

# テオブロミンの摂取が骨髄由来体性幹細胞の増殖および分化能に与える影響

Effect of theobromine intake on proliferation and bone differentiation abilities of bone marrow-derived somatic stem cells

堀本泰弘<sup>1)</sup>, 中谷祥恵<sup>1)</sup>, 齋藤彩果<sup>1)</sup>,  
片倉賢紀<sup>1)</sup>, 杉本直俊<sup>2)</sup>, 古旗賢二<sup>1)\*</sup>  
Yasuhiro Horimoto<sup>1)</sup>, Sachie Nakatani<sup>1)</sup>, Saika Saito<sup>1)</sup>,  
Masanori Katakura<sup>1)</sup>, Naotoshi Sugimoto<sup>2)</sup>, Kenji Kobata<sup>1)</sup>

## 要旨

テオブロミンはキサンチンのメチル誘導体の一種で、カカオ、茶やガラナなどに含まれている。テオブロミンの生理作用として、カフェインと同様に血管拡張作用や覚醒作用などが知られている。最近の研究で、テオブロミンは間葉系幹細胞 (MSC) から骨芽細胞への分化を促進する可能性が報告された。そこで、本研究では、テオブロミンの摂取がマウスの骨密度と骨髄中の MSC および造血系幹細胞 (HSC) の増殖能および分化能に与える影響を検討した。

6週齢の雄性 C57BL/6J マウスを通常食、0.05% テオブロミン食の2群に分け、自由摂食条件下で4週間飼育した。飼育終了後、右後肢脛骨の骨密度をX線 CT で測定した。また、後肢大腿骨および脛骨の骨髄液から採取した MSC の細胞増殖能を WST-1 法で評価した。骨芽細胞への分化能は、アルカリフォスファターゼ (ALP) 活性染色法を用いて評価した。HSC の破骨細胞への分化能は、tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) 陽性細胞数で評価した。さらに、骨髄液中のテオブロミン濃度を LC-MS/MS によって測定した。

テオブロミン食群の骨密度は通常食群と比較して皮質骨で有意に高値を示し、海綿骨では高値傾向 ( $p = 0.0602$ ) であった。テオブロミン食群骨髄由来の MSC の増殖能および分化能は通常食群と比較していずれも 1.3 倍で有意に高値を示した。HSC の分化能は、テオブロミン食群で通常食群と比較して低値傾向 ( $p = 0.1055$ ) であった。骨髄液のテオブロミンは、テオブロミン食群でのみ検出されたが、 $18.9 \pm 5.6$  pg/mL と低濃度だった。

これらの結果から、継続的なテオブロミン摂取が間接的に MSC の増殖能と骨芽細胞への分化能を高め、一方で HSC の破骨細胞への分化能を抑えることにより、骨密度を増加させる可能性が示唆された。

Functional Food Research 16 : 57-64, 2020

## keywords

テオブロミン, 骨密度, 間葉系幹細胞, 造血系幹細胞

## はじめに

テオブロミンはメチルキサンチン類と呼ばれるアル

カロイドの一種で、カカオ、茶、ガラナなど様々な植物に含まれ、古くから飲料や食品として利用されてきた<sup>1-3)</sup>。テオブロミン以外の代表的なメチルキサンチ

受付日 2020年4月3日 受理日 2020年6月18日 原著

1) 城西大学大学院薬学研究所 Graduate school of pharmaceutical sciences, Josai University 〒350-0295 埼玉県坂戸市けやき台 1-1

\* kobata@josai.ac.jp 2) 金沢大学医薬保健研究域医学系 Graduate School of Medical Sciences, Kanazawa University

ンとしてはカフェインがあり (図 1), これらの共通の作用として, 緩和な興奮作用, 気管支拡張作用, 末梢血管拡張作用などが報告されている<sup>4,5)</sup>.

骨粗鬆症とは骨強度が低く, 骨が脆くなり, 骨折しやすくなった病態である. 骨粗鬆症は加齢により有病率が上昇し, 現在の日本では, 80 歳以上の女性の 65% が骨粗鬆症に罹患している<sup>6)</sup>. 骨粗鬆症に伴う大腿骨近位部の骨折は要介護のリスクを増大させることから, 骨粗鬆症の予防は超高齢社会を迎えた日本にとって解決すべき課題となっている.

四肢の主要な骨である長管骨は皮質骨と海綿骨から構成され, 身体を支持する硬組織として機能している. 骨には骨芽細胞と破骨細胞が存在し, 骨芽細胞が骨形成, 破骨細胞が骨吸収を担うことで常にリモデリングが行われ, 骨の量と質が保たれている. 骨芽細胞および破骨細胞は, 骨髄中の体性幹細胞である間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cell, MSC) と造血幹細胞 (Hematopoietic stem cell, HSC) からそれぞれ供給されている. すなわち, MSC および HSC が必要に応じて増殖し, 適切に骨芽細胞および破骨細胞に分化することが, 健全な骨の維持に重要である.

