

## 学位論文審査の結果の要旨

氏名	常陰 幸乃	
学位の種類	博士（理学）	
学位記番号	甲 第1778号	
学位授与の日付	令和3年8月31日	
学位授与の要件	文部科学省令学位規則 第4条第1項 該当	
学位論文題目	<i>Nasturtium officinale</i> extract suppresses osteoclastogenesis in RAW 264 cells by inhibiting I $\kappa$ B-kinase $\beta$	
主研究指導教員	片岡 浩介	
論文審査委員	(主査) 古久保 哲朗	教授
	(副査) 川崎 ナナ	教授
	(副査) 秋山 泰身	大学院客員教授
	(副査) 守屋 繁春	大学院客員准教授

## 論文内容の要旨

骨は、骨芽細胞による形成と破骨細胞による破壊のバランスによって動的に維持されている。破骨細胞の過剰な活性化は、骨粗鬆症や関節性リウマチにおける骨破壊の原因となる。申請者は、破骨細胞の分化を抑制するような健康食品開発を視野に、植物由来の天然成分の発見と、その作用機序の解明を目標に本研究を行なった。

破骨細胞の分化は、マクロファージ系の前駆細胞に、骨芽細胞由来のサイトカインの1種であるRANKLが作用することによって誘導されることが明らかにされている。マクロファージ系の株化細胞であるRAW264を組換えRANKLタンパク質で刺激することにより、5~7日かけて破骨細胞への分化を誘導する *in vitro* 実験系が広く使われているので、これを用いて、*Nasturtium officinale* (クレソン) の抽出物が破骨細胞への分化を抑制することを見出した。すなわち、*N. officinale* 抽出物は、RANKLによる破骨細胞への分化 (TRAP (=酒石酸耐性ホスファターゼ) 陽性の多核化した巨細胞の出現) を濃度依存的に抑制した。このとき、分化形態だけでなく、骨基質の吸収能力を抑制することも、*in vitro* の骨吸収アッセイで示した。

これらの結果を受けて、*N. officinale* 抽出物による破骨細胞分化抑制の分子機構の解明を試みた。まず、破骨細胞の最終分化マーカー遺伝子である *trap*, *dc-stamp*, *atp6v0d2*, *cathepsin K* の発現を定量RT-PCR法で調べ、これらのmRNAのRANKLによる発

現誘導が抑制される傾向にあることを示した。これらの遺伝子は、破骨細胞分化のマスター因子NFATc1が誘導されることによって転写レベルで活性化されることが知られているので、NFATc1のmRNAとタンパク質の発現を調べ、RANKL刺激3日後のNFATc1の発現誘導を*N. officinale*抽出物が抑制することを見出した。

RANKLは、破骨前駆細胞の受容体RANKを介してその下流の細胞内シグナルを惹起してNFATc1を誘導することが先行研究により分かっている。そこで、*N. officinale*抽出物が、このシグナル経路のいずれかのポイントを遮断する可能性を考えて、その特定を試みた。NFATc1の誘導には、MAPK (Erk, JNK, p38) の活性化とNFκBの活性化の両方が必要である。Western blotにより、RANKL刺激後30分以内の素早いErk, JNK, p38の活性化が、同抽出物の添加によって抑制されることが分かった。また、NFκBのRANKL刺激による一過的な誘導も抑制されることを、ゲル・シフト法で示した。RANKLにより誘導されるNFκBはカノニカルなp50-Re1A複合体であることを、特異抗体によるゲル・シフトのバンド消失により確認したのち、この経路の誘導に必須なIκBαの素早いリン酸化と分解の誘導も、同抽出物によって抑制される傾向にあることを明らかにした。さらに、IκBαのリン酸化を担うキナーゼIKKβの活性が、*N. officinale*抽出物によって直接抑制されることを、*in vitro*のkinase assayにより示した。したがって、IKKβは同抽出物の標的候補と考えられた。

