

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

前 田 美 咲

2023

## 目 次

序 論	1
本 論	15
第 1 章 ER アゴニスト活性および骨形成促進作用を示す琉球弧植物の探索	15
第 1 節 琉球弧植物を用いた ER アゴニスト活性スクリーニング	15
第 2 節 アカボシタツナミソウの ER アゴニスト活性に関する評価	16
第 1 項 ER アゴニスト活性の確認	16
第 2 項 ヒト乳がん細胞増殖作用評価	18
第 2 節 アカボシタツナミソウの骨形成への影響に関する評価	19
第 1 項 SRE の骨芽細胞の分化初期への影響	19
第 2 項 SRE の骨芽細胞の分化後期への影響	24
第 3 節 アカボシタツナミソウの骨吸収への影響に関する評価	28
第 4 節 小括	29
第 2 章 アカボシタツナミソウの成分探索および ER アゴニスト活性・骨形成促進作用の評価	32
第 1 節 アカボシタツナミソウの成分探索	32
第 1 項 5,8,2',6'-tetramethoxy-6,7-methylenedioxyflavone (1) の構造	34
第 2 項 5,2',6'-trimethoxy-6,7-methylenedioxyflavone (2) の構造	40
第 3 項 その他の化学成分の構造	47
第 2 節 ER アゴニスト活性評価	51
第 3 節 骨形成への影響	52
第 4 節 小括	62
総 括	65
実験の部	68
謝 辞	76
引用文献	77

## 序 論

### I. 超高齢社会の日本における問題

我が国の平均寿命は延び続けており、2022年の世界保健統計によると我が国の平均寿命、健康寿命はともにWHO加盟国194ヶ国中でトップである。しかし、超高齢社会の我が国では社会保障費が年々増大しており、国の財政を圧迫している。特に2025年には1947—1949年生まれ、いわゆる団塊世代が75歳以上の後期高齢者になることによる社会保障費の急増が見込まれ、喫緊の課題となっている。平均寿命および健康寿命ともに世界首位であるにもかかわらず、このような問題が発生する原因は平均寿命と健康寿命の「差」にあると考えられる。健康寿命は日常生活に制限のない期間と定義されていることから、平均寿命から健康寿命の差をとると日常生活に制限のある健康でない期間、すなわち、要介護に近い状態であると考えられる。厚生労働省の第16回健康日本21(第二次)推進専門委員会資料3-1<sup>1)</sup>によると、平均寿命と健康寿命の差は、例えば男性では平成19年では8.9年、平成25年では9.0年、令和元年では8.7年であることがわかる。女性では、平成19年では12.6年、平成25年では12.4年、令和元年では12.1年であることがわかる。従って、男女ともに日常生活に制限のある健康でない期間、つまり、要介護に近い状態が約10年間続くことが推測される(Fig. 1-1)。

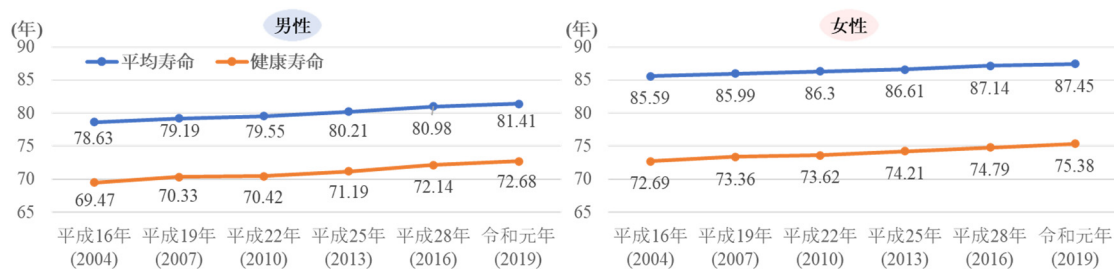


Fig. 1-1. 平均寿命と健康寿命の推移<sup>1)</sup>

我が国における要介護認定者は年々増加しており、令和元年には65歳以上の人口の約13%にあたる約471.2万人が要介護認定者と登録されている (Fig. 1-2a). 要介護者からみた主な介護者の続柄は同居している人が半数を超えており、その年齢を見ると男女ともに約70%以上が60歳以上であることがわかっている (Fig. 1-3). したがって、老老介護と称される高齢者が高齢者を介護する場合も相当数存在していると考えられ、非常に深刻な社会問題となっている。65歳以上の要介護に陥る原因には脳血管疾患 (脳卒中)、心疾患 (心臓病)、関節疾患、認知症や高齢による衰弱などが挙げられるが、その1つに骨折・転倒がある (Fig. 1-2b). 要介護状態になってしまうような骨折の背景には、大腿骨などの大きな骨を損傷しやすい状態である骨粗しょう症の存在が隠れていると考えられる。

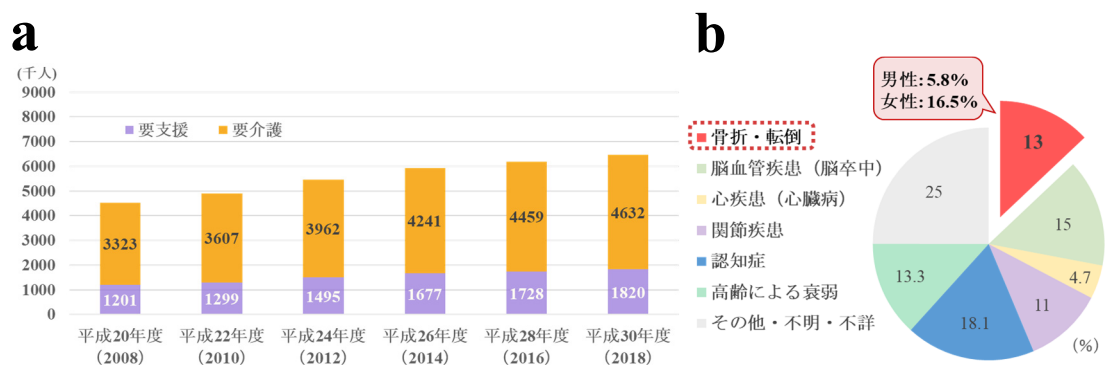


Fig. 1-2. (a) 第1号被保険者(65歳以上)の要介護度別認定者数の推移<sup>2)</sup>, (b) 65歳以上の要介護者等の性別にみた介護が必要となった主な原因<sup>2)</sup>

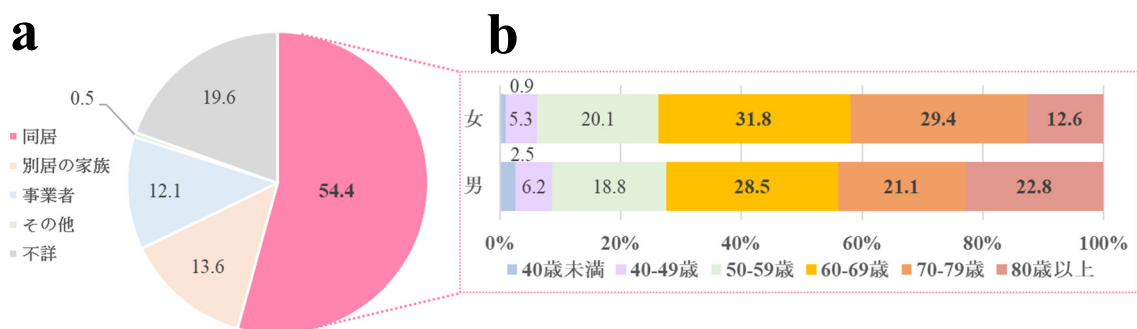


Fig. 1-3. (a) 要介護者の続柄, (b) (a) の”同居”における男女別年齢の割合<sup>2)</sup>

## II. 骨粗しょう症と治療薬

骨粗しょう症は、低骨量と骨組織の微細構造の異常を特徴とし、骨の脆弱性が増大し、骨折の危険性が増大する疾患であると WHO では定義されている。

本症は主に、原発性骨粗しょう症、糖尿病などの疾患や副腎皮質ステロイド薬などによって引き起こされる続発性骨粗しょう症、その他骨軟化症などの低骨量をきたす疾患による骨粗しょう症に大別される。これらは骨密度測定や脊椎エックス線撮影などによる骨評価に加えて、医療面接、身体診察、画像診断、血液・尿検査による骨代謝マーカーなどの測定も行い、鑑別を行う。また、骨粗しょう症を診断する際には、若年成人平均値 (young adult mean: YAM) もしくは若年成人の平均値の標準偏差 (standard deviation: SD) と骨密度の充実度を比較する。

原発性骨粗しょう症は、低骨量をきたす骨粗しょう症以外の疾患や続発性骨粗しょう症の原因を認めないことを前提に、大腿骨近位部骨折または椎体骨折がある場合、それ以外の脆弱性骨折があり、骨密度が YAM の 80%未満の場合、もしくは骨密度の値が YAM の 70%以下または-2.5SD 以下の場合に診断が下される (Fig. 1-4).

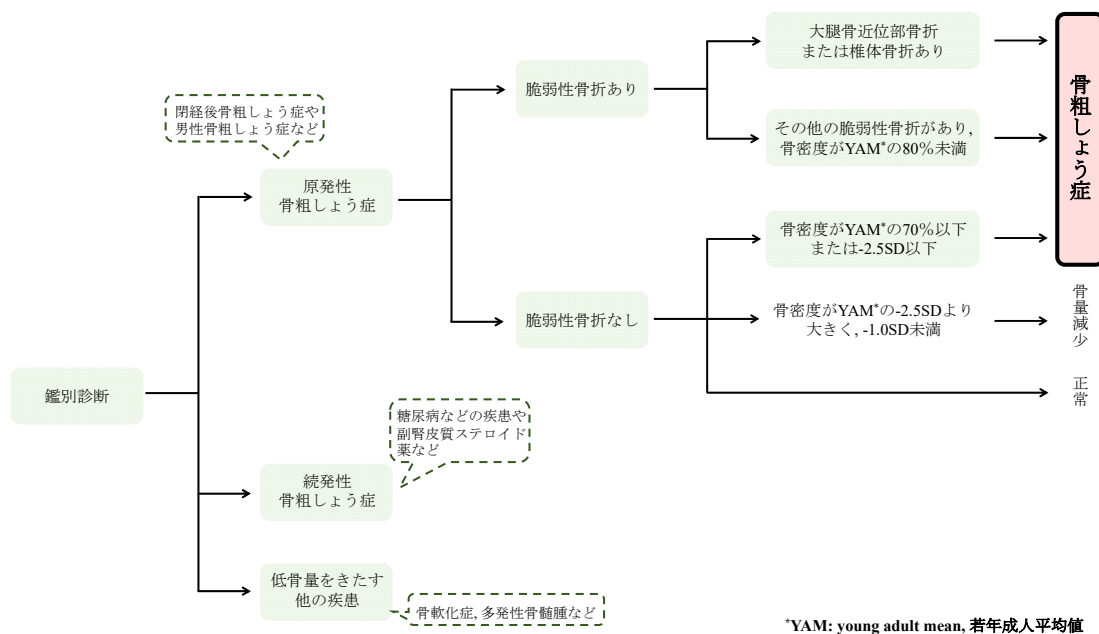


Fig. 1-4. 骨粗しょう症の診断

骨は骨芽細胞を主体とした骨形成と破骨細胞を主体とした骨吸収により、常に新陳代謝が行われており、この制御機構を骨リモデリングという(Fig. 1-5)<sup>3)</sup>。この骨リモデリングの絶妙なバランスで骨は形態を維持しているが、このバランスが崩れて骨吸収が骨形成を上回った状態が続くと骨密度の低下と骨質の低下が惹起され、骨強度が低下して骨粗しょう症の状態となる。

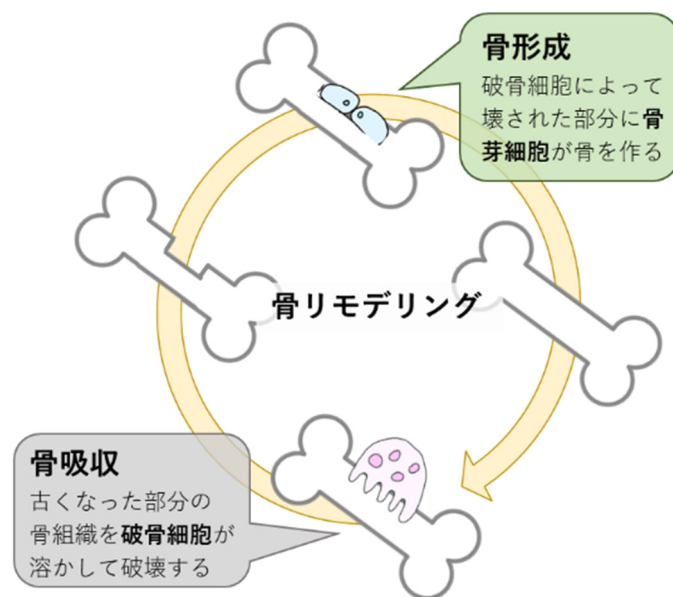


Fig. 1-5. 骨リモデリング

原発性骨粗しょう症の原因としては若年期における不十分な最大骨量, カルシウム・ビタミンD・ビタミンK不足や閉経によるエストロゲン欠乏などが挙げられる。女性は閉経により低エストロゲン状態となり、更年期障害と総称されるホットフラッシュ, 気分の落ち込み, 尿路感染症や骨量減少などの症状を抱える。そのため、女性は60代から骨粗しょう症の有病率が急激に上昇し、80代では有病率が約6割にも達する(Fig. 1-6)。

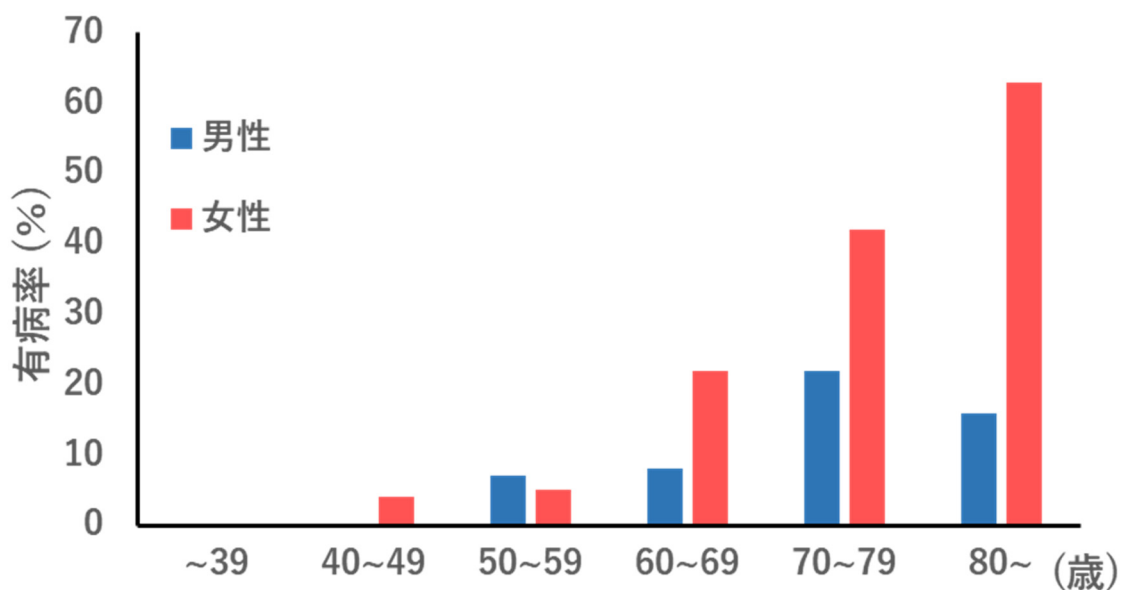


Fig. 1-6. 骨粗しょう症有病率の性・年代別分布 (大腿骨頸部のみ)<sup>4)</sup>

現在, ビスホスホネート製剤, 選択的エストロゲン受容体モジュレーター (selective estrogen receptor modulator: SERM), 活性型ビタミン D<sub>3</sub> 製剤, パラトルモン (parathyroid hormone: PTH) 製剤などが代表的な骨粗しょう症治療薬として挙げられ (Fig. 1-7), 近年, 抗 Receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand (RANKL) 抗体や抗スクレロスチン抗体といった抗体製剤も上市された. このように治療薬の種類は増えてきたものの, 破骨細胞による骨吸収を抑制する作用の医薬品が中心であり, 骨形成促進薬として分類されるのは PTH 製剤と抗スクレロスチン抗体のみである.

分類	種類
骨吸収抑制薬	ビスホスホネート製剤 選択的エストロゲン受容体モジュレーター (selective estrogen receptor modulator: SERM) エストロゲン製剤 抗Receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand (RANKL) 抗体 抗スクレロスチン抗体
骨形成促進薬	パロトルモン (parathyroid hormone: PTH) 製剤 抗スクレロスチン抗体
カルシウム補充薬	活性型ビタミンD3製剤 カルシウム製剤

Fig. 1-7. 主な骨粗しょう症治療薬

ビスホスホネート製剤, SERM や抗 RANKL 抗体といった骨吸収抑制薬は骨折リスクの増大した状態を改善する. しかし, あくまでも骨吸収による骨量や骨密度の低下を防いでいるに過ぎず, 骨質を改善しない. そのため, 骨強度を改善することができず, ビスホスホネート製剤の副作用として代表される骨吸収薬関連顎骨壊死や, 長期服用により大腿骨非定型骨折リスクの上昇などが生じる<sup>5-8)</sup>.

一方, 骨形成促進薬である抗スクレロスチン抗体はスクレロスチンが分布する箇所で作作用を発揮するため, 冠動脈壁などに異所性骨形成を誘導するという副作用が問題となっている<sup>9)</sup>. また, 使用可能期間が PTH 製剤の場合は2年, 抗スクレロスチン抗体の場合は1年であり, 長期的に使用できないという問題点もある. 加えて剤形が注射剤のみであり, 侵襲性が高く高価であることから患者の負担が大きいというデメリットも挙げられる.

閉経後骨粗しょう症に対してはエストロゲンを投与すると症状が改善することが知られているが, 長期服用では乳がんや子宮がんなどの生殖器癌の懸念がある<sup>10, 11)</sup>. そのため, 組織選択性のある SERM が注目されており, 閉経後女性が長期服用する場合には選択されることが多い. しかし, 現在, 我が国において承認されているラロキシフェンおよびバゼドキシフェンのどちらも深部静脈血栓やホットフラッシュ, 下肢痙攣といった副作用の発生率はプラセボ群より依然として高い<sup>12)</sup>.



エストロゲン受容体 (ER) には  $\alpha$ ,  $\beta$  および GPR30 などのサブタイプが存在する. SERM の組織選択性はサブタイプだけでなく, 転写共役因子の組織間での発現量などの関与が指摘されている. ER に結合した化合物の構造の違いによる複合体の立体構造変化が転写共役因子との親和性に影響して, 作用や有害事象の違いを生んでいる可能性が考えられている<sup>13-16</sup>). よって, 既存 SERM の構造に類似していない素材が新たな特性を有する可能性が期待できるため, 天然物をスクリーニング対象として用いた.

これらのような経緯から, 閉経後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, 低エストロゲン状態の改善および骨粗しょう症の予防・改善を目指し, ER の活性化および骨形成促進のデュアル作用を示す天然物の探索を行った.

### III. 骨リモデリングについて

「骨リモデリング」は骨形成と骨吸収による骨組織の形態維持の制御機構であると先述したが, 以下にその詳細について述べる.

骨リモデリングはいくつかの段階で成立している. まず, 成熟破骨細胞が骨基質に吸着し, 分泌した酸による骨基質中のカルシウムやリンなどの無機質の溶解およびタンパク質の消化を行い, 吸収窩が形成される (吸収相). 骨吸収が完了すると, その骨表面に骨芽細胞が付着して (逆転相) 骨形成が開始する (形成相). 骨芽細胞の分化に伴い, I 型コラーゲンや osteocalcin などの骨基質タンパク質が産生されることで類骨が形成され, その後数日で無機質が沈着する, すなわち石灰化が起こる<sup>17</sup>). そして, 破骨細胞によって形成された吸収窩は新生骨で埋められることとなる. このリモデリングは一周期に約 3 ヶ月かかり, 全骨格の 3-6% で常に起こっている.

骨形成を担う骨芽細胞は, 段階的に分化していく特徴を有しており, 間葉系幹細胞を起点に骨芽細胞前駆細胞 (osteoprogenitor cell), 前骨芽細胞 (preosteoblast), 骨芽細胞 (osteoblast) と順に分化し, 骨芽細胞が石灰化することで最終的に骨細胞 (osteocyte) となる (Fig. 1-8)<sup>18</sup>).

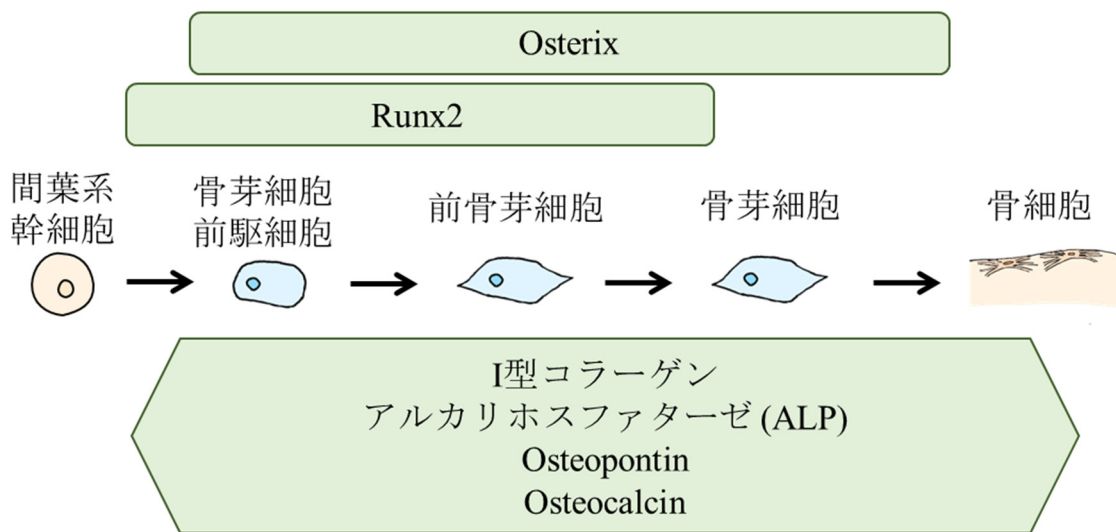


Fig. 1-8. 骨芽細胞の分化

骨芽細胞の分化には様々なホルモンや成長因子に関わるが、中でも骨芽細胞の分化に欠かせない転写因子が骨形成主要制御因子 Runt-related transcription factor 2 (Runx2) である。未分化間葉系幹細胞は Runx2 の発現により、アルカリホスファターゼ (alkaline phosphatase: ALP) のような酵素や, osteopontin, osteocalcin などの骨基質タンパク質を産生し, 成熟していく<sup>19)</sup>。このような分化の際に産生される物質は骨形成マーカーとして扱われており, 臨床では骨型 ALP (bone specific alkaline phosphatase: BAP) や osteocalcin などが用いられている。

骨形成を調節する Runx2 の転写を活性化する細胞内シグナル伝達経路の 1 つに, Bone Morphogenetic Proteins (BMP)/Smad シグナル伝達経路がある (Fig. 1-9)。骨基質タンパク質の産生に関与する BMP-2 は BMP 受容体を介して 3 つの細胞質タンパク質 Smad 1/5/8 を活性化する。活性化された Smad 1/5/8 は Smad4 と複合体を形成し, 複合体が核内に移行する。その後, 転写調節領域に存在する Smad 結合配列 (Smad Binding Element: SBE) に結合し, Runx2 の転写を調節する<sup>20)</sup>。Smad は, 特異型 Smad (R-Smad), 共有型 Smad (Co-Smad) および抑制型 Smad (I-Smad) の 3 つに分類され, Smad 1 および 5 は BMP シグナル伝達を特異的に伝達する R-Smad であり, Smad4 は R-Smad と複合体を形成してシグナル伝達に関与する Co-Smad である<sup>21)</sup>。

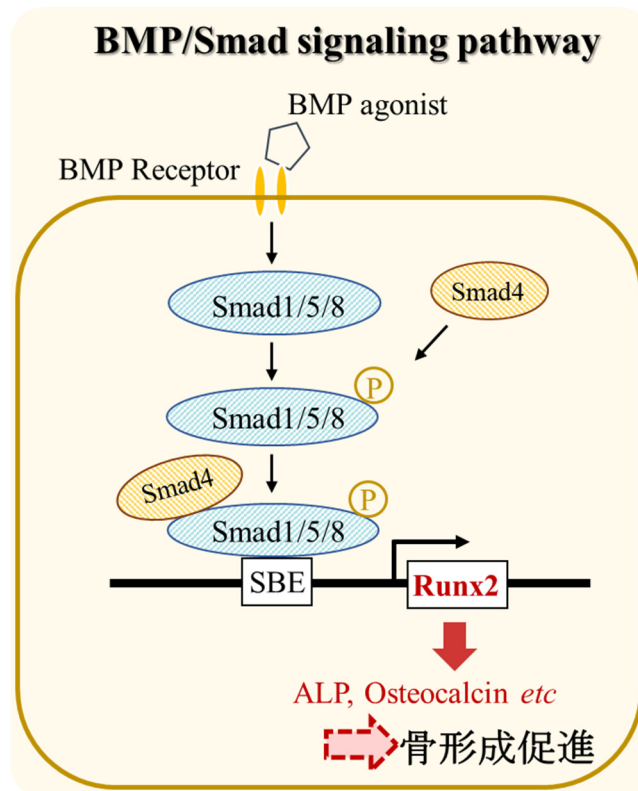


Fig. 1-9. BMP/Smad シグナル伝達経路について

一方, 骨吸収を担う破骨細胞は, 造血幹細胞から形成された顆粒球・単球系前駆細胞が RANKL により単核の破骨細胞前駆細胞に分化し, これらが融合して多核細胞である破骨細胞へと分化していく (Fig. 1-10)<sup>22</sup>. その際に産生される酒石酸耐性ホスファターゼ (tartrate-resistant acid phosphatase: TRAP) は ALP と同様に骨吸収マーカーとして扱われており, 臨床では TRAP5b として知られる.

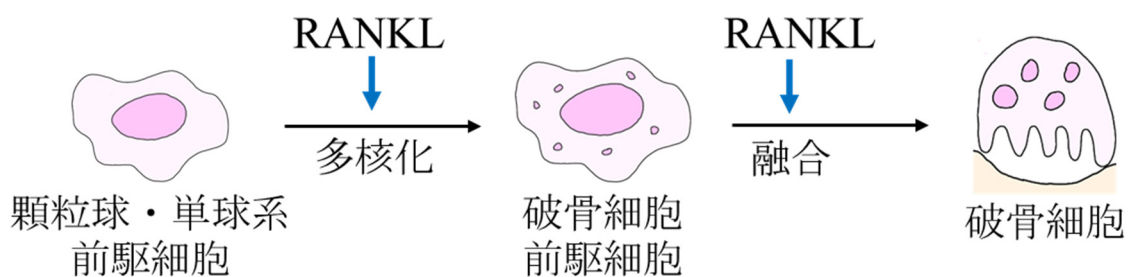


Fig. 1-10. 破骨細胞の分化

#### IV. 植物採集の現状と琉球弧

近年, 生態系の破壊に対する懸念から, 国連などにおいて生物の多様性の包括的な保全や, 生物資源の持続可能な利用を行うための国際的な枠組みについて議論が行われてきた. 1993年には生物の多様性に関する条約(生物多様性条約)が発行され, 2017年には遺伝資源の取得の機会とその利用から生ずる利益の公正かつ衡平な配分を実施するための国際文書である名古屋議定書の効力が発生した. これにより, 海外での植物採集および日本国内への持ち込みが非常に難しくなっている. そこで, 固有植物に加えて, 亜熱帯地域の一般的な植物が多く自生する琉球弧地域に着目し, 沖縄本島および奄美大島にて植物採集を行った.