メチルキサンチン類であるカフェインやテオフィリンの摂取は骨芽細胞の分化を抑制し, 破骨細胞の分化を促進させることで骨密度を低下させる可能性が複数の研究で報告されてきた<sup>7-12)</sup>. 一方, 最近の報告で, 妊娠および授乳中のラットにテオブロミンを摂取させた結果, 仔ラットの骨密度が増加し, 長管骨の長さも有意に増加することが報告された<sup>13)</sup>. また, 間葉系幹細胞に直接テオブロミンを添加すると骨芽細胞への分化が促進されることが報告された<sup>13)</sup>. しかし, 摂取したテオブロミンが骨髄液中に到達するのか, また, 骨髄液中に存在する幹細胞に影響を与えるのかについては検討されていない.

本研究では, 健全な成長期のマウスに 28 日間継続的にテオブロミンを摂取させた後の骨髄液中へのテオブロミンの到達量, および骨髄液中に含まれる MSC および HSC の増殖能ならびに分化能に与える影響を評価することを目的とした.

## 1. 方法

### 1 | 動物飼育

実験動物は雄性 C57BL/6J マウス (三協ラボサービス株式会社, 東京, 日本) を 20 匹用いた. 5 週齢

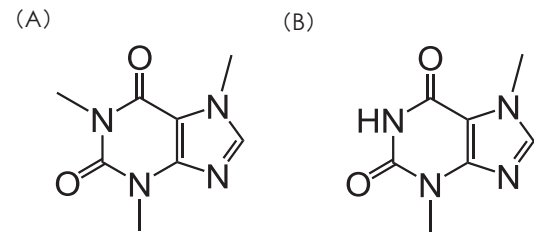


図 1 メチルキサンチン類の構造  
(A) カフェイン (B) テオブロミン

のマウスを 7 日間予備飼育し, 6 週齢となったマウスを通常食群, 0.05% テオブロミン食群の 2 群 (各  $n = 10$ ) に分け, それぞれ 28 日間飼育した. 0.05% テオブロミン食は CRF-1 飼料 (オリエンタル酵母工業株式会社, 東京, 日本) にテオブロミン (純度 98% 以上, 富士フィルム和光純薬工業株式会社, 大阪, 日本) を混合し調製した.

マウスは恒温恒湿度 (室温:  $21 \pm 1^\circ\text{C}$ , 湿度: 45 ~ 50%), 12 時間明暗サイクル (明期: 7:00 ~ 19:00) 環境下で飼育を行った. 本実験は, 城西大学全学実験動物管理委員会の承認を得た後 (承認番号 JU19075), 城西大学実験動物指針に基づいて行われた.

試験食開始から 28 日後, イソフルラン麻酔下で全採血を行った. 右後脚脛骨は大腿骨と分離し, 70% EtOH で固定を行い使用時まで  $4^\circ\text{C}$  で保存した.

## 2 | 骨密度

70% EtOH に保存した右後脚脛骨を測定に使用した. 画像解析は, 小型実験動物用 3D マイクロ X 線 CT CosmoScan GX (株式会社リガク, 東京, 日本) で行った. マイクロ X 線 CT 装置で得られた画像を Analyze 14.0 Bone Microarchitecture Analysis software (Analyze Direct, Seattle, WA, USA) を用いて再構築し, 脛骨の前額断面画像を取得し, 骨構造を比較した.

骨密度測定には実験動物用 X 線 CT 装置 (Latheta LCT-100, 日立, 東京, 日本) を用いて, peripheral Quantitative Computed Tomography (pQCT) 法によって測定した. 測定条件は出力管電圧 40 kV, 出力管電流 3 mA とし, 脛骨近位部から 1 mm ごとに 20 箇所測定した. 骨密度は Latheta 付属の骨解析ソフトウェアを用いて, 骨計測モードで解析し, 皮質骨骨密度および海綿骨骨密度を算出した.

