

## 論文の内容の要旨

氏名：前田 美咲

博士の専攻分野の名称：博士（薬学）

論文題名：琉球弧植物に着目した骨代謝に影響を与える天然薬物の探索

### 【背景】

我が国は世界有数の長寿国であるが、平均寿命と健康寿命の差を考慮すると、約10年間にわたり多くの人が要介護状態で過ごしている。65歳以上の高齢者が要介護状態に陥る原因の上位に骨粗しょう症による骨折・転倒が挙げられており、罹患者数が約1300万人を超えていることから、骨粗しょう症の予防・改善は健康寿命を延伸し、多くの高齢者のQOLの向上に繋がると考えられる。

骨は骨芽細胞を主体とした骨を形成する骨形成と、破骨細胞を主体とした骨を破壊する骨吸収との絶妙な動的平衡（リモデリング）によってその形態を維持している。そのため、骨粗しょう症は骨吸収が骨形成を上回っている状態が続くことにより発症する。現在の骨粗しょう症治療薬は骨吸収阻害が作用の中心であり、リモデリングの改善を伴わないため顎骨壊死の誘発や長期服用による非定型大腿骨骨折リスクの上昇などが問題視されている。また、本症の多くが閉経による低エストロゲン状態によっても引き起こされる閉経後骨粗しょう症であり、選択的エストロゲン受容体モジュレーターが用いられることもあるが、更年期様症状や深部静脈血栓症を誘発する可能性がある。以上のことから、骨粗しょう症の予防・改善において新たな選択肢が必要であると考え、骨形成促進およびエストロゲン受容体（ER）活性化のデュアル作用を示す天然物の探索を行うこととした。第1章では、独自に構築した琉球弧植物のエクスライブラリーを用いてER活性化作用についてスクリーニングを行い、活性の認められたアカボシタツナミソウ *Scitellaria rubropunctata* var. *rubropunctata* の全草について骨代謝に対する影響を検討した。第2章では、これまで未詳であったアカボシタツナミソウの成分探索を行い、単離化合物について骨形成への影響を検討した。

### 第1章 エストロゲン受容体活性化作用を有する琉球弧植物の骨代謝に対する影響

### 【方法】

琉球弧植物エクスライブラリー1531種類のER転写活性化作用についてヒト胎児腎細胞HEK293にGAL4融合ERを発現するプラスミドとGAL4結合配列を持つレポータープラスミドを導入し、ルシフェラーゼレポーターアッセイを行いER転写活性の評価を行った。活性エキスについて、骨芽細胞様細胞MC3T3-E1を用いてアルカリホスファターゼ（ALP）活性試験およびアリザリン染色試験を行い、短期培養および長期培養における影響を検討した。また、定量的RT-PCR法により分化初期および後期の遺伝子への影響について評価した。更に、sRANKLにより破骨細胞様細胞に分化するRAW264.7細胞を用いて酒石酸耐性ホスファターゼ（TRAP）活性試験を行い、破骨細胞への影響について検討を行った。RAW264.7細胞における細胞生存率およびヒト乳がん細胞MCF-7における細胞増殖率についてはMTT試験により評価した。

### 【結果・考察】

スクリーニングの結果、アカボシタツナミソウ全草の80%MeOHエキス（SRE）に濃度依存的なER転写活性化作用が認められた。この作用はER $\alpha$ アンタゴニストであるICI182,780によって阻害されたことから支持された。MCF-7に対する増殖作用は示さなかったことから、SREはER刺激で懸念される乳がん細胞の増殖作用を示さないことが示唆された（Fig. 1）。

MC3T3-E1細胞を用いた評価では、SREは短期培養時にALP活性を有意に上昇させたが、長期培養時の石灰化染色試験では顕著な促進作用は認められなかった（Fig. 2）。このことから、SREは主に骨芽細胞の分化初期に影響を与える可能性が示唆された。

