

(様式5)

指導教員 承認印	主	副	副
	㊟	㊟	㊟

2018年 2月 14日

Year Month Day

学 位 ( 博 士 ) 論 文 要 旨

論文提出者 Ph. D. Candidate	生物システム応用科学府 共同先進健康科学専攻 (博士課程) 平成 <u>24</u> 年度入学(Your Entrance Fiscal Year) 氏名 <u>松本 茂</u> ㊟ (Your Name(Family, First) and Seal)				
主指導教員 氏 名 Chief Advisor's Name	稲田 全規	副指導教員 氏 名 Vice Advisor's Name		副指導教員 氏 名 Vice Advisor's Name	
論文題目 Title	ポリメトキシフラボノイド類による骨代謝性疾患モデルへの効果検証				

論文要旨 (和文要旨(2000字程度)または英文要旨(500words))

ポリメトキシフラボノイド (PMF) は様々な薬理作用に関する報告がなされている。これまでに、抗腫瘍効果、脂質代謝改善効果、高血糖改善効果、抗炎症効果、記憶障害改善効果等が報告されている。また、骨代謝系に対する作用については、骨芽細胞機能、破骨細胞形成に対する抑制効果、並びに、閉経後骨粗鬆症モデル、歯周病モデルの有効性が報告されている。これまで当研究室では、柑橘類特有のフラボノイドであるポリメトキシフラボノイドの一種、ノビレチンが閉経後骨粗鬆症モデルマウスの骨量を回復し、エストロゲン欠乏性の骨量減少に対して有効であることを明らかにしてきた。しかし、ポリメトキシフラボノイドの炎症性骨吸収に対する作用は未だ不明な点が多い。

本研究では、最初に、ポリメトキシフラボノイドの複合標品 (以下、PMF) を用いて、炎症性骨吸収および破骨細胞分化に対する効果を検討した。PMF は、骨芽細胞と骨髄細胞との共培養系において、IL-1 刺激による破骨細胞形成に対して有意な抑制効果を示した。なお、PMF と天然由来ポリメトキシフラボノイドの単一成分 (ノビレチン、タンゲレチン) との破骨細胞形成に対する抑制効果を同一濃度で比較したところ、PMF の方が強力な抑制効果を示した。PMF は、マウス頭頂骨を用いた IL-1 誘導性骨吸収に対しても、破骨細胞形成を抑制する濃度で有意な抑制効果を示した。また、刺激剤を IL-1 から LPS に変更しても、PMF は破骨細胞形成のみならず頭頂骨あるいは歯槽骨の骨吸収に対して有意な抑制効果を示した。更に、in vivo 卵巣摘出 (OVX) モデルマウスにおいても、PMF は骨密度の低下を有意に改善した。この際、PMF の毒性所見は認められなかった。以上の結果から、PMF は、破骨細胞形成を抑制することにより骨吸収を抑制している可能性が示唆された。

PMF は、ポリメトキシフラボノイドの単一成分 (ノビレチン、タンゲレチン) よりも強力な破骨細胞形成抑制効果を示したが、既存の PMF は高価であり、動物実験への応用は経済的負担が大きい。また、純度が 90% に満たないため、作用メカニズム解析に用いるのは適当でない。更に、PMF は、長時間乾燥させた柑橘類の果皮から抽出するため、大量調製には長時間を要する点が課題として挙げられる。そのため、次に、PMF と比較して安価・高純度かつ製造期間が短い特長をもつ有機合成品のポリメトキシフラボノイド (ノビレチン及びヘプタメトキシフラボノイド: HMF) を用いて、骨代謝調節作用機序について検討した。

ノビレチン及びHMFは、骨芽細胞と骨髄細胞の共培養系において、IL-1刺激による破骨細胞形成を濃度依存的に抑制した。破骨細胞形成には細胞内の活性酸素種（ROS）が関与していること、また、ノビレチン及びHMFは抗酸化作用を有することが報告されているため、ノビレチン及びHMFのROS産生について評価した結果、ノビレチン及びHMFはIL-1によって誘導される細胞内ROS産生を濃度依存的に抑制した。また、同じ共培養系で、抗酸化物質であるカタラーゼ、NAC、Troloxも破骨細胞形成を有意に抑制することが認められた。

