

様式第 1 号

論文内容要旨

*Nasturtium officinale* Extract Suppresses Osteoclastogenesis  
in RAW 264 Cells by Inhibiting I $\kappa$ B-kinase  $\beta$

学位申請者氏名：常陰 幸乃  
研究指導教員：片岡 浩介

## 1. 序

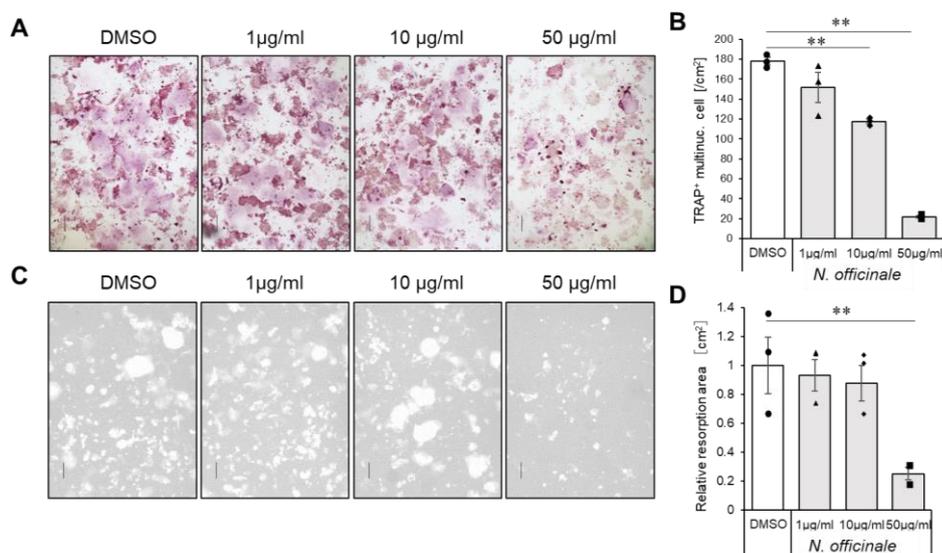
骨代謝は、正常な骨量及びカルシウム代謝を維持するために重要な生体システムで(1)、破骨細胞による骨破壊と骨芽細胞による骨形成のバランスによって制御されている(2)。骨粗鬆症や関節リウマチにおける骨破壊においては、破骨細胞の過剰な活性化が原因となることが報告されている (3, 4)。従って、破骨細胞の分化や活性化の制御機構の解明は、これらの疾患の予防および治療戦略ターゲットの同定において非常に有望であると考えられている。

本研究では、機能性の高い健康食品開発および、骨疾患の予防に重要な創薬シーズの開発、破骨細胞分化の分子メカニズム解明へ貢献することを目的とし、*Nasturtium officinale*\*抽出物が破骨細胞分化とその機能に与える影響及びメカニズムを解析した。

## 2. 研究結果及び方法

### 3.1. *N. Officinale* 抽出物は RAW 264 細胞の破骨細胞への分化能と骨吸収能を低下させる

はじめに、RANKL 刺激による RAW 264 細胞の破骨細胞形成において *N. officinale* 抽出物の影響を TRAP 染色法\*により調べた。*N. officinale* 抽出物を添加した細胞では、多核化した TRAP 陽性細胞の数が、濃度依存的に減少していた (Fig.1A, B)。骨吸収能アッセイを Osteo Assay Plate (24 well plate; Corning)を用いて行くと、*N. officinale* 抽出物を添加した細胞では骨吸収能が低下していた (Fig. 1 C, D)。



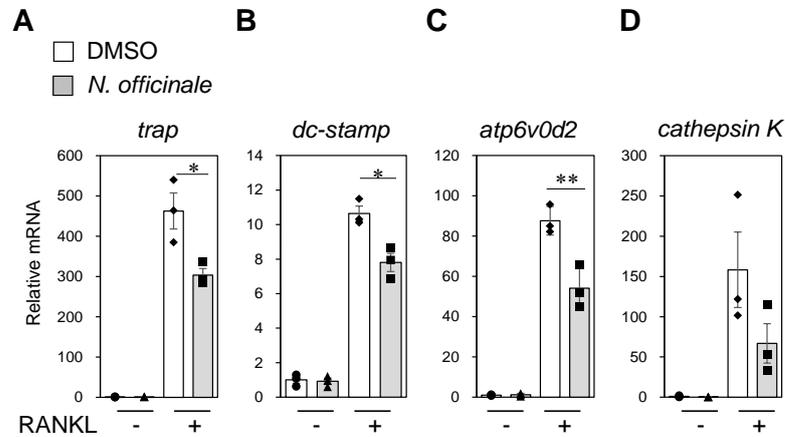
Tsunekage *et al.*, Natural Product Communications, accepted