### 3 | 骨髄液の採取および骨髄由来体性幹細胞の初代培養

マウスの両大腿骨および左脛骨の両骨端 2 mm を切除後、2000 × *g* で遠心し、骨髄液を回収した。得られた骨髄液に 20 μL ダルベッコ PBS (-) (日本製薬株式会社, 東京都, 日本) を添加し、ピペッティング後、回転数 6000 rpm 遠心力 2000 × *g* で遠心 (Fisher Scientific) し、上清の一部をテオブロミンの定量に用いた。また、骨髄液を 10% FBS (Sigma-Aldrich Japan, 東京, 日本) および 100 U/mL Penicillin (明治製薬ファルマ株式会社, 東京, 日本) 含有 Minimum Essential Medium Alpha Medium (ライフテクノロジーズジャパン株式会社, 東京, 日本) 10 mL で懸濁後、100 mm dish に播種して、37°C, 5% CO<sub>2</sub> 条件下で培養した。24 時間培養後、HSC を含む浮遊細胞を回収し、96 well plate に 4.0 × 10<sup>4</sup> cells/well で播種した。また、骨髄液の播種から 3 日後、浮遊細胞を取り分け、繊維芽細胞様の接着細胞を MSC として 96 well plate に 1.5 ~ 2.0 × 10<sup>4</sup> cells/well で再播種した。破骨細胞への分化誘導剤として、浮遊細胞に 30 ng/mL macrophage colony-stimulating factor (M-CSF, R & D Systems, MN, USA), 50 ng/mL receptor activator of nuclear factor kappa B ligand (RANKL, Peprotech, NJ, USA) を添加した。一方、骨芽細胞への分化誘導剤として MSC に 50 μg/mL L-アスコルビン酸 (Sigma-Aldrich Japan), 5 mM β-グリセロリン酸 (Sigma-Aldrich Japan), 5 nM デキサメタゾン (Sigma-Aldrich Japan) を添加した。

### 4 | 細胞増殖試験

MSC を 96 well plate に 1.5 × 10<sup>4</sup> cells/well で播種し、2 日間培養を行った。2 日後、細胞増殖試験試薬 WST-1 (ロシュ・ダイアグノスティクス株式会社, 東京, 日本) を終濃度 10% で培地に溶解し、全量培地交換を行った。37°C, 5% CO<sub>2</sub> 条件下でインキュベートし、2 時間後に 440 nm の吸光度を Spectra Max M2e (モレキュラーデバイスジャパン株式会社, 東京, 日本) を用いて測定した。

### 5 | Alkaline phosphatase (ALP) 活性染色

MSC を 96 well plate に 2.0 × 10<sup>4</sup> cells/well で播種し骨分化誘導試薬存在下で 24 時間培養を行っ

た。培養後、20% ホルマリン溶液で 20 分間固定後、純水で洗浄し、室温で 15 分静置した。ALP 染色液は、10 mM naphthol AS-BI phosphate (Sigma-Aldrich Japan) および 1 mM Fast Red violet LB salt (Sigma-Aldrich Japan) を含む 0.05 M 2-アミノ-2-メチル-1-プロパノール (ナカライテスク株式会社) 緩衝液 (pH 9.8) を用いた。固定された細胞のプレートに染色液を入れ、37°C で 20 分間静置した。染色液を取り除いた後、純水で 5 回洗浄した。染色されたプレートはスキャナーで読み取り、画像解析ソフトウェア Image J (National Institutes of Health, MD, USA) を用いて染色強度を数値化した。

### 6 | Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) 活性染色

HSC を 96well プレートに 4.0 × 10<sup>4</sup> cells/well で播種した。播種と同時に分化誘導試薬 30 ng/mL M-CSF, 50 ng/mL RANKL を添加し、3 日目に培地交換を行った。4 日間の培養後、TRAP 染色を行った。細胞を 10% マイルドホルム (富士フィルム和光純薬) で 10 分間固定後、TRAP 溶液 (50 μL Fast Garnet, 50 μL Sodium Nitrite: 83.3 μL Mix 液, 3750 μL 純水, 41.66 μL Naphthol, 166.6 μL Acetate, 83.8 μL Tartrate (Sigma-Aldrich Japan) を加え、遮光した状態で 37°C・60 分間インキュベートした。核染色はヘマトキシリン染色 (Sigma-Aldrich Japan) を用いた。3 核以上の細胞を TRAP 陽性多核破骨細胞とし、顕微鏡下でカウントした。

### 7 | 骨髄液中のテオブロミンの定量

テオブロミンの定量はマウスの骨髄液 40 μL に、内部標準物質の 5 μg/mL caffeine-*d*9 (Toronto Research Chemicals Inc., North York, ON, Canada) 40 μL とアセトニトリル 120 μL を加え、攪拌後 -30°C で 30 分静置した。その後、遠心分離 (8400 × *g*, 15 min, 4°C) し、上清を LC/MS/MS にて測定した。LC/MS/MS システムは、LC: Shimadzu Prominence System (島津製作所, 京都, 日本), MS/MS: 4000QTRAP (AB Sciex, 東京, 日本), 解析ソフト: Analyst® version 1.5.1 (AB Sciex), カラム: ReproSil-Pur 120 C18-AQ, 3 μm, 100 × 2.0 mm (Dr. Maisch, Ammerbuch, Germany), カラム温度: 40°C とした。移動相は、流速 0.1 mL/min で、アセトニトリル: メタノール

