-CSFによる骨髄細胞培養からの破骨細胞形成を阻害した (図2AおよびB)。その阻害効果はRAW264細胞における効果とほぼ同程度であった。更に, ケルセチンは, 活性型ビタミンD₃存在下における骨髄細胞と骨芽細胞との共存培養による破骨細胞形成を阻害した (data not shown)。

ケルセチンは成熟破骨細胞のアクチンリングの破壊を誘導する。

破骨細胞が骨吸収機能を果たすためには分化終了後の活性化過程が必要不可欠である。活性化破骨細胞はアクチンリングを含むが, sRANKLおよびPD98059存在下でRAW264細胞からもこの構造をもった多核破骨細胞が形成される (図3)。このアクチンリングをもつ破骨細胞をケルセチンで24時間処理するとリング状の細胞構造が破壊された。ケルセチンはTRAP活性や破骨

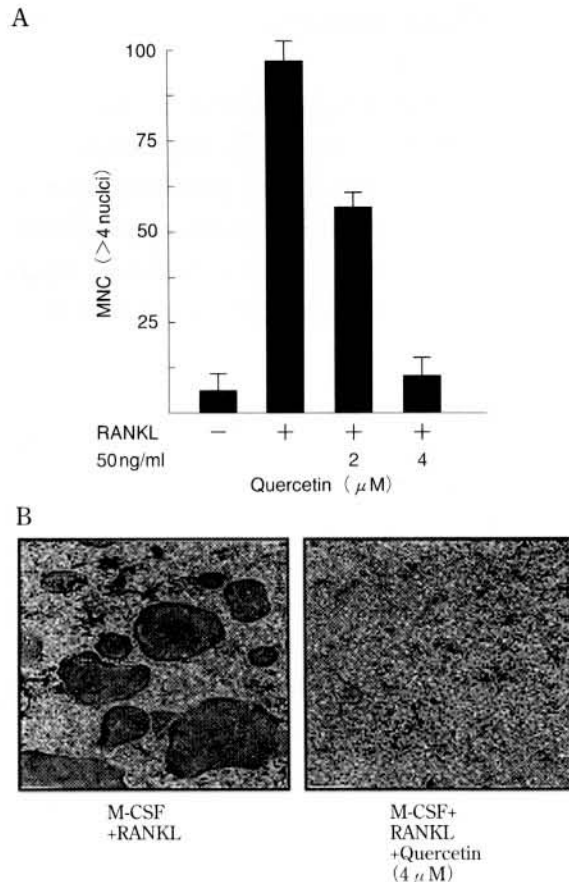


図2 骨髄細胞から破骨細胞形成に対するQuercetinの効果

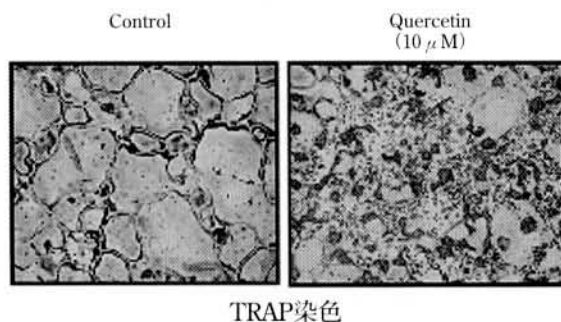


図3 Quercetinによる成熟破骨細胞のリング構造の破壊

細胞の生存に影響は認められなかった。ケルセチン5 μMで50%、10 μMで90%以上リング状の細胞構造が破壊された。一方、破骨細胞をケルセチンで12時間処理後、培地からケルセチンを除去すると破壊されたリング状の細胞構造の回復(約80%)が認められた。

ケルセチンは破骨細胞による骨吸収を抑制する

骨吸収機能を有する破骨細胞を骨片上に培養するとピットを形成する。骨髄細胞と骨芽細胞との共存培養から得られた成熟破骨細胞を象牙

切片上に培養し、ピット形成に対するケルセチンの効果を検討した。その結果、ケルセチンは濃度依存的にピット形成を抑制した(図4)。また、⁴⁵Caプレラベル骨の培養でPTHは骨から培地へのカルシウムの放出を促進する。ケルセチンは、PTHによる⁴⁵Caの放出促進を抑制した(data not shown)。