Fig. 1 *N. officinale* 抽出物または DMSO 存在下で、RANKL 刺激 5 日後の RAW264 細胞の TRAP 染色 (A, B) 及び骨吸収アッセイ (C, D)。

### 3.2. *N. officinale* 抽出物は RANKL 刺激による破骨細胞マーカー\*遺伝子の誘導を抑制する

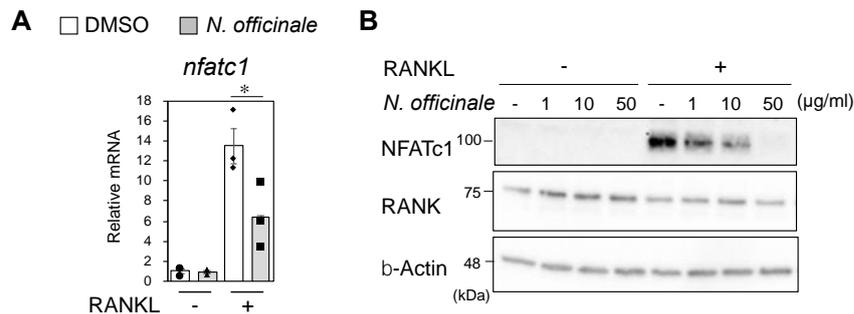
次に *N. officinale* 抽出物が、RANKL 刺激した RAW 264 細胞における破骨細胞関連因子の発現に与える影響を定量 PCR 及びイムノブロット法によって調べた。*N. officinale* 抽出物は RANKL 刺激 3 日後の *trap*, *dc-stamp*, *atp6v0d2*, *cathepsin K* の mRNA 発現誘導を抑制し

ていた (Fig. 2A-D)。 *N. officinale* 抽出物を添加した細胞では、破骨細胞分化のマスターレギュレーターである NFATc1 の mRNA 発現及びタンパク質発現も顕著に低下していた (Fig. 3A, B) 一方で、RANKL の受容体 RANK のタンパク質発現には影響しなかった (Fig. 3A, B)。



Tsunekage *et al.*, Natural Product Communications, accepted

Fig. 2 *N. officinale* 抽出物 (50µg/ml) または DMSO 存在下で、RANKL 刺激 3 日後の RAW264 細胞における *trap* (A), *dc-stamp* (B), *atp6v0d2* (C), *cathepsin K* (D) の mRNA 発現。