琉球弧とは日本列島南西端の九州から南約 1,260 km の洋上にある 199 余の島々のことを指す (Fig. 1-11)<sup>23)</sup>. 琉球弧は海峡により大きく地域が分けられており, 九州からトカラ海峡の間を北琉球, トカラ海峡からケマン海峡の間を中琉球, ケマン海峡から与那国海峡までを南琉球という. 北琉球は大隈諸島やトカラ列島, 中琉球は奄美諸島や沖縄諸島, 南琉球は宮古諸島や八重山諸島がそれぞれ含まれる. 琉球弧の気候帯は亜熱帯と暖温帯のグラデーションになっているため, 亜熱帯系の植物群と温帯系の植物群の両方が自生しており, この地域が分布境界線となっている植物も多く確認されている. 同程度の緯度に位置する他の亜熱帯地域は雨量が少ないが, 琉球弧は夏と冬の季節風(モンスーン)による梅雨および秋雨や台風により降雨量が年平均 2000 mm を超える. そのため, 世界でも珍しい亜熱帯性降雨林が成立する地域である. このような要因により, 琉球の植物相は固有種が豊富であり, 日本本土, 台湾, 中国大陸, フィリピン, 東南アジアやオーストラリアなど様々な地域由来の植物が混ざり合った特殊な植物相を成立させている. 日本国内で比較しても琉球弧の単位面積 (10 km<sup>2</sup>) 当たりの植物数は九州以北の 45 倍と推定されるほどである<sup>24, 25)</sup>.



Fig. 1-11. 琉球弧の位置と分類

## V. *Scutellaria* 属およびアカボシタツナミソウについて

*Scutellaria* 属の植物は、日本においては約 19 種、世界においては約 360 種が存在しており<sup>26,27)</sup>、国内外で薬用に用いられている植物が含まれている。コガネバナ *S. baicalensis* の周皮を除いた根は局方生薬である黄芩<sup>おうごん</sup>として用いられ、消炎、解熱、健胃、止瀉などの効能を有する<sup>28)</sup>。漢方の処方としては小柴胡湯や黄連解毒湯に用いられている。また、セイタカナミキソウ *S. barbata* は、その乾燥した全草を中医学で半枝蓮<sup>ハンシレン</sup>として用いられており、清熱、解毒、止血などの効能があり、出血、癌腫、蛇による咬傷や打撲に利用されている<sup>29)</sup>。ブルースカルキャップ *S. lateriflora* の全草はメディカルハーブ・スカルキャップとして知られる<sup>30)</sup>。アメ

リカの先住民たちによって生理不順に用いられてきたが、現在では主に鎮静や神経強壯を期待して使用される<sup>31)</sup>。

同属のアカボシタツナミソウ *Scutellaria rubropunctata* var. *rubropunctata* (Fig. 1-13) は、奄美大島から沖縄諸島に固有の植物である。高さ約 10—100 cm の多年草で、花期の 1—5 月頃には唇形花を咲かせる。葉は対生で、卵/卵広型、短い毛を有しており、縁には鈍きよ歯がある。植物名は葉裏面の腺点が赤褐色で目立つことに由来する<sup>32)</sup>。

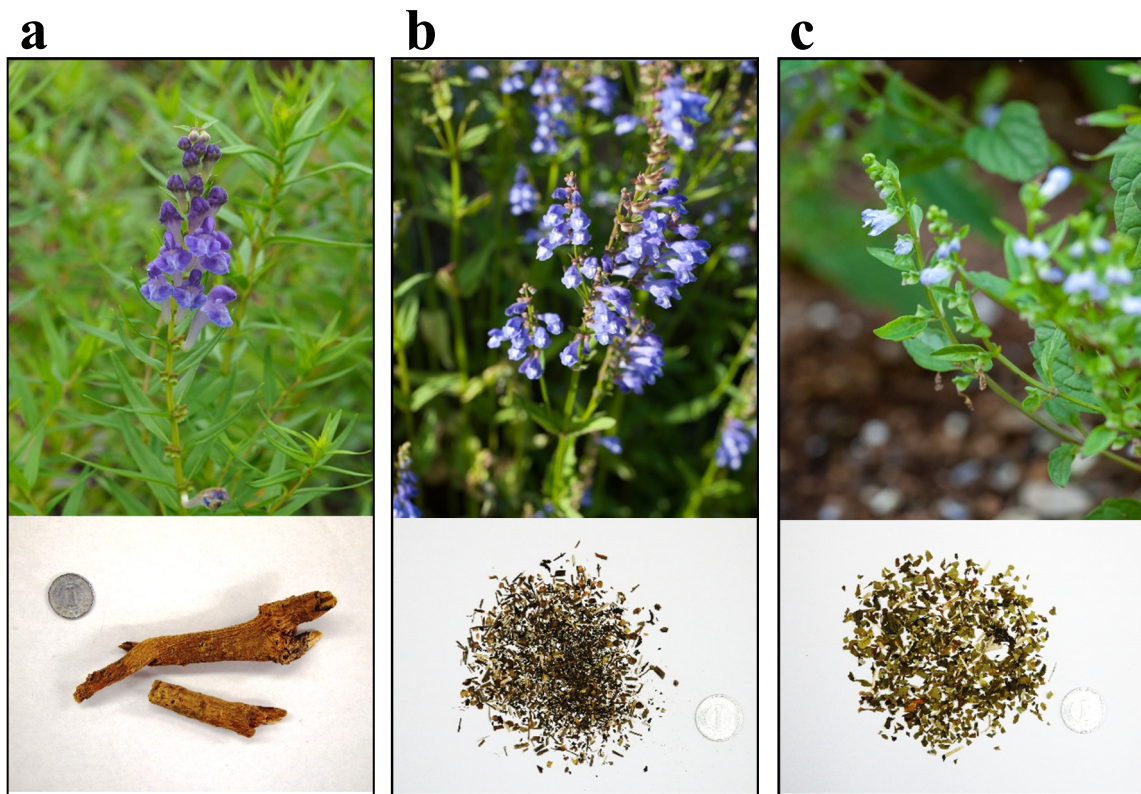


Fig. 1-12. 薬用植物として知られる *Scutellaria* 属植物の例, (a) コガネバナ *S.baicalensis* およびその周皮を除いた根; 【局】黄芩<sup>おうごん</sup>, (b) セイタカナミキソウ *S. barbata* および乾燥した全草; 半枝連<sup>はんしれん</sup>, (c) ブルースカルキャップ *S. lateriflora* および乾燥した全草; スカルキャップ



Fig. 1-13. アカボシタツナミソウ *S. rubropunctata* var. *rubropunctata*

*Scutellaria* 属の代表的な成分としては baicalin, scutellarin, skullcapflavone や viscidulin II などのフラボノイドおよびその配糖体, scutellone や scutalpin などのジテルペノイドが挙げられる. なかでも skullcapflavone (rivularin) や viscidulin II のような B 環の 2', 6' 位に置換基を有するフラボノイドが特徴的である<sup>33, 34</sup>. コガネバナ, セイタカナミキソウやブルースカルキャップについては成分や生物活性について研究がなされているが<sup>35-37</sup>, アカボシタツナミソウについてはこれまでに生物活性や成分情報に関する報告はなされていない.

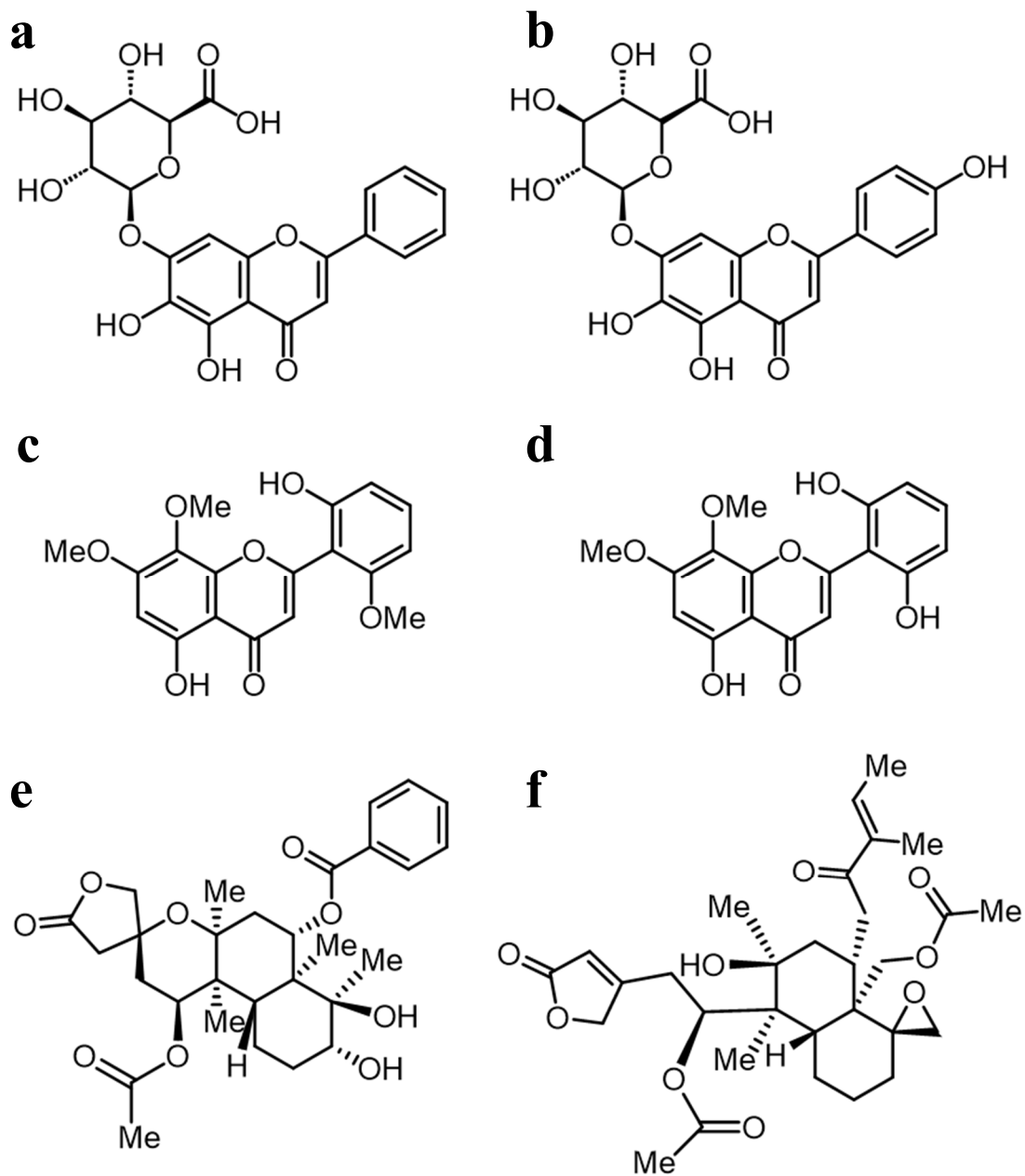


Fig. 1-14. *Scutellaria* 属の代表的な成分. (a) baicalin, (b) scutellarin, (c) skullcapflavone (rivularin), (d) viscidulin, (e) scutellone, (f) viscidulin II.

第1章では独自に構築した琉球弧植物エキスライブラリーを用いてERアゴニスト活性についてスクリーニングを行った. その結果, 活性の認められたアカボシタツナミソウの全草について骨代謝に対する影響を検討した. 第2章では第1章で活性の認められ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 ER アゴニスト活性および骨形成への影響を検討した。

## 本 論

### 第 1 章 ER アゴニスト活性および骨形成促進作用を示す琉球弧植物の探索

#### 第 1 節 琉球弧植物を用いた ER アゴニスト活性スクリーニング

まず, ER アゴニスト活性作用を有する琉球弧植物の探索を目的に独自に構築した琉球弧植物エキスライブラリーを用いて, ルシフェラーゼレポーターアッセイによるスクリーニングを行った。

奄美大島および沖縄本島で採集した 656 種類の琉球弧植物を, 可能なものは部位毎に分けて, 1531 種類の 80%メタノール (MeOH) エキスライブラリーを製作した. それぞれをジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解して 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  に調製したものをエキスライブラリーとして実験に用い, ポジティブコントロールには 1 nM 17 $\beta$ -エストラジオールを使用した. スクリーニングの結果, アカボシタツナミソウの全草に最も強い活性が認められた (Fig. 2-1).

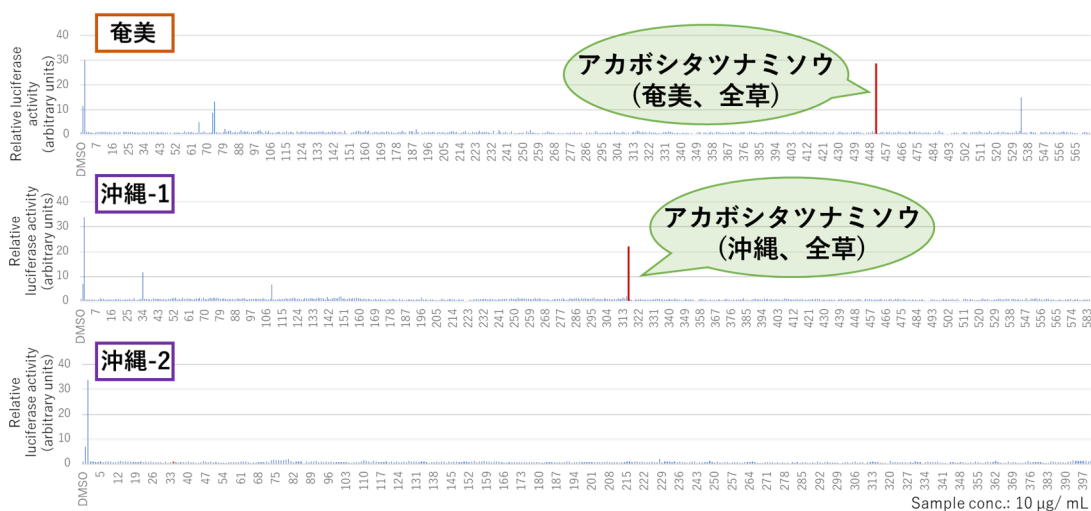


Fig. 2-1. 琉球弧植物エキスライブラリーの ER アゴニスト活性. 琉球弧植物 80%MeOH エキスのアゴニスト活性について HEK293 細胞を用いたルシフェラーゼレポーターアッセイにより検討した. DMSO のみ添加したコントロール (cont.) を 1 とした。

## 第2節 アカボシタツナミソウの ER アゴニスト活性に関する評価

### 第1項 ER アゴニスト活性の確認

ER アゴニスト活性スクリーニングにより活性の認められたエキスのうち,最も活性の強かったアカボシタツナミソウ全草の 80%MeOH エキス (SRE) について,再現性を確認するため,1—10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の濃度で検討した. その結果, SRE の 3 および 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の濃度において,コントロールと比較して 9.2 倍および 33.1 倍有意な ER アゴニスト活性が認められた (Fig. 2-2).

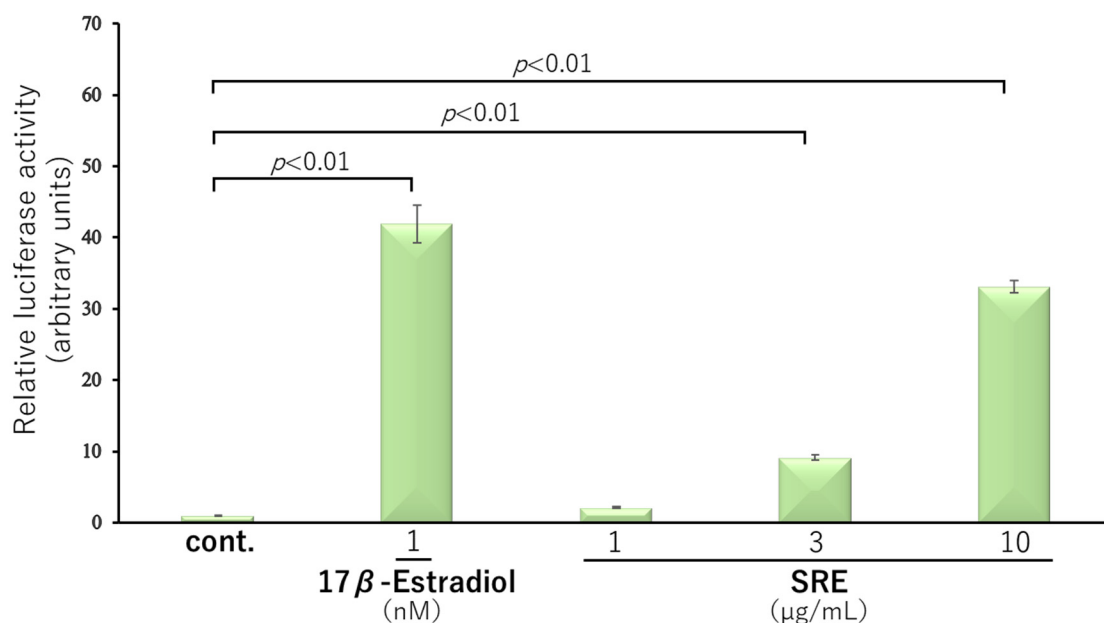


Fig. 2-2. SRE の ER アゴニスト活性. HEK293 細胞を用いたルシフェラーゼレポーターアッセイにより検討した. DMSO のみ添加したコントロール (cont.) を 1 とした. データは 3 回の独立した実験の平均の標準誤差 (SE) で表した ( $n=3$ ). 統計解析による比較は JMP 14 (SAS Institute, Cary, NC, USA) を用いた Dunnett の多重比較検定による一元配置分散分析 (ANOVA) を行うことにより有意差を表示した.  $p$  値は,  $p < 0.05$  および  $p < 0.01$  に設定した.

ルシフェラーゼレポーターアッセイでは、ルシフェラーゼとサンプルが相互作用を起こすなどして偽陽性を示すことがある。そのため、ER アンタゴニストである ICI182,780 (10 nM) をポジティブコントロールおよびサンプルに加え、レポーターアッセイでの SRE の活性が ER を介していることの確認を行った。その結果、1—10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の濃度のうち、最も活性の高かった 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の濃度の活性値は 2.3 倍に減少した。SRE の ER アゴニスト活性は ICI182,780 によって阻害されたことから、SRE の ER アゴニスト活性が確認された (Fig. 2-3)。

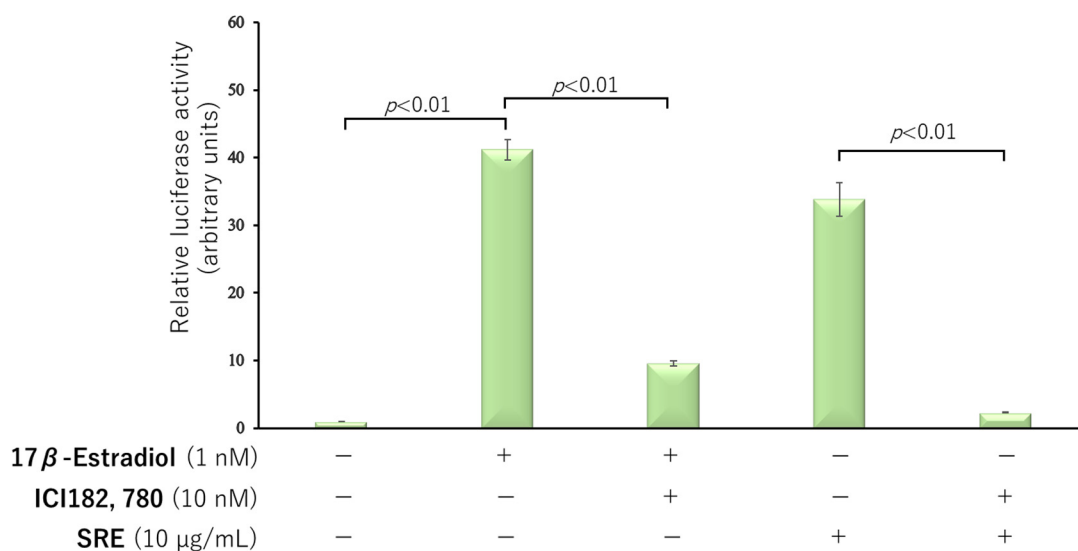


Fig. 2-3. ER アンタゴニスト ICI182,780 の SRE の ER アゴニスト活性に与える影響. HEK293 細胞を用いたルシフェラーゼレポーターアッセイにより検討した. DMSO のみ添加したコントロール (cont.) をとした. データは 3 回の独立した実験の平均の SE で表した (n=3). 統計解析による比較は JMP 14 を用いた Dunnett の多重比較検定による ANOVA を行うことにより有意差を表示した.  $p$  値は,  $p < 0.05$  および  $p < 0.01$  に設定した.

## 第2項 ヒト乳がん細胞増殖作用評価

ERの活性化は、乳がんなどのホルモン感受性がんを増殖させる危険性があることが知られている。そこで、ヒト乳がん細胞 MCF7 を用いて MTT 試験により、SRE の乳がん細胞の増殖への影響を評価した。検討の結果、ポジティブコントロールである 17 $\beta$ -エストラジオールでは増殖が認められたが、SRE は 0.1–30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の濃度において増殖作用は認められなかった (Fig. 2-4)。よって、SRE の ER 活性化はヒト乳がん細胞の増殖を伴わないことが明らかとなった。

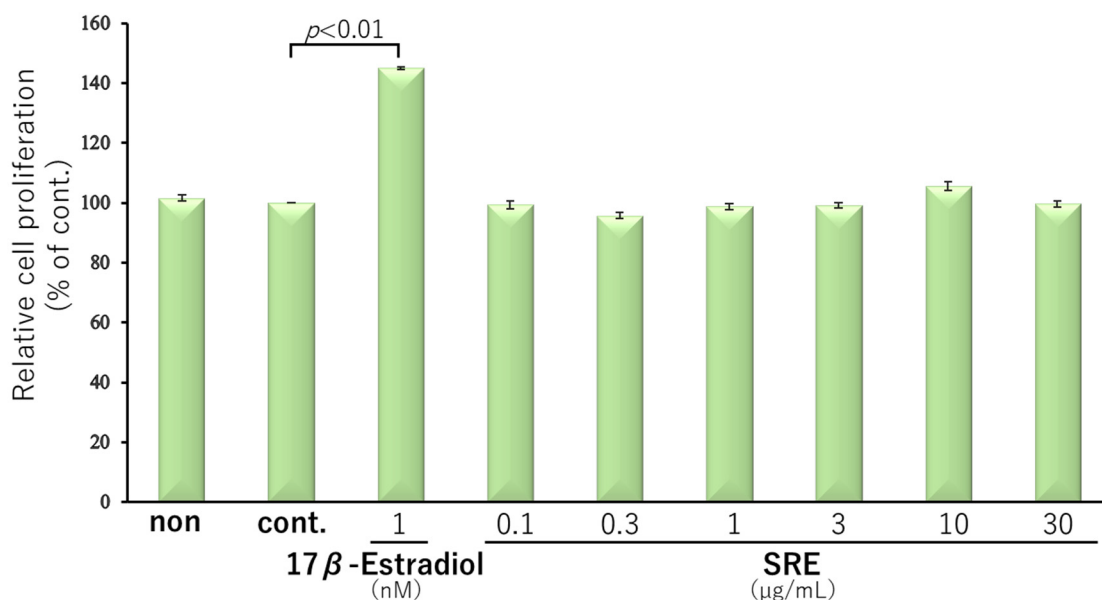


Fig. 2-4. SRE のヒト乳がん細胞 MCF7 の細胞増殖に対する影響. MTT 試験法により検討した。何も添加していないものを non とし、DMSO のみ添加したコントロール (cont.) を 100%とした。データは 3 回の独立した実験の平均の SE で表した (n=3)。統計解析による比較は JMP 14 を用いた Dunnett の多重比較検定による ANOVA を行うことにより有意差を表示した。p 値は、 $p < 0.05$  および  $p < 0.01$  に設定した。

## 第2節 アカボシタツナミソウの骨形成への影響に関する評価

骨リモデリングのうち、骨形成を担う骨芽細胞に対する SRE の影響について検討した。骨芽細胞の分化の初期における SRE の分化への影響について、ALP 活性試験、分化の後期における影響は石灰化染色試験で評価し、分化の初期および後期における骨形成誘導遺伝子、骨形成マーカーおよび Smad の発現に対する影響を検討するために遺伝子解析を行った。

### 第1項 SRE の骨芽細胞の分化初期への影響

骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 を用いて 72 時間培養した際の SRE (0.1—1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) の ALP 活性への影響について検討を行った。MC3T3-E1 細胞の分化は、分化誘導剤としてアスコルビン酸、ヒドロコルチゾン、 $\beta$ -グリセロリン酸により誘導した。ポジティブコントロールには BMP-2 (6.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) を用いた。濃度は Hiraki らの報告<sup>38)</sup>や試薬販売会社のデータをもとに設定した。その結果、ALP 活性は SRE の 0.3 および 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の濃度において、コントロールと比較して 131.5% および 149.3% 有意に促進された (Fig. 3-1a)。また、定量的 Real-time PCR 法を用いて ALP の遺伝子情報をコードする *Alpl* の mRNA 発現量を測定したところ、SRE の 0.1—1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の濃度において濃度依存的に増加していた (0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ : 1.6, 0.3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ : 2.3, 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ : 2.8,  $p < 0.01$ , Fig. 3-1b)。よって、SRE は骨芽細胞の ALP 活性の増加作用を有すると考えられた。

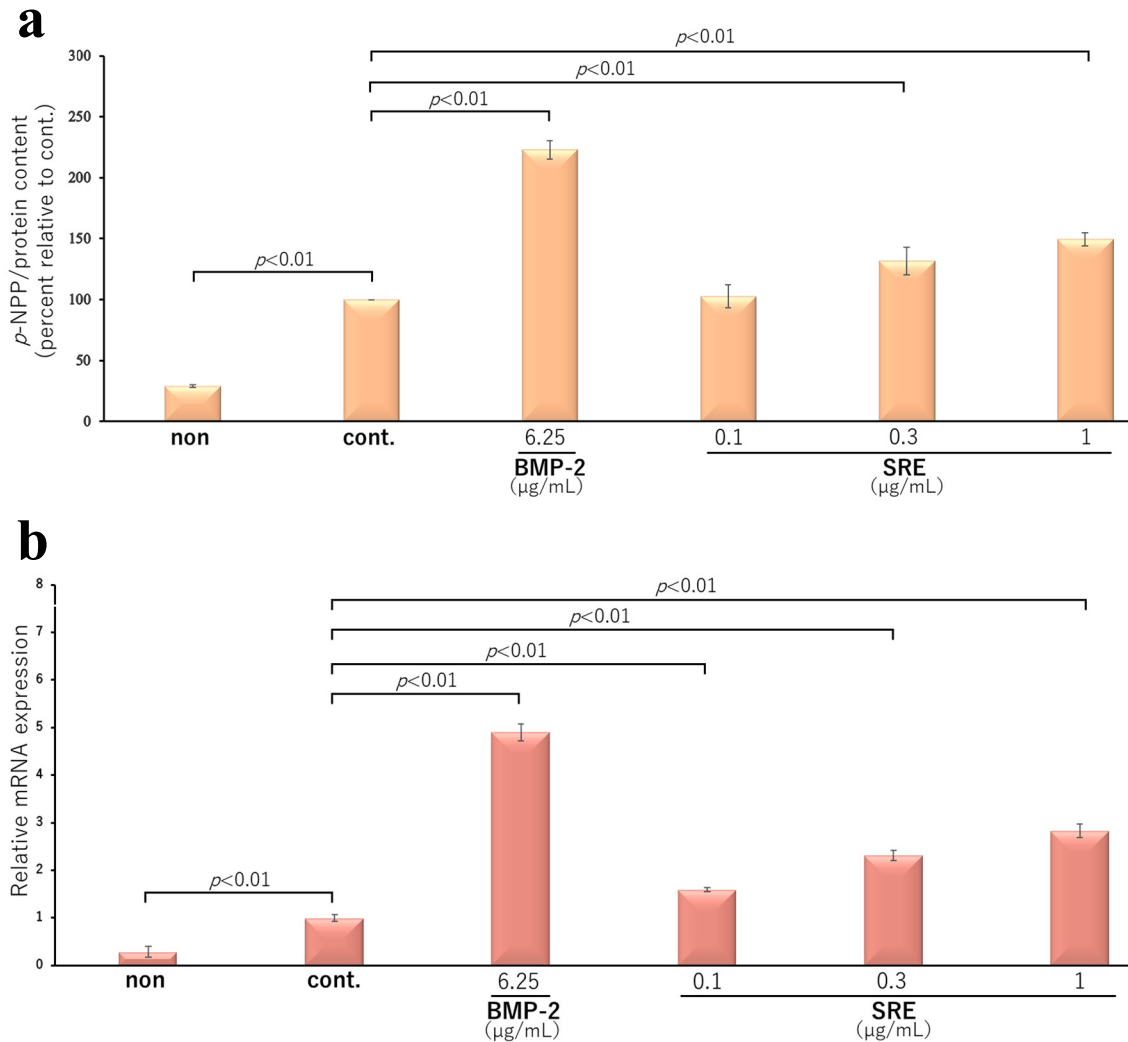


Fig. 3-1. SRE の MC3T3-E1 細胞における 72 時間培養時の (a) ALP 活性に対する影響および (b) *Alpl* の mRNA 発現量への影響. 分化誘導剤を添加せずに DMSO のみを添加したものを non とし, 誘導剤および DMSO のみ添加したコントロール (cont.) を 100%とした. データは 3 回の独立した実験の平均の SE で表した (n=3). 統計解析による比較は JMP 14 を用いた Dunnett の多重比較検定による ANOVA を行うことにより有意差を表示した.  $p$  値は,  $p < 0.05$  および  $p < 0.01$  に設定した.

