

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：12614

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24800026

研究課題名(和文)骨粗鬆症予防に資する海藻由来成分の生体機能解析

研究課題名(英文)Studies on the biofunction of seaweed extract for osteoporosis prevention

研究代表者

西本 壮吾 (Sogo, Nishimoto)

東京海洋大学・海洋科学技術研究科・准教授

研究者番号：70392066

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)： テングサメタノール抽出物(GME)に破骨細胞分化抑制作用が認められた。作用機序を明らかにするため、破骨細胞分化において重要な役割を担う遺伝子の発現を検討した。GMEを添加培養した破骨細胞前駆細胞はNFATc1およびJNK遺伝子の発現量の減少が見られたが、NF- κ Bの遺伝子発現には影響を及ぼさなかった。

以上の結果から、RANKを介したシグナル伝達において、GMEは破骨細胞前駆細胞のTRAF6の下流に作用し、JNK経路に影響を与えると考えられた。JNKの発現低下はNFATc1の発現低下を導き、成熟破骨細胞への分化が抑制した可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)： In this study, we found that Gelidium elegans Katzing methanol extract (GME) suppressed the osteoclast differentiation.

To clarify this mechanism, we investigated the major and important gene expression in osteoclast differentiation. NFATc1 and JNK gene expression were decreased in osteoclast cultured with GME. It was revealed that GME was operated at the downstream of TRAF6. Moreover, the reduction of gene expression level of JNK and NFATc1 was induced by GME treatment.

These results from were suggested that GME carried out suppression of osteoclast differentiation in the intracellular signal transduction via RANK.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学・応用健康科学

キーワード：生理活性 海藻 骨粗鬆症 細胞

1. 研究開始当初の背景

日本国内の骨粗鬆症患者数は約 1100 万人と言われ、人口の約 10%に相当する。骨粗鬆症は「骨強度の低下を特徴とし、骨折のリスクが増大しやすくなる骨格疾患」と定義付けられ、大腿骨や椎体の骨折を引き起こす主な原因であるとされる。科学技術の進歩や生活水準の向上による平均寿命の延伸と高齢化を背景に、骨粗鬆症が寝たきりや要介護状態の原因となっている。骨粗鬆症は現代社会において様々な問題を引き起こす要因と考えられ、骨代謝の改善効果を示す食品および食品成分の探索と成分同定は重要な課題であると考えられる。

申請者は、海藻に含まれる成分の機能性を検討し、骨代謝に焦点を当てた。

2. 研究の目的

高齢社会の QOL (生活の質) 低下を未然に防ぐ一方策として骨折リスクを軽減する必要があり、予防医学的利用価値を持つ天然物素材として海藻に着目した。カルシウム摂取量の慢性的不足が現状であり、カルシウム摂取を推奨するだけでは対応できていない現状がある。そのため、骨量減少抑制効果を示す食品成分の有用性は高いと考えられる。

海藻に含まれる骨代謝に関わる成分同定と作用機序を解明することによって海藻機能の包括的理解を助け、予防医学に応用できる食品成分の研究基盤構築につなげることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 海藻成分による破骨細胞の分化抑制

三重県尾鷲市にて採取されたテングサをサンプルとして使用した。ミキサーにて細断したテングサをメタノールに 5 日間浸漬し、ろ液を回収した後、減圧乾固体を得た。減圧乾固体をブレンダーで粉末状にし、ヘキサン抽出を行った。ヘキサン層をフラッシュカラムクロマトグラフィーで分離し、得られた 14 画分を減圧乾固させた。

以降の実験は乾固体を DMSO に溶解したものをサンプルとし、実験に使用した。以下、GME と表記する。

マウス大腿骨より回収した骨髄細胞と骨芽細胞株 MC3T3-E1 細胞の共培養系に活性型ビタミン D₃ とプロスタグランジン E₂ を添加し、破骨細胞分化を誘導した。GME は共培養開始時から添加し、7 日後の破骨細胞分化の抑制効果を酒石酸耐性酸性ホスファターゼ (TRAP) 法により検討した。

GME の細胞毒性については、MTT 法にて細胞生存率を確認した。

(2) 破骨細胞分化における遺伝子発現

マウス大腿骨より骨髄細胞を調製し、M-CSF を添加した培地で培養を行った。3 日後、M-CSF に加え RANKL および GME を添加した培地に置換し、さらに 3 日間培養した。培養後、破骨細胞を回収し、定法によって総 RNA を回収した。cDNA 合成後、破骨細胞分化に関わる遺伝子について、リアルタイム PCR を用いて発現量を評価した。

この結果から、GME が RANK-RANKL を介した破骨細胞分化におけるシグナル伝達系の標的部位を検討した。

4. 研究成果

(1) 破骨細胞分化の抑制活性について

骨芽細胞株 MC3T3-E1 とマウス大腿骨から調製した骨髄細胞を共培養し、破骨細胞への分化を誘導した。この過程で調製した GME14 画分を添加し、破骨細胞分化を TRAP 法によって検討した。GME14 画分のうち、3 画分に破骨細胞への分化が抑制傾向を示す成分が含まれることがわかった。この 3 画分のうち、最も破骨細胞分化の抑制傾向が強く見られた 1 画分を以降の実験に用いた。