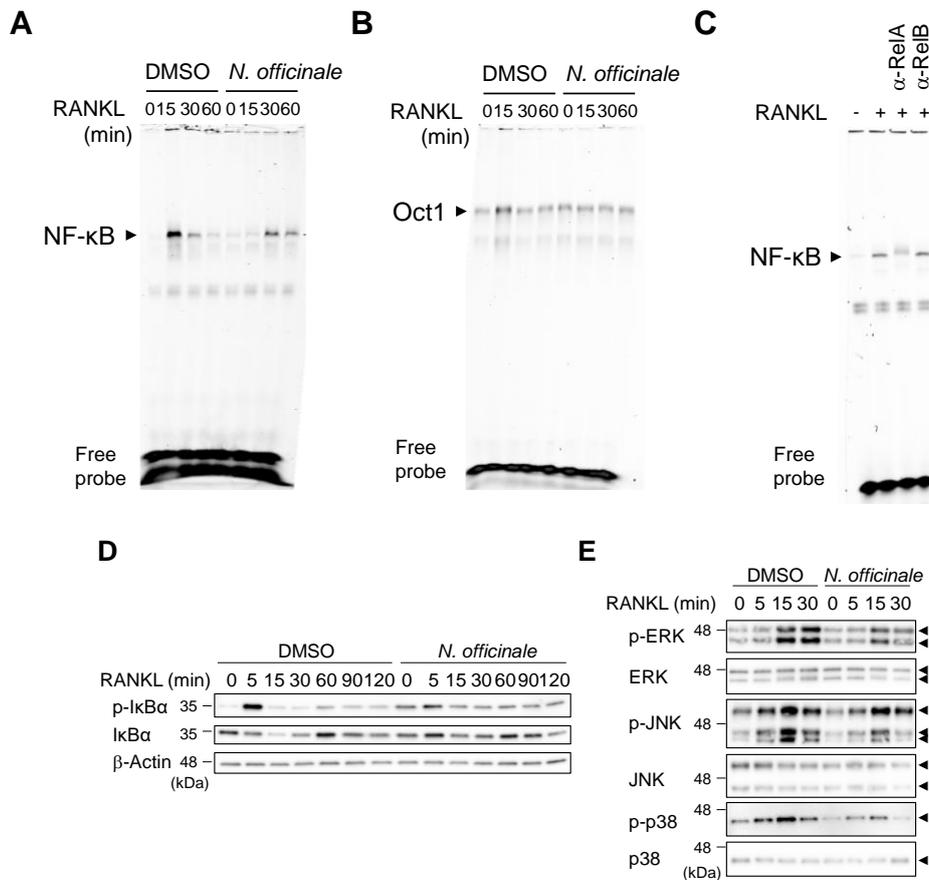
Tsunekage *et al.*, Natural Product Communications, accepted

Fig. 3 *N. officinale* 抽出物 (50µg/ml) または DMSO 存在下で、RANKL 刺激 3 日後の RAW264 細胞における *nfatc1* の mRNA 発現 (A) 及び NFATc1 と RANK のタンパク質発現 (B)。

### 3.3. *N. officinale* 抽出物は RANKL-RANK シグナル<sup>\*</sup>を抑制する

次に RANKL-RANK シグナル下流で活性化され、NFATc1 誘導に必要な NF-κB 及び MAPK シグナルの解析をゲルシフトアッセイ及びイムノブロットにより行った。その結果、*N. officinale* 抽出物は NF-κB の活性化を抑制することが示唆された (Fig. 4A, B)。NF-κB の活性化には複数の経路が存在するので、スーパーシフトアッセイによって RAW 264 細胞における活性化経路を調べたところ、RelA 抗体によってスーパーシフトが見られた。したがって、RAW 264 細胞においては RANKL 刺激によって RelA Canonical NF-κB 経路が活性化されることが示された (Fig. 4C)。また、RelA Canonical NF-κB の活性化に重要な Iκ-B のリン酸化は、*N. officinale* 抽出物によって抑制されることも明らかにした (Fig. 4C)。また、*N. officinale* 抽出物は、MAPK シグナル経路のコンポーネントである ERK, p38 及び JNK のい

ずれのリン酸化も抑制していた (Fig. 4D)。



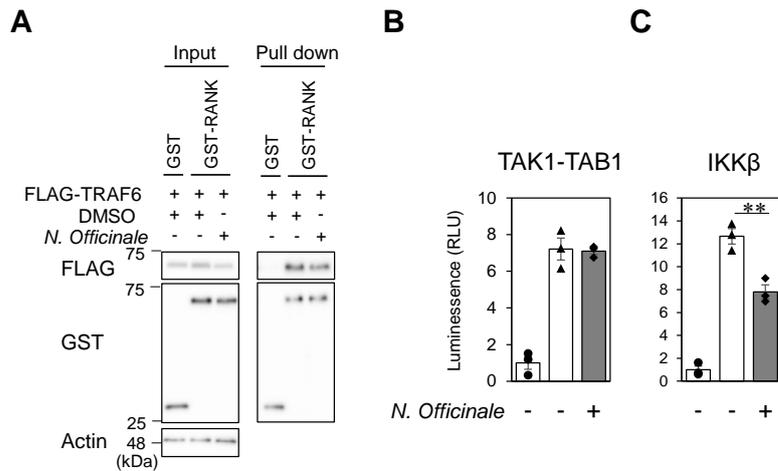
Tsunekage *et al.*, Natural Product Communications, accepted