次に、短期培養時における SRE の骨形成誘導遺伝子および骨形成マーカーへの影響について、定量的 Real-time PCR 法を用いて遺伝子解析を行った。

Runx2 や osterix は骨芽細胞の分化を調節している骨形成誘導遺伝子であり、osteopontin や osteocalcin はこれらの転写因子が活性化することによって産生される骨形成マーカーである。

ALP 活性試験と同様に MC3T3-E1 細胞を分化誘導し、SRE (0.1—1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) を添加して 72 時間培養した際の total RNA を用いて検討を行った。また、ポジティブコントロールには BMP-2 (6.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) を用いた。その結果、SRE は骨形成主要制御因子である Runx2 の mRNA 発現量をコントロールと比較して、0.3 および 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の濃度において 3.5 倍および 7.2 倍増加させ (Fig. 3-2a), その下流に存在する osterix の mRNA 発現量も 0.1 および 0.3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の濃度において 1.4 倍および 1.5 倍増加させた (Fig. 3-2b)。加えて、SRE は 0.1, 0.3 および 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の濃度において、osteopontin の mRNA 発現量を 1.7 倍, 1.6 倍および 1.9 倍増加させ (Fig. 3-2c), osteocalcin の mRNA 発現量も 0.1, 0.3 および 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の濃度において 1.5 倍, 1.8 倍および 2.4 倍と濃度依存的に増加させた (Fig. 3-2d)。よって、SRE は骨芽細胞の分化誘導遺伝子である Runx2 や osterix および骨形成マーカーの osteopontin や osteocalcin を誘導する可能性があると考えられる。

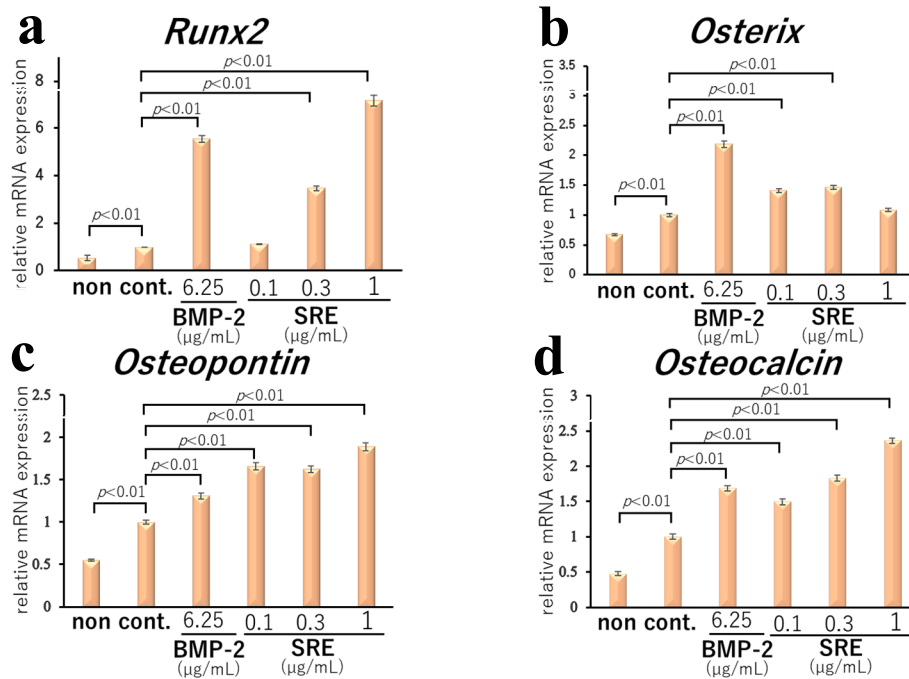


Fig. 3-2. SRE の MC3T3-E1 細胞における 72 時間培養時の (a) *Runx2*, (b) *osterix*, (c) *osteopontin*, (d) *osteocalcin* の mRNA 発現量に対する影響. 定量的 Real-time PCR により測定し, 標準化には  $\beta$ -actin を用いた. 誘導剤を添加せずに DMSO のみを添加したものを non とし, 分化誘導剤および DMSO のみ添加したコントロール (cont.) を 1 とした. データは 3 回の独立した実験の平均の SE で表した (n=3). 統計解析による比較は JMP 14 を用いた Dunnett の多重比較検定による ANOVA を行うことにより有意差を表示した.  $p$  値は,  $p < 0.05$  および  $p < 0.01$  に設定した.



加えて、Runx2 を誘導する経路として知られている BMP/Smad シグナル伝達経路への SRE の影響についても定量的 Real-time PCR 法を用いて遺伝子解析を行った。その結果、SRE は 0.3 および 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の濃度において、コントロールと比較して *Smad1* の mRNA 発現量を 1.3 倍および 1.4 倍増加させた (Fig. 3-3a)。 *Smad4* の mRNA 発現量は 0.1, 0.3 および 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の濃度においてコントロールと比較して 1.5 倍, 1.7 倍および 3.3 倍と濃度依存的に増加した (Fig. 3-3b)。 また、 *Smad5* の mRNA 発現量も 0.3 および 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の濃度においてコントロールと比較して 1.3 倍および 2.7 倍に増加させた (Fig. 3-3c)。 よって、SRE は *Smad1*, *Smad4* および *Smad5* を誘導している可能性が示唆された。

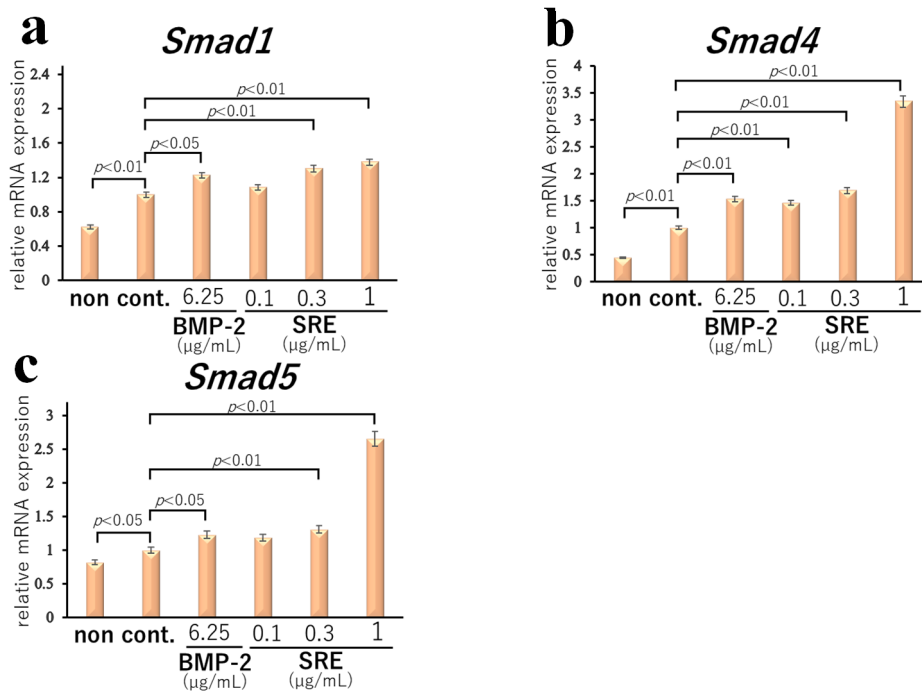


Fig. 3-3. SRE の MC3T3-E1 細胞における 72 時間培養時の (a) *Smad1*, (b) *Smad4*, (c) *Smad5* の mRNA 発現量に対する影響。定量的 Real-time PCR により測定し、標準化には  $\beta$ -actin を用いた。分化誘導剤を添加せずに DMSO のみを添加したものを non とし、誘導剤および DMSO のみ添加したコントロール (cont.) を 1 とした。データは 3 回の独立した実験の平均の SE で表した (n=3)。統計解析による比較は JMP 14 を用いた Dunnett の多重比較検定による ANOVA を行うことにより有意差を表示した。P 値は、 $p < 0.05$  および  $p < 0.01$  に設定した。

## 第2項 SREの骨芽細胞の分化後期への影響

骨芽細胞は分化が進むにつれて石灰化が進行することから、石灰化の程度は骨芽細胞の分化の後期において分化の指標となる。そこで、SREの石灰化への影響を検討するため、14日間および21日間の長期培養を行い、石灰化結節中のリン酸カルシウムをアリザリンレッドにより染色した。染色状態を撮影後、5%ギ酸を用いてリン酸カルシウムに結合した色素を溶出し、その上清の415 nmにおける吸光度を測定することにより定量を行った。骨芽細胞様細胞MC3T3-E1をアスコルビン酸、ヒドロコルチゾン、 $\beta$ -グリセロリン酸により骨芽細胞へ分化誘導すると同時に、ポジティブコントロールであるBMP-2 (6.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) およびSRE (0.1—1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) を添加した。3—4日毎に分化培地の交換および試料の添加を行い、14日間もしくは21日間培養した。SREはコントロールと比較して、14日間の培養の際は1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度において132.2%、21日間の培養時は0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度において126.5%、有意に染色された (Fig. 3-4)。よって、ALP活性試験と同様の0.1—1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度では、14日目では、1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度においてのみ、21日目になると0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度においてのみ、SREは石灰化を促進する可能性が考えられる。

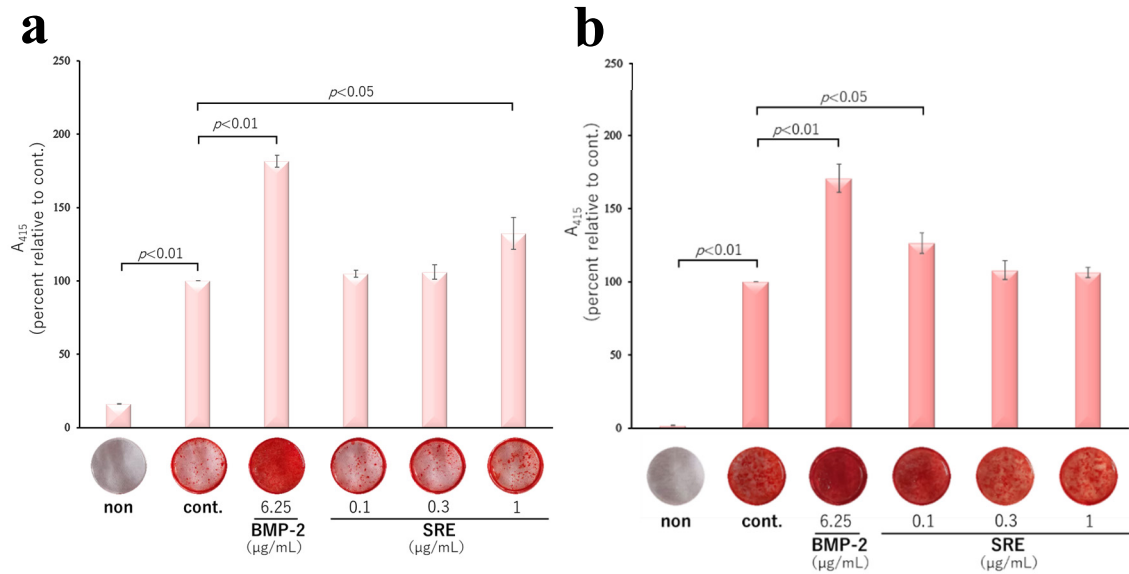


Fig. 3-4. SRE の MC3T3-E1 細胞における (a) 14 日間, (b) 21 日間培養時の石灰化への影響. 誘導剤を添加せずに DMSO のみを添加したものを non とし, 分化誘導剤および DMSO のみ添加したコントロール (cont.) を 100% とした. データは 3 回の独立した実験の平均の SE で表した (n=3). 統計解析による比較は JMP 14 を用いた Dunnett の多重比較検定による ANOVA を行うことにより有意差を表示した.  $p$  値は,  $p < 0.05$  および  $p < 0.01$  に設定した.

次に, SRE の長期培養時における骨形成誘導遺伝子および骨形成マーカーへの影響について, 定量的 Real-time PCR 法を用いて遺伝子解析を行った.

SRE は *Runx2* の mRNA の発現量を 0.3 および 1  $\mu\text{g/mL}$  の濃度において, コントロールと比較して 1.3 倍および 1.2 倍増加させ (Fig. 3-5a), *osterix* の mRNA 発現量を 0.1  $\mu\text{g/mL}$  の濃度において 1.8 倍増加させた (Fig. 3-5b). 加えて, SRE は *osteopontin* の mRNA 発現量を 1  $\mu\text{g/mL}$  の濃度において 1.3 倍増加させたが (Fig. 3-5c), *osteocalcin* の mRNA 発現量には変化を与えなかった (Fig. 3-5d). よって, SRE は骨芽細胞分化の後期段階において, *Runx2*, *osterix* や *osteopontin* を誘導するが, *osteocalcin* には影響しない可能性があると考えられる.

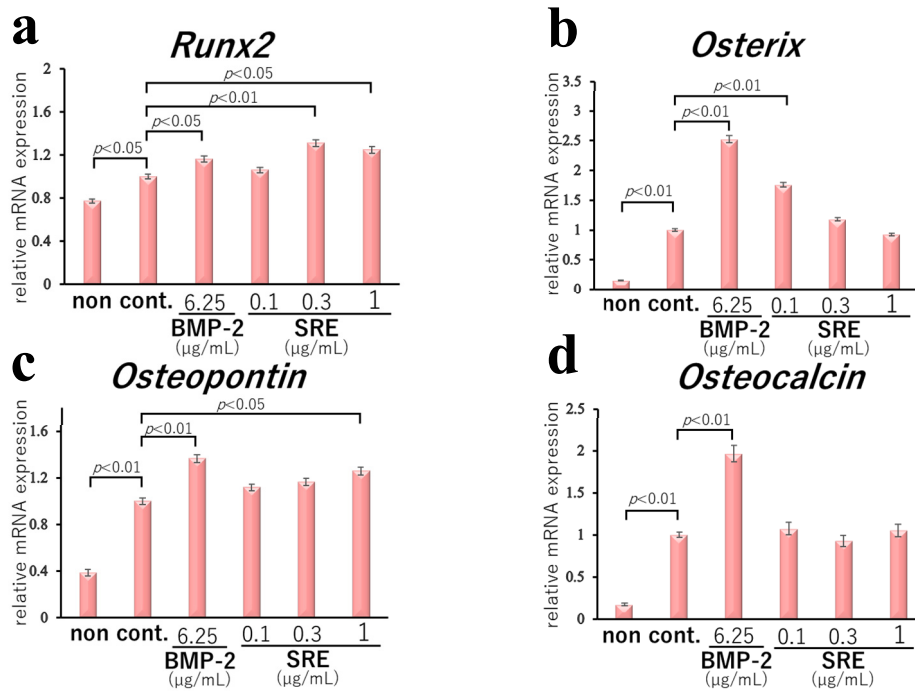


Fig. 3-5. SRE の MC3T3-E1 細胞における 21 日間培養時の (a) *Runx2*, (b) *osterix*, (c) *osteopontin*, (d) *osteocalcin* の mRNA 発現量に対する影響. 定量的 Real-time PCR により測定し, 標準化には  $\beta$ -actin を用いた. 誘導剤を添加せずに DMSO のみを添加したものを non とし, 分化誘導剤および DMSO のみ添加したコントロール (cont.) を 1 とした. データは 3 回の独立した実験の平均の SE で表した ( $n=3$ ). 統計解析による比較は JMP 14 を用いた Dunnett の多重比較検定による ANOVA を行うことにより有意差を表示した.  $p$  値は,  $p < 0.05$  および  $p < 0.01$  に設定した.

また, 長期培養時における SRE の Smad への影響についても定量的 Real-time PCR 法を用いて遺伝子解析を行った. その結果, SRE は 0.3 および 1  $\mu\text{g/mL}$  の濃度において, コントロールと比較して *Smad1* の mRNA 発現量を 1.6 倍および 2.1 倍増加させた (Fig. 3-6a). *Smad4* の mRNA 発現量は 0.1, 0.3 および 1  $\mu\text{g/mL}$  の濃度においてコントロールと比較して 4.4 倍, 2.7 倍および 2.0 倍増加した (Fig. 3-6b). また, *Smad5* の mRNA 発現量も 0.1, 0.3 および 1  $\mu\text{g/mL}$  の濃度においてコントロールと比較して 1.5 倍, 1.3 倍および 1.4 倍に増加させた (Fig. 3-7c). よって, SRE は分化の後期においても *Smad1*, *Smad4* および *Smad5* を誘導している可能性が示唆された.

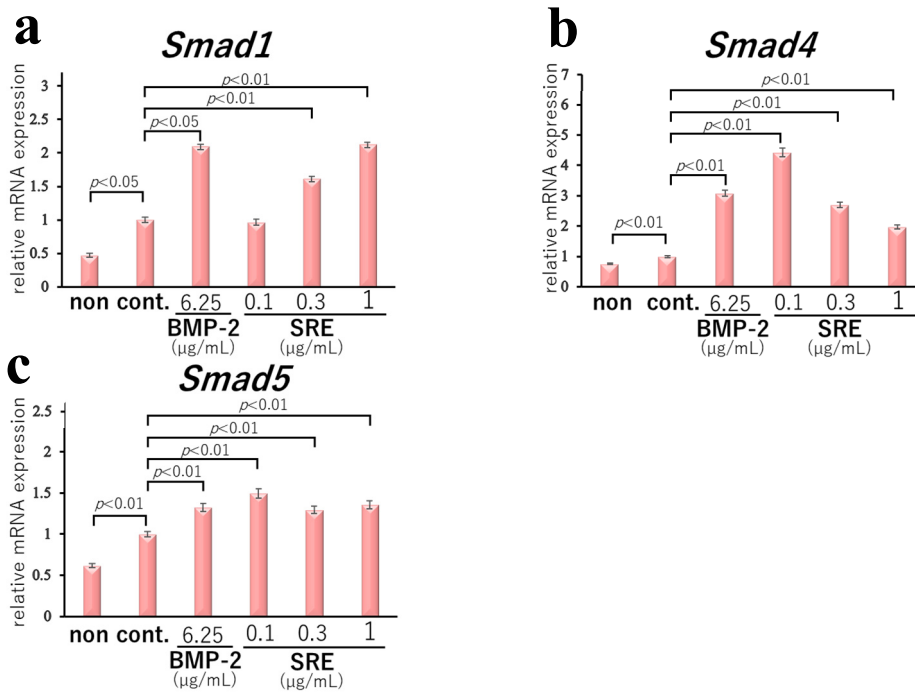


Fig. 3-6. SRE の MC3T3-E1 細胞における 21 日間培養時の (a) *Runx2*, (b) *osterix*, (c) *osteopontin*, (d) *osteocalcin* の mRNA 発現量に対する影響. 定量的 Real-time PCR により測定し, 標準化には  $\beta$ -actin を用いた. 誘導剤を添加せずに DMSO のみを添加したものを non とし, 分化誘導剤および DMSO のみ添加したコントロール (cont.) を 1 とした. データは 3 回の独立した実験の平均の SE で表した ( $n=3$ ). 統計解析による比較は JMP 14 を用いた Dunnett の多重比較検定による ANOVA を行うことにより有意差を表示した.  $p$  値は,  $p < 0.05$  および  $p < 0.01$  に設定した.

### 第3節 アカボシタツナミソウの骨吸収への影響に関する評価

SRE の骨吸収に対する影響を評価するため、破骨細胞様細胞を用いて TRAP 活性試験を行った。RAW264.7 細胞を sRANKL で破骨細胞様細胞に分化させ、SRE (0.1—1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) を添加して 5 日間培養した。TRAP 活性は SRE の 10 および 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の濃度でコントロールに対して 82.4% (抑制率 17.6%,  $p<0.05$ ) および 51.6% (抑制率 48.4%,  $p<0.01$ ) と有意に抑制された (Fig. 4-1)。しかし、30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の濃度の細胞生存率は 51.6% ( $p>0.01$ ) だったことから低下したことから、SRE の破骨細胞分化抑制作用はこれらの濃度では細胞毒性によるものである可能性が示唆された。

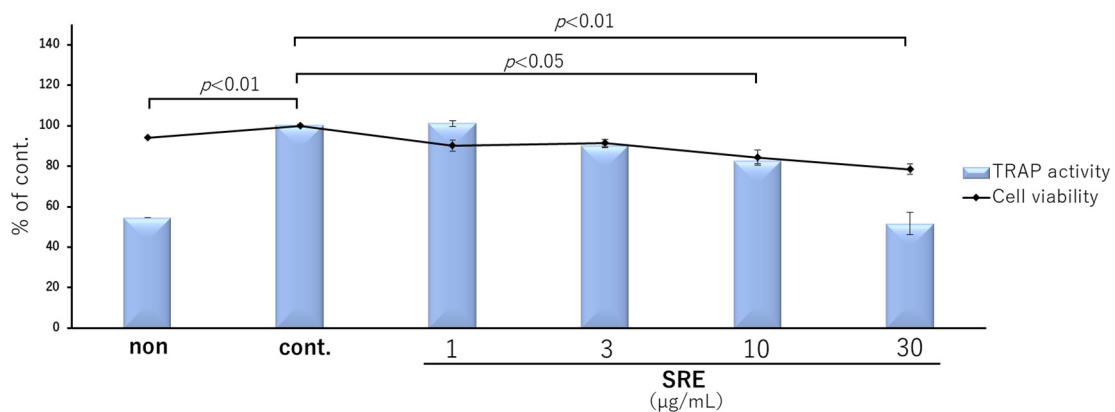


Fig. 4-1. SRE の破骨細胞様細胞に対する TRAP 活性および細胞生存率への影響。sRANKL を添加せずに DMSO のみを添加したものを non とし、sRANKL および DMSO のみ添加したコントロール (cont.) を 100% とした。データは 3 回の独立した実験の平均の SE で表した (n=3)。統計解析による比較は JMP 14 を用いた Dunnett の多重比較検定による ANOVA を行うことにより有意差を表示した。p 値は、 $p<0.05$  および  $p<0.01$  に設定した。

## 第4節 小括

低エストロゲン状態の改善および骨粗しょう症の予防・改善を目指し、ERの活性化および骨形成促進のデュアル作用を示す天然物の探索を行った。

独自に構築した琉球弧植物エキスライブラリー1531種類のERアゴニスト活性についてルシフェラーゼレポーターアッセイによりスクリーニングを行ったところ、SREに3および10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度において、コントロールと比較して9.2倍および33.1倍の活性が認められた。ERの活性化はホルモン感受性がんを増殖させる危険性があることが知られているため<sup>10, 11</sup>、SREの乳がん細胞の増殖率への影響についてヒト乳がん細胞MCF7細胞を用いたMTT試験により評価した。その結果、SREはMCF7細胞を増殖させなかったことから、SREのER活性化は乳がん細胞の増殖を伴わないことが明らかとなった。

次に、SREの骨形成への影響を検討するため、骨芽細胞様細胞MC3T3-E1を用いてALP活性試験、石灰化染色試験や定量的Real-time PCR法による遺伝子解析を行った。骨芽細胞は段階的に分化していく特徴を有しており、骨基質の産生や石灰化を進める分化初期と石灰化結節を形成し成熟骨芽細胞となっていく分化後期に大きく分けられる。SREの分化の初期における影響はALP活性試験、分化の後期における影響は石灰化染色試験で評価し、それぞれの骨形成誘導遺伝子である*Runx2*および*osterix*、骨形成マーカーである*osteopontin*および*osteocalcin*や*Smad*の発現に対する影響を検討した。

ALP活性試験では、SREは0.3および1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度において、コントロールと比較してALP活性を131.5%および149.3%有意に増加させた。加えて、*Alpl*のmRNA発現量もコントロールと比較して、0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ で1.6倍、0.3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ で2.3倍、1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ で2.8倍と濃度依存的に増加させた。さらに、短期培養時の遺伝子解析では、*Runx2*のmRNA発現量を、0.3および1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度において3.51倍および7.2倍、*osterix*のmRNA発現量は0.1および0.3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度において1.4倍および1.5倍、*osteopontin*のmRNA発現量を1.7倍、1.6倍および1.9倍、*osteocalcin*のmRNA発現量も0.1、0.3および1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度において1.5倍、1.8倍および2.4倍増加させた。以上のことから、SREは*Runx2*等の骨形成誘導遺伝子や*osteocalcin*などの骨形成マーカーを誘導し、骨芽細胞の分化初期において

分化を誘導する可能性が示唆された。また、*Runx2* や *osterix* の転写を活性化させる細胞内シグナルの1つである、BMP/Smadシグナル伝達経路に対するSREの影響について定量的Real-time PCR法を用いて検討を行った。その結果、コントロールと比較して*Smad1*のmRNA発現量を、0.3および1 μg/mLの濃度において1.3倍および1.4倍、*Smad4*のmRNA発現量は0.1, 0.3および1 μg/mLの濃度において1.5倍, 1.7倍および3.3倍、*Smad5*のmRNA発現量は0.3および1 μg/mLの濃度において1.3倍および2.7倍増加させた。このことから、SREの骨芽細胞の分化初期における分化の誘導はBMP/Smadシグナル伝達経路を介している可能性が考えられる。

次に、石灰化染色による試験では、14日間および21日間培養した骨芽細胞様細胞の石灰化結節をアリザリンレッドにより染色した。その結果、SREはコントロールと比較して、14日間の培養の際は1 μg/mLの濃度において132.2%、21日間の培養時は0.1 μg/mLの濃度において126.5%、有意に染色された。骨芽細胞様細胞MC3T3-E1は分化誘導剤による14日間程度の培養で石灰化結節が形成され始め、21日間程度経過するとマトリックスが成熟する<sup>39)</sup>。よって、ALP活性試験と同様の0.1—1 μg/mLの濃度では、14日目では、1 μg/mLの濃度においてのみ石灰化結節の形成が促進されており、21日目になると0.1 μg/mLの濃度においてのみ、マトリックスの成熟が促進している可能性が考えられる。加えて、21日間培養した際の遺伝子解析では、コントロールと比較して*Runx2*のmRNAの発現量を0.3および1 μg/mLの濃度において、1.3倍および1.2倍、*osterix*のmRNA発現量を0.1 μg/mLの濃度において1.8倍、*osteopontin*のmRNA発現量を1 μg/mLの濃度において1.3倍増加させた。また、コントロールと比較して*Smad1*のmRNA発現量を0.3および1 μg/mLの濃度において、1.6倍および2.1倍、*Smad4*のmRNA発現量は0.1, 0.3および1 μg/mLの濃度において4.4倍, 2.7倍および2.0倍、*Smad5*のmRNA発現量も0.1, 0.3および1 μg/mLの濃度において1.5倍, 1.3倍および1.4倍に増加させた。しかし、骨基質タンパク質の産生に關与する*osteocalcin*のmRNA発現量には変化を与えなかった。