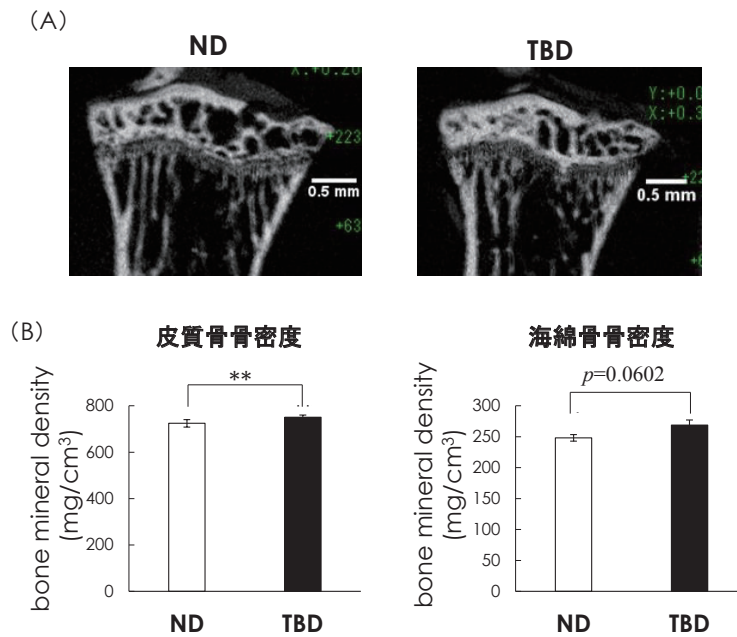


図2 テオブロミン摂取が骨密度に与える影響

(A) 各群の脛骨近位部マイクロCT画像, (B) マウス脛骨骨密度。  
通常食群 (ND), テオブロミン食群 (TBD).  
Means  $\pm$  SEM (n = 7-8), Student *t* test, \*\*  $p < 0.01$ .

= 4 : 1 と 0.1% ギ酸を 10 : 90 の割合で 2 分間流し, その後 4 分間で 100 : 0 にした. MS/MS の条件として, electro spray ionization (ESI) 法, positive イオン検出, イオンスプレー電圧: 5500V, ネブライザーガス圧力: 80 psi, ターボガス圧力: 70 psi, 測定イオン: テオブロミン  $m/z$  181.1[M+H]<sup>+</sup>/138.1, caffeine-*d9*  $m/z$  204.1[M+H]<sup>+</sup>/144.1 とした.

## 8 | 統計

データは平均  $\pm$  標準誤差 (Mean  $\pm$  SEM) で表記した. 統計分析はデータ分析ソフトウェア JMP® (SAS Institute Japan 株式会社, 東京, 日本) を用いて行った. 統計的有意性は, Student *t* test を用いて, \*  $p < 0.05$  または \*\*  $p < 0.01$  で判断した.

## II. 結果

### 1 | テオブロミンの摂取が骨密度に与える影響

脛骨の前額断面画像を比較した結果, テオブロミン食群は通常食群と比較して, 皮質骨および一次海綿骨を示す面積の割合が高い画像が得られた (図 2A). また, pQCT 法を用いて骨密度を比較した結果, テオブ

ロミン食群は通常食群と比較し, 皮質骨骨密度で有意に高値を示した. また, テオブロミン食群は通常食群と比較し, 海綿骨骨密度に増加傾向がみられた ( $p = 0.0602$ , 図 2B).

### 2 | テオブロミンの摂取が骨髄液中の MSC および HSC に与える影響

MSC の増殖能に与える影響を検討した結果, テオブロミン食群由来の MSC は通常食群と比較して, 約 1.3 倍と有意に高値を示した (図 3A). また, ALP 活性を比較した結果, テオブロミン食群由来の MSC の ALP 活性は, 通常食群と比較し, 約 1.3 倍と有意に高値を示した (図 3B).

テオブロミン食群由来の HSC の TRAP 陽性多核破骨細胞数は通常食群と比較し, 減少傾向であった ( $p = 0.1055$ , 図 4).

### 3 | テオブロミンの摂取が骨髄液中のテオブロミン量に与える影響

骨髄液中のテオブロミン量を LC-MS/MS で測定した結果, テオブロミン食群の骨髄液中のテオブロミン濃度は  $18.9 \pm 5.6$  pg/mL であった (図 5). 通常食群の骨髄液中からはテオブロミンは検出されなかった.