Fig. 4 *N. officinale* 抽出物 (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) または DMSO 処理し RANKL 刺激後の NF- $\kappa\text{B}$  (A) と Oct1 (B) の DNA 結合アッセイ及び、NF- $\kappa\text{B}$  のスーパーシフトアッセイ (C)。I $\kappa\text{B}$  (D) と MAPK (E) のリン酸化解析。

### 3.4. *N. Officinale* 抽出物は IKK $\beta$ の酵素活性を阻害する

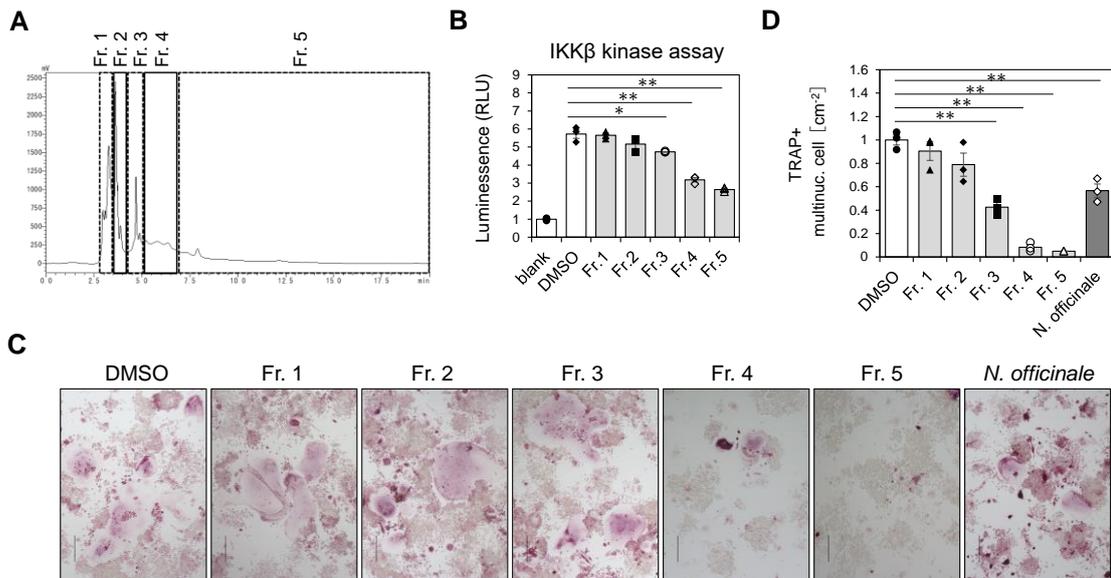
破骨細胞分化シグナルにおける NF- $\kappa\text{B}$  シグナル及び MAPK シグナルの活性化の上流因子である TRAF6 の RANK へのリクルート及び TAK1-TAB1 と IKK $\beta$  の活性を GST-pull down assay 及び ADP-Glo™ Kinase Assay (Promega) を用いて解析した。その結果、*N. officinale* 抽出物は TRAF6 のリクルート及び TAK1-TAB1 の活性化には影響を与えなかったが (Fig. 5 A, B)、IKK $\beta$  の活性化を抑制した (Fig. 5 C)。

*N. officinale* 抽出物を HPLC により粗分画したところ (Fig. 6 A)、IKK $\beta$  のキナーゼ活性は Fr. 4 と Fr. 5 によって強く阻害された (Fig. 6 B)。また、破骨細胞分化の抑制活性はこれらの画分 Fr. 4 と Fr. 5 にみられ、IKK $\beta$  の阻害活性と相関していた (Fig. 6 C, D)。これらのことから、*N. officinale* 抽出物に含まれる IKK $\beta$  活性阻害成分が、RAW264 細胞における破骨細胞分化を抑制する成分の一つである可能性が示唆された。



Tsunekage *et al.*, Natural Product Communications, accepted

Fig. 5 *N. officinale* 抽出物 (1 mg/ml) または DMSO 存在下で、TRAF6 の GST-pull down アッセイ(A)、TAK1-TAB1(B)、IKK $\beta$  (C)の *in vitro* キナーゼアッセイ。