以上のことから、SREは骨芽細胞の分化後期においては、一部の濃度で石灰化を促進するが、骨基質タンパク質の産生には影響を与えない可能性が示唆された。この要因の1つに、SREが分化後期の*Runx2*発現量を増加させていることが



挙げられる。Runx2は、骨芽細胞の分化の初期および後期で役割が変化するという特徴を有しており、未成熟な骨芽細胞に対しては分化を誘導する方に作用するが、骨芽細胞が成熟してくると抑制方向に働く。Runx2がこのような特性を示すことで、生体内では骨の過形成を防ぐと考えられている<sup>40)</sup>。

さらに、SREの破骨細胞への影響について評価するために、RAW264.7細胞をsRANKLで破骨細胞様細胞に誘導してTRAP活性試験により検討を行った。その結果、SREはコントロールと比較して、10および30 µg/mLの濃度で82.4% (抑制率17.6%)、51.6% (抑制率48.4%) TRAP活性を抑制したが、同時に30 µg/mLの濃度の細胞生存率は51.6%であった。よって、SREの破骨細胞分化抑制作用は細胞毒性によるものである可能性が示唆された。

以上の結果より、SREは破骨細胞の分化には影響を与えず、骨芽細胞分化初期においてBMP/Smadシグナル伝達経路を介して分化を促進させると考えられた。

## 第 2 章 アカボシタツナミソウの成分探索および ER アゴニスト活性・骨形成促進作用の評価

第 1 章で ER 活性化および骨形成促進のデュアル作用を有することが明らかとなった琉球弧植物アカボシタツナミソウ *S. rubropunctata* var. *rubropunctata* にはこれまで成分情報に関する報告がなかった。そこで、成分探索を行い、単離された化合物について ER 活性および骨形成への影響について検討した。

### 第 1 節 アカボシタツナミソウの成分探索

アカボシタツナミソウ 全草 300 g を 80%MeOH で抽出し、81.2 g の 80%MeOH エキスを得た。得られたエキスを水に懸濁し、*n*-hexane, chloroform (CHCl<sub>3</sub>), ethyl acetate (EtOAc) および *n*-butanol (*n*-BuOH) で順次分配抽出を行った。各画分のうち、CHCl<sub>3</sub> 可溶画分に ER アゴニスト活性 (活性値: 25.4) および ALP 活性化作用 (活性値: 123.6%) が認められた。そこで、CHCl<sub>3</sub> 可溶画分を順相および逆相カラムクロマトグラフィーにより分離し、HPLC を用いて精製することで新規化合物 2 種 (**1** および **2**) および既知化合物 8 種 (**3—10**) を含む 10 種のメトキシフラボンを得た (Fig. 5-1)。

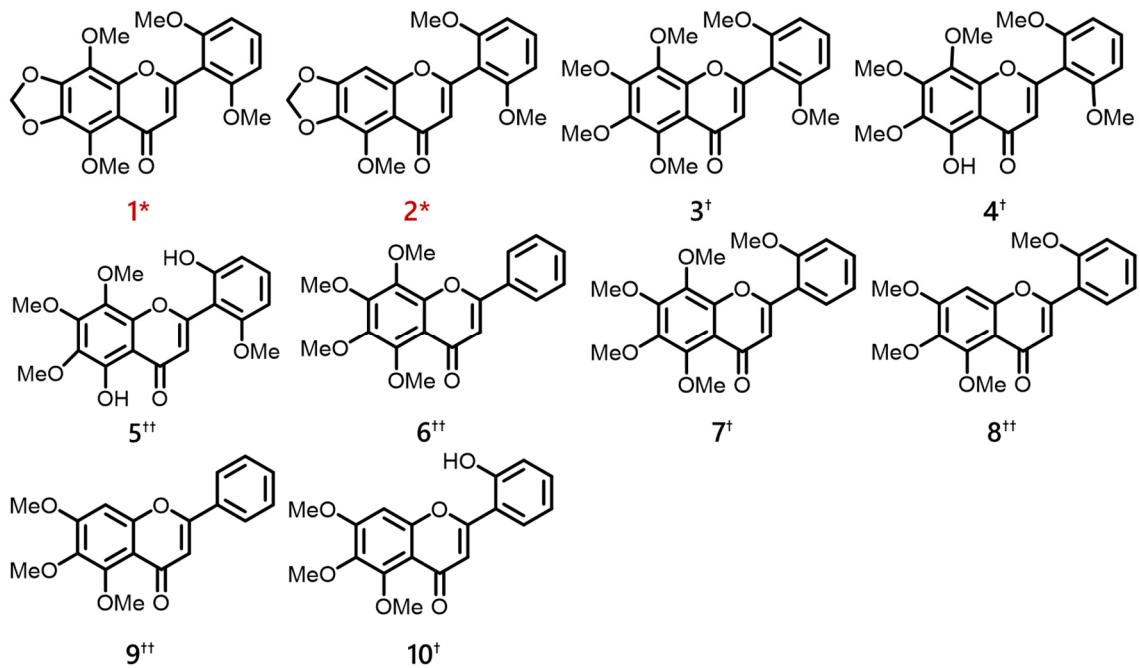


Fig. 5-1. アカボシタツナミソウの全草より単離した **1—10** の構造. \*: new compound, †: naturally first isolation, ††: new component

## 第 1 項 5,8,2',6'-tetramethoxy-6,7-methylenedioxyflavone (1) の構造

化合物 **1** は黄色粉末として得られ, 高分解能エレクトロスプレーイオン化質量測定 (high-resolution electrospray ionization mass spectrometry: HR-ESI-MS) では  $m/z$  409.0904  $[M+Na]^+$  (calcd. for  $C_{20}H_{18}O_8Na$ , 409.0899) に疑似分子イオンピークが認められたことから, 分子式  $C_{20}H_{18}O_8$  と推定された. 紫外線 (ultraviolet: UV) スペクトルでは 265 nm および 305 nm, 赤外線 (infrared: IR) スペクトルでは 1624  $cm^{-1}$  にカルボニル基に基づく吸収が認められた.

プロトン核磁気共鳴 ( $^1H$ -Nuclear Magnetic Resonance:  $^1H$ -NMR) スペクトル (Fig. 5-3) では, 芳香族領域の  $\delta_H$  7.48 (1H, t,  $J=9.0$  Hz, 4'-H) および  $\delta_H$  6.80 (2H, d,  $J=9.0$  Hz, 3', 5'-H) のプロトンシグナルから 1, 2, 3-三置換ベンゼンの存在が示唆された. また, メチレンジオキシ構造に基づくと推定されるプロトンシグナル  $\delta_H$  6.19 (2H, s, O-CH<sub>2</sub>-O), 芳香族の水素に基づくプロトンシグナル  $\delta_H$  6.09 (1H, s, 3-H), 4つのメトキシ基に基づくプロトンシグナル  $\delta_H$  3.88 (3H, s, 8-OMe),  $\delta_H$  3.83 (3H, s, 5-OMe) および  $\delta_H$  3.77 (6H, s, 2', 6'-OMe) が観測された. **1** のカーボン NMR ( $^{13}C$ -NMR) スペクトル (Fig. 5-4) および distortionless enhancement by polarization transfer (DEPT) スペクトルの解析から, カルボニル基 1 個 ( $\delta_C$  175.7), メチル基 4 個 ( $\delta_C$  56.1 $\times$ 2, 60.8, 61.2), メチレン基 1 個 ( $\delta_C$  103.0), メチン 4 個 ( $\delta_C$  104.4 $\times$ 2, 114.7, 132.6), 四級炭素 10 個 ( $\delta_C$  110.1, 113.2, 128.0, 135.2, 137.1, 143.0, 147.4, 157.6, 158.1, 175.7) の存在が明らかとなった. Heteronuclear multiple quantum correlation (HMQC) スペクトルにより水素が直接結合する炭素シグナルを帰属すると O-CH<sub>2</sub>-O のプロトンシグナルと  $\delta_C$  103.0 の炭素シグナルに相関が認められたことから, 低磁場シフトしたメチレン, すなわちメチレンジオキシ構造の存在が示唆された. これらのスペクトルデータから, **1** をメチレンジオキシ構造を有するフラボノイド誘導体であると推定した. Heteronuclear Multiple Bond Coherence (HMBC) スペクトル (Fig. 5-5) では 3', 5'-H から  $\delta_C$  157.6 (C-2) への  $^4J$  ロングレンジおよび  $\delta_C$  110.1 (C-1') への相関, 2', 6'-OMe から  $\delta_C$  158.1 (C-2', 6') への相関, 3-H から C-2 および C-1' への相関が観測されたことより, フラボノイドの B 環が 2', 6'-ジメトキシベンゼンであることが示唆された. また, 3-H から  $\delta_C$  153.2 (C-5) への  $^4J$  ロングレンジ相関より, 5-OMe がフラボノイドの A 環の 5

位の炭素 ( $\delta_c$  135.2) に結合していることが推定された。1次元 nuclear overhauser effect spectroscopy (1-D NOESY) スペクトル (Fig. 5-6) では、2', 6'-OMe と 3-H および 2', 6'-OMe と 8-OCH<sub>3</sub> との相関が認められたことから、8-OMe がフラボノイドの A 環の 8 位の炭素 ( $\delta_c$ : 128.0) に結合していることが明らかとなった。

以上の結果より、**1** を新規化合物 5,8,2',6'-tetramethoxy-6,7-methylenedioxyflavone と決定した (Fig. 5-2)。

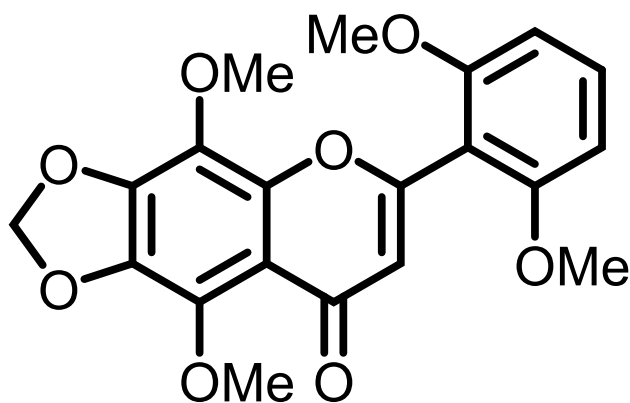


Fig. 5-2. 5,8,2',6'-tetramethoxy-6,7-methylenedioxyflavone の構造

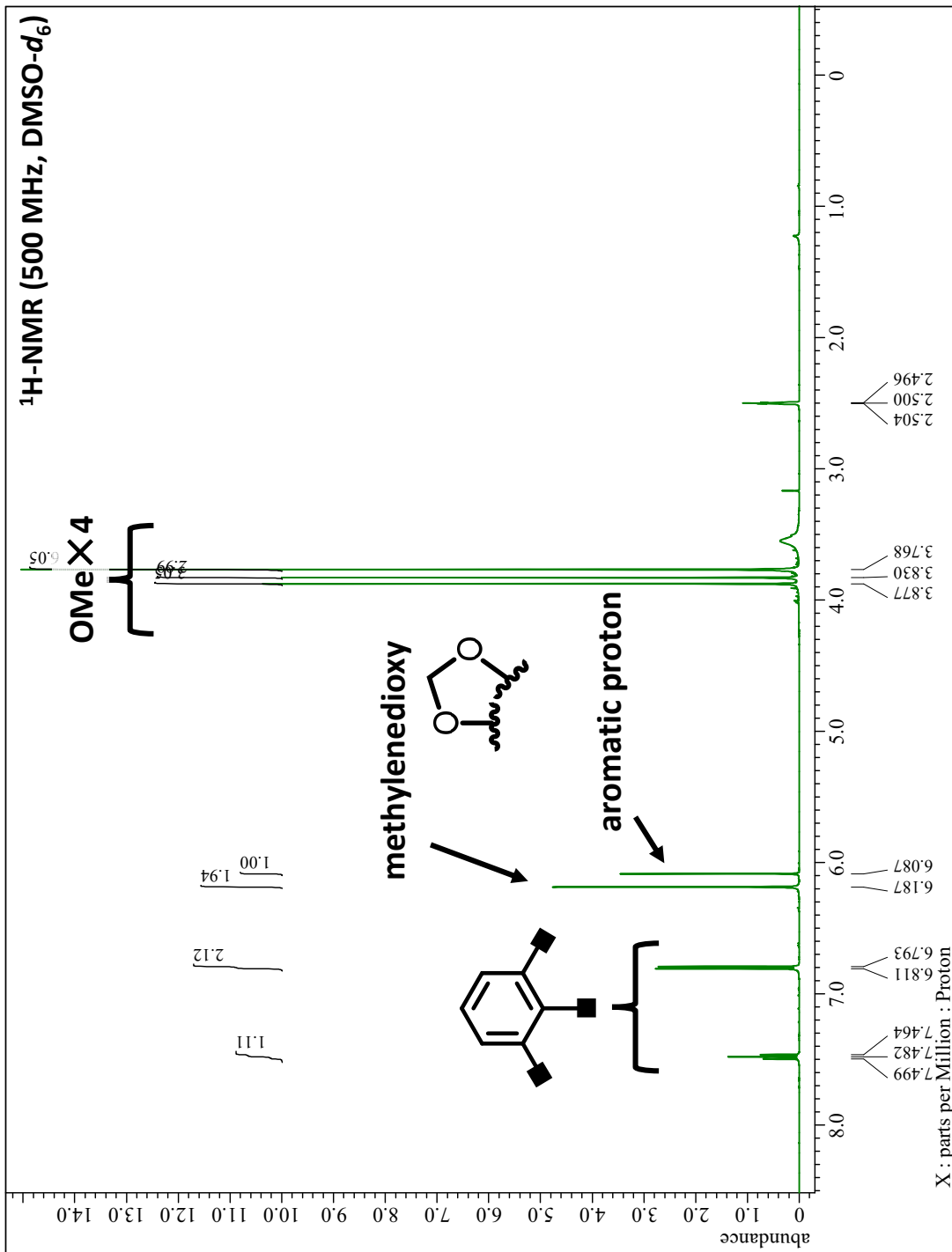


Fig. 5-3. 1 の <sup>1</sup>H-NMR スペクトル

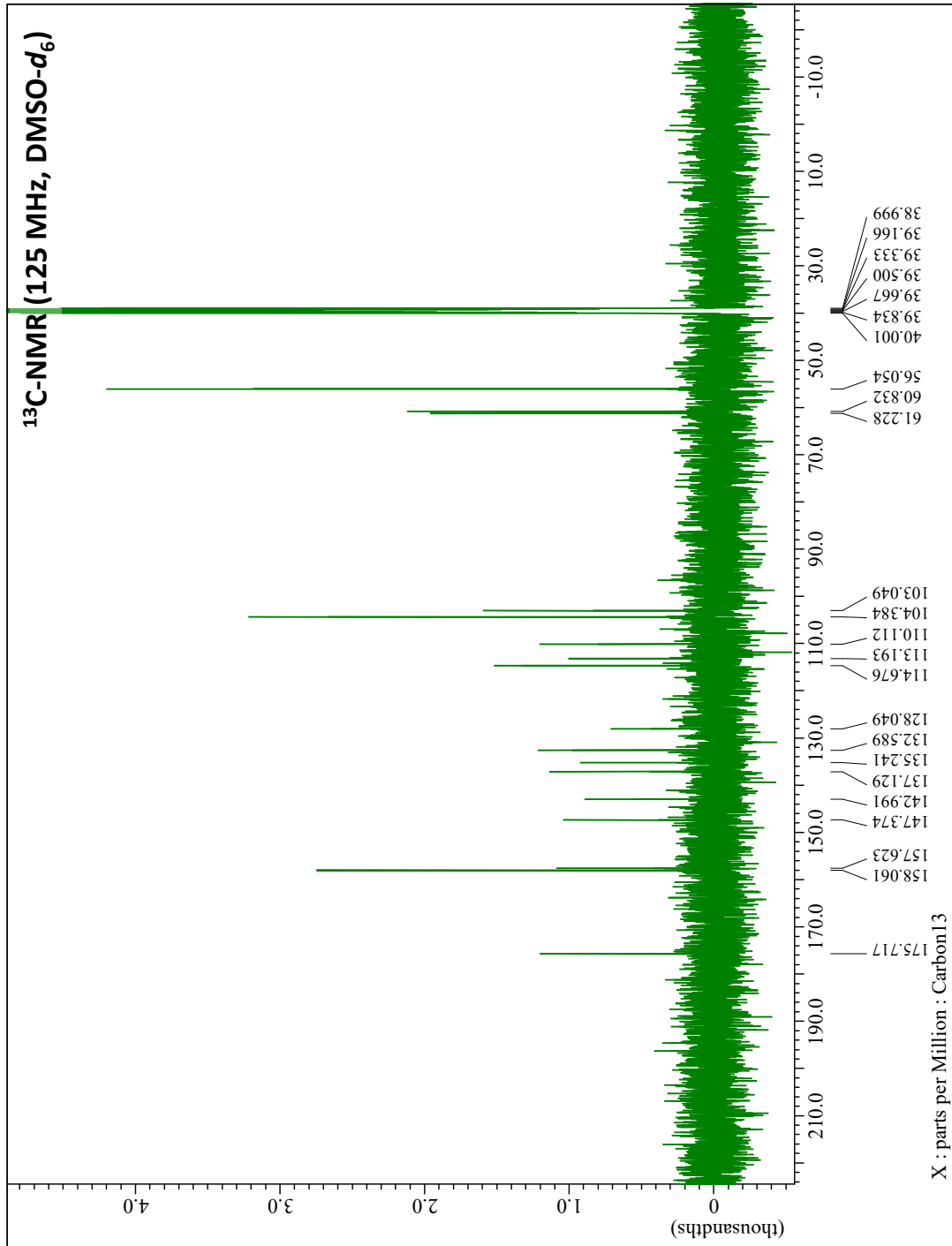


Fig. 5-4. 1 の  $^{13}\text{C-NMR}$  スペクトル

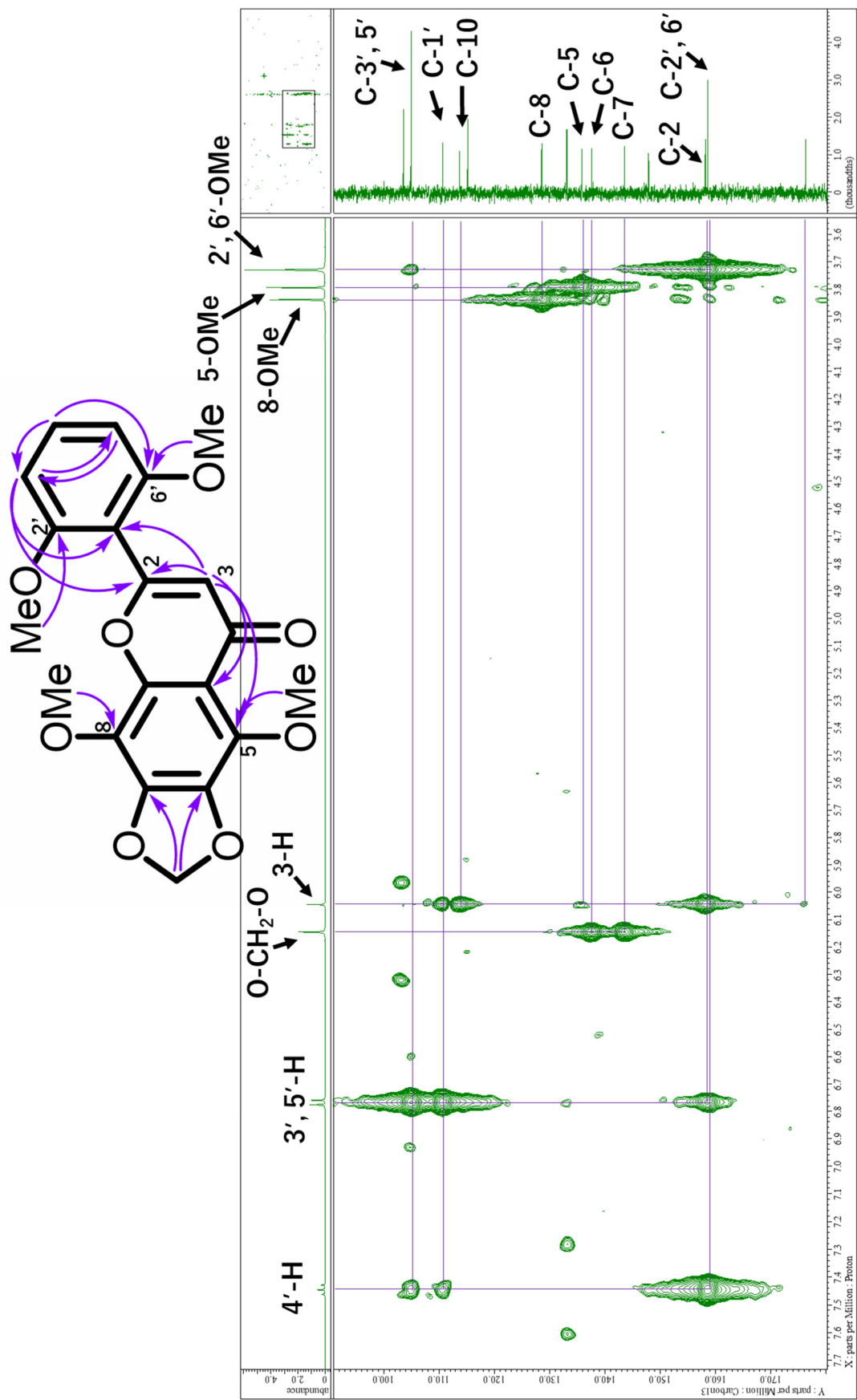


Fig. 5-5.1 の HMBC スペクトル



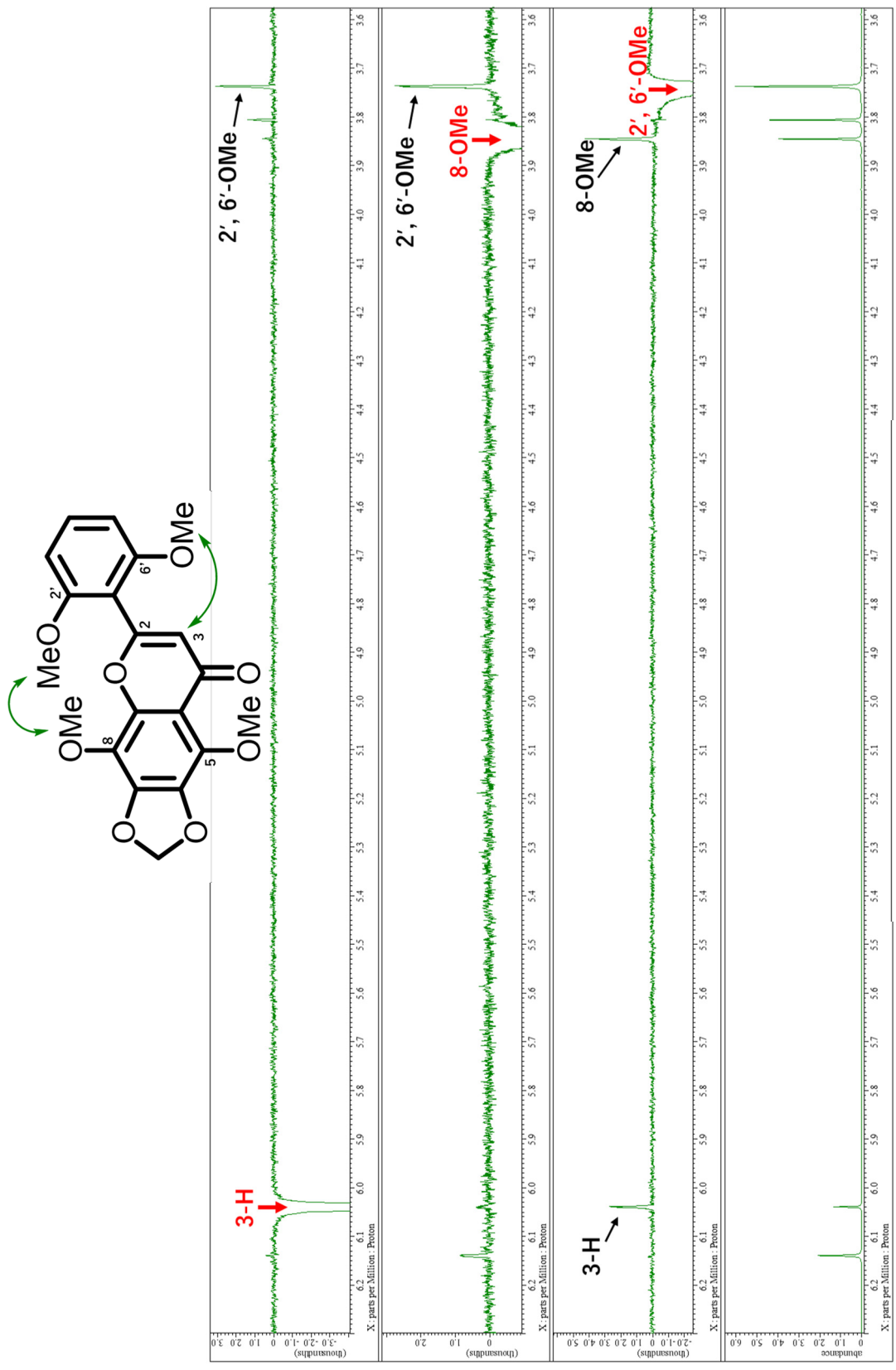


Fig. 5-6. 1 の 1D-NOESY スペクトル

## 第 2 項 5,2',6'-trimethoxy-6,7-methylenedioxyflavone (2) の構造

化合物 **2** は無色粉末として得られ, HR-ESI-MS では  $m/z$  379.0794  $[M+Na]^+$  (calcd. for  $C_{19}H_{16}O_7Na$ , 379.0794) に疑似分子イオンピークが認められたことから, 分子式  $C_{19}H_{16}O_7$  と推定された. UV スペクトルでは 262 nm および 319 nm に極大吸収が認められ, IR スペクトルでは  $1655\text{ cm}^{-1}$  にカルボニル基に基づく吸収が認められた.