骨芽細胞株と骨髄細胞の共培養系に様々な濃度の GME を添加したところ、GME 高濃度域において破骨細胞への分化を抑制する効果が明らかとなった (図 1)。

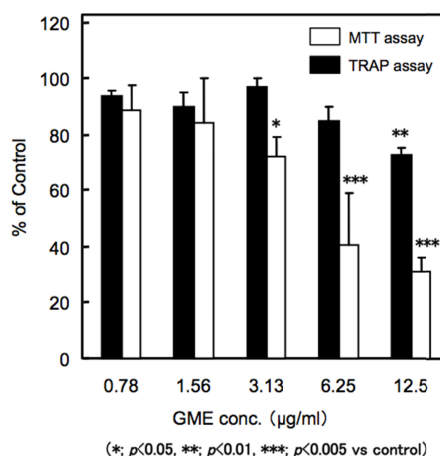


図 1 .GME による破骨細胞分化抑制効果と細胞生存率

また、GME の細胞毒性を評価するため、MTT 法によって細胞生存率を測定した。GME 高濃度域では細胞生存率が低下するものの、約 70%の生存率を保っており、強い細胞毒性は示さないと考えられた。

(2) RANK-RANKL を介した破骨細胞の分化に関わる遺伝子発現について

骨髄細胞は M-CSF と RANKL によって破骨細胞へと分化する。破骨細胞への分化抑制効果を示す GME の作用機序を明らかにするため、M-CSF および RANKL 刺激存在下で破骨細胞分化に関わる遺伝子について発現を検討した。

GME が破骨細胞分化の抑制効果を示しており、成熟破骨細胞の形成には転写複合体が関与しており、構成因子である NFATc1 の発現を検討した。

その結果、GME を添加しなかったコントロールと比較して GME 添加した破骨細胞では NFATc1 の発現が減少した (図 2)。NFATc1 は RANKL を介したシグナル伝達に特異的であり、GME は破骨細胞分化を遺伝子レベルで抑制していることが明らかとなった。

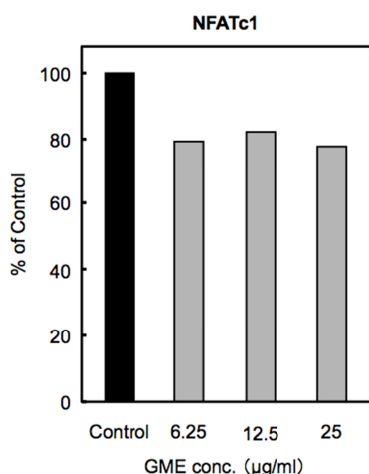


図 2 .GME 添加による破骨細胞中の NFATc1 発現

RANKL を介したシグナル伝達系において NFATc1 は上流の JNK や NF-κB によって制御されており、GME 添加による破骨細胞内のこれらの遺伝子発現を検討した。

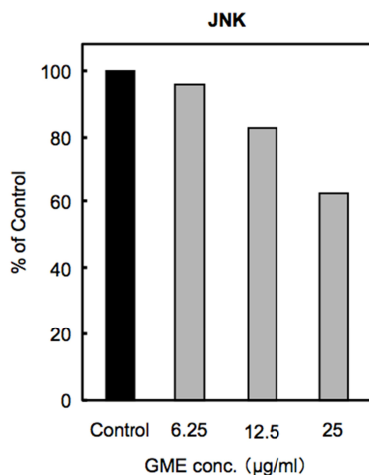


図 3 . GME 添加による破骨細胞中の JNK 発現

その結果、NFATc1 を含む転写複合体の構成因子の一つである AP-1 の発現制御を担う JNK の発現量が減少することがわかった (図 3)。その一方で、NF-κB の発現量に変化は認められなかったことから、NF-κB を介した NFATc1 発現には影響を及ぼさないと考えられた。

本研究の結果から、GME は RANK を介した破骨細胞分化過程において、NFATc1 および JNK の遺伝子発現を低下させることによって成熟破骨細胞への分化を抑制する可能性が示唆された。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

(1) Choi J-H., Yoshida M., Suzuki T, Harada E., Kawade M., Yazawa K., Nishimoto S., Hirai H. and Kawagishi H. (2013): A novel sphingosine with osteoclast-forming suppressing activity, from the edible mushroom *Grifola gargar*. *Tetrahedron*, 69, 8609-8611. 査読有 .

(2) Koyama T., Nakajima C., Nishimoto S., Takami M., Woo J-T. and Yazawa K. (2012): Suppressive effects of the leaf of *Terminalia catappa* L. on osteoclast differentiation in vitro and bone weight loss in vivo. *Journal of Nutrition Science Vitaminology*, 58, 129-135. 査読有 .

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西本 壮吾 (NISHIMOTO Sogo)
東京海洋大学・特任准教授
研究者番号：70392066

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：