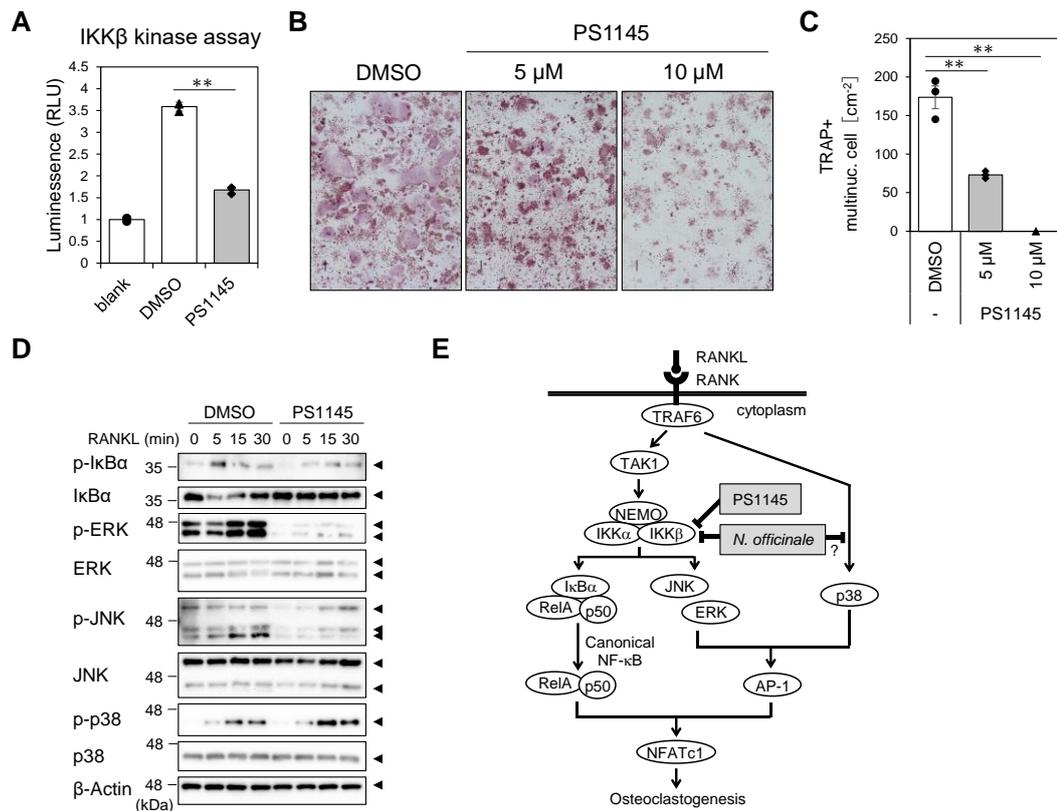


Tsunekage *et al.*, Natural Product Communications, accepted

Fig. 6 HPLC による *N. officinale* 抽出物の分画チャート (A)。分画サンプル (Fr.1-Fr.5) を用いた IKK $\beta$  の *in vitro* キナーゼアッセイ (B) と TRAP 染色 (C, D)。

### 3.5. IKK $\beta$ の阻害剤 PS1145 は破骨細胞分化を阻害する

IKK $\beta$ の阻害剤である PS1145 は、IKK $\beta$ の酵素活性を *in vitro*で阻害し(Fig. 7A)、RANKL 刺激による RAW 264 細胞の破骨細胞分化を抑制した(Fig. 7B, C)。また、RANKL-RANK シグナルにおいて I $\kappa$ -B だけでなく、ERK、JNK のリン酸化も抑制することが示されたが、p38 のリン酸化は抑制しなかった(Fig. 7D)。これらのことから、*N. officinale* 抽出物は破骨細胞分化阻害において、IKK $\beta$ を標的分子としてその酵素活性を阻害することによって RANKL-RANK シグナルを抑制する可能性が示された (Fig. 7E)。



