

骨代謝に影響を与える天然薬物の探索と標的分子解明  
矢作忠弘（日本大学薬学部生薬学研究室）

【目的】

骨粗鬆症は、低骨量と骨組織の微細構造の異常を特徴とし、骨の脆弱性が増大し骨折の危険性が増大する疾患である。骨粗鬆症の予防と治療ガイドライン 2015 年版<sup>1)</sup>によると、日本では人口の急速な高齢化に伴い骨粗鬆症の患者数が年々増加しており、その数は 1300 万人と推測されている。日本は世界でもトップクラスの長寿国ではあるが、健康寿命と平均寿命に約 10 年の差があり、実際には多くの人々が長い間「健康ではない」状態で過ごしている。その理由の 1 つに骨粗鬆症による骨折があげられ、特に大腿骨頸部骨折は高齢者が寝たきりになる理由の上位である。骨粗鬆症は自覚症状が現れないため、気づきにくく骨折してしまって初めて認識する疾患である。しかしながら高齢者の骨折による寝たきり状態は、介護が必要になり、QOL が著しく低下してしまう。よって骨粗鬆症を予防し骨を健康に保つことは、超高齢化社会である我が国において必要不可欠なことである。

骨は、破骨細胞が行なう骨吸収と骨芽細胞が行なう骨形成の絶妙なバランスで動的な恒常性を維持している (Fig. 1)。骨リモデリングと呼ばれるこの再構築は、破骨細胞が古くなった骨を壊すことで一連のプロセスがはじまり、骨芽細胞により骨が新生される。<sup>2,3)</sup> このバランスが破綻することにより、様々な骨疾患が惹起する。多くは、骨芽細胞による骨形成の働きが弱くなり、破骨細胞による骨吸収が相対的に上回ることで、骨量を十分に補充できなくなり引き起こされている。また骨吸収は数週間で完了するが、骨形成は数か月を要するため、一度減少した骨量を元に戻すには時間がかかってしまう。

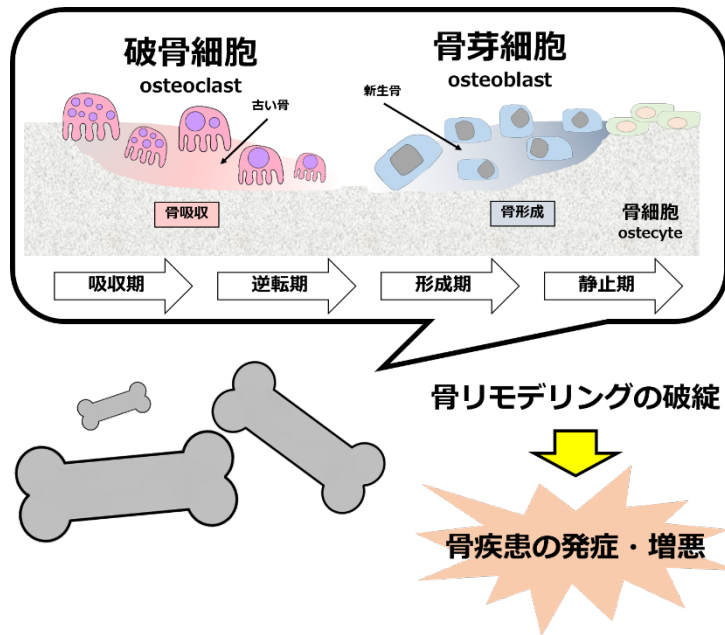


Fig. 1 骨リモデリングの流れ

臨床現場においては、破骨細胞による骨吸収を抑制するビスホスホネート製剤が多く用いられているが、食事の影響を受けやすく、長期治療による大腿骨骨折および顎骨壊死などの副作用報告があとを絶たない。他の骨吸収抑制薬としては、選択的エストロゲン受容体調節薬 (SERM) などもあるが、その作用機序のため閉経後骨粗鬆症のみにしか用いれない。骨形成促進薬としては、副甲状腺ホルモン製剤であるテリパラチドが使用可能であるが、発がん性が懸念されるため投与期間に制限 (24 か月以内) が設けられていたり、自己注射のためコンプライアンスの低下が懸念されたりと問題点が多い。とりわけ骨形成に関する治療薬は乏しく、超高齢化社会で多様化する骨粗鬆症患者に対して、対応しきれていないのが現状である。