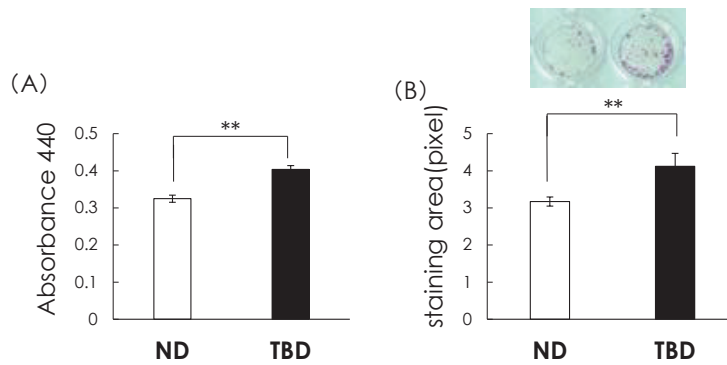


図3 テオブロミン摂取が MSC の増殖能および骨芽細胞分化に与える影響

(A) WST-1 法, (B) ALP 活性染色

通常食群 (ND), テオブロミン食群 (TBD). Means  $\pm$  SEM (n = 5). Student *t* test, \*\*  $p < 0.01$ .

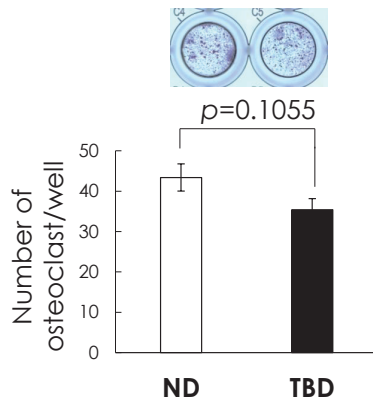


図4 テオブロミン摂取が HSC の破骨細胞分化に与える影響

通常食群 (ND), テオブロミン食群 (TBD). Means  $\pm$  SEM (n = 5).

Student *t* test, \*\*  $p < 0.01$ .

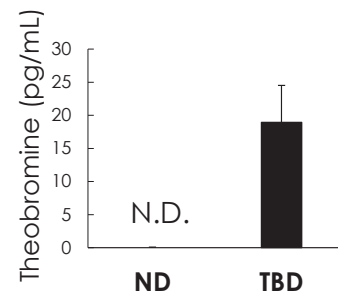


図5 骨髄液中のテオブロミン濃度

通常食群 (ND), テオブロミン食群 (TBD)

Means  $\pm$  SEM (n = 10). N.D.: not detected.

### III. 考察

テオブロミンはカカオの実の他、マテ茶、コーラ、茶、ガラナなどいくつかの植物で含有量が高いことが報告されている<sup>1-3)</sup>。近年、カカオを原料とするチョコレートやココアには、抗酸化作用や血圧低下作用などの機能性を有することが報告されている<sup>14,15)</sup>。これらの有用成分として、カカオポリフェノールに関する研究報告が多いが<sup>16,17)</sup>、テオブロミンも機能性成分として期待されている。

テオブロミンと同じくメチルキサンチン類であるカフェインは、骨芽細胞の分化を抑制し、破骨細胞の分化を促進させることが報告されている<sup>7,8)</sup>。さらに、過剰なカフェイン摂取は骨密度を低下させるリスクも報告されている<sup>10-12)</sup>。一方、テオブロミンが骨代謝に与える影響に関してはほとんど報告されていない。また、チョコレートの摂取が骨密度および骨質に与える影響は、チョコレートに含まれる砂糖、脂質、ポリフェノール、テオブロミン量などが各々異なるため、

相反する報告があり<sup>18)</sup>、見解の一致はなされていない。

本研究では、成長期である6週齢の正常マウスにテオブロミンを28日間摂取させた結果、皮質骨骨密度では有意に増加し、海綿骨骨密度では増加傾向を示す結果を得た(図2)。MSCの骨芽細胞への分化過程で、骨形成の基質供給のためにALP活性が上昇することが知られている<sup>19)</sup>。すなわち、ALP活性の上昇は、骨芽細胞の分化のポジティブマーカーとなる。今回、テオブロミンを摂取させたマウス骨髄液由来のMSCの骨芽細胞への分化能は高まっていた(図3B)。さらにMSCの細胞増殖能も高まっていた(図3A)。一方、HSCは、マクロファージ様細胞を経て単核破骨細胞へと分化し、続く核融合により多核破骨細胞となり骨吸収能を獲得する。この過程でTRAP活性が発現する。本研究では、テオブロミンを摂取させたマウス骨髄液由来のHSCから誘導されるTRAP陽性破骨細胞数は通常食群と比較して低値傾向を示した(図4)。本研究で示されたテオブロミン摂取によるMSC