Tsunekage *et al.*, Natural Product Communications, accepted

Fig. 7 PS1145 (10 μM) または DMSO 存在下で、IKKβの *in vitro* キナーゼアッセイ (A)、RANKL 刺激後の TRAP 染色 (B, C)、RANKL-RANK シグナルのリン酸化解析 (D)とまとめ (E)。

### 3. 討論

本研究では *N. officinale* 抽出物が、IKKβの酵素活性を抑制することで、NF-κB 及び MAPK シグナルを抑制し、RANKL 刺激による RAW264 細胞の破骨細胞分化と骨吸収能を抑制することを明らかにした。

骨粗鬆症は自覚症状がほとんどない疾患であることから、予防医学が重要視される疾患である。本研究結果は、骨代謝シグナルに着目した機能性の高いサプリメントの開発や、さらには、活性成分同定による新たな創薬シーズの発見に大きく貢献できると考えられる。

### 4. まとめ

- 1) *N. officinale* 抽出物は RAW264 細胞において RANKL 刺激による破骨細胞分化と骨吸収能を抑制する。
- 2) *N. officinale* 抽出物は MAPK 及び Canonical な NF-κB シグナルを抑制する。
- 3) *N. officinale* 抽出物の標的因子の一つは IKKβである。

### 5. 今後の研究計画

*N. officinale* 抽出物をさらに分画し、TRAP 染色や IKKβ *in vitro* kinase assay を用いて活性成

分を同定する。

## 6. 論文リスト

### 【主論文】

*Nasturtium officinale* Extract Suppresses Osteoclastogenesis in RAW 264 Cells by Inhibiting I $\kappa$ B-kinase  $\beta$ . *Natural Product Communications*, accepted.

## 7. 参考文献等

- (1) M Asagiri, H Takayanagi, The molecular understanding of osteoclast differentiation. *Bone* 40, 251-264(2006).
- (2) G Karsenty, E F Wagner. Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development. *Developmental Cell* 2, 389-406(2002).
- (3) M Feldmann, F M Brennan, R N Maini. Rheumatoid arthritis. *Cell* 85, 307-310(1996).
- (4) W C Dougall, M Chaisson. The RANK/RANKL/OPG triad in cancer-induced bone diseases. *Cancer and Metastasis Reviews* 25, 541-549(2006).
- (5) M K Szczykutowicz, A Szopa , H Ekiert. Chemical composition, traditional and professional use in medicine, application in environmental protection, position in food and cosmetics industries, and biotechnological studies of *Nasturtium officinale* (watercress) - a review. *Fitoterapia* 129, 283-292 (2018).

## 8. 用語集

### *Nasturtium officinale*

クレソンとして知られている *Nasturtium officinale* は、ヨーロッパを起源とするハーブの一種でアブラナ科に属している。今日までに薬理的な研究によって、抗酸化・抗菌・抗炎症・心臓保護などの効果が示されている(5)。

### 破骨細胞

破骨細胞は単球/マクロファージ由来細胞の融合によって形成される骨吸収能を持つ多核巨細胞である。破骨細胞の分化は、主に M-CSF (macrophage colony-stimulating factor) と RANKL (receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand) の2つのサイトカインによって制御される。

### TRAP 染色

破骨細胞のマーカーである酒石酸抵抗性ホスファターゼ TRAP は、分化した破骨細胞で高発現しているので、酒石酸存在下でホスファターゼの酵素活性染色を行うと赤褐色～茶褐色を呈する。

### 破骨細胞分化マーカー

DC-stamp は破骨細胞の融合に関わる因子であり、Atp6v0d2 は、骨吸収において細胞外酸性化を仲介する破骨細胞特異的プロトンポンプである。Cathepsin K は破骨細胞から分泌され、I 型コラ

ーゲンを分解するシステインプロテアーゼである。

### **RANKL-RANK シグナル**

骨芽細胞や骨髄間質細胞に発現する RANKL は、破骨前駆細胞に発現する RANKL 受容体である RANK に結合することで TRAF6 のリクルートを誘導し、MAPK や NF- $\kappa$ B シグナルを活性化する。その結果誘導される NFATc1 などの転写因子が破骨細胞分化関連遺伝子の発現を調節することで破骨細胞分化が進行する。これらの一連のシグナル伝達を RANKL-RANK シグナルという。