続いて、骨芽細胞分化初期および後期におけるSREの骨形成関連遺伝子への影響について検討したところ、短期培養時では骨形成主要制御因子であるRunx2や下流のOsterix（Osx）、骨形成マーカーであるOsteopontin（Opn）、Osteocalcin（Ocn）のmRNA発現量を増加させたが、Osxへの作用は弱かった（Fig. 3）。長期培養時はRunx2についてはmRNA量の増加が認められたが、Osx、Opnについては僅かな増加

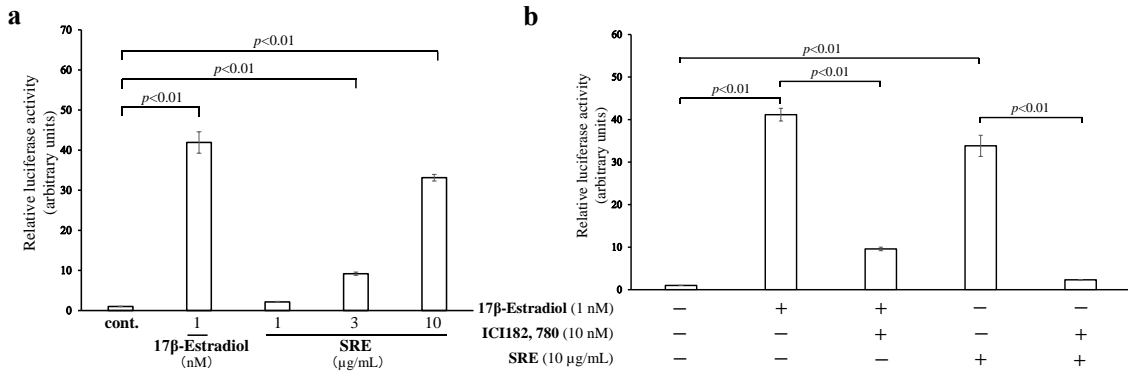


Fig. 1. (a) ER transcription-promoting activity of SRE, (b) Effect of the ER antagonist ICI 182,780 on the ER transcription-promoting activity of SRE

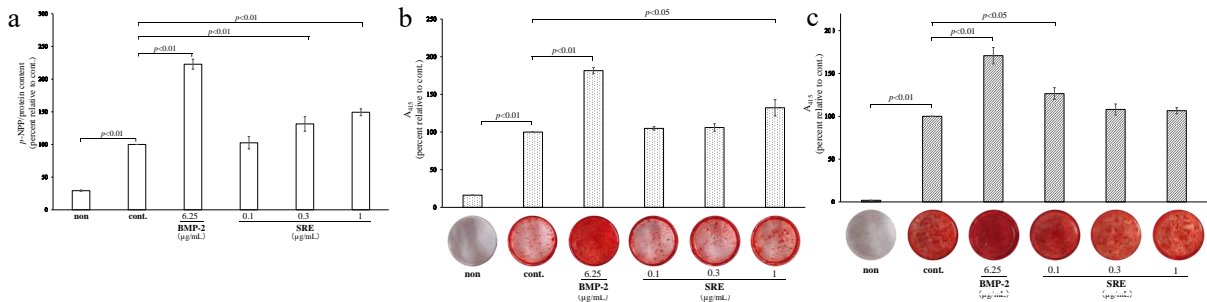


Fig. 2. Effect of SRE on (a) alkaline phosphatase (ALP) activity in the MC3T3-E1 mouse osteoblastic cell line, (b) mineralization in MC3T3-E1 cells incubated for 14 d and (c) mineralization in MC3T3-E1 cell incubated for 21 d.