$^1\text{H-NMR}$  スペクトル (Fig. 5-8) では, 芳香族領域の  $\delta_{\text{H}}$  7.47 (1H, t,  $J=8.0\text{ Hz}$ , 4'-H) および  $\delta_{\text{H}}$  6.79 (2H, d,  $J=8.0\text{ Hz}$ , 3', 5'-H) のプロトンシグナルから 1, 2, 3-三置換ベンゼンの存在が示唆された. また, メチレンジオキシ構造に基づくと推定されるプロトンシグナル  $\delta_{\text{H}}$  6.17 (2H, s, O-CH<sub>2</sub>-O), 芳香族の水素に基づくプロトンシグナル  $\delta_{\text{H}}$  6.05 (1H, s, 3-H) および  $\delta_{\text{H}}$  6.97 (1H, s, 8-H), 3つのメトキシ基に基づくプロトンシグナル  $\delta_{\text{H}}$  3.91 (3H, s, 5-OMe) および  $\delta_{\text{H}}$  3.76 (6H, s, 2', 6'-OMe) が観測された. **2** の  $^{13}\text{C-NMR}$  スペクトル (Fig. 5-9) および DEPT スペクトルの解析から, カルボニル基 1 個 ( $\delta_{\text{C}}$  175.7), メチル基 3 個 ( $\delta_{\text{C}}$  56.1 $\times$ 2, 60.9), メチレン基 1 個 ( $\delta_{\text{C}}$  102.6), メチン 5 個 ( $\delta_{\text{C}}$  94.0, 104.3 $\times$ 2, 114.7, 132.5), 四級炭素 9 個 ( $\delta_{\text{C}}$  110.2, 112.7, 140.1, 135.9, 152.7, 154.8, 157.7, 158.0, 175.7) の存在が明らかとなった. HMQC スペクトルにより水素が直接結合する炭素シグナルを帰属すると O-CH<sub>2</sub>-O のプロトンシグナルおよび  $\delta_{\text{C}}$  102.6 の炭素シグナルに相関が認められたことから, 低磁場シフトしたメチレン, すなわちメチレンジオキシ構造の存在が示唆された. これらのスペクトルデータから, **2** はフラボノイド誘導体であると推定した. HMBC スペクトル (Fig. 5-10) では 3', 5'-H から  $\delta_{\text{C}}$  157.7 (C-2) への  $^4J$  ロングレンジ相関および  $\delta_{\text{C}}$  110.2 (C-1') への相関, 2', 6'-OMe から  $\delta_{\text{C}}$  158.0 (C-2', 6') への相関, 3-H から C-2 および C-1' への相関より, 2', 6'-ジメトキシベンゼンがフラボノイドの B 環であることが示唆された. また, 3-H から  $\delta_{\text{C}}$  140.1 (C-5) への相関より, 5-OMe がフラボノイドの A 環の 5 位の炭素 ( $\delta_{\text{C}}$  140.1) に結合していることが推定された. さらに,  $\delta_{\text{H}}$  6.97 (1H, s, 8-H) から  $\delta_{\text{C}}$  135.9 (C-6) および  $\delta_{\text{C}}$  112.7 (C-10), 3-H から C-10 への相関が観測された. 1-D NOESY スペクトル (Fig. 5-11) では, 8-H と 2', 6'-OMe および 3-H と 2', 6'-OMe の相関が観測されたことから,  $\delta_{\text{C}}$  94.0 (C-8) および 8-H がフラボノイドの B 環の 8 位の炭素および水素で

あることが明らかとなった。

以上の結果より、**2** を新規化合物 5,2',6'-trimethoxy-6,7-methylenedioxyflavone と決定した (Fig. 5-7)。

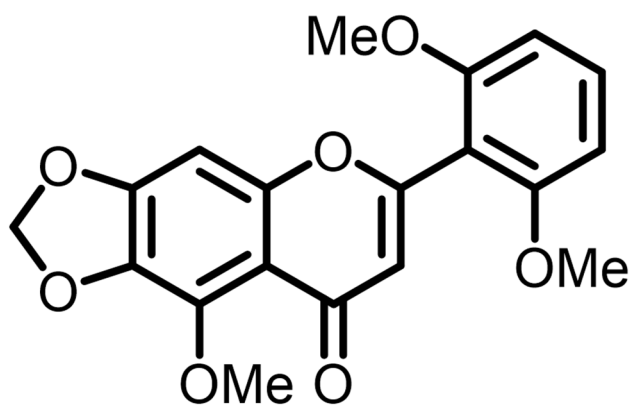


Fig. 5-7. 5,2',6'-trimethoxy-6,7-methylenedioxyflavone の構造

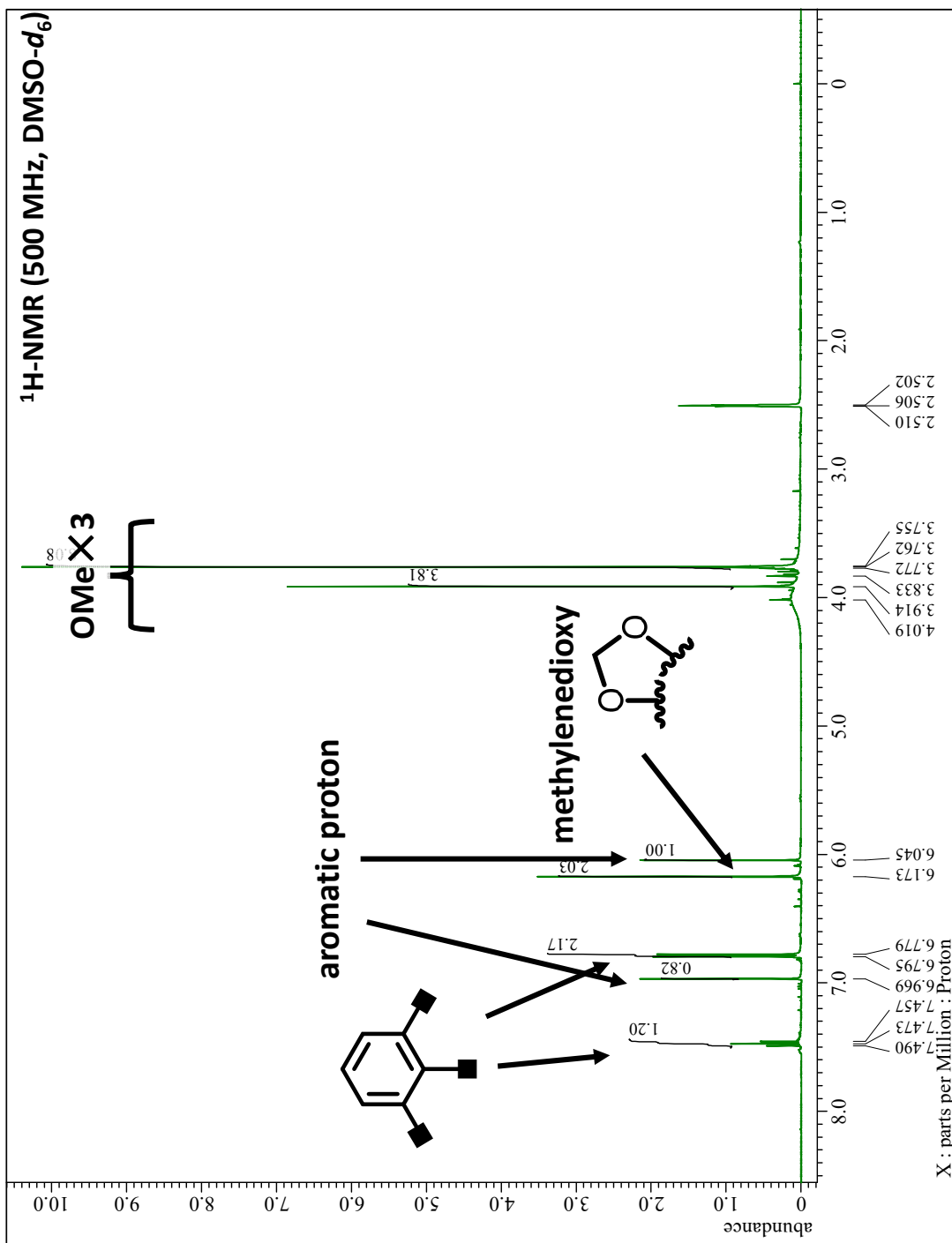


Fig. 5-8.2 の <sup>1</sup>H-NMR スペクトル

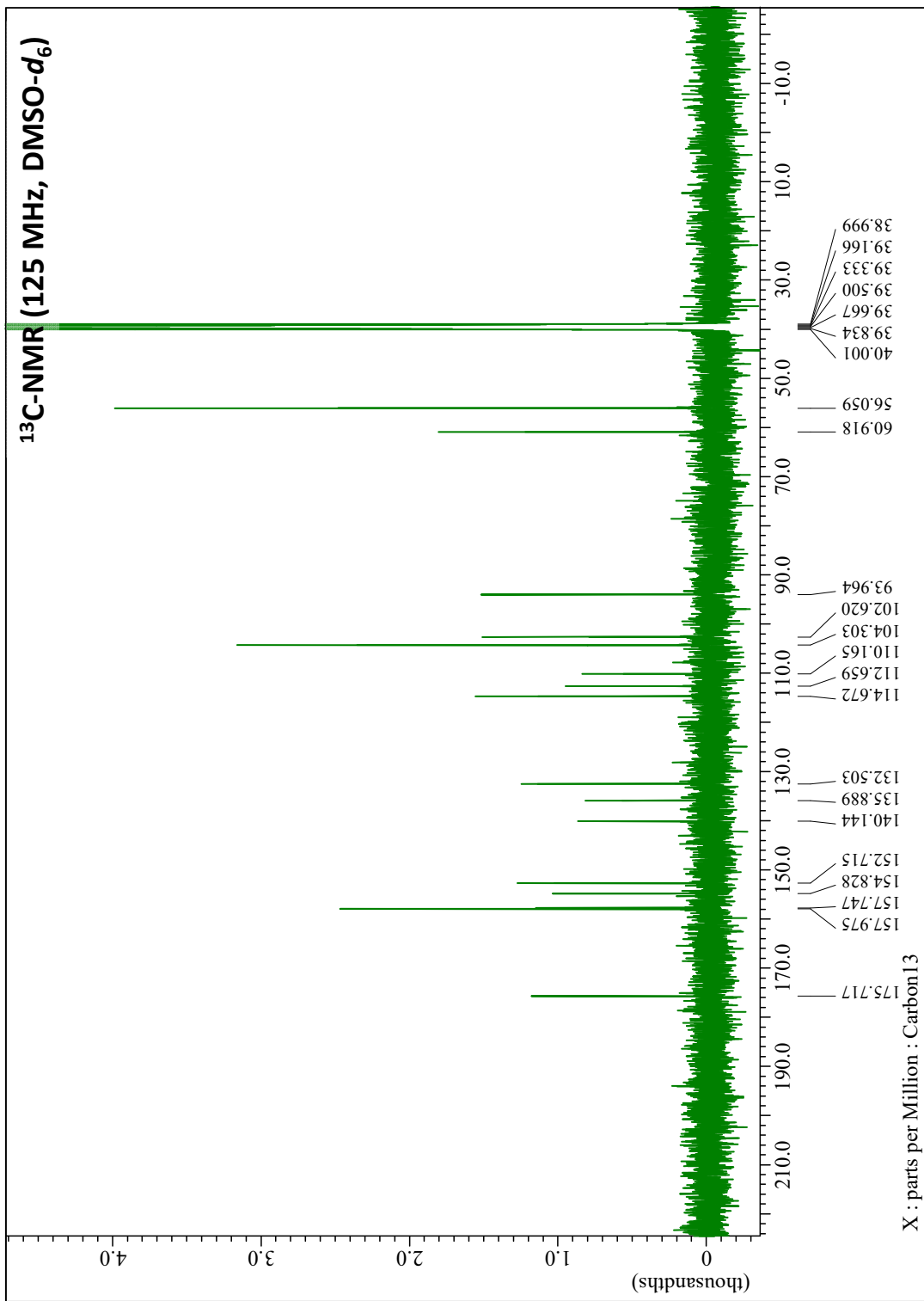


Fig. 5-9. 2 の  $^{13}\text{C-NMR}$  スペクトル

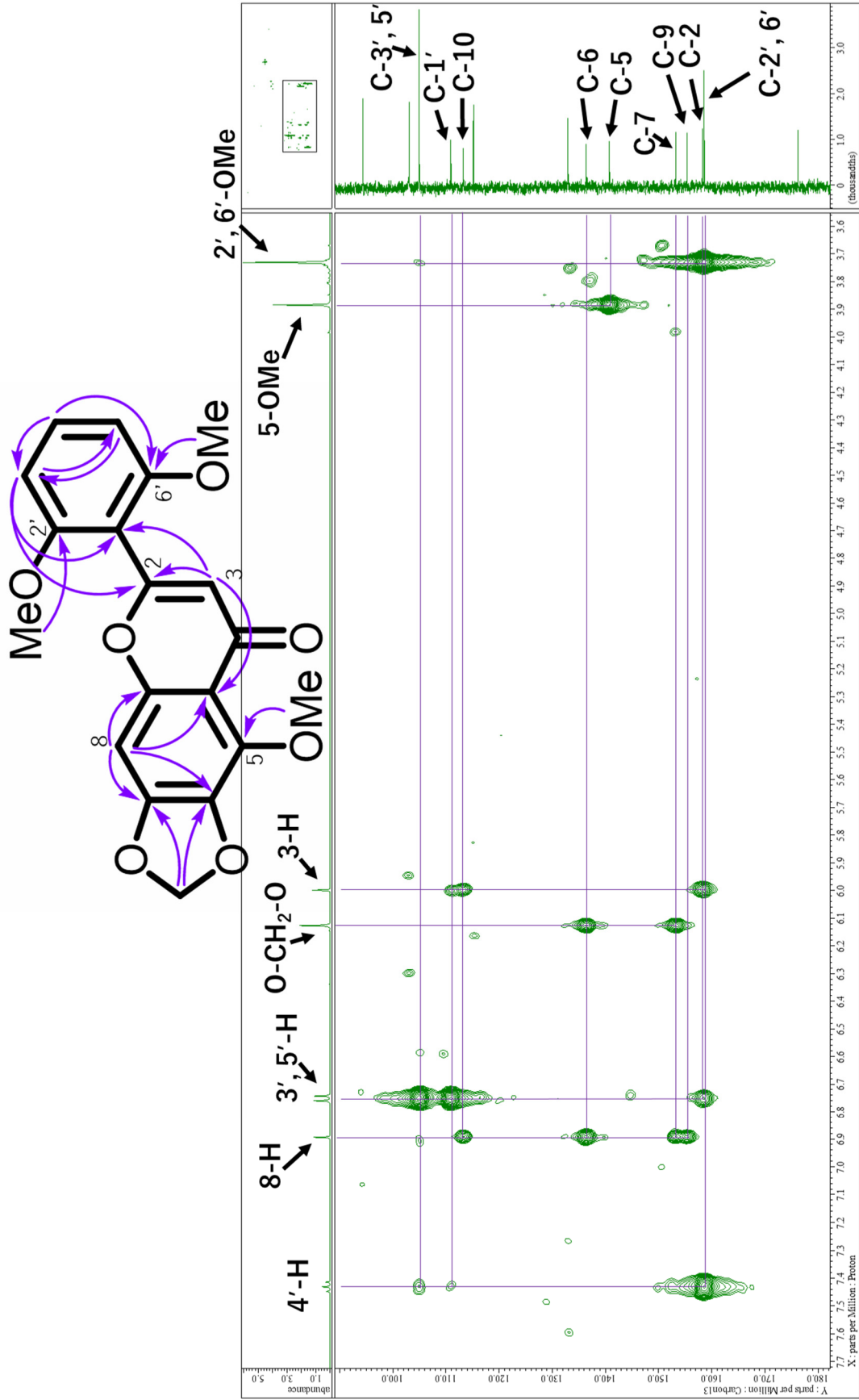


Fig. 5-10. 2 の HMBC スペクトル

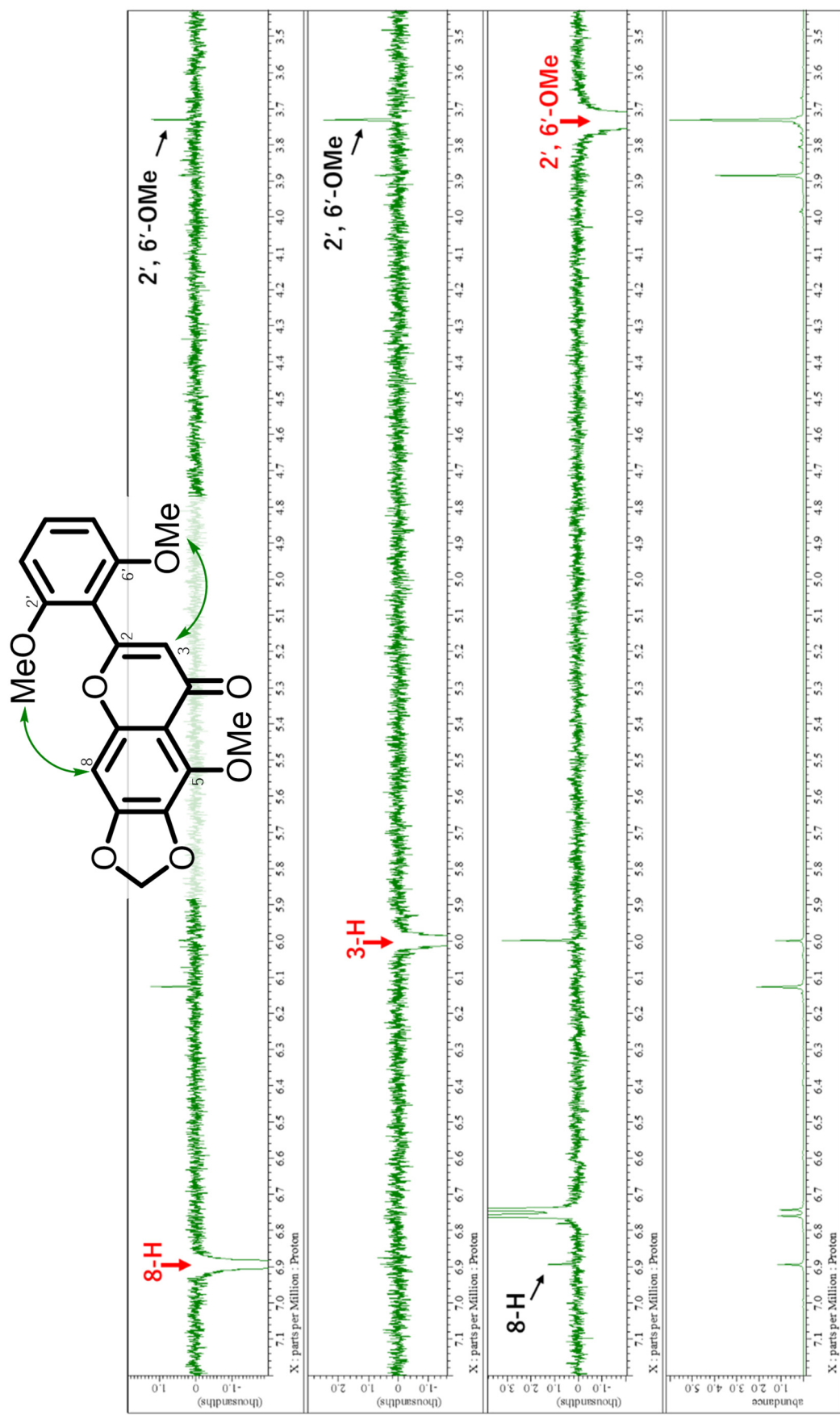


Fig. 5-11. 2 の 1D-NOESY スペクトル

Table 1-1. **1** および **2** の  $^1\text{H}$ -and  $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトルデータ

<b>1</b>		<b>2</b>	
Position	$\delta_{\text{C}}$	Position	$\delta_{\text{H}}$
2	157.6	2	157.7
3	114.7	3	114.7
4	175.7	4	175.7
5	135.2	5	140.1
6	137.1	6	135.9
7	143.0	7	152.7
8	128.0	8	94.0
9	147.4	9	154.8
10	113.2	10	112.7
1'	110.1	1'	110.2
2', 6'	158.1	2', 6'	158.0
3', 5'	104.4	3', 5'	104.3
4'	132.6	4'	132.5
5-OCH <sub>3</sub>	60.8	5-OCH <sub>3</sub>	60.9
8-OCH <sub>3</sub>	61.2		
2', 6'-OCH <sub>3</sub>	56.1	2', 6'-OCH <sub>3</sub>	56.1
O-CH <sub>2</sub> -O	103.0	O-CH <sub>2</sub> -O	102.6
			6.17 (2H, s)
			6.79 (2H, d, $J = 8.0$ )
			7.47 (1H, t, $J = 8.0$ )
			6.05 (1H, s)
			6.97 (1H, s)
			3.76 (6H, s)
			3.83 (3H, s)
			3.88 (3H, s)
			3.77 (6H, s)
			6.80 (2H, d, $J = 9.0$ )
			7.48 (1H, t, $J = 9.0$ )

Chemical shifts are given in ppm; coupling constants  $J$  (in parentheses) are given in Hz



### 第3項 その他の化学成分の構造

既知の単離化合物についてはNMR, MSなどのデータを文献値と比較することにより, それぞれ**3**を5,6,7,8,2',6'-hexamethoxyflavone<sup>41)</sup>, **4**を2'-methoxyskullcapflavone II<sup>42)</sup>, **5**をskullcapflavone II<sup>43)</sup>, **6**を5,6,7,8-tetramethoxyflavone<sup>44)</sup>, **7**を5,6,7,8,2'-pentamethoxyflavone<sup>45)</sup>, **8**を5,6,7,2'-tetramethoxyflavone<sup>46)</sup>, **9**を5,6,7-trimethoxyflavone<sup>47)</sup> および**10**を2'-hydroxy 5,6,7-trimethoxyflavone<sup>47)</sup>と同定した (Table1-2—4). なお, **3, 4, 7**および**10**は天然から初めて単離され, **5, 6, 8**および**9**はアカボシタツナミソウから初めて単離された化合物である.

Table 1-2. 3—10 の <sup>13</sup>C-NMR スペクトルデータ

Position	3	4	5	6	7	8	9	10
2	158.1	161.8	162.5	160.3	158.5	158.1	160.0	158.2
3	114.3	112.1	112.0	107.6	112.2	112.3	107.4	111.7
4	175.6	182.5	182.6	175.9	175.9	175.8	175.4	175.8
5	148.1	148.6	148.6	147.6	147.5	151.5	151.4	151.4
6	143.6	135.9	135.9	143.7	143.5	139.7	139.8	139.6
7	151.0	152.7	152.6	151.2	151.1	157.6	157.4	157.3
8	137.7	133.0	132.6	137.9	137.8	97.3	97.1	97.1
9	147.6	146.2	146.3	147.3	147.5	154.2	153.8	154.0
10	114.7	106.3	106.4	114.4	114.2	111.9	112.0	118.4
1'	110.1	109.9	108.9	131.0	119.7	119.5	130.8	117.4
2'	158.1	158.1	158.4	126.0	157.6	157.6	125.8	156.4
3'	104.4	104.4	102.3	129.2	112.5	112.4	128.8	116.9
4'	132.7	132.6	132.6	131.7	132.8	132.7	131.2	132.0
5'	104.4	104.4	108.8	129.2	120.9	120.7	128.8	119.1
6'	158.1	158.1	156.7	126.0	128.8	128.9	125.8	128.2
5-OCH <sub>3</sub>	61.9			61.9	61.9	61.9	61.6	61.7
6-OCH <sub>3</sub>	61.6	60.6	60.6	61.5	61.6	61	60.8	60.8
7-OCH <sub>3</sub>	61.5	61.5	61.5	61.4	61.4	56.5	56.3	56.3
8-OCH <sub>3</sub>	61.7	61.7	61.8	61.9	61.8			
2'-OCH <sub>3</sub>	56.1	56.1	55.9		55.9			
6'-OCH <sub>3</sub>	56.1	56.1						

Chemical shifts are given in ppm

Table 1-3. 3—6 の <sup>1</sup>H-NMR スペクトルデータ

Position	3	4	5	6
3	6.10 (1H, s)	6.35 (1H, s)	6.34 (1H, s)	6.84 (1H, s)
2'				8.02 (1H, dd, <i>J</i> = 8.0, 2.0)
3'	6.82 (1H, d, <i>J</i> = 8.5)	6.80 (1H, d, <i>J</i> = 9.0)	6.60 (1H, d, <i>J</i> = 8.0)	7.57 (1H, overlap)
4'	7.48 (1H, t, <i>J</i> = 8.5)	7.50 (1H, t, <i>J</i> = 9.0)	7.30 (1H, t, <i>J</i> = 8.0)	7.58 (1H, overlap)
5'	6.82 (1H, d, <i>J</i> = 8.5)	6.80 (1H, d, <i>J</i> = 9.0)	6.61 (1H, d, <i>J</i> = 8.0)	7.57 (1H, overlap)
6'				8.02 (1H, dd, <i>J</i> = 8.0, 2.0)
5-OH		12.6 (1H, s)	12.6 (1H, s)	
5-OCH <sub>3</sub>	3.77 (3H, s)			3.78 (3H, s)
6-OCH <sub>3</sub>	3.82 (3H, s)	3.81 (3H, s)	3.81 (3H, s)	3.84 (3H, s)
7-OCH <sub>3</sub>	3.99 (3H, s)	4.00 (3H, s)	3.99 (3H, s)	4.02 (3H, s)
8-OCH <sub>3</sub>	3.80 (3H, s)	3.76 (3H, s)	3.78 (3H, s)	3.96 (3H, s)
2'-OCH <sub>3</sub>	3.76 (3H, s)	3.77 (3H, s)	3.74 (3H, s)	
6'-OCH <sub>3</sub>	3.76 (3H, s)	3.77 (3H, s)		

Chemical shifts are given in ppm; coupling constants *J* (in parentheses) are given in Hz

Table 1-4. 7-10 の <sup>1</sup>H-NMR スペクトルデータ

	7	8	9	10
Position				
3	6.74 (1H, s)	6.74 (1H, s)	6.72 (1H, s)	6.95 (1H, s)
8		7.15 (1H, s)	7.15 (1H, s)	7.15 (1H, s)
2'			8.00 (1H, dd, $J = 8.0, 2.0$ )	
3'	7.23 (1H, d, $J = 8.5$ )	7.23 (1H, d, $J = 8.5$ )	7.52 (1H, overlap)	7.04 (1H, dd, $J = 8.0, 1.0$ )
4'	7.55 (1H, dt, $J = 8.5, 1.5$ )	7.55 (1H, dt, $J = 8.5, 1.5$ )	7.54 (1H, overlap)	7.37 (1H, dt, $J = 8.0, 2.0$ )
5'	7.15 (1H, t, $J = 7.5$ )	7.14 (1H, t, $J = 7.0$ )	7.52 (1H, overlap)	6.98 (1H, dt, $J = 8.0, 1.0$ )
6'	7.83 (1H, dd, $J = 7.5, 1.5$ )	7.91 (1H, dd, $J = 7.0, 1.5$ )	8.00 (1H, dd, $J = 8.0, 2.0$ )	7.90 (1H, dd, $J = 8.0, 2.0$ )
5-OCH <sub>3</sub>	3.77 (3H, s)	3.80 (3H, s)	3.79 (3H, s)	3.81 (3H, s)
6-OCH <sub>3</sub>	3.83 (3H, s)	3.76 (3H, s)	3.75 (3H, s)	3.78 (3H, s)
7-OCH <sub>3</sub>	4.01 (3H, s)	3.93 (3H, s)	3.93 (3H, s)	3.95 (3H, s)
8-OCH <sub>3</sub>	3.91 (3H, s)			
2'-OCH <sub>3</sub>		3.92 (3H, s)		

Chemical shifts are given in ppm; coupling constants  $J$  (in parentheses) are given in Hz

## 第2節 ER アゴニスト活性評価

単離した **1—10** の ER アゴニスト活性についてルシフェラーゼレポーターアッセイにより評価を行った。サンプル濃度は 0.3—3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  とし、ポジティブコントロールには 1 nM 17 $\beta$ -エストラジオールを用いた。その結果、**1—10** のいずれにも ER アゴニスト活性が認められなかった (Fig. 6-1)。一方で、**1, 4, 5, 7** および **9** については 3  $\mu\text{M}$  の濃度において、それぞれコントロールと比較して、0.55 倍、0.38 倍、0.66 倍、0.71 倍および 0.39 倍と ER アゴニスト活性が減少した。また、コントロールと比較して、**6** は 1 および 3  $\mu\text{M}$  の濃度で 0.78 倍および 0.38 倍、**8** については 1 および 3  $\mu\text{M}$  の濃度で、0.71 倍および 0.38 倍、ER アゴニスト活性が減少した。よって、**1—10** 以外の SRE の ER 活性化に寄与する化合物がアカボシタツナミソウに含まれていると考えられる。ER アゴニスト活性が減少したものについては、単離化合物の HEK293 細胞の細胞生存率に与える影響について検討していないため断言はできないが、細胞毒性による可能性が考えられる。