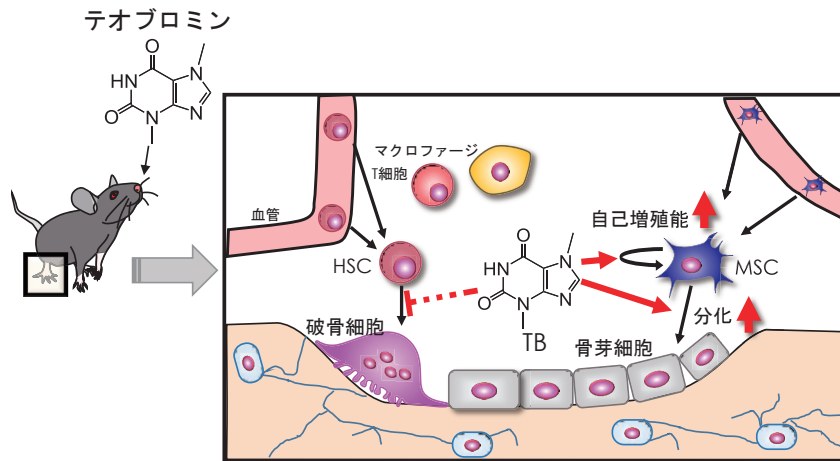


図6 テオブロミン摂取が MSC および HSC に作用し骨密度を上げる推定メカニズム

への正の制御, HSC への負の制御は, 骨密度の上昇という結果と一致した.

Clough らは, MSC にテオブロミンを直接添加すると, ALP 活性およびオステオプロテゲリン量を増加させ, 石灰化を促進させることを報告している<sup>13)</sup>. そのテオブロミンの有効濃度は 25  $\mu\text{M}$  である. 本研究ではマウスに体重当たり約 0.06 mg/g のテオブロミンを 4 週間継続摂取させた後の骨髓液中のテオブロミン濃度は約 20 pg/mL であった (図 5). これは Clough らの *in vitro* の実験系の作用濃度と比較して顕著に低い濃度であったため, 本研究で得られたテオブロミン摂取による MSC の増殖能および骨分化能の増加および HSC の破骨細胞への分化能低下は, テオブロミンが骨髓中の MSC および HSC へ直接作用したというよりは, 間接的に作用したと考えるのが妥当である. 今後, テオブロミン摂取による MSC および HSC への影響の新たなメカニズムを検討する必要がある.

従来, 体性幹細胞は外部環境から隔絶したニッチに存在し, 自己増殖能力を維持しているため, 加齢による外部環境変化の影響を受けにくいと考えられていた. しかし, 最近では, 加齢, II 型糖尿病や閉経後骨粗鬆症などの生活習慣病, 高脂肪食などの生活習慣や機能性成分が体性幹細胞の分化応答性に影響を与えることが *in vivo* の実験系で報告されるようになってきている<sup>20-23)</sup>. 本研究の結果も, テオブロミンの摂取が, 骨芽細胞の供給源である MSC を増殖させ, 骨芽細胞への分化も促進させ, さらに HSC の破骨細胞への分化を抑える可能性を示した (図 6). したがって, テオブロミンの摂取は, 加齢や生活習慣病などに伴う骨密度の低下を予防できる可能性が示された. 本

研究は正常な若齢マウスに通常食を基本とした餌を与えた実験であったため, 骨代謝への効果は劇的ではなかったと考えられる. また, 本研究では皮質骨骨密度は有意に増加したものの, 海綿骨骨密度は有意な差はなかった. この結果は, 6 週齢で長管骨が顕著に伸長中である成長期のマウスを用いたため, 海綿骨の代謝が活発で誤差が大きかったことも影響したと考えている. 今後, 加齢モデル, 閉経後骨粗鬆症モデル, II 型糖尿病モデルなど動物を用いてテオブロミンの骨粗鬆症予防作用について検討する必要がある. また, 本研究は約 1 か月の摂食期間であったため, 最終的な評価項目である骨密度や骨代謝を評価するには期間が短かった. より長期的な摂食実験を行い, 骨形態計測などの骨質を含めた詳細な検討を実施して, テオブロミンの摂取が骨代謝に与える影響を評価する必要がある.

今後, テオブロミンが MSC や HSC の増殖および分化応答性を制御したメカニズムを解明する必要がある. テオブロミンはホスホジエステラーゼ阻害作用を有し, cAMP を増加させることが報告されている<sup>24)</sup>. cAMP は MSC の骨細胞への分化を促進させることも報告されている<sup>25)</sup>. 一方, テオブロミンはアデノシン受容体の阻害作用を有することが報告されている<sup>26)</sup>. アデノシン受容体の阻害は受容体の種類によっては cAMP を減少させる<sup>27,28)</sup>. 今後, テオブロミンが MSC の細胞内の cAMP 量に与える影響を検討することで, テオブロミンの作用メカニズムを明らかにできる可能性がある. さらに, 構造が類似しているカフェインやテオフィリンなどのメチルキサンチン類についても検討する必要がある.

