

た。さらに貯蔵14日目においても細胞が良好な状態で維持されていた。これらの知見より、申請者はマグロ類の貯蔵においては、未凍結状態であればより低温で貯蔵することで重要な品質指標である肉色を長期間に渡って維持できることを明らかにした。

ここまでの結果より、申請者は氷結点以下の過冷却温度域での貯蔵が魚類の鮮度保持に有効であることを明らかにした。しかしながら、過冷却状態は物理的ストレスや環境温度の変化などによって容易に崩壊してしまうため、その安定化が重要であるが、実用的な技術として確立されていない。

そこで第3章では、3魚種（マダイ、ヒラメ、ハマチ）を用い、1日あたり保存温度を0.5℃および1.0℃というきわめて緩慢な早さで下げ、それにより過冷却状態を作り出し、物性・組織構造・タンパク質組成の変化を調べた。その結果、-3.5℃付近まで魚肉の凍結が起きないことを明らかにした。なお、魚肉の破断強度の低下は1.0℃/dayの方が遅い傾向にあったが、コラーゲン線維の崩壊は1.0℃/dayにおいてより早く進行した。

本研究結果は魚肉において、0℃を大きく下回る過冷却状態を作り出すことが可能であることを示したものであり、新しい長期貯蔵方法として今後の期待される。

以上のように本研究は、0℃以下でありながら未凍結状態であるというきわめて特徴的な環境を用いた貯蔵を試みいくつかの重要な新しい知見を得た。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。なお、審査にあたっては、論文に関する専攻内審査および公聴会など所定の手続きを経たうえ、平成24年2月9日、農学研究科教授会において、論文の価値ならびに博士の学位を授与される学力が十分であると認められた。

氏名	道原成和
学位の種類	博士（農学）
学位記番号	農第178号
学位授与の日付	平成24年3月22日
学位授与の要件	学位規程第5条第1項該当
学位論文題目	Studies on anti-osteoporotic action of puerarin, the major isoflavonoid of Kudzu plant (<i>Pueraria lobata</i>) (クズの主要イソフラボノイド、プエラリンの抗骨粗鬆症作用)
論文審査委員（主査）	教授 河村 幸雄
（副主査）	教授 松田 一彦
（副主査）	教授 飯田 彰

論文内容の要旨

高齢化の著しい現在、骨粗鬆症は深刻な問題で、その予防は非常に重要である。特に、女性の閉経後骨粗鬆症では閉経によりエストロゲンレベルが低下することで骨芽細胞と破骨細胞の機能にアンバランスが生じ、骨吸収機能が骨形成機能を上回る結果、骨吸収が亢進し、骨量が減少して骨粗鬆症を発症する。そこでこのエストロゲンと類似構造を持つイソフラボンや多くの有機低分子化合物を含むものにもかかわらず未利用な植物資源であるマメ科植物であるクズに注目し、その骨粗鬆症予防作用について研究を行った。

クズ各部位(根、蔓、一年生蔓、種子、葉、花)をエタノール抽出し、破骨細胞前駆細胞であるRAW264.7細胞の破骨細胞分化過程への影響を検討した。本来、破骨細胞前駆細胞は骨芽細胞と共存して破骨細胞を形成する。骨芽細胞はMCS-Fを分泌して破骨細胞前駆細胞に生存シグナルを伝達し、細胞膜上のRANKLを介して破骨細胞分化シグナルを活性化する。RAW264.7細胞は、MCS-F非存在下において破骨細胞様細胞へと分化するモデル系として有用である。RANKL(100ng/ml)、クズ各サンプルを添加し、骨吸収分子マーカーであるTRAP活性を測定した。クズの試料を添加することにより、TRAP活性の値が低下したことから、それは破骨細胞様細胞形成を抑制していることが推定された。特に蔓・葉・種子・根に抑制効果が認められた。RT-PCRにより、骨吸収マーカーのTRAPの遺伝子発現を検討した結果も同様に抑制効果が認められた。

クズ蔓抽出物を卵巣摘出マウスに経口投与したところ、昂進した骨吸収レベルを正常化し、骨量も回復させた。また、その安全性も確認された。次に、このクズの構成イソフラボンの検討を行った。クズに含まれるイソフラボノイドにはグリコシド型のプエラリン(puerarin)、ダイジン(daizin)、グリシチン(glycitin)、ゲニスチン(genistin)、6"-O-マロニルダイジン(6"-O-malonyldaizin)、6"-O-マロニルグリシチン(6"-O-malonylglycitin)、6"-O-マロニルゲニスチン(6"-O-malonylgenistin)、6"-O-アセチルゲニスチン(6"-O-acetylgenistin)、6"-O-アセチルダイジン(6"-O-acetyldaizin)、6"-O-アセチルグリシチン(6"-O-acetylglycitin)、アグリコン型のダイゼイン(daizein)、ゲニステイン(genistein)、グリシテイン(glycitein)、ホルモノネチン(formononetin)があることがわかり、中でもイソフラボノイドを多く含有する根と蔓にはプエラリンとダイジンが多く含まれていることがわかった。そこで、これらのイソフラボノイドをRAW264.7細胞に添加し、TRAP活性を確認したところ、クズ主要イソフラボンであるプエラリンは細胞毒性を示さず骨吸収抑制効果を示した。

プエラリンをクズ抽出物同様に卵巣摘出マウスに投与した。その結果、プエラリンは昂進した骨吸収レベルを正常化し、骨吸収マーカーのTRAP・カテプシンK・mmp9の遺伝子発現レベルを低下させた。また、組織観察からその骨梁の変化を視覚的に確認できた。

そこで、RANKL誘導性破骨細胞分化に関する情報伝達系に対するプエラリンの効果を検討した。RANKL刺激RAW264.7細胞にプエラリンを添加し、遺伝子および、タンパク質発現を検討した。プエラリンはTRAPやカテプシンKの遺伝子レベルだけでなく、その上流の転写因子であるNFATc1やNFκBの発現レベルの低下、IKBやIkkのリン酸化レベルの低下を促すことが示された。このことはRANKL刺激により、破骨細胞前駆細胞が破骨細胞への分化の情報伝達系の中でIKBを通過する経路に影響を及ぼしていることが判明した。

骨粗鬆症は特に女性において閉経を境に増加し、60歳代では約33%、80歳代には60%を超える発生頻度となる。これは、もともと女性は、最大骨量が男性に比べて低いことと、骨密度の維持に重要な働きをつかさどっている女性ホルモンの閉経期以降急激な低下に伴い、骨量も大きく低下するためである。プエラリンは、エストロゲンと類似構造をもつためエストロゲン様作用を持つかを検討した。エストロゲン依存的細胞増殖を示す乳がん細胞のMCF-7細胞を用いて、エストロゲンアンタゴニストのICI182,780の増殖に与える効果を解析した。プエラリンはMCF-7細胞に対してエストロゲン依存的細胞増殖作用を示さなかった。エストロゲンレセプターとのダイレクトな結合も検討した結果、エストロゲンレセプターα・βの両者に結合しないか、非常に弱い結合しか示さなかった。一方、プエラリンの長期投与マウスにおいても子宮の肥大は確認