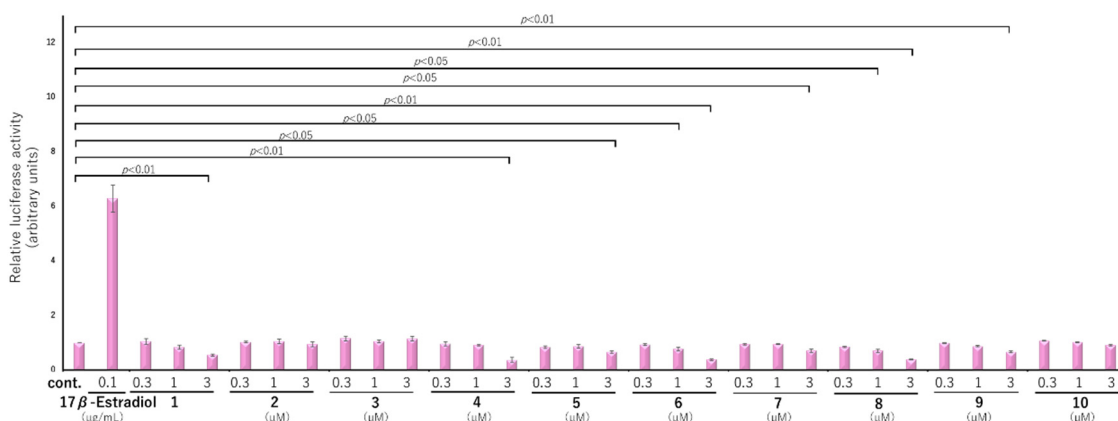


Fig. 6-1. 単離化合物 **1—10** の ER アゴニスト活性. HEK293 細胞を用いたルシフェラーゼレポーターアッセイにより検討した。DMSO のみ添加したコントロール (cont.) をとした。データは 3 回の独立した実験の平均の標準誤差 (SE) で表した ( $n=3$ )。統計解析による比較は JMP 14 を用いた Dunnett の多重比較検定による ANOVA を行うことにより有意差を表示した。p 値は、 $p < 0.05$  および  $p < 0.01$  に設定した。

### 第3節 骨形成への影響

単離した **1—10** の骨形成への影響について、骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 を用いた ALP 活性試験により検討を行った。MC3T3-E1 細胞の分化には、分化誘導剤としてアスコルビン酸、ヒドロコルチゾン、 $\beta$ -グリセロリン酸により誘導した。サンプル濃度は 0.3—3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  とし、ポジティブコントロールには BMP-2 (3.125  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) を用いた。その結果、ALP 活性はコントロールと比較して、**1** の 0.3, 1 および 3  $\mu\text{M}$  の濃度において 119.1%, 126.7% および 157.6%, **2** の 0.3 および 1  $\mu\text{M}$  の濃度において 127.8% および 121.3%, **9** の 1 および 3  $\mu\text{M}$  の濃度において 122.8% および 142.4%, それぞれ増加した (Fig. 7-1a, b)。よって、**1, 2** および **9** は骨芽細胞の ALP 活性増加作用を有すると考えられた。

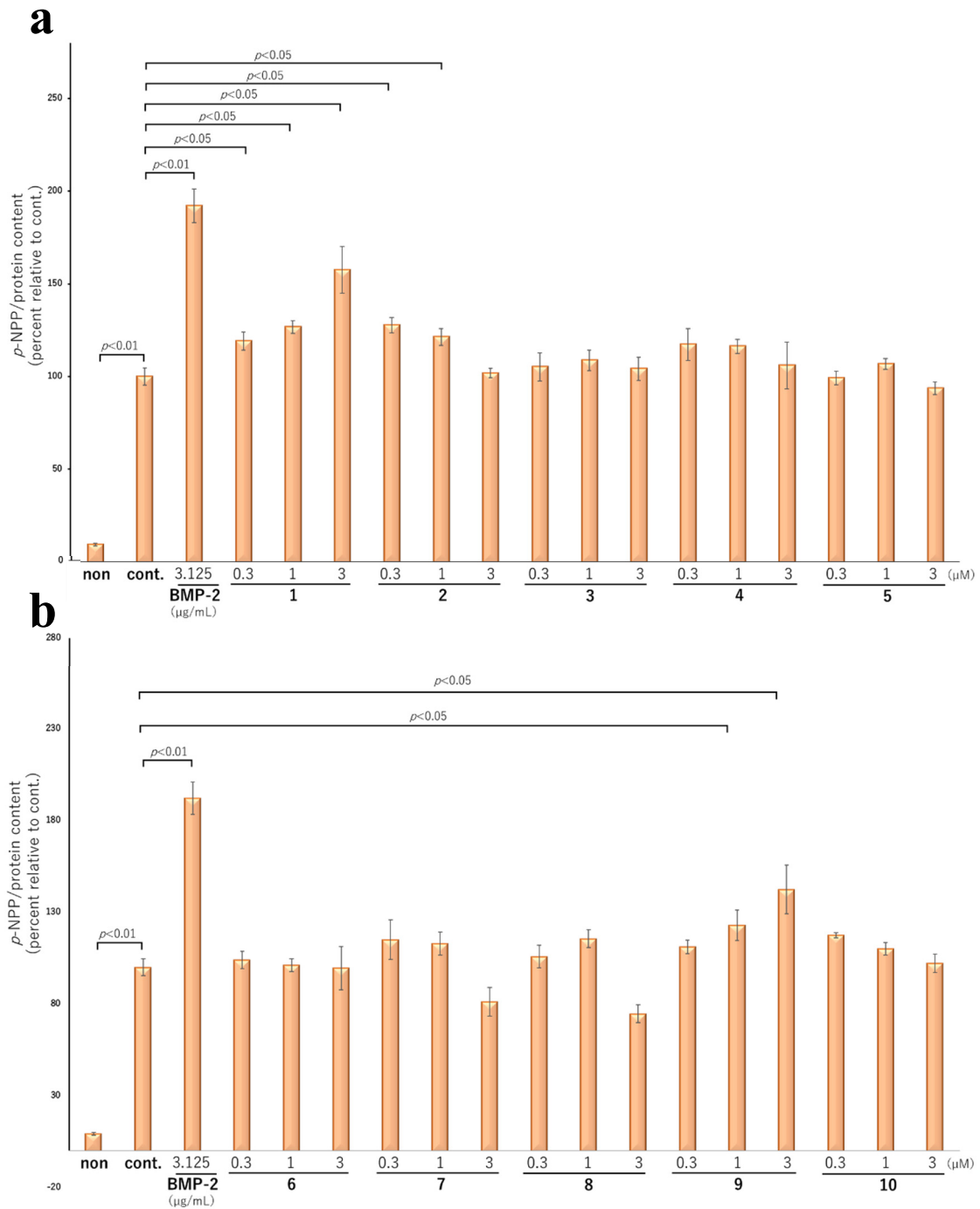


Fig. 7-1. 単離化合物 (a) 1—5 (b) 6—10 の MC3T3-E1 細胞における ALP 活性に対する影響. 分化誘導剤を添加せずに DMSO のみを添加したものを non とし, 誘導剤および DMSO のみ添加したコントロール (cont.) を 100%とした. データは 3 回の独立した実験の平均の SE で表した (n=3). 統計解析による比較は JMP 14 を用いた Dunnett の多重比較検定による ANOVA を行うことにより有意差を表示した.  $p$  値は,  $p < 0.05$  および  $p < 0.01$  に設定した.

次に、ALP 活性の認められた **1**, **2** および **9** について、骨形成誘導遺伝子および骨形成マーカーへの影響について、定量的 Real-time PCR 法を用いて遺伝子解析を行った。

ALP 活性試験と同様に分化誘導剤 (アスコルビン酸, ヒドロコルチゾン,  $\beta$ -グリセロリン酸) を用いて MC3T3-E1 細胞を分化誘導し, **1**, **2** および **9** (0.3—3  $\mu$ M) を添加して 72 時間培養した際の total RNA を用いて検討を行った。また, ポジティブコントロールには BMP-2 (3.125  $\mu$ g/mL) を用いた。その結果, **1** はコントロールと比較して, *Runx2* の mRNA 発現量を 0.3, 1 および 3  $\mu$ M の濃度において 1.5 倍, 1.7 倍および 2.1 倍と濃度依存的に増加させた(Fig. 7-2a)。*osterix* の mRNA 発現量はコントロールと比較して, 0.3 および 1  $\mu$ M の濃度において 1.4 倍および 1.5 倍, *osteopontin* の mRNA 発現量は 0.3, 1 および 3  $\mu$ M の濃度において 1.4 倍, 1.5 倍および 2.1 倍, *osteocalcin* の mRNA 発現量は 0.3 および 1  $\mu$ M の濃度において 1.5 倍および 1.3 倍増加させた(Fig. 7-2b—d)。**2** は 0.3  $\mu$ M でコントロールと比較して, *Runx2* の mRNA 発現量を 1.4 倍, *osterix* の mRNA 発現量を 1.7 倍, *osteopontin* の mRNA 発現量を 1.9 倍, *osteocalcin* の mRNA 発現量を 1.4 倍増加させた(Fig. 7-3a—d)。**9** はコントロールと比較して, *Runx2* の mRNA 発現量を 0.3, 1 および 3  $\mu$ M の濃度において 2.3 倍, 1.4 倍および 1.2 倍, *osterix* の mRNA 発現量は 0.3  $\mu$ M の濃度において 1.3 倍, *osteopontin* の mRNA 発現量は 0.3, 1 および 3  $\mu$ M の濃度において 2.3 倍, 2.2 倍および 1.8 倍, *osteocalcin* の mRNA 発現量は 0.3, 1 および 3  $\mu$ M の濃度において 1.4 倍, 1.5 倍および 2.0 倍増加させた(Fig. 7-4a—d)。

よって, 今回の濃度域では **2** については 3  $\mu$ M の濃度に限られるが, **1**, **2** および **9** は骨芽細胞の分化誘導遺伝子である *Runx2* や *osterix* および骨形成マーカーの *osteopontin* や *osteocalcin* を誘導する可能性があると考えられる。



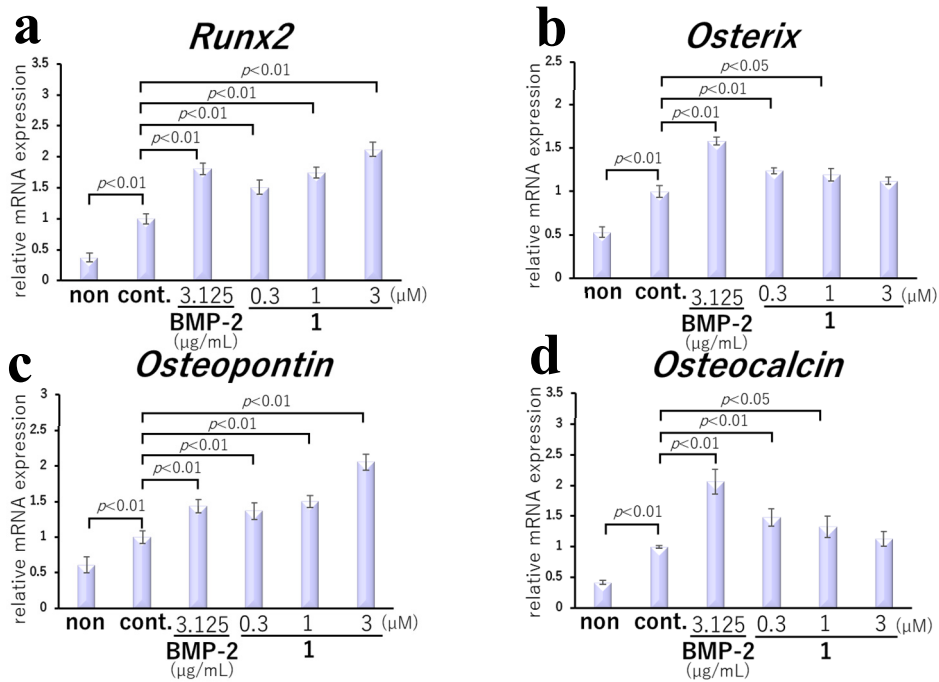


Fig. 7-2. 1 の MC3T3-E1 細胞における (a) *Runx2*, (b) *osterix*, (c) *osteopontin*, (d) *osteocalcin* の mRNA 発現量に対する影響. 定量的 Real-time PCR により測定し, 標準化には  $\beta$ -actin を用いた. 誘導剤を添加せずに DMSO のみを添加したものを non とし, 分化誘導剤および DMSO のみ添加したコントロール (cont.) を 1 とした. データは 3 回の独立した実験の平均の SE で表した (n=3). 統計解析による比較は JMP 14 を用いた Dunnett の多重比較検定による ANOVA を行うことにより有意差を表示した.  $p$  値は,  $p < 0.05$  および  $p < 0.01$  に設定した.

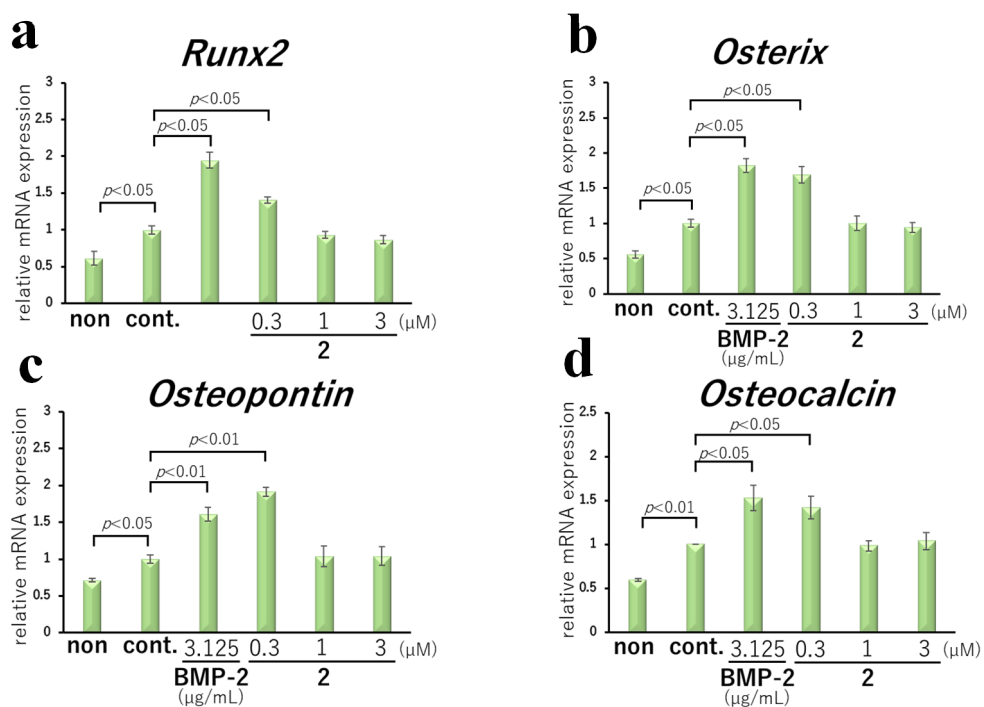


Fig. 7-3. 2 の MC3T3-E1 細胞における (a) *Runx2*, (b) *osterix*, (c) *osteopontin*, (d) *osteocalcin* の mRNA 発現量に対する影響. 定量的 Real-time PCR により測定し, 標準化には  $\beta$ -*actin* を用いた. 誘導剤を添加せずに DMSO のみを添加したものを non とし, 分化誘導剤および DMSO のみ添加したコントロール (cont.) を 1 とした. データは 3 回の独立した実験の平均の SE で表した (n=3). 統計解析による比較は JMP 14 を用いた Dunnett の多重比較検定による ANOVA を行うことにより有意差を表示した.  $p$  値は,  $p < 0.05$  および  $p < 0.01$  に設定した.

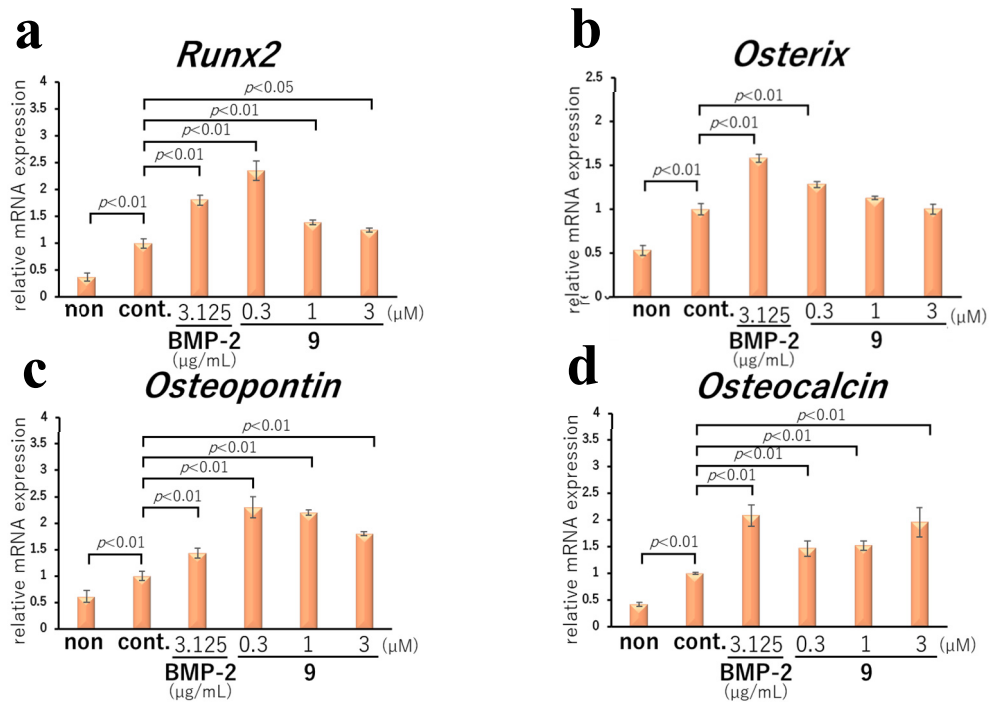


Fig. 7-4. 9 の MC3T3-E1 細胞における (a) *Runx2*, (b) *osterix*, (c) *osteopontin*, (d) *osteocalcin* の mRNA 発現量に対する影響. 定量的 Real-time PCR により測定し, 標準化には  $\beta$ -actin を用いた. 誘導剤を添加せずに DMSO のみを添加したものを non とし, 分化誘導剤および DMSO のみ添加したコントロール (cont.) を 1 とした. データは 3 回の独立した実験の平均の SE で表した (n=3). 統計解析による比較は JMP 14 を用いた Dunnett の多重比較検定による ANOVA を行うことにより有意差を表示した.  $p$  値は,  $p < 0.05$  および  $p < 0.01$  に設定した.

さらに、**1**、**2** および **9** の Smad への影響についても定量的 Real-time PCR 法を用いて遺伝子解析を行った。その結果、**1** はコントロールと比較して *Smad1* の mRNA 発現量を 0.3, 1 および 3  $\mu\text{M}$  の濃度において、1.4 倍、1.9 倍および 1.8 倍、*Smad4* の mRNA 発現量は 0.3, 1 および 3  $\mu\text{M}$  の濃度において 2.2 倍、1.9 倍および 1.9 倍、*Smad5* の mRNA 発現量も 0.3, 1 および 3  $\mu\text{M}$  の濃度において 1.4 倍、1.7 倍および 1.8 倍に増加させた (Fig. 7-5a—c)。**2** はコントロールと比較して *Smad1* の mRNA 発現量を 0.3 および 1  $\mu\text{M}$  の濃度において、2.7 倍および 1.7 倍、*Smad4* の mRNA 発現量は 0.3  $\mu\text{M}$  の濃度において 1.4 倍、*Smad5* の mRNA 発現量は 0.3  $\mu\text{M}$  の濃度において 1.4 倍増加させた (Fig. 7-6a—c)。**9** はコントロールと比較して *Smad1* の mRNA 発現量を 0.3 および 1  $\mu\text{M}$  の濃度において、1.6 倍および 1.4 倍、*Smad4* の mRNA 発現量は 0.3, 1 および 3  $\mu\text{M}$  の濃度において 1.4 倍、1.3 倍および 1.3 倍増加させ、*Smad5* の mRNA 発現量に関しては変化させなかった (Fig. 7-5a—c)。

よって、**1** および **2** は *Smad1*、*Smad4* および *Smad5* を、**9** は *Smad1* および *Smad4* を誘導している可能性が示唆された。

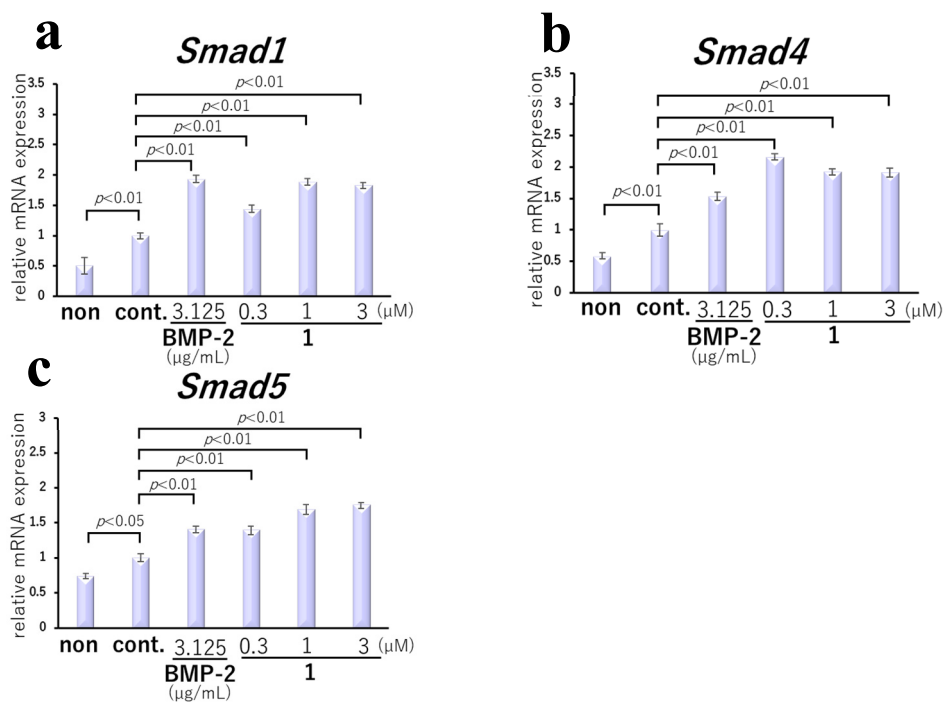


Fig. 7-5. 1 の MC3T3-E1 細胞における (a) *Smad1*, (b) *Smad4*, (c) *Smad5* の mRNA 発現量に対する影響. 定量的 Real-time PCR により測定し, 標準化には  $\beta$ -actin を用いた. 誘導剤を添加せずに DMSO のみを添加したものを non とし, 分化誘導剤および DMSO のみ添加したコントロール (cont.) を 1 とした. データは 3 回の独立した実験の平均の SE で表した ( $n=3$ ). 統計解析による比較は JMP 14 を用いた Dunnett の多重比較検定による ANOVA を行うことにより有意差を表示した.  $p$  値は,  $p<0.05$  および  $p<0.01$  に設定した.

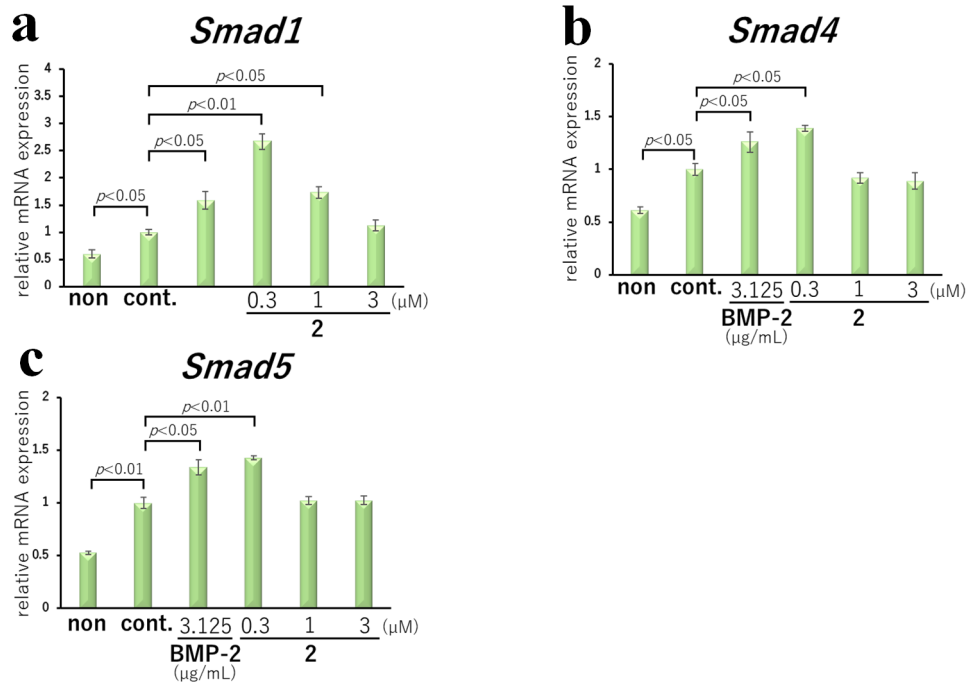


Fig. 7-6. 2 の MC3T3-E1 細胞における (a) *Smad1*, (b) *Smad4*, (c) *Smad5* の mRNA 発現量に対する影響. 定量的 Real-time PCR により測定し, 標準化には  $\beta$ -actin を用いた. 誘導剤を添加せずに DMSO のみを添加したものを non とし, 分化誘導剤および DMSO のみ添加したコントロール (cont.) を 1 とした. データは 3 回の独立した実験の平均の SE で表した (n=3). 統計解析による比較は JMP 14 を用いた Dunnett の多重比較検定による ANOVA を行うことにより有意差を表示した.  $p$  値は,  $p < 0.05$  および  $p < 0.01$  に設定した.

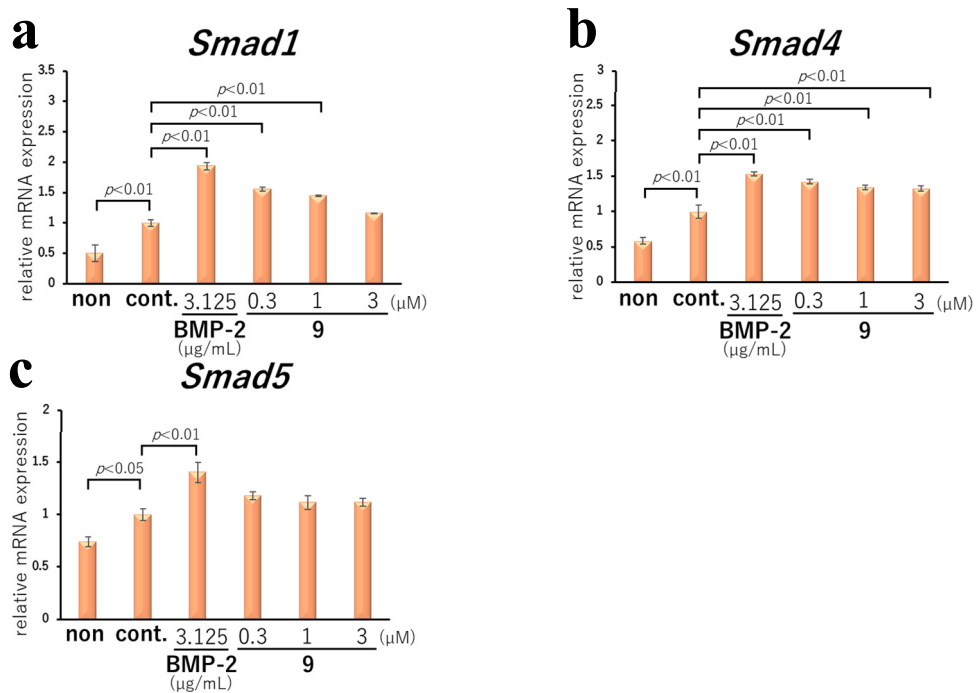


Fig. 7-7. 9 の MC3T3-E1 細胞における (a) *Smad1*, (b) *Smad4*, (c) *Smad5* の mRNA 発現量に対する影響. 定量的 Real-time PCR により測定し, 標準化には  $\beta$ -actin を用いた. 誘導剤を添加せずに DMSO のみを添加したものを non とし, 分化誘導剤および DMSO のみ添加したコントロール (cont.) を 1 とした. データは 3 回の独立した実験の平均の SE で表した (n=3). 統計解析による比較は JMP 14 を用いた Dunnett の多重比較検定による ANOVA を行うことにより有意差を表示した.  $p$  値は,  $p < 0.05$  および  $p < 0.01$  に設定した.