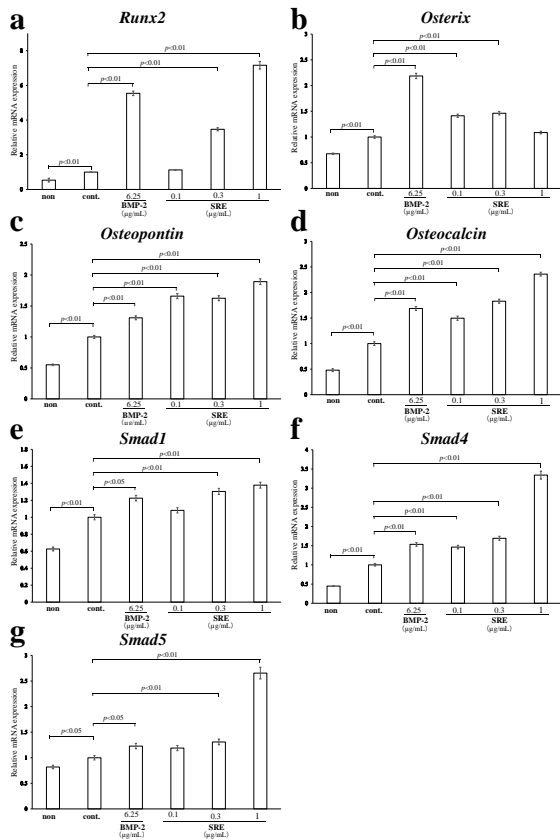


Fig. 3. Effect of incubation with SRE for 72 h on the mRNA expression of osteoblast-differentiation-related genes in MC3T3-E1 cells. The mRNA expression levels of (a) *Runx2*, (b) *Osterix*, (c) *Osteopontin*, (d) *Osteocalcin*, (e) *Smad1*, (f) *Smad4*, and (g) *Smad5* were measured by quantitative RT-PCR.

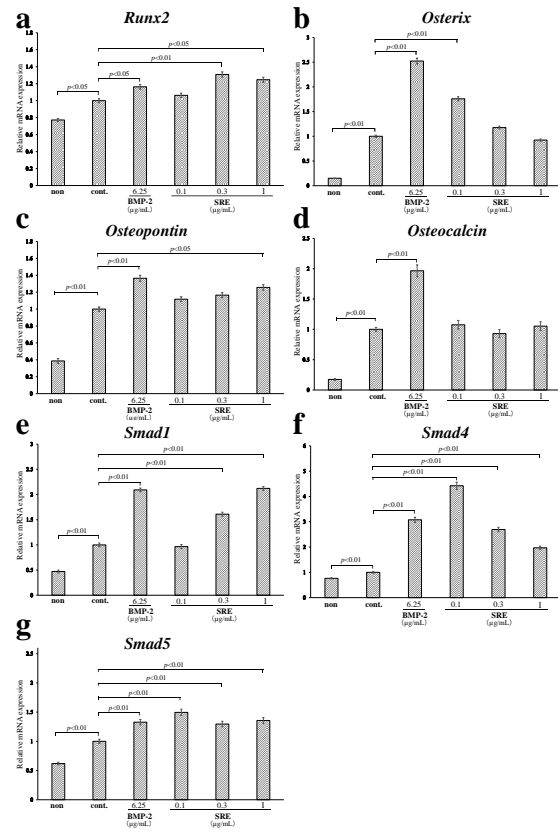


Fig. 4. Effect of incubation with SRE for 21 d on the mRNA expression of osteoblast-differentiation-related genes in MC3T3-E1 cells. The mRNA expression levels of (a) *Runx2*, (b) *Osterix*, (c) *Osteopontin*, (d) *Osteocalcin*, (e) *Smad1*, (f) *Smad4*, and (g) *Smad5* were measured by quantitative RT-PCR.