本研究において, 日常摂取している食品成分の継続

的摂取が、生体内の幹細胞に作用して、その増殖能や分化応答性を変容させることを明らかにした。この作用が、食品成分が直接的に幹細胞に作用しているのか、生体内環境を変化させるなど間接的に作用しているのかは、今後の研究課題である。

#### ◆文献

- 1) Schuster J, Mitchell ES. More than just caffeine: psychopharmacology of methylxanthine interactions with plant-derived phytochemicals. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 2019; 89: 263-274.
- 2) Koleva II, van Beek TA, Soffers AE, Dusemund B, Rietjens IM. Alkaloids in the human food chain – Natural occurrence and possible adverse effects. *Mol Nutr Food Res*. 2012; 56: 30-52.
- 3) Ashihara H, Sano H, Crozier A. Caffeine and related purine alkaloids: biosynthesis, catabolism, function and genetic engineering. *Phytochemistry*. 2008; 69: 841-56.
- 4) Monteiro J, Alves MG, Oliveira PF, Silva BM. Pharmacological potential of methylxanthines: Retrospective analysis and future expectations. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2019; 59: 2597-2625.
- 5) Monteiro JP, Alves MG, Oliveira PF, Silva BM. Structure-Bioactivity Relationships of Methylxanthines: Trying to Make Sense of All the Promises and the Drawbacks. *Molecules*. 2016; 27: 974.
- 6) Yoshimura N, Muraki S, Oka H, Mabuchi A, En-Yo Y, Yoshida M, Saika A, Yoshida H, Suzuki T, Yamamoto S, Ishibashi H, Kawaguchi H, Nakamura K, Akune T. Prevalence of knee osteoarthritis, lumbar spondylosis, and osteoporosis in Japanese men and women: the research on osteoarthritis/osteoporosis against disability study. *J Bone Miner Metab*. 2009; 27: 620-8.
- 7) Tassinari MS, Gerstenfeld LC, Stein GS, Lian JB. Effect of caffeine on parameters of osteoblast growth and differentiation of a mineralized extracellular matrix in vitro. *J Bone Miner Res*. 1991; 6: 1029-36.
- 8) Yi J, Yan B, Li M, Wang Y, Zheng W, Li Y, Zhao Z. Caffeine may enhance orthodontic tooth movement through increasing osteoclastogenesis induced by periodontal ligament cells under compression. *Arch Oral Biol*. 2016; 64: 51-60.
- 9) Pal S, Khan K, China SP, Mittal M, Porwal K, Shrivastava R, Taneja I, Hossain Z, Mandalapu D, Gayen JR, Wahajuddin M, Sharma VL, Trivedi AK, Sanyal S, Bhadauria S, Godbole MM, Gupta SK, Chattopadhyay N. Theophylline, a methylxanthine drug induces osteopenia and alters calciotropic hormones, and prophylactic vitamin D treatment protects against these changes in rats. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2016; 295: 12-25.
- 10) Vondracek SF, Hansen LB, McDermott MT. Osteoporosis risk in premenopausal women. *Pharmacotherapy*. 2009; 29: 305-17.
- 11) Swaminathan R. Nutritional factors in osteoporosis. *Int J Clin Pract*. 1999; 53: 540-8.
- 12) Ibrahim NA, Nabil N, Ghaleb S. Pathophysiology of the Risk Factors Associated with Osteoporosis and their Correlation to the T-score Value in Patients with Osteopenia and Osteoporosis in the United Arab Emirates. *J Pharm Bioallied Sci*. 2019; 11: 364-372.
- 13) Clough BH, Ylostalo J, Browder E, McNeill EP, Bartosh TJ, Rawls HR, Nakamoto T, Gregory CA. Theobromine Upregulates Osteogenesis by Human Mesenchymal Stem Cells In Vitro and Accelerates Bone Development in Rats. *Calcif Tissue Int*. 2017; 100: 298-310.
- 14) Zugravu C, Otelea MR. Dark Chocolate: To Eat or Not to Eat? A Review. *J AOAC Int*. 2019; 102: 1388-1396.
- 15) Shrime MG, Bauer SR, McDonald AC, Chowdhury NH, Coltart CE, Ding EL. Flavonoid-rich cocoa consumption affects multiple cardiovascular risk factors in a meta-analysis of short-term studies. *J Nutr*. 2011; 141: 1982-8.
- 16) Maleki SJ, Crespo JF, Cabanillas B. Anti-inflammatory effects of flavonoids. *Food Chem*. 2019; 299: 125124.
- 17) Matsumoto C. Cocoa Polyphenols: Evidence from Epidemiological Studies. *Curr Pharm Des*. 2018; 24: 140-145.
- 18) Seem SA, Yuan YV, Tou JC. Chocolate and chocolate constituents influence bone health and osteoporosis risk. *Nutrition*. 2019; 65: 74-84.
- 19) Hoemann CD, El-Gabalawy H, McKee MD. In vitro osteogenesis assays: influence of the primary cell source on alkaline phosphatase activity and mineralization. *Pathol Biol (Paris)*. 2009; 57: 318-23.
- 20) Bellantuono I, Aldahmash A, Kassem M. Aging of marrow stromal (skeletal) stem cells and their contribution to age-related bone loss. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1792(4): 364-70.
- 21) Hardouin P, Pansini V, Cortet B. Bone marrow fat. *Joint Bone Spine*. 2014; 81(4): 313-9.