上記評価は、生体でのイベントを反映する破骨細胞と骨芽細胞が共存する評価系で行ったが、次に標的細胞を破骨細胞のみに焦点を当て、M-CSF/sRANKL刺激・骨髄細胞評価系並びにsRANKL刺激・RAW264.7細胞評価系を用いて、ノビレチン及びHMFの効果について評価した。その結果、ノビレチン及びHMFは、骨髄細胞並びにRAW264.7細胞を用いた両方の評価系において、破骨細胞の形成を有意に抑制した。破骨細胞の分化誘導や機能発現には、そのマスター制御因子であるNFATc1の発現増加が必須であるため、次に、RAW264.7細胞を用いて、sRANKL刺激によるNFATc1発現に対するノビレチン及びHMFの評価を行った。ノビレチン及びHMFは、sRANKLで誘導されたNFATc1の発現増加に対して濃度依存的な抑制効果を示した。これらの結果から、ノビレチン及びHMFは、破骨細胞前駆細胞に作用してROS産生を抑制することにより破骨細胞形成を抑制している可能性が示唆された。更に、ノビレチン及びHMFは、RAW264.7細胞においてsRANKL刺激による破骨細胞形成を抑制する条件下で、抗酸化物質のカタラーゼの発現を増強した。

以上の結果から、ノビレチン及びHMFの破骨細胞形成抑制効果は、直接的な抗酸化作用と、細胞内カタラーゼの発現増加を介した間接的なROS産生抑制を介したNFATc1の発現抑制に起因している可能性が示された。また、ポリメトキシフラボノイドは、骨関連疾患に対する予防・治療薬としての可能性を有することが示唆された。

(英訳) ※和文要旨の場合(300 words)

The purpose of this study is to examine the effects of naturally polymethoxy flavonoid and synthetic-derived polymethoxy flavonoid extracts (PMF) on osteoclastogenesis and bone disease models and to investigate the inhibitory mechanism of PMFs on osteoclastogenesis.

PMF inhibited the IL-1-induced osteoclast formations in co-cultures of osteoblasts and bone marrow cells, and also suppressed IL-1 or LPS-induced bone resorption in organ cultures of mouse calvariae and mandibular alveolar bones. PMF also prevented severe bone loss by increased bone resorption due to estrogen deficiency.

In the experiment of IL-1-induced osteoclast formations in co-cultures of osteoblasts and bone marrow cells, when the effect of PMF were compared with naturally extracted polymethoxy flavonoid, nobiletin and tangeretin at the same concentration, PMF showed stronger effect than nobiletin and tangeretin.

To investigate the inhibitory mechanism of polymethoxy flavonoid on osteoclastogenesis, synthetic nobiletin and 3,5,6,7,8,3',4'-heptamethoxyflavone (HMF) were used in several experiments. These two polymethoxy flavonoids suppressed IL-1-induced osteoclast formation concentration dependently in co-cultures of osteoblasts and bone marrow cells. In the same concentration range, they also decreased IL-1-induced reactive oxygen species (ROS) production in the same culture condition. Furthermore, antioxidant, catalase, N-acetylcysteine (NAC) and Trolox also suppressed ROS production in the cells. From these results, the inhibitory effect of nobiletin and HMF on osteoclastogenesis may be dependent on suppression of ROS production intracellularly.

Nobiletin and HMF also suppressed M-CSF/sRANKL-induced osteoclastogenesis in bone marrow cells and sRANKL-induced osteoclastogenesis and NFATc1 mRNA expression in RAW264.7 cells. Furthermore, nobiletin and HMF showed the increase in the expression of antioxidant, catalase in osteoclast induced by sRANKL in the culture of RAW264.7 cells.

Therefore, it is suggested that synthetic polymethoxy flavonoids show the inhibitory effect on osteoclastogenesis via suppression of NFATc1 activation by decreasing the ROS production, which is resulted from their antioxidative effect and the increase in catalase expression in osteoclast precursor cell.

In conclusion, we firstly demonstrated synthetic polymethoxy flavonoids prevent osteoclastogenesis and elucidated its inhibitory mechanism in osteoclast precursor cell. PMF extracts suppressed bone resorption of alveolar bone and bone loss due to estrogen deficiency. Therefore, it is possible that PMFs may be beneficial to bone health in postmenopausal women and periodontal bone loss.