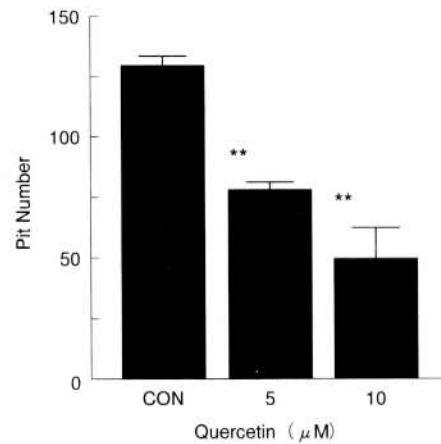


図4 Quercetinによる骨吸収抑制効果

考 察

ケルセチンは動物実験で骨吸収を抑制することが知られているが、その作用標的細胞はまだ明らかにされていなかった。今回、我々の研究で、ケルセチンは、破骨細胞の前駆細胞RAW264に作用しRANKLによる単核破骨細胞の形成を阻害することが明らかになった。また、骨髄細胞とST2細胞との共存培養における破骨細胞形成もケルセチンによって阻害された。また、活性化破骨細胞に認められるアクチンリング構造の破壊を誘導し、破骨細胞による象牙切片上でのピット形成を抑制した。更に、ケルセチンは、⁴⁵Caのプレラベルしたマウスの骨から培地へのCaの放出を抑制した。したがって、骨吸収抑制効果は、アクチンリングの阻害に由来すると考えられる。最近、ケルセチンは成熟破骨細胞の細胞死を誘導することが報告されている(Walle et al., 2003)。しかし、その濃度は50 μM以上で破骨細胞による骨吸収を阻害する濃度の10倍以上である。したがって、ケルセチンの骨吸収抑制活性が、破骨細胞の細胞死誘導に由来するのは部分的であり、アクチンリングの破壊と初期分化阻害が骨吸収抑制に深く関わ

っていると考えられる。ケルセチンは、日常の食品から吸収され、人において血中濃度が0.5–1.6 μ Mまで上昇することが知られている (Paganga et al., 1997)。この濃度は、破骨細胞の分化を阻害する濃度とほぼ一致する。以上より、ケルセチンの骨粗鬆症予防食品素材としての応用が期待される。

参考文献

Hotokezaka H., Sakai E., Kanaoka K., Saito K., Matsuo K., Kitaura H., Yoshida N., Nakayama K. 2002. U0126 and PD98059, specific inhibitors of MEK, accelerate differentiation of RAW264.7 cells into osteoclast-like cells. *J. Biol. Chem.* 277, 47366-47372

Horcajada-Molteni M.N., Crespy V., Coxam V., Davicco M.J., Remesy C., Barlet J.P. 2000. Rutin inhibits ovariectomy-induced osteopenia in rats. *J. Bone Miner. Res.* 15 2251-2258

Ingold P., Kneissel M., Muhlbauer R.C., Gasser J.A. 1998. 2nd Joint meeting of the ASBMR and the IBMS. Abstracts. *Bone* 23 (suppl), S387

Muhlbauer R.C., Li F. 1999. Effect of vegetables on bone metabolism. *Nature* 401, 343-344

Paganga G., Rice-Evans C.A. 1997. The identification of flavonoids as glycosides in human plasma. *FEBS Lett.* 401, 78-82

Takahashi N., Akatsu T., Udagawa N., Sasaki T., Yamaguchi A., Moseley J.M., Martin T.J., Suda T. 1988. Osteoblastic cells are involved in osteoclast formation. *Endocrinology* 123, 2600-2602

Wani M.R., Fuller K., Kim N.S., Choi Y., Chambers T. 1999. Prostaglandin E2 cooperates with TRANCE in osteoclast induction from hemopoietic precursors: synergistic activation of differentiation, cell spreading,

and fusion. *Endocrinology* 140, 1927-1935

Wattel A., Kamel S., Mentaverri R., Lorget F., Prouillet C., Petit J.P., Fardelonne P., Brazier M. 2003. Potent inhibitory effect of naturally occurring flavonoids quercetin and kaempferol on in vitro osteoclastic bone resorption. *Biochem Pharmacol.* 65, 35-42

Title : Quercetin suppresses bone resorption by inhibiting the differentiation and disrupting actin ring in osteoclasts.

Author : Je-Tae Woo, Kun-Hyung Lee and Kazuo Nagai (Department of Biological Chemistry, Chubu University).

Keywords : Osteoclast, bone resorption, quercetin, osteoporosis