- 22) Justesen J, Stenderup K, Ebbesen EN, Mosekilde L, Steiniche T, Kassem M. Adipocyte tissue volume in bone marrow is increased with aging and in patients with osteoporosis. *Biogerontology*. 2001; 2(3): 165–71.
- 23) Xu F, Dong Y, Huang X, Li M, Qin L, Ren Y, et al. Decreased osteoclastogenesis, osteoblastogenesis and low bone mass in a mouse model of type 2 diabetes. *Mol Med Rep*. 2014; 10(4): 1935–41.
- 24) Sugimoto N, Miwa S, Hitomi Y, Nakamura H, Tsuchiya H, Yachie A. Theobromine, the primary methylxanthine found in Theobroma cacao, prevents malignant glioblastoma proliferation by negatively regulating phosphodiesterase-4, extracellular signal-regulated kinase, Akt/mammalian target of rapamycin kinase, and nuclear factor- $\kappa$ B. *Nutr Cancer*. 2014; 66(3): 419–23.
- 25) Siddappa R, Martens A, Doorn J, Leusink A, Olivo C, Licht R, van Rijn L, Gaspar C, Fodde R, Janssen F. cAMP/PKA pathway activation in human mesenchymal stem cells in vitro results in robust bone formation in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2008; 105: 7281–7286.
- 26) Mitani T, Watanabe S, Yoshioka Y, Katayama S, Nakamura S, Ashida H. Theobromine Suppresses Adipogenesis Through Enhancement of CCAAT-enhancer-binding Protein  $\beta$  Degradation by Adenosine Receptor A1. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*. 2017; 1864(12): 2438–2448.
- 27) Carroll SH, Wigner NA, Kulkarni N, Johnston-Cox H, Gerstenfeld LC, Ravid K. A2B Adenosine Receptor Promotes Mesenchymal Stem Cell Differentiation to Osteoblasts and Bone Formation in Vivo. *J Biol Chem*. 2012; 287(19): 15718–27.
- 28) Strohmeier GR, Reppert SM, Lencer WI, Madara JL. The A2b Adenosine Receptor Mediates cAMP Responses to Adenosine Receptor Agonists in Human Intestinal Epithelia. *J Biol Chem*. 1995; 270(5): 2387–94.

## Abstract

Theobromine, a methylated derivative of xanthines, is included in some plants such as cocoa beans, tea and guarana. A recent *in vitro* study reported that theobromine possibly promotes osteoblast differentiation from mesenchymal stem cell (MSC). In this study, we investigated the effects of theobromine feeding to mice on the bone density and the proliferation and differentiation of MSC and hematopoietic stem cell (HSC) of the mice.

C57BL/6J mice were fed a normal diet (ND) and 0.05% theobromine-containing diet (TBD) for 4 weeks. The tibias of the mice were dissected to measure the bone mineral density. The MSCs and HSCs were collected from the bone marrow fluids. The proliferation ability, the ability of the MSCs to differentiate to osteoblasts and the ability of the HSCs to differentiate to osteoclasts were evaluated. The theobromine concentration of the bone marrow fluids was analyzed by an LC-MS/MS method.

The cortical bone density of the TBD group was significantly higher than that of the ND group. The proliferation and differentiation abilities of the MSCs from the TBD group significantly surpassed those from the ND group. The differentiation ability of the HSCs from the TBD group tended to be lower than that from the ND group ( $p = 0.1055$ ). Theobromine was detected only in the TBD group at the concentration of  $18.9 \pm 5.6$  pg/mL.

These results suggest that continuous intake of theobromine possibly increased the bone density by promoting the osteoblast proliferation and differentiation and suppressing the osteoclast differentiation.