## 第4節 小括

ER アゴニスト活性および骨形成促進のデュアル作用を示すことが明らかとなったアカボシタツナミソウについて成分探索を行った. 80%MeOH エキスを分配抽出し得られた CHCl<sub>3</sub> 可溶画分に ER アゴニスト活性 (活性値: 25.4) および ALP 活性 (活性値: 123.6%) が認められたため, 各種クロマトグラフィーや HPLC により分離・精製を行い, 10 種のメトキシフラボン **1—10** を得た. **1** および **2** はメチレンジオキシ構造を有する新規化合物であり, **3, 4, 7** および **10** は天然から初めて単離され, **5, 6, 8** および **9** はアカボシタツナミソウから初めて単離された化合物であった. また, **1—5** はフラボノイドの B 環の 2', 6' 位に置換基を有する *Scutellaria* 属に特徴的なフラボノイドであり, **1—4** は B 環の置換基がメトキシ基であった.

*Scutellaria* 属の薬用植物を代表する *S. baicalensis* では, L-フェニルアラニンを出発物質として, フェニルアラニンアンモニアリアーゼによりケイ皮酸が生成されるところからフラボノイドの生合成が始まる<sup>48, 49</sup>. 生成されたケイ皮酸は 4-クマロイル CoA リガーゼによりシンナモイル CoA となり, カルコンシンターゼ, カルコンイソメラーゼやフラボンシンターゼ II などの働きによりフラボノイドが合成される. Wogonin のようなメトキシフラボンは, フラボノイド O-メチルトランスフェラーゼによるフェノール性水酸基へのメチル基転移反応によって生成されることが知られている<sup>48, 49</sup>. しかし, 今回単離されたようなフラボノイドの B 環の 2', 6' 位に置換基修飾を行う酵素はまだ特定されていない. アカボシタツナミソウから単離した 5 種の化合物は天然から初めて単離された化合物であり, 生合成を解明していく一助となることが期待される.

また, **5** はコガネバナ *S. baicalensis* から<sup>50</sup>, **6** はタツナミソウ *S. indica*<sup>51</sup>, ブラジルの固有種であるノウゼンカズラ科の *Zeyhera tuberculosa*<sup>52</sup> や, クスノキ科の *Lindera lucida*<sup>53</sup> から, **8** はミカン科のホワイトサポテ *Casimiroa edulis*<sup>54</sup> から, **9** はシソ科に属するムラサキシキブ *Callicarpa japonica*<sup>55</sup> およびノウゼンカズラ科の *Z. tuberculosa*<sup>52</sup> から単離報告がなされている.

**1—10** の ER アゴニスト活性についてルシフェラーゼレポーターアッセイにより評価を行ったところ, いずれの化合物も活性を示さなかった. このことから,



アカボシタツナミソウ全草の 80%MeOH エキスの ER アゴニスト活性の発現には **1—10** ではない, 他の化合物が関与している可能性や単離した化合物が単独でなく協働して活性を示している可能性が示唆された. また, **1, 4, 5, 7** および **9** については 3  $\mu\text{M}$  の濃度において, それぞれコントロールと比較して, 0.55 倍, 0.38 倍, 0.66 倍, 0.71 倍および 0.39 倍, **6** は 1 および 3  $\mu\text{M}$  の濃度で 0.78 倍および 0.38 倍, **8** については 1 および 3  $\mu\text{M}$  の濃度で, 0.71 倍および 0.38 倍と ER アゴニスト活性が減少した. 細胞生存率について検討を行う必要があるが, 細胞毒性によって ER アゴニスト活性が減少した可能性が考えられる.

次に, **1—10** の骨形成への影響について, 骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 を用いた ALP 活性試験により検討を行ったところ, ALP 活性はコントロールと比較して, **1** の 0.3, 1 および 3  $\mu\text{M}$  の濃度において 119.1%, 126.7% および 157.6%, **2** の 0.3 および 1  $\mu\text{M}$  の濃度において 127.8% および 121.3%, **9** の 1 および 3  $\mu\text{M}$  の濃度において 122.8% および 142.4%, それぞれ増加した. 特に **1** の ALP 活性は, 濃度依存的に増加し, 3 つの化合物のうち, 3  $\mu\text{M}$  で 157.6% と最も増加していた.

そこで, ALP 活性の増加が認められた **1, 2** および **9** における *Runx2*, *osterix*, *osteopontin*, *osteocalcin* および *Smad* に対する影響を遺伝子解析により評価した. その結果, **1** はコントロールと比較して, *Runx2* の mRNA 発現量を 0.3, 1 および 3  $\mu\text{M}$  の濃度において 1.5 倍, 1.7 倍および 2.1 倍, *osterix* の mRNA 発現量は 0.3 および 1  $\mu\text{M}$  の濃度において 1.4 倍および 1.5 倍, *osteopontin* の mRNA 発現量は 0.3, 1 および 3  $\mu\text{M}$  の濃度において 1.4 倍, 1.5 倍および 2.1 倍, *osteocalcin* の mRNA 発現量は 0.3 および 1  $\mu\text{M}$  の濃度において 1.5 倍および 1.3 倍, *Smad1* の mRNA 発現量を 0.3, 1 および 3  $\mu\text{M}$  の濃度において, 1.4 倍, 1.9 倍および 1.8 倍, *Smad4* の mRNA 発現量は 0.3, 1 および 3  $\mu\text{M}$  の濃度において 2.2 倍, 1.9 倍および 1.9 倍, *Smad5* の mRNA 発現量も 0.3, 1 および 3  $\mu\text{M}$  の濃度において 1.4 倍, 1.7 倍および 1.8 倍に増加させた. これらのことから, **1** は *Runx2* 等の骨形成誘導遺伝子や *osteocalcin* などの骨形成マーカーを誘導し, 骨芽細胞の分化初期において分化を誘導すると考えられる. 加えて, その作用は BMP/Smad シグナル伝達経路を介している可能性が示唆された.

**2** は 0.3  $\mu\text{M}$  でコントロールと比較して, *Runx2* の mRNA 発現量を 1.4 倍, *osterix* の mRNA 発現量を 1.7 倍, *osteopontin* の mRNA 発現量を 1.9 倍, *osteocalcin*

の mRNA 発現量を 1.4 倍増加させた。また、**2** はコントロールと比較して *Smad1* の mRNA 発現量を 0.3 および 1  $\mu\text{M}$  の濃度において、2.7 倍および 1.7 倍、*Smad4* の mRNA 発現量は 0.3  $\mu\text{M}$  の濃度において 1.4 倍、*Smad5* の mRNA 発現量は 0.3  $\mu\text{M}$  の濃度において 1.4 倍増加させた。**2** は骨形成誘導遺伝子、骨形成マーカーや *Smad* を誘導している可能性があるが、今回の濃度域ではいずれの遺伝子の mRNA 発現量に対しても 0.3  $\mu\text{M}$  を頂点に濃度が高くなると変化を与えなくなる。このことから、0.3  $\mu\text{M}$  より低濃度で検討を行う必要性はあるが、**1** や **9** と比較して **2** は低濃度で作用を示す可能性があると考えられる。

**9** はコントロールと比較して、*Runx2* の mRNA 発現量を 0.3, 1 および 3  $\mu\text{M}$  の濃度において 2.3 倍、1.4 倍および 1.2 倍、*osterix* の mRNA 発現量は 0.3  $\mu\text{M}$  の濃度において 1.3 倍、*osteopontin* の mRNA 発現量は 0.3, 1 および 3  $\mu\text{M}$  の濃度において 2.3 倍、2.2 倍および 1.8 倍、*osteocalcin* の mRNA 発現量は 0.3, 1 および 3  $\mu\text{M}$  の濃度において 1.4 倍、1.5 倍および 2.0 倍、*Smad1* の mRNA 発現量を 0.3 および 1  $\mu\text{M}$  の濃度において、1.6 倍および 1.4 倍、*Smad4* の mRNA 発現量は 0.3, 1 および 3  $\mu\text{M}$  の濃度において 1.4 倍、1.3 倍および 1.3 倍増加させ、*Smad5* の mRNA 発現量に関しては変化させなかった。このことから **9** は、**1** と同様に骨形成誘導遺伝子や *osteocalcin* などの骨形成マーカーを誘導し、骨芽細胞の分化初期において分化を誘導すると考えられる。加えて、その作用は BMP/Smad シグナル伝達経路を介している可能性が示唆された。しかし、**9** は **1** と異なり、0.3, 1, 3  $\mu\text{M}$  と濃度が高くなるほど *Runx2* の発現量が 2.3 倍、1.4 倍、1.2 倍と減少傾向であるのと同じように、*osteopontin* も 2.3 倍、2.2 倍、1.8 倍と減少傾向を示すが、*osteocalcin* は 1.4 倍、1.5 倍、2.0 倍と増加する。よって、*Runx2* の骨形成に対する特性や *osteocalcin* が骨芽細胞分化の中期や後期により産生されることを踏まえると、**9** は骨芽細胞の分化初期だけでなく、後期においても分化促進作用を示す可能性が考えられる。

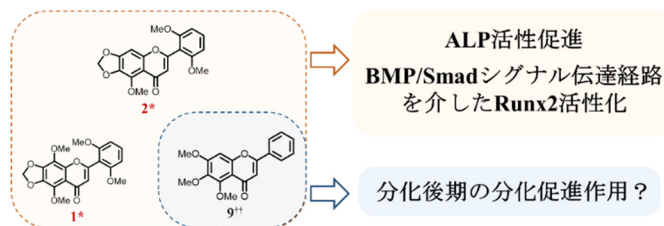


Fig. 8-1. 単離化合物 **1**, **2** および **9** の作用

## 総 括

本研究では、低エストロゲン状態の改善および骨粗しょう症の予防・改善を目指し、ERの活性化および骨形成促進のデュアル作用を示す天然物の探索を行った。

まず、独自に構築した琉球弧植物エキスイブラリー(1531種類)を用いて、ER活性化作用についてスクリーニングを行った。その結果、アカボシタツナミソウ *Scutellaria rubropunctata* var. *rubropunctata* の全草の80%MeOHエキス(SRE)にヒト乳がん細胞増殖作用を伴わない強いERアゴニスト活性が認められた。SREの骨形成への影響を検討したところ、ALP活性や*Runx2*および骨形成マーカーのmRNA発現量へ及ぼす影響から骨芽細胞分化促進作用を有することが示唆された。一方で、石灰化や長期培養時における遺伝子発現への影響から、SREは骨芽細胞の分化初期の分化を促進するが、分化後期では一部の濃度で石灰化を促進するが、骨基質タンパク質の産生には影響を与えない可能性が示唆された。SREの骨芽細胞分化促進作用は、*Smad*のmRNA発現量への影響からBMP/*Smad*シグナル伝達経路を介している可能性があると考えられる。

第2章では、ERの活性化および骨形成促進のデュアル作用を有することが明らかとなったアカボシタツナミソウの成分探索を行った。分配抽出により得た各画分のうち、ERアゴニスト活性およびALP活性化の認められたCHCl<sub>3</sub>可溶画分から2種の新規化合物(1および2)を含む、10種のメトキシフラボン(1—10)を単離した。1および2はメチレンジオキシ構造を有する新規化合物であり、3, 4, 7および10は天然から初めて単離され、5, 6, 8および9はアカボシタツナミソウから初めて単離された化合物であった。

まず、1—10のERアゴニスト活性について検討を行ったところ、いずれの化合物にも活性が認められなかったことから、アカボシタツナミソウのERアゴニスト活性の発現には他の含有成分が関与している、もしくはいくつかの化合物が協働していると考えられる。*Scutellaria*属にはフラボノイドが多く含まれることや共役系によりフラボノイドがUV検出されやすく分離しやすいことなどから、今回単離した化合物はフラボノイドのみであった。しかし、同属植物からはscutelloneやscutalpinなどのジテルペノイドの単離報告も多く存在していること

から<sup>33,34)</sup>, そういった成分が ER アゴニスト活性に寄与している可能性も考えられる。

加えて, **1—10** の骨形成への影響について検討したところ, **1, 2** および **9** に ALP 活性化が認められた. Real-time PCR 法による遺伝子解析の結果, **1** および **9** がアカボシタツナミソウの骨芽細胞分化促進作用の発現に寄与していることが示唆された. 特に, **9** については *Runx2* および骨形成マーカーの mRNA 発現量への影響から, 骨芽細胞分化後期においても分化促進作用を示す可能性が考えられた. SRE は分化の後期において一部の濃度で石灰化を促進したが, **9** の結果を考慮すると, SRE 中に石灰化を促進する化合物と抑制する化合物の両者を含んでいる可能性も考えられる。

第 1 章で検討した SRE および第 2 章で検討した **1, 2** および **9** を通して, いずれも *osterix* の mRNA 発現量に濃度依存的な増加は認められなかった. よって, SRE や **1, 2** および **9** は BMP/Smad シグナル伝達経路だけでなく, 他の骨芽細胞の分化に関わる遺伝子や経路が関与している可能性が考えられた. 例えば, ATF4 も骨形成に関与する遺伝子のうちの 1 つである. JNK 経路で活性化される ATF4 は *Runx2* がノックアウトされた骨芽細胞では働かないが, *Runx2* が発現している骨芽細胞では協調的に作用し, *Runx2* と共に *osteocalcin* などの骨形成マーカーを誘導する<sup>56,57)</sup>. 従って, JNK 経路のような他の骨芽細胞の分化に関わる遺伝子や経路への影響について今後, 更なる検討が行われることを期待する。

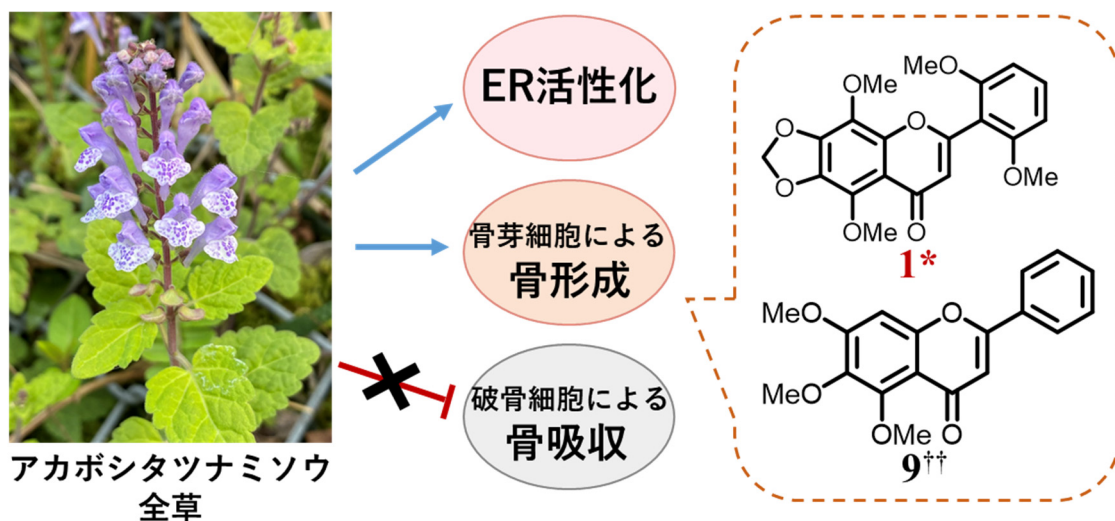


Fig. 9-1. アカボシタツナミソウおよび単離した **1** および **9** の作用

アカボシタツナミソウと同属であり、*Scutellaria* 属の代表的な薬用植物である *S. baicalensis* には *in vivo* で骨密度を増加させた報告や、baicalin および baicalein には骨芽細胞の分化を促進する作用が報告されている<sup>58,59)</sup>。

本研究ではアカボシタツナミソウから 10 種のフラボノイドを得て、このうち 3 種が骨形成を促進する可能性が示唆されたが、フラボノイドには kaempferol や syringetin など骨芽細胞の分化を誘導するものが報告されている<sup>60,61)</sup>。また、今回単離したフラボノイドと同様に複数のメトキシ基を有するヒラミレモン *Citrus depressa* をはじめとする柑橘類に含まれる nobiletin には骨量減少抑制や骨芽細胞の分化促進作用などが報告されている<sup>62-64)</sup>。さらに、フラボノイドの摂取量は骨吸収マーカーと負の関連があるという報告<sup>65)</sup>や女性の脊椎の骨密度と正の関連がある<sup>66)</sup>という報告があり、骨粗しょう症の予防において注目されている。

また、本研究では単離まで至らなかったが、*Scutellaria* 属であることから含まれる可能性が考えられるテルペノイドについても、kirenol などに骨芽細胞の分化を促進する報告がなされている<sup>67-69)</sup>。

骨粗しょう症は日常生活動作 (Activities of Daily Living: ADL) や生活の質 (Quality of Life: QOL) を低下させるだけでなく、寝たきり状態や施設入所状態となる危険因子であるという報告<sup>70)</sup>や、骨粗しょう症による骨密度の低下は死亡リスクを増加させるという報告もなされている<sup>71-74)</sup>。このことから、長期的に考慮すると生存率に影響すると考えられている。そのため、骨粗しょう症の治療だけでなく、骨粗しょう症になる前に骨量減少をできるだけ予防することが大切であると考えられる。現在、セルフメディケーションの推進に伴い、女性の性ホルモンの変動による不定愁訴や骨量減少の予防に対して植物エストロゲンが注目されている。ダイズ由来の植物性エストロゲンである daidzein, genistein やクズに多く含まれる puerarin などの SERM 様作用を示す植物エストロゲンはサプリメントや健康食品に応用されている<sup>75-78)</sup>。今後、*in vitro* でのアカボシタツナミソウのより詳細な作用機序の解析やマウスなどを用いた *in vivo* での ER および骨リモデリングへの影響について評価が行われることで、機能性表示食品などにアカボシタツナミソウエキスが応用され、骨の健康維持に寄与し、健康寿命の延伸に貢献することを期待したい。

## 実験の部

### 1. 分析機器

紫外可視分光光度計は V-730 BIO spectrophotometer (JASCO, Tokyo, Japan), 赤外分光光度計は FT/IR-4200E spectrophotometer (JASCO)を用いた. 旋光度は, P1020 polarimeter (JASCO) を用いて測定した. 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) は, 送液ユニット JASCO PU-2080, 検出器 JASCO UV-2075 を用いて行った. NMR は, JNM ECX-500 型核磁気共鳴装置 (JEOL, Tokyo, Japan) を用いて, 内部標準にはテトラメチルシラン (TMS) を使用した. HR-ESI-MS は, Xevo G2-S Q-Tof tandem mass spectrometer (Waters Co., Milford, MA, USA) を用いた. カラムクロマトグラフィー (C. C.) は, 活性炭 (FUJIFILM Wako Pure Chemical, Osaka, Japan), シリカゲル (63-210 $\mu$ m, Kanto Chemical Co., Inc., Tokyo, Japan), オクタデシルシリル (ODS) 化シリカゲル (120-S150, YMC Co., Ltd., Tokyo, Japan), Sephadex LH-20 (Cytiva, Tokyo, Japan) を用いて行った. HPLC による分取には, Cosmosil Cholester, Cosmosil  $\pi$ NAP (10 mm i.d.×250 mm, Nacalai Tesque Co., Ltd., Kyoto, Japan) を使用した.

### 2. 植物の入手

スクリーニングサンプルとして用いたアカボシタツナミソウは 2019 年 8 月に鹿児島県奄美大島にて採取した. 本植物は, 国立科学博物館所属の分類学者 (田中伸幸氏) により鑑別・同定された. エキスサンプルとして用いるものとは別に標本も作製した (Fig. 10-1). 標本は, 東京薬科大学薬学部 (E08269) および国立科学博物館の標本館 (TNS0134184) に保管されている.

成分探索を行う際に使用したアカボシタツナミソウは, 2021 年 10 月に鹿児島県奄美大島の同じ場所にて採取され, 東京薬科大学薬学部講師の三宅克典氏により鑑別・同定された.



Fig. 10-1. 研究に使用したアカボシタツナミソウの標本

### 3. サンプル調製

植物を乾燥させた後、粉砕機で粉末状にし、粉末 1 g を 10 mL の 80%MeOH で超音波 (15 min) で抽出した。その後、遠心分離 (3000 rpm, 5 min) し、綿栓ろ過後、濃縮した。サンプルとして使用する際には DMSO で溶解、希釈して用いた。

### 4. 細胞培養

ヒト胎児腎細胞株 HEK293 細胞, マウス頭蓋冠由来細胞株 MC3T3-E1 細胞, マウスマクロファージ様細胞株 RAW264.7 細胞およびヒト乳腺癌細胞株 MCF7 細胞は RIKEN BioResource Research Center から提供された細胞株を用いた。

HEK293 細胞および MCF7 細胞はダルベッコ改変イーグル培地 (Dulbecco's Modified Eagle's medium: DMEM, Nacalai Tesque) に 10% fetal bovine serum (FBS, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) および 1% penicilline-streptomycin (P/S, Nacalai Tesque) を加えて調整した液体培地を用いて培養した。

MC3T3-E1 細胞および RAW264.7 細胞はイーグル最小必須培地  $\alpha$  改変型 ( $\alpha$ -minimum essential medium:  $\alpha$ -MEM, Nacalai Tesque) に 10% FBS および 1% P/S を加えて調整した液体培地を用いて培養した。

なお, FBS は補体を失活させるため, 56°C で 30 分間加熱処理を行い, 非働化したものを使用した。

細胞の剥離には trypsin/ ethylenediaminetetraacetic acid (Nacalai Tesque) を用い, 細胞培養は CO<sub>2</sub> インキュベーター MCO-17A1C (SANYO, Tokyo, Japan) にて 37°C, 5%CO<sub>2</sub> にて行った。

#### 5. ER アゴニスト活性ルシフェラーゼレポーターアッセイ

PEI MAX (50  $\mu$ g/mL, Polysciences, Warrington, PA, USA) と Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific) を用いて発現プラスミド pBIND-ER $\alpha$  (50 ng/ $\mu$ L, Promega, Madison, WI, USA) とレポータープラスミド pG5-Luc (50 ng/ $\mu$ L, Promega) をトランスフェクションした。プラスミドとトランスフェクション試薬を混合し, 室温で 20 分間インキュベートした後, 70%コンフルエントにシャーレ上で培養された HEK293 細胞に滴下し, 37°C で 6 時間トランスフェクションした。トランスフェクションした細胞を 96 穴プレートに  $2 \times 10^4$  cells/well で播種し, DMSO を溶媒としてスクリーニングサンプル (10  $\mu$ g/mL), SRE, 1nM 17 $\beta$ -エストラジオール (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 10 nM ICI182,780 (Abcom, Cambridge, UK) を添加して, 37°C で 24 時間培養した。その後, 培地を除去し, luciferase assay system (Promega) を用いて, FLUOstar Omega マイクロプレートリーダー (BMG LABTECH, Ortenberg, Germany) により, 製造者の指示に従って発光を測定した。

#### 6. ALP 活性試験

MC3T3-E1 細胞を  $1 \times 10^5$  cells/ well の密度で 24 穴プレートに播種した。細胞が 90% コンフルエントに達した後, Osteoblast-Inducer Reagent (TaKaRa Bio, Shiga, Japan) を含む分化誘導培地に交換した。その後, SRE または BMP-2 (Bio Legend, CA, USA) とともに 37°C, 5%CO<sub>2</sub> で 72 時間インキュベートした。培地除去後, 生理食塩水で洗浄し, 1% NP-40 (Nacalai Tesque) を加えて細胞抽出を行った。細胞抽出液を 0.2 M Tris-HCl (pH 9.5)/ 1 mM MgCl<sub>2</sub> 緩衝液で希釈し, ALP 活性を測定



した. ALP 活性は, LabAssay™ ALP Kit (FUJIFILM Wako Pure Chemical,) を用いて, 製造者の指示に従って測定した. FLUOstar Omega マイクロプレートリーダーを用いて 405 nm の吸光度を測定し, *p*-ニトロフェノール標準物質の吸光度と比較した. 細胞抽出液のタンパク質濃度は, TaKaRa BCA Protein Assay Kit (TaKaRa Bio) を用いて測定した. ALP 活性試験の結果は, タンパク質 1 μg あたりの *p*-ニトロフェノール濃度をコントロールとの比 (%) で表した.

## 7. 石灰化染色試験

MC3T3-E1 細胞を  $1 \times 10^5$  cells/ well の密度で 24 穴プレートに播種した. 細胞が 90%コンフルエントに達した後, Osteoblast-Inducer Reagent (TaKaRa Bio) を含む分化誘導培地に交換した. その後, SRE または BMP-2 (Bio Legend, CA, USA) とともに 37°C, 5%CO<sub>2</sub> で 72 時間インキュベートした. 3—4 日毎に分化培地の交換およびサンプルの添加を行い, 14 日間もしくは 21 日間培養した. その後, 上清を除去し, 10%ホルムアルデヒド中性緩衝液 (Nacalai Tesque) で細胞を固定した. 固定した細胞を製造者の指示に従ってアリザリンレッド溶液 (IWAI CHEMICALS, Tokyo, Japan) で染色し, 染色の様子を撮影した. その後, 各ウェルに 5%ギ酸を添加して染色を溶解した. 溶解液の 415 nm における吸光度を FLUOstar Omega マイクロプレートリーダーを用いて測定した.

## 8. TRAP 活性試験

RAW264.7 細胞を 96 穴プレートに  $5 \times 10^3$  cells/ well の密度で播種し, 37°C で 24 時間培養した. その後, sRANKL (Oriental Yeast Co., Tokyo, Japan) を添加し, 破骨細胞への分化を誘導し, 同時に SRE を添加した. 37°C で 5 日間インキュベートした後, 上清を除去し, 分化した細胞を溶解して 50 mM citrate buffer (pH4.6)/ 10 mM tartrate/ 0.1%tritonX-100/ 10 mM *p*-Nitrophenyl phosphate Hexahydrate を加えて 37°C, 30 分間インキュベートした. これに 2 mM NaOH を添加して反応を停止し, 405 nm で吸光度を測定した.

## 9. 細胞生存および増殖試験

MCF7 細胞および RAW264.7 細胞を 96 穴プレートに  $1 \times 10^5$  cells/ mL の密度で播種し, 37°C で 24 時間インキュベートした後, SRE を加えて 48 時間または 5 日間インキュベートした. 培養後, 各ウェルに 0.1 mg/mL 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, DOJINDO LABORATORIES, Kumamoto, Japan) を加えて 37°C で 4 時間培養し, 上清を除去した後, 各ウェルに DMSO を加えてフォルマザンの結晶を溶解した. FLUOstar Omega マイクロプレートリーダーを用いて, 波長 570 nm, 基準波長 655 nm でそれぞれの吸光度を測定した.

## 10. 定量的 Real-time PCR

RNeasy mini kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) を用いて, ALP 活性試験および石灰化染色試験と同様に分化させた MC3T3-E1 細胞を用いて製造者の指示に従って total RNA を抽出した. Prime Script RT-PCR kit (Qiagen) と TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice (TaKaRa Bio) を用いて 250 ng total RNA から cDNA を合成した. 定量的 Real-time PCR は, Applied Biosystems® StepOnePlus™ (Thermo Fisher Scientific) を用い, GoTaq® Green Master Mix (Promega) を用いて, 製造者の指示に従って行った. 増幅条件は, 95°C, 2 分間, その後 95 °C, 15 秒間および 65 °C, 1 分間を 40 サイクル行った. 標的遺伝子の mRNA 発現量は, StepOne Software v2.3 を用いて  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法により算出し, 標準化には  $\beta$ -actin を用いた. 各プライマーの配列は以下に示すとおりである (Table 2-1).