抽出物中の活性成分の同定を視野に、抽出物をHPLCで粗分画し、各画分のRAW264細胞の分化抑制活性とIKKβ阻害活性を調べたところ、両方の活性はよく相関していた。活性成分の同定には至らなかったものの、この結果はIKKβの阻害が分化抑制の主たるメカニズムであることを示唆するものであった。そこで、IKKβの特異的阻害薬とされる化合物PS1145を*in vitro*分化系に添加すると、予想通りIκBαのリン酸化と分解を抑制しつつ、RAW264細胞の破骨細胞分化も抑制した。のみならず、一般的にはIKKβの下流とは考えられていないErkとJNKの活性化も抑制した。このことから、*N. officinale*抽出物によるErkとJNKの活性化の抑制も、IKKβの阻害で説明が可能ではないかと考えた。また、PS1145はp38の活性化には影響しなかったので、*N. officinale*抽出物はIKKβの阻害とは別の機構でp38の活性化を阻害していると想像された。

以上のように本論文では、まず食品・植物由来の*N. officinale*抽出物に破骨細胞の分化を抑制する活性があることを新規に発見した。そして、定量PCR、Western blot、ゲル・シフト法、*in vitro* kinase assay、HPLC分画など、既存技術ではあるが多岐にわたる手法を用いて、その抑制の分子機構の解明に取り組み、同抽出物が重要なシグナル分子であるIKKβの阻害活性を持つことを明らかにした。IKKβの阻害が、破骨細胞分化阻害の本質的な要因であるかどうかを示す決定的な証拠を示すことはできていないものの、植物由来の抽出物の持つ新しい生物活性を発見し、混合物として複雑・複合的な作用を持つ可能性がある中で、その分子機構の一部を明らかにすることができたことは高く評価できる。活性成分の同定を含めた今後の発展も期待される。

## 論文審査結果の要旨

本論文の審査は、提出論文の内容、発表会（令和3年6月30日午後1時～2時）および審査会での質疑応答（令和3年6月30日午後2時～3時）に基づいて、4名の審査員（主査：古久保哲朗 教授、副査：川崎ナナ 教授、秋山泰身 大学院客員教授、守屋繁春 大学院客員准教授）によって行われた。審査会は発表会に引き続いて行われたので、内容の要約をあらためて行うことはせず、すぐに質疑応答を行なった。

専門分野の議論においては、IKK $\beta$ の活性阻害が*N. officinale*抽出液による分化抑制の主たる作用点であるか否か、また、IKK $\beta$ の下流でMAPK経路が阻害されるとの見解が妥当か、などの点について、複数の切り口から繰り返し問われた。

川崎副査から、破骨細胞分化抑制の活性を持つことが既知のフェネチルイソチアネートが含まれていることを予想した上でこの抽出物を選んで使ったのか、との質問があったが、そうではなく、いくつかの植物抽出物のスクリーニングでヒットしたのちに、フェネチルイソチアネートが含まれる可能性があることを知った、との回答であった。また、抽出物の分画を行なったHPLCの詳しい条件と、その条件ではフェネチルイソチアネートが分画できないために活性成分を単離できなかったのではないかと、また、それが含まれていないことはどのような実験で担保したのか、を問われ、共同研究先で行われたHPLCについては十分に理解できていない印象であった。さらに、IKK $\beta$ の下流でMAPK経路が阻害されるとの主張は、阻害剤PS1145による分化阻害とErk, JNK阻害の結果に基づくと考えられるが、その根拠はどれほど堅固かを問われ、PS1145のIKK $\alpha$ , IKK $\beta$ に対する阻害の選択性などを挙げた上で、その他のものを阻害する可能性は排除できないので、IKK $\beta$ がMAPK経路を制御しているのではない可能性があることは認識しているとの回答であった。