しか認められず、*Ocn*については特に影響が認められなかった (Fig. 4)。

骨芽細胞は間葉系幹細胞を起点として骨芽細胞前駆細胞、前骨芽細胞、骨芽細胞、と段階を経て、最終的に骨細胞となる。この分化を制御する因子である *Runx2* は骨芽細胞が未成熟な段階では分化を誘導するが、成熟に伴い分化を抑制する方向に働くことが知られている。SRE は分化の前後期通して *Runx2* の mRNA 発現量を増加させたことから、前述の ALP 活性試験および石灰化染色試験の結果が支持されることとなった。*Runx2* の転写活性化に関わる経路の一つに BMP/Smad 経路がある。*Smad1*、4 および 5 について遺伝子解析を行ったところ短期および長期培養においていずれも mRNA の発現量が増加していたことから、SRE の骨芽細胞分化促進作用は Smad を介した *Runx2* の活性化によるものと考えられた。次に SRE の破骨細胞への影響を検討した結果、細胞生存率が低下していくと共に TRAP 活性の抑制が認められたことから、SRE は破骨細胞の分化には影響しないと考えられる。以上のことから、SRE はヒト乳がん細胞を増殖させることなく ER 転写活性化作用を示し、Smad を介した *Runx2* 活性化による骨芽細胞の分化初期における分化促進作用を有する可能性が示唆された。

## 第2章 アカボシタツナミソウの成分探索および骨形成促進作用の評価

### 【方法】

アカボシタツナミソウは沖縄や奄美大島の固有植物であるが成分情報はこれまで未詳であった。そのため、含有成分を明らかにするために成分探索を行った。アカボシタツナミソウの全草 300 g を 80%MeOH で抽出し、得られたエキスを常法により分配抽出を行った。各層について ALP 活性試験を行った結果、CHCl<sub>3</sub>層に活性 (0.3 μg/mL: 123.6%, vs cont. :100%) が認められたため、各種クロマトグラフィーにより分離・精製を行った。単離化合物は各種機器分析法により構造を解析し、ALP 活性試験および定量的 RT-PCR 法による骨形成関連遺伝子への影響を検討した。

### 【結果・考察】

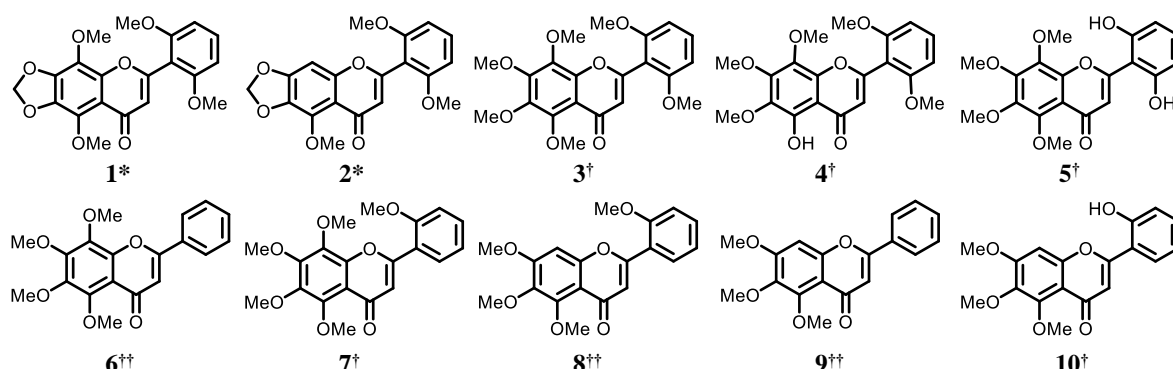


Fig. 5. Structures of 1—10 from the whole plant of SRE. \*: new compound, † : naturally first isolation, † † : new component