Table 2-1. 使用したプライマー配列

<i>Alpl</i>	sense: 5'-GCA GTA TGA ATT GAA TCG GAA CAA C-3' antisense: 5'-ATG GCC TGG TCC ATC TCC AC-3'
<i>Runx2</i>	sense: 5'-AGG GAC TAT GGC GTC AAA CA-3' antisense: 5'-GGC TCA CGT CGC TCA TCT T-3'
<i>Osterix</i>	sense: 5'-CGC TTT GTG CCT TTG AAA T-3' antisense: 5'-CCG TCA ACG TTA TGC-3'
<i>Osteopontin</i>	sense: 5'-ACA CTT TCA CTC CAA TCG TCC CTA C-3' antisense: 5'-GGA CTC CTT AGA CTC ACC GCT CTT-3'
<i>Osteocalcin</i>	sense: 5'-CAG ACA AGT CCC ACA CAG-3' antisense: 5'-GCA GAG TGA GCA GAA AGA-3'
<i>Smad1</i>	sense: 5'-ACG GGT TCG AGA CCG TGT AT-3' antisense: 5'-CAT CCT GCC GGT ATT CG-3'
<i>Smad4</i>	sense: 5'-TGG GTC CGT GGG TGG AAT A-3' antisense: 5'-GAG GTC ATC CAC ACC GAT GC-3'
<i>Smad5</i>	sense: 5'-ACC GCA CAT GCC ACA AAA C-3' antisense: 5'-CAG GGG AAG GAG GAT AGG G-3'
<i>β-actin</i>	sense: 5'-AAG GCC AAC CGT GAA AAG AT-3' antisense: 5'-GTG GTA CGA CCA GAG GCA TAC-3'

## 11. 成分分離

アカボシタツナミソウ *S. rubropunctata* var. *rubropunctata* の全草 (300 g) を 16 L の 80% MeOH で 3 回室温浸漬抽出し、この抽出物を減圧濃縮して 80%MeOH 抽出物 (81.18 g) を得た。これを水に懸濁し、*n*-hexane (3 × 1: 1 v/v), CHCl<sub>3</sub> (3 × 1: 1 v/v), EtOAc (3 × 1: 1 v/v), *n*-BuOH (3 × 1: 1 v/v) で順次分配をした。抽出量はそれぞれ 4.49, 8.21, 7.35, 31.72 g であり、残留した H<sub>2</sub>O 画分は 29.41 g であった。各画分について ER 活性ルシフェラーゼレポーターアッセイおよび ALP 活性試験を行い、CHCl<sub>3</sub> 可溶画分に ER アゴニスト活性 (活性値: 25.4) および ALP 活性化作用 (活性値: 123.6%) が認められた。CHCl<sub>3</sub> 画分について MeOH で活性炭 C. C.

に付し、クロロフィル類を除去した. クロロフィル類の除去された  $\text{CHCl}_3$  可溶画分 (3.52 g) を ODS C. C. (50 mm i.d.  $\times$  200 mm) に付し,  $\text{H}_2\text{O}$ -MeOH (50: 50 $\rightarrow$ 0: 100) で溶出し, Fr. C1—C10 を得た. Fr. C3 (1.58 g) をシリカゲル C. C. (50 mm i.d.  $\times$  120 mm) に付し,  $\text{CHCl}_3$ -MeOH (100: 0 $\rightarrow$ 0: 100) で溶出して, Fr. C31—C35 を得た. C32 から **9** (108.6 mg), C33 から **10** (38.0 mg) をそれぞれ沈殿物として単離した. Fr. 32 (1244.2 mg) を  $\text{H}_2\text{O}$ -MeOH (20: 80) を含む Sephadex LH-20 C. C. (30 mm i.d.  $\times$  600 mm) に付し, Fr. C321—C325 を得た. Fr. 324 (128.4 mg) を 0.1% trifluoroacetic acid (TFA)-MeOH (40: 60) を用いた逆相 HPLC で精製し, **1** (18.2 mg), **2** (13.8 mg), **5** (21.6 mg) を得た. Fr. C4 (487.0 mg) を  $\text{H}_2\text{O}$ -MeOH (20: 80) の Sephadex LH-20 C. C. (20 mm i.d.  $\times$  700 mm) に付し, Fr. C41—46 を得た. C46 から **4** (111.5 mg) を沈殿物として単離した. Fr. C42 (14.8 mg) を 0.1% TFA-MeOH (30: 70) を用いた逆相 HPLC で精製し, **3** (2.1 mg) を得た. Fr. C43 (54.2 mg) を 0.1% TFA-MeOH-MeCN (42: 56: 2) で逆相 HPLC 精製し, **6** (17.1 mg), **7** (13.5 mg), **8** (4.8 mg) を得た (Fig. 10-2).

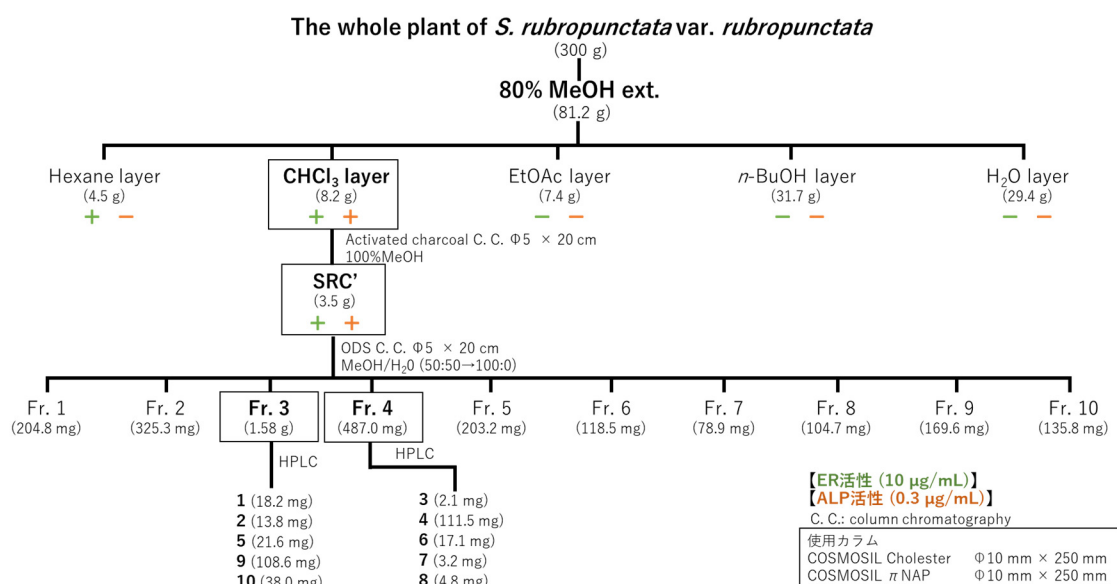


Fig. 10-2. アカボシタツナミソウより得た化合物の単離手順

## 12. 新規化合物の性状

### **5,8,2',6'-tetramethoxy-6,7-methylenedioxyflavone (1)**

amorphous yellow powder

UV  $\lambda_{\max}$  (CH<sub>3</sub>OH) nm (log  $\epsilon$ ): 305 (3.00), 265 (3.23)

IR $\nu_{\max}$  (KBr) cm<sup>-1</sup>: 1624 cm<sup>-1</sup>

HR-ESI-MS:  $m/z$  409.0904 [M+Na]<sup>+</sup> (calcd. for C<sub>20</sub>H<sub>18</sub>O<sub>8</sub>Na, 409.0899)

<sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C-NMR: See Table 1.

### **5,2',6'-trimethoxy-6,7-methylenedioxyflavone (2)**

amorphous colorless powder

UV  $\lambda_{\max}$  (CH<sub>3</sub>OH) nm (log  $\epsilon$ ): 319 (3.05), 262 (3.29)

IR $\nu_{\max}$  (KBr) cm<sup>-1</sup>: 1655 (conj. C=O)

HR-ESI-MS:  $m/z$  379.0794 [M+Na]<sup>+</sup> (calcd. for C<sub>19</sub>H<sub>16</sub>O<sub>7</sub>Na, 379.0794)

<sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C-NMR: See Table 1.

## 13. 統計解析

各試験結果は平均値±SE で表した. 統計解析による比較は JMP14 (SAS Institute, Cary, NC, USA) を用いた Dunnett の多重比較検定による一元配置分散分析 (ANOVA) を行うことにより有意差を表示した.  $p$  値は,  $p < 0.05$  および  $p < 0.01$  に設定した.

## 謝 辞

本研究の実施と論文の作成において御指導, 御助言を賜りました日本大学薬学部 生薬学研究室 松崎 桂一 教授に深く感謝いたします。

本研究を行うにあたり, 有益なるご助言を賜りました 日本大学薬学部薬学科 安川 憲 名誉教授, 古川 めぐみ 博士, 牧野 三津子 博士, 矢萩 弘晃 博士に深く感謝いたします。本研究の遂行および論文作成において, 直接御指導を賜りました 矢作 忠弘 助教に心から深く感謝いたします。

本研究および論文作成につきまして, ご指導および実験材料をご提供いただきました東京薬科大学薬学部 三宅克典 講師, 島根大学医学部 小谷 仁司 講師, 国際医療福祉大学薬学部 小川 拓哉 准教授に深く感謝いたします。

琉球弧植物の採集にご協力いただきました, 大宜見 浩氏 (NEO) に感謝いたします。

各種 MS 測定を行っていただきました目鳥 幸一 博士に感謝いたします。

本研究に特に御協力いただいた同研究室の上倉りなさん, 福富遥都さん, ならびに同研究室の皆さまに深く感謝いたします。

最後に, 長い研究生生活を支えてくださった家族, 友人, 先輩, 後輩の皆さまに深く感謝いたします。

## 引用文献

- 1) 第 16 回健康日本 21 (第二次) 推進専門委員会 資料 3-1, 厚生労働省 (2021).
- 2) 令和 3 年版高齢社会白書, 内閣府 (2021).
- 3) de Vernejoul M.C., Dynamics of bone remodelling: biochemical and pathophysiological basis, *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, **34**(9), 729-734 (1996).
- 4) Yoshimura N., Muraki S., Oka H., *et al.*, Cohort Profile: Research on Osteoarthritis/Osteoporosis Against Disability study, *Int. J. Epidemiol.*, **39**(4), 988-995(2010).
- 5) Woo S.B., Hellstein J.W., Kalmar J.R., Narrative review: bisphosphonates and osteonecrosis of the jaws, *Ann. Intern. Med.*, **144**(10), 753-761 (2006).
- 6) Ruggiero S.L., Mehrotra B., Rosenberg T.J., *et al.*, Osteonecrosis of the jaws associated with the use of bisphosphonates: a review of 63 cases, *J. Oral Maxillofac. Surg.*, **62**(5), 527-534 (2004).
- 7) Shane E., Burr D., Ebeling P.R., *et al.*, American Society for Bone and Mineral Research. Atypical subtrochanteric and diaphyseal femoral fractures: report of a task force of the American Society for Bone and Mineral Research, *J. Bone Miner. Res.*, **25**(11), 2267-2294 (2010).
- 8) Shane E., Burr D., Abrahamsen B., *et al.*, Atypical subtrochanteric and diaphyseal femoral fractures: second report of a task force of the American Society for Bone and Mineral Research, *J. Bone Miner. Res.*, **29**(1), 1-23 (2014).
- 9) Mori H., Torii S., Kutyna M., *et al.*, Coronary Artery Calcification and its Progression: What Does it Really Mean?, *JACC. Cardiovasc. Imaging*, **11**(1), 127-142 (2018).
- 10) Grady D., Rubin S.M., Petitti D.B., *et al.*, Hormone therapy to prevent disease and prolong life in postmenopausal women. *Ann. Intern. Med.*, **117**, 1016-1037 (1992).
- 11) Beral V., Million Women Study Collaborators., Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study, *Lancet*, **362**, 419-427 (2003).
- 12) Silverman S.L., Christiansen C., Genant H.K., *et al.*, Efficacy of bazedoxifene in

- reducing new vertebral fracture risk in postmenopausal women with osteoporosis; results from a 3-year, randomized, placebo-, and activecontrolled clinical trial, *J. Bone Miner. Res.*, **23**, 1923-1934 (2008).
- 13) Berrodin T., Chang K., Komm B., *et al.*, Differential Biochemical and Cellular Actions of Premarin Estrogens: Distinct Pharmacology of Bazedoxifene-Conjugated Estrogens Combination, *Molecular Endocrinology*, **23**(1), 74-85 (2009).
  - 14) Shang Y., Brown M., Molecular determinants for the tissue specificity of SERMs, *Science*, **295**(5564), 2465-2468 (2002).
  - 15) Lonard D.M., Smith C.L., Molecular perspectives on selective estrogen receptor modulators (SERMs): progress in understanding their tissue-specific agonist and antagonist actions, *Steroids*, **67**(1), 15-24 (2002).
  - 16) Smith C.L., O'Malley B.W., Coregulator function: a key to understanding tissue specificity of selective receptor modulators, *Endocr. Rev.*, **25**(1), 45-71 (2004).
  - 17) Parfitt A.M., Osteonal and hemi-osteonal remodeling: the spatial and temporal framework for signal traffic in adult human bone, *J. Cell Biochem.*, **55**(3), 273-286 (1994).
  - 18) Pittenger M.F., Mackay A.M., Beck S.C., *et al.*, Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells, *Science*, **284**, 143-147 (1999).
  - 19) Ducy P., Zhang R., Geoffroy V., *et al.*, *Osf2/Cbfa1*: A transcriptional activator of osteoblast differentiation, *Cell*, **89**, 747-754 (1997).
  - 20) Wu M., Chen G., Li Y.P., TGF- $\beta$  and BMP signaling in osteoblast, skeletal development, and bone formation, homeostasis and disease, *Bone Res.*, **4**, 16009 (2016).
  - 21) Moustakas A., Souchelnytskyi S., Heldin C.H., Smad regulation in TGF-beta signal transduction, *J. Cell Sci.*, **114 Pt 24**, 4359-4369 (2001).
  - 22) Boyle W.J., Simonet W.S., Lacey D.L., Osteoclast differentiation and activation, *Nature*, **423**, 337-342 (2003).



- 23) 小田静夫, “琉球弧の考古学—南西諸島におけるヒト・モノの交流史—,” “地域の多様性と考古学—東南アジアとその周辺—,” 雄山閣, 日本, 2007, pp.37-61.
- 24) 宮城邦治, “南西諸島および沖縄島北部地域の自然環境の特性とその保全.”,” *南島文化*, **15**, 39-50 (1992).
- 25) 島袋敬一, 植物, *沖縄の生物*, 23-32 (1984).
- 26) Ohashi H., Kadota Y., Murata J., *et al.*, “Wild Flowers of Japan Volume 5 Convolvulaceae~Caprifoliaceae,” Heibonsha Limited Publishers, Tokyo, Japan, 2017, pp. 115-119.
- 27) Christenhusz M., Fay M., Chase M., “PLANTS OF THE WORLD AN ILLUSTRATED ENCYCLOPEDIA OF VASCULAR PLANTS FAMILIES,” Royal Botanic Gardens, Kew, Richmond, UK, 2017, p. 577.
- 28) Yahagi T., Ishiuchi K., Atsumi T., *et al.*, Database for the Descriptions about the Efficacies of Crude Drugs Appearing in Successive Textbooks. Part I, *Japan. J. Pharmacog.*, **71**(1), 1-19 (2017).
- 29) Shang hai ke xue ji shu chu ban she, Shogakukan Inc., “中薬大辞典 第4巻,” Shogakukan Inc., Tokyo, 1985, p. 2187.
- 30) American Herbal Products Association, McGuffin M., Gardner Z., “メディカルハーブ安全性ハンドブック第2版,” Tokyodo Shuppan Co. Ltd., Tokyo, 2016, p. 697.
- 31) Chevallier A., “世界薬用植物百科事典,” Seibundo Shinkosha Publishing Co., Ltd., Tokyo, 2000, p. 134.
- 32) Katanoda I., “Illustrated Field Guide to the Flora of Ryukyu,” Nanposhinsya, Kagoshima, 2019, p.174.
- 33) Shang X., He X., He X., *et al.*, The genus *Scutellaria* an ethnopharmacological and phytochemical review, *J. Ethnopharmacol.*, **128**(2), 279-313 (2010).
- 34) Karimov A.M., Botirov E.K., Structural Diversity and State of Knowledge of Flavonoids of the *Scutellaria* L. Genus, *Russ. J. Bioorg. Chem.*, **43**, 691-711 (2017).
- 35) Wang Z.L., Wang S., Kuang Y., *et al.*, A comprehensive review on phytochemistry, pharmacology, and flavonoid biosynthesis of *Scutellaria baicalensis*, *Pharm. Biol.*,

- 56**(1), 465-484 (2018).
- 36) Wang T., Wang S., Xiao D., *et al.*, A review of phytochemistry and antitumor activity of a valuable medicinal species: *Scutellaria barbata*, *J. Med. Plants Res.*, **6**(26), 4259-4275 (2012).
- 37) Zhang Z., Lian X., Li S., *et al.*, Characterization of chemical ingredients and anticonvulsant activity of American skullcap (*Scutellaria lateriflora*), *Phytomedicine*, **16**(5), 485-493 (2009).
- 38) Hiraki Y., Inoue H., Shigeno C., *et al.*, Bone morphogenetic proteins (BMP-2 and BMP-3) promote growth and expression of the differentiated phenotype of rabbit chondrocytes and osteoblastic MC3T3-E1 cells in vitro., *J. Bone Miner. Res.*, **6**(12), 1373-85 (1991).
- 39) Ducy P., Zhang R., Geoffroy V., *et al.*, Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation, *Cell*, **89**(5), 747-754 (1997)
- 40) Liu W., Toyosawa S., Furuichi T., *et al.*, Overexpression of Cbfa1 in osteoblasts inhibits osteoblast maturation and causes osteopenia with multiple fractures, *J. Cell Biol.*, **155**(1), 157-166 (2001).
- 41) Miyata Y., Oshitari T., Okuyama Y., *et al.*, Polymethoxyflavones as agents that prevent formation of cataract: nobiletin congeners show potent growth inhibitory effects in human lens epithelial cells, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **23**(1):183–187 (2013).
- 42) Kikuchi Y., Miyaichi Y., Yamaguchi Y., *et al.*, Studies on the Nepalese Crude Drugs. XII. On the Phenolic Compounds from the Root of *Scutellaria prostrata* JACQ. ex BENTH, *Chem. Pharm. Bull.*, **39**(4), 1047-1050 (1991).
- 43) Tayarani-Najjarani Z., Asili J., Parsaee H., *et al.*, Wogonin and neobaicalein from *Scutellaria litwinowii* roots are apoptotic for HeLa cells, *Rev. Bras. Farmacogn. Braz. J. Pharmacogn.*, **22**(2), 268–276 (2012).
- 44) Park H., Dao T.T., Kim H.P., Synthesis and inhibition of PGE2 production of 6,8-disubstituted chrysin derivatives, *Eur. J. Med. Chem.*, **40**(9), 943-948 (2005).

- 45) Oshitari T., Okuyama Y., Miyata Y., *et al.*, B-Ring-modified and/or 5-demethylated nobiletin congeners: inhibitory activity against pro-MMP-9 production, *Bioorg. Med. Chem.*, **19**(23), 7085-7092 (2011).
- 46) Liao H.L., Hu M.K., Synthesis and anticancer activities of 5,6,7-trimethylbaicalein derivatives, *Chem. Pharm. Bull.*, **52**(10), 1162-1165 (2004).
- 47) Iinuma M., Matsuura S., Kusuda K., <sup>13</sup>C-Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Spectral Studies on Polysubstituted Flavonoids. I. <sup>13</sup>C-NMR Spectra of Flavones, *Chem. Pharm. Bull.*, **28**(3), 708-716 (1980).
- 48) Wang Z., Wang S., Kuang Y., *et al.*, A comprehensive review on phytochemistry, pharmacology, and flavonoid biosynthesis of *Scutellaria baicalensis*, *Pharmaceutical Biology*, **56**(1), 465-484 (2018).
- 49) Pei T., Yan M., Huang Y., *et al.*, Specific Flavonoids and Their Biosynthetic Pathway in *Scutellaria baicalensis*, *Front. Plant Sci.*, **13**, 866282 (2022).
- 50) Takido M., Aimi M., Takahashi S., *et al.*, Constituents in the water extracts of crude drugs. I. Roots of *Scutellaria baicalensis*, *Yakugaku Zasshi*, **95**(1), 108-113 (1975).
- 51) Xianrui L., Cui Z., Isolation and identification of the constituents from *Scutellaria indica* L., *Zhejiang Gongye Daxue Xuebao*, **44**(1), 88-91 (2016).
- 52) Kutney J.P., Hanssen H.W., 5,6,7-Trimethoxyflavone and 5,6,7,8-tetramethoxyflavone from *Zeyhera tuberculosa*, *Phytochemistry*, **10**(12), 3298-3302 (1971).
- 53) Lee H.H., Tan C.H., Syntheses of flavones from *Lindera lucida*, *Journal of the Chemical Society*, **0**, 2743-2749 (1965).
- 54) Sondheimer F., Meisels A., Constituents of *Casimiroa edulis*. VI: 2',5,6-Trimethoxyflavone, 2',5,6,7-tetramethoxyflavone (zapotin), and 5-hydroxy-2',6,7-trimethoxyflavone (zapotinin), *Tetrahedron*, **9**, 139-144 (1960).
- 55) Hosozawa S., Kato N., Munakata K., 5,6,7-Trimethoxy flavone from *Callicarpa japonica*, *Phytochemistry*, **11**(7), 2362 (1972).
- 56) Xiao G., Jiang D., Ge C., *et al.*, Cooperative interactions between activating transcription factor 4 and Runx2/Cbfa1 stimulate osteoblast-specific osteocalcin gene expression, *J. Biol. Chem.*, **280**(35), 30689-30696 (2005).

- 57) Yang X., Matsuda K., Bialek P., *et al.*, ATF4 is a substrate of RSK2 and an essential regulator of osteoblast biology; implication for Coffin-Lowry Syndrome, *Cell*, **117**(3), 387-398 (2004).
- 58) Zhang G., Li C., Niu Y., *et al.*, Osteoprotective Effect of *Radix Scutellariae* in Female Hindlimb-Suspended Sprague-Dawley Rats and the Osteogenic Differentiation Effect of Its Major Constituent, *Molecules*, **22**(7), 1044 (2017).
- 59) Chen L.J., Hu B.B., Shi X.L., *et al.*, Baicalein enhances the osteogenic differentiation of human periodontal ligament cells by activating the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway, *Arch. Oral Biol.*, **78**, 100-108 (2017).
- 60) Sharma A.R., Nam J.S., Kaempferol stimulates WNT/ $\beta$ -catenin signaling pathway to induce differentiation of osteoblasts, *J. Nutr. Biochem.*, **74**, 108228 (2019).
- 61) Hsu Y.L., Liang H.L., Hung C.H., *et al.*, Syringetin, a flavonoid derivative in grape and wine, induces human osteoblast differentiation through bone morphogenetic protein-2/extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway, *Mol. Nutr. Food Res.*, **53**(11), 1452-1461 (2009).
- 62) Matsumoto S., Tominari T., Matsumoto C., *et al.*, Effects of Polymethoxyflavonoids on Bone Loss Induced by Estrogen Deficiency and by LPS-Dependent Inflammation in Mice, *Pharmaceuticals (Basel)*, **11**(1), 7 (2018).
- 63) Harada S., Tominari T., Matsumoto C., *et al.*, Nobiletin, a polymethoxy flavonoid, suppresses bone resorption by inhibiting NF $\kappa$ B-dependent prostaglandin E synthesis in osteoblasts and prevents bone loss due to estrogen deficiency, *J. Pharmacol. Sci.*, **115**(1), 89-93 (2011).
- 64) Pang Y., Liu L., Mu H., *et al.*, Nobiletin promotes osteogenic differentiation of human osteoblastic cell line (MG-63) through activating the BMP-2/RUNX-2 signaling pathway, *Saudi J. Biol. Sci.*, **28**(9), 4916-4920 (2021).
- 65) Hardcastle A.C., Aucott L., Reid D.M., *et al.*, Associations between dietary flavonoid intakes and bone health in a Scottish population, *J. Bone Miner. Res.*, **26**(5), 941-947 (2011).

- 66) Welch A., MacGregor A., Jennings A., *et al.*, Habitual flavonoid intakes are positively associated with bone mineral density in women, *J. Bone Miner. Res.*, **27**(9), 1872-1878 (2012).
- 67) Kim M.B., Song Y., Hwang J.K., Kirenol stimulates osteoblast differentiation through activation of the BMP and Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathways in MC3T3-E1 cells, *Fitoterapia*, **98**, 59-65 (2014).
- 68) Lee Y.S., Choi E.M., Costunolide stimulates the function of osteoblastic MC3T3-E1 cells., *Int. Immunopharmacol.*, **11**(6), 712-718 (2011).
- 69) Suh K.S., Choi E.M., Lee Y.S., *et al.*, Protective effect of albiflorin against oxidative-stress-mediated toxicity in osteoblast-like MC3T3-E1 cells, *Fitoterapia*, **89**, 33-41 (2013).
- 70) Shiraki M., Kuroda T., Shiraki Y., *et al.*, Effects of bone mineral density of the lumbar spine and prevalent vertebral fractures on the risk of immobility, *Osteoporos. Int.*, **21**, 1545-1551 (2010).
- 71) Ensrund K.E., Thompson D.E., Cauley J.A., *et al.*, Prevalent vertebral deformities predict mortality and hospitalization in older women with low bone mass, *J. Am. Geriatr. Soc.*, **48**, 241-249 (2009).
- 72) Nguyen N.D., Center J.R., Eisman J.A., *et al.*, Bone loss, weight loss, and weight fluctuation predict mortality risk in elderly men and women, *J. Bone. Miner. Res.*, **22**, 1147-1154 (2007).
- 73) Suzuki T., Yoshida H., Low bone mineral density at femoral neck is a predictor of increased mortality in elderly Japanese women, *Osteoporos. Int.*, **21**, 71-79 (2010).
- 74) Qu X., Huang X., Jin F., *et al.*, Bone mineral density and all-cause, cardiocascular and stroke mortality: a metaanalysis of prospective cohort studies, *Int. J. Cardiol.*, **166**, 385-393 (2013).
- 75) Cos P., De Bruyne T., Apers S., *et al.*, Phytoestrogens: Recent developments, *Planta Med.*, **69**, 589-599 (2003).
- 76) Picherit C., Coxam V., Bennetau-Pelissero C., *et al.*, Daidzein is more efficient than genistein in preventing ovariectomy-induced bone loss in rats, *J. Nutr.*, **130**, 1675-1681 (2000).

- 77) Bitto A., Burnett B.P., Polito F., Marini H., *et al.*, Effects of genistein aglycone in osteoporotic, ovariectomized rats: A comparison with alendronate, raloxifene and oestradiol, *Br. J. Pharmacol.*, **155**, 896-905 (2008).
- 78) Wong R., Rabie B., Effect of puerarin on bone formation, *Osteoarthr. Cartil.*, **15**, 894-899 (2007).

## 学術雑誌掲載論文目録

本学位論文は、学術雑誌に掲載された下記の論文を基礎とするものである。

- 1) Misaki Watanabe, Tadahiro Yahagi, Takahiro Shirayama, Katsunori Miyake, Hitoshi Kotani, Takuya Ogawa, Keiichi Matsuzaki, Effects of a whole plant extract of *Scutellaria rubropunctata* var. *rubropunctata* on bone metabolism with estrogen receptor activation, *Plants*, **11**(16), 2075 (2022).
  
- 2) Misaki Watanabe, Tadahiro Yahagi, Rina Kamikura, Hitoshi Kotani, Katsunori Miyake, Keiichi Matsuzaki, Methoxyflavones isolated from the whole plant of *Scutellaria rubropunctata* Hayata var. *rubropunctata* promote osteoblast differentiation in MC3T3-E1 cells. *Journal of Natural Medicines*, Online ahead of print (2023).