守屋副査からは、IKK $\beta$ の下流でMAPKのErk, JNKが制御されるとの結論について、その根拠と、新規性について問われた。実験結果に基づいて説明がなされ、そのような報告もあるがコンセンサスが得られるほど確立されたものではなく、自分の実験結果から提唱するものであるとの回答であった。どのような実験を行えば証明ができるかをさらに問われ、分化を阻害する活性成分を単離・同定することができれば、それがどのシグナル分子を阻害するかを調べることで可能だろうとの妥当な回答を得た。

秋山副査からは、TRAP染色やNFATc1発現への抽出液の影響は劇的に大きいと、マーカー遺伝子の発現への影響はそれほどでもない点などから、抽出液の作用点は分化の初期のIKK $\beta$ ではなく、もっと後期の過程ではないかと問われ、RANKL刺激の3日後に抽出液を加えても分化阻害が観察されるなどの実験結果を紹介し、その可能性もありうるとの回答であった。また、破骨細胞分化誘導系としてRAW264細胞を用いるメリット・デメリットについて問われ、マウス初代骨髄マクロファージBMMを用いるのが一般的であるものの、動物を用いない点がメリットである旨を回答したが、初代細胞

より *in vivo* を反映していないというデメリットには言及できていなかった。

古久保主査からは、抽出液はNFκBの誘導を阻害するというよりも遅延させるように見える点などから、それらの初期のシグナルへの影響が、本当に分化阻害の原因なのかどうかを問われ、IKKβの阻害薬PS1145を使った自分の実験結果をもとに説明を試みたが、十分に説得力のあるものではなかった。阻害剤耐性のIKKβ変異体が利用できれば証明できるのではないかと指摘に対しても、その意味するところを充分には理解できていなかった様子であった。細胞の生存を調べたのがRANKL刺激3日後までである理由や、RelBを解析対象から外した根拠などについては、妥当な回答がなされていた。一方、NFATc1の発現抑制に関して、mRNAの変化に比べてタンパク質の抑制の程度が著しい点をどう考えるかを問われたが、RT-PCRの定量性の信頼度を中心に答えようとしたため、少し議論が噛み合わなかった。

関連科目の知識について、川崎副査から、タンパク質のリン酸化を調べる方法として抗リン酸化抗体でのWestern blot以外の方法を問われたが、思いつくことができなかった。一方、将来的に食品または医薬品として開発する際の具体的な道筋や計画を問われ、活性成分が同定できた場合、健康食品・サプリとしてhealth claimを厚労省に申請するなどのいくつかの可能性について、ほぼ妥当に答えていた。守屋副査からは、本論文で扱っているもの以外のシグナル伝達系とその意義の説明を求められ、皮膚でのUVやLPS刺激によるNGF産生と神経伸長、TGFβによるSmad活性化とコラーゲン発現誘導などを挙げることができたものの、少し不十分な印象であった。秋山副査からは、NFκBの生理機能の説明を求められた。例としてマクロファージを挙げ、LPSやUVで活性化されて炎症応答・防御反応を起こすので、IKKβを阻害してしまうと生体防御の観点からは好ましくないだろう、と答えた。古久保主査からは、HPLCの原理と、その実験で用いたODSについて具体的な説明を求められ、大まかな概念は理解しているようだったが、詳しい点までは説明できず不十分な回答であった。

英語力（外国語科目）では、まず英文報告書は自力で作成したことを確認した。内容は全体として過不足なくまとまっていたものの、スペルミスや文法ミスが散見された。文法ミスは、指摘されてその場で正しい表現に修正することができたものもあれば、ある程度誘導しないとできないものもあった。また、スライド1枚の英語での口頭説明を求めたところ、文法的なミスがありながらも、なんとか意図を伝えることができるレベルであった。英語での質問は、内容が伝わらなかったようだったため、日本語での質問に切り替えたところ、誤りを含んでいたものの、英語で妥当な返答をすることができていた。

以上の質疑応答の直後に審査委員全員で討議を行なった。研究内容や質疑は十分学位に値するレベルであり、関連科目や英語の能力なども総合的に判断して、申請者は博士の学位を得るにふさわしい資格を有すると判定された。