以上の学術的背景から、骨リモデリングにおいて、破骨細胞の再吸収だけを抑制してしまうことは、古い骨が蓄積したままになり、骨質の改善には至らないため、積極的な骨形成促進を有し骨質や骨密度を向上させるような天然薬物の探索を行うことは、骨粗鬆症の治療薬やシード化合物となりうる可能性がある。

今回、骨代謝に影響を与える天然薬物を探索する一環で、クリニカルエビデンスを有する漢方処方とその構成生薬、未開拓資源が多く存在するミャンマー資源植物などについて、骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 を用いた骨芽細胞分化促進試験をスクリーニング法として用いて、骨形成に対する影響を検討した。

## 【方法】

### 試験検体の調製

漢方処方および構成生薬のエキスの作成は、50 分間熱水抽出後ろ過し、凍結乾燥させることにより作成した。ミャンマー薬用植物の抽出エキスに関しては、高知県立牧野植物園より提供を受けたものを、必要に応じて希釈し使用した。その他のサンプルに関しては、80%MeOH で抽出してエキスを作成した。

### 骨芽細胞分化促進試験

MC3T3-E1 細胞を 96well プレート播種し、24 時間後にアスコルビン酸 (終濃度 50 µg/ml) および β-グリセリン酸 (終濃度 10 mM) を含む培地に交換し、同時に DMSO に溶解した検体を加えた。3 日間培養後、培地を除き PBS で洗浄し、発色試液 [100 mM 炭酸緩衝液 (pH 10.0)、0.2% Triton-X、2 mM MgCl<sub>2</sub>、5 mM *p*-ニトロフェニルりん酸] を加え、10 分間インキュベートした後、マイクロプレートリーダー (405nm/655nm) を用いて骨芽細胞の分化の指標であるアルカリフォスファターゼ (ALP) 活性を測定した。細胞毒性に関しては MTT 法を用いて評価した。

### タンパク質量の測定

各検体を加えた well 中のタンパク質濃度については BCA 法を用いて行い、マイクロプレートリーダー (562 nm/655 nm) を用いて測定した。

【結果および考察】

骨粗鬆症の治療に用いることのある桂枝加朮附湯、補中益気湯および牛車腎気丸について検討を行った結果、桂枝加朮附湯（終濃度 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）や陳皮（終濃度 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）に若干の促進活性が認められた（Fig. 2）。また、柴胡に強い抑制活性（終濃度 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）が認められた。