CHCl<sub>3</sub>層の成分探索を行った結果、2種の新規化合物(1および2)を含む10種のmethoxyflavone(1—10)を単離した (Fig. 5)。1—5のようにフラボノイドB環の2'、6'位に置換基が結合している化合物は天然からの単離報告は少なく、*Scutellaria* 属に特徴的な構造である。これらの化合物について ALP 活性試験を行ったところ、1、2および9に ALP 活性が認められ、骨芽細胞分化を促進する可能性が示唆された (Fig. 6)。骨形成関連遺伝子についての遺伝子解析では、1および9は *Runx2*、*Osx*、*Opn* および *Ocn* の mRNA 発現量を増加させたことから、骨芽細胞分化促進作用はこれら遺伝子の発現が関与している可能性が示唆された (Fig. 7)。さらに1は *Smad1*、4および5の mRNA 量の発現を増加させたことから、*Runx2* の活性化は Smad を介している可能性が示唆された (Fig. 7)。9に関しては、*Smad1* および4の mRNA 発現量を増加させたが (Fig. 7)、*Runx2* の mRNA 発現量が低濃度で増加しているのに対し、*Ocn* は高濃度で発現量の増加が認められたことから、分化後期においても分化を促進する可能性や、Smad を介した *Runx2* の活性化のみならず、活性発現に他の経路が関与している可能性が考えられた。2は、*Runx2*、*Osx*、*Opn*、*Ocn*、*Smad1*、4および5の遺伝子の mRNA 量を増加させたものの、*Smad1* および4を除いて 0.1 μM の濃度においてのみ増加が認められたことから、骨芽細胞分化促進作用はあるもののその作用は弱いと考えられた (Fig. 7)。また、ER 転写活性化作用を検討したが活性化作用は認められなかったことから、SRE が示した ER 転写活性化作用は別の含有成分が活性発現に寄与している可能性が示唆された。

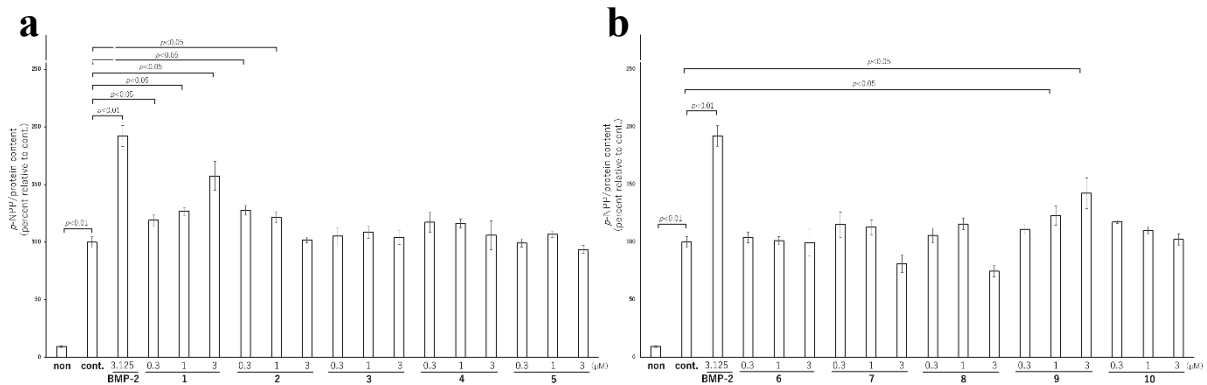


Fig. 6. Effect of (a) 1—5 (b) 6—10 on alkaline phosphatase (ALP) activity in the MC3T3-E1 mouse osteoblastic cell line.