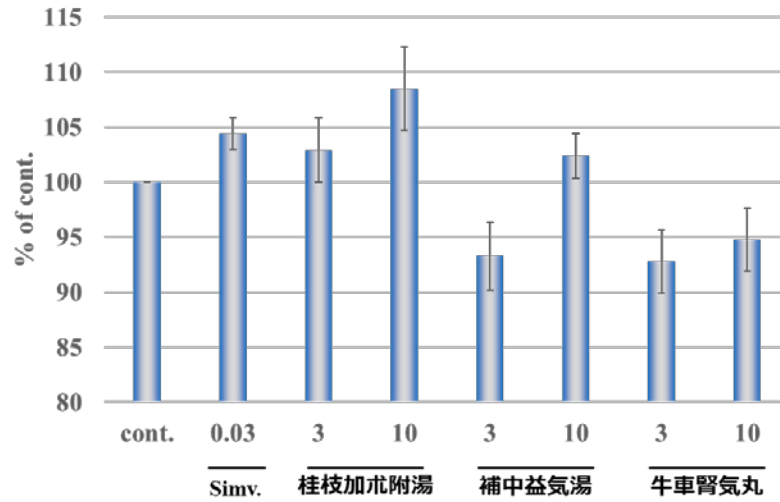


Fig. 2 各漢方薬の骨芽様細胞への影響（濃度  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）

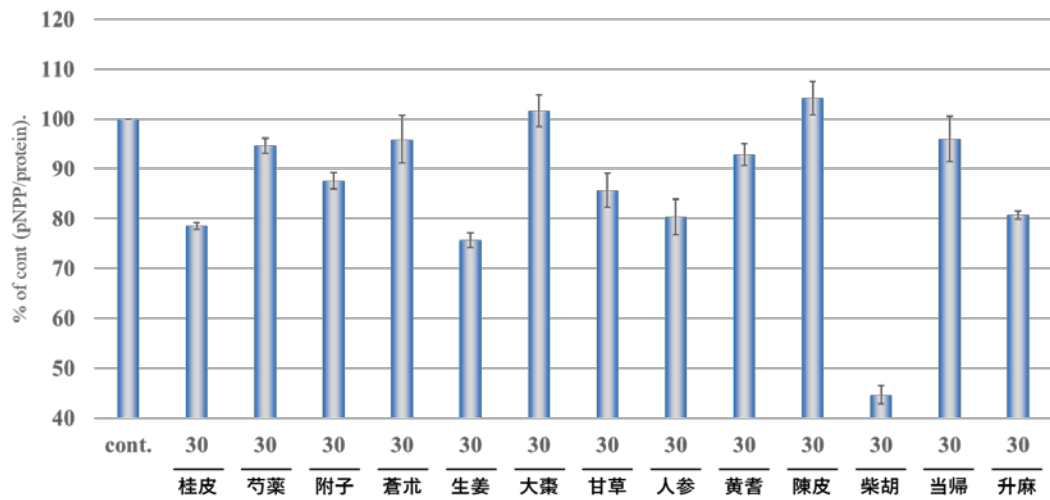


Fig. 3 桂枝加朮附湯および補中益気湯構成生薬の骨芽様細胞への影響（濃度  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）

ミャンマー資源植物 400 種についてスクリーニングを行なった結果、以下の植物に促進活性（終濃度 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）が認められた (Fig. 4., Table 1.)。

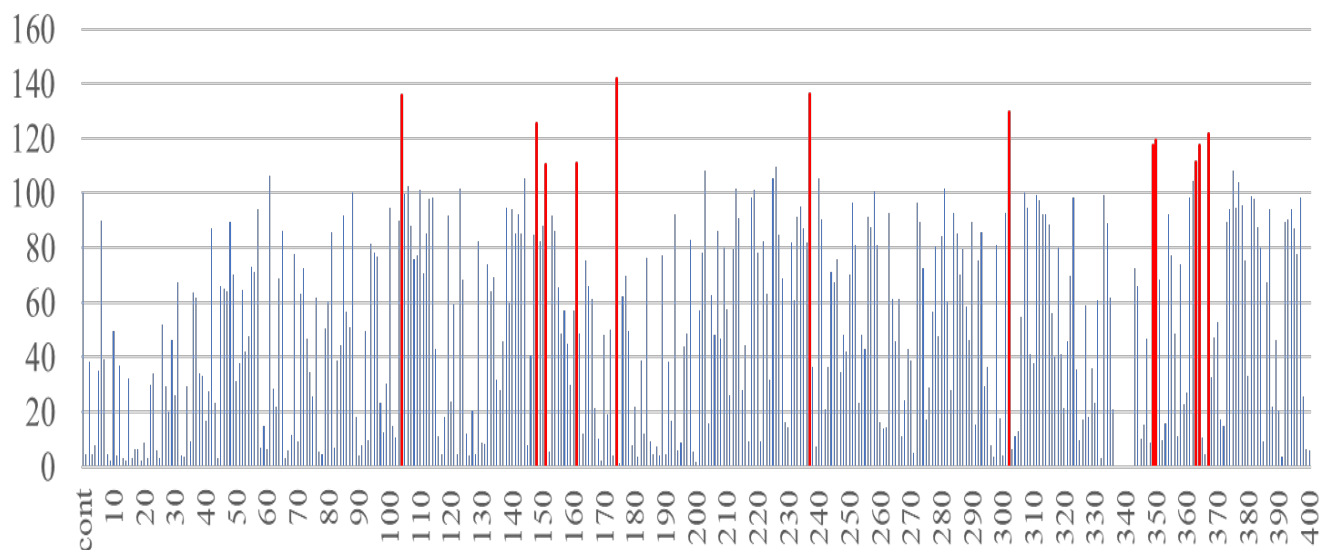


Fig. 4 ミャンマー資源植物の骨芽様細胞への影響

Table 1. 活性が認められたミャンマー資源植物

No.	学名	科名	部位	活性値
104	<i>Cryptolepis buchananii</i> Schult.	Apocynaceae	stem	135.8
148	<i>Euphorbia trigona</i> Mill.	Euphorbiaceae	fruit	125.7
151	<i>Hyptis suaveolens</i>	Lamiaceae	leaf	110.4
161	<i>Cryptolepis buchananii</i> Schult.	Apocynaceae	leaf&stem	111.2
174	<i>Euphorbia nerifolia</i>	Euphorbiaceae	stem	142.0
237	<i>Blumea fistulosa</i>	Compositae	leaf&stem	136.4
302	<i>Piptanthus nepalensis</i>	Leguminosae	stem	129.8
349	<i>Ficus virens</i>	Moraceae	stem&fruit	117.4
350	<i>Ficus virens</i>	Moraceae	leaf	119.4
363	<i>Ficus hirta</i>	Moraceae	leaf	111.7
364	<i>Ficus hirta</i>	Moraceae	stem	117.7
367	<i>Toona ciliate</i>	Meliaceae	leaf	122.0

特に活性が認められたのは、トウダイグサ科植物である *Euphorbia nerifolia* であった。インド原産で中国名では麒麟角と呼ばれ、ミャンマーでは便秘、鼓腸、発熱、消化不良、喘息、咳やアレルギーの治療に用いられている。またクワ科イチジク属の植物である *Ficus virens* や *Ficus hirta* の葉や茎にも活性が認められた。九州や沖縄などにも *Ficus* 属に属する日本固

有の植物が多く存在し、特に外来種ではあるがイチジク *Ficus carica* L.は愛知県、和歌山県や福岡県などで生産が盛んな作物であり、不老長寿の果物とも呼ばれるため、今後それらについても検討していきたい。活性が認められたエキスに関しては、さらなる機能解析や活性成分の探索に着手していきたい。

今回は骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 の分化初期に焦点を当ててスクリーニングを行なったが、骨形成は様々な段階を経て骨細胞へと分化していくため、今後は分化誘導後の細胞に対して及ぼす影響を検討していく予定である。

#### 【謝辞】

本研究の一部は、平成 28 年度日本大学薬学部萌芽探究型研究助成金の支援により行われた。また、ミャンマー資源植物エキスを提供していただいた、高知県立牧野植物園園長 水上元先生および関係者の方々に感謝致します。

#### 【参考文献】

- 1) 骨粗鬆症の予防と治療ガイドライン作成委員会, 骨粗鬆症の予防と治療ガイドライン, 2015 年版, ライフサイエンス出版株式会社 (2015)
- 2) Parfitt A. M. et al., *J. Bone Miner. Res.*, 11, 150-159 (1996)
- 3) Seeman E., Delmas P. D., *N. Engl. J. Med.*, 354, 2250-2261 (2006)