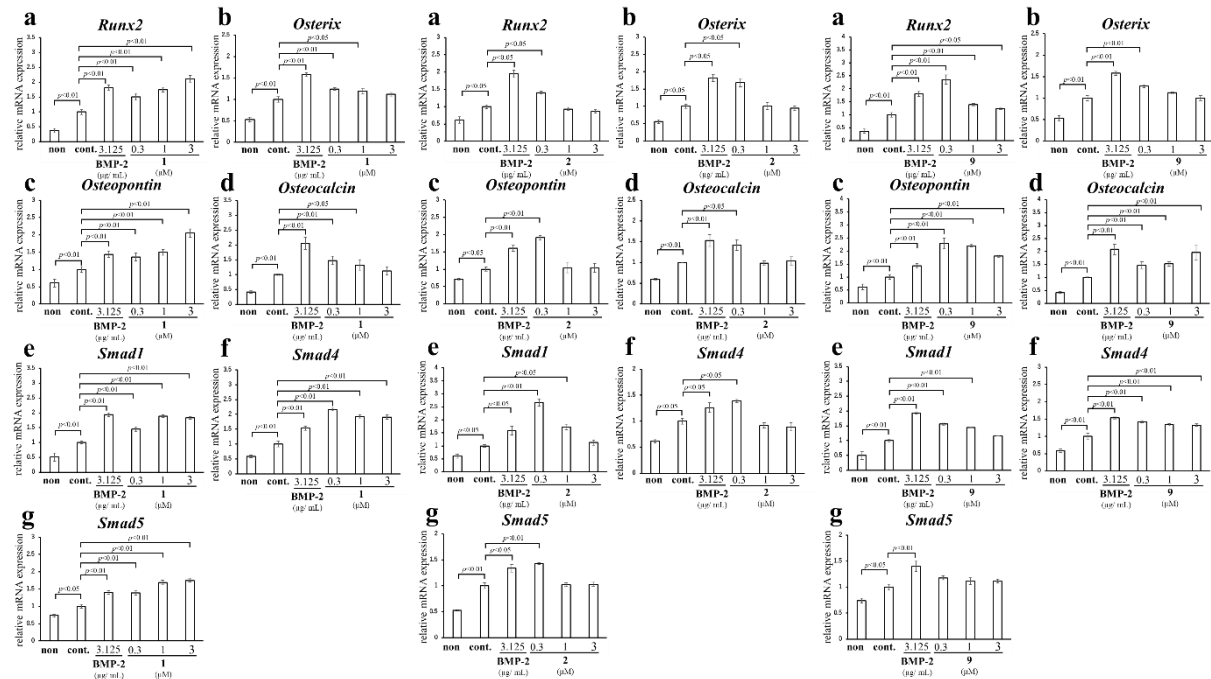


Fig. 7. Effect of incubation with 1, 2 and 9 for 72 h on the mRNA expression of osteo-blast-differentiation-related genes in MC3T3-E1 cells. The mRNA expression levels of (a) *Runx2*, (b) *Osterix*, (c) *Osteopontin*, (d) *Osteocalcin*, (e) *Smad1*, (f) *Smad4*, and (g) *Smad5* were measured by quantitative real-time PCR.

### 【結論】

本研究では骨粗しょう症の予防や改善に新たな選択肢が必要であると考え、琉球弧植物エキスライブラリーを用いて骨形成促進および ER 活性化のデュアル作用を示す天然物の探索を行い、アカボシタツナミソウを見出した。ER 刺激に着目した試験では、アカボシタツナミソウはヒト乳がん細胞を増殖させずに ER 転写活性を示すことを明らかにした。骨形成に着目した試験では、アカボシタツナミソウは破骨細胞の分化を抑制することなく、BMP/Smad 経路を介して骨芽細胞の分化初期における分化促進作用を有することを明らかにした。次に、成分未詳であったアカボシタツナミソウの成分を明らかにするため、成分探索を行ったところ、新規化合物 2 種を含む 10 種のメトキシフラボンを単離した。これらの骨形成への影響について ALP 活性試験および遺伝子解析を行ったところ、1、2 および 9 に ALP 活性の促進が認められ、特に 1 および 9 は BMP/Smad 経路の活性化が関与している可能性が示唆された。さらに 9 は分化後期に対しても分化促進する可能性や作用発現に関して他の経路が関与する可能性が考えられた。

ER の活性化に依存せずに骨形成促進作用を示す天然物であるアカボシタツナミソウについて更に研究を進め、更年期の不定愁訴の改善および骨の健康維持を目的とした機能性表示食品等への応用や骨粗しょう症の改善において課題とされている骨リモデリングの改善に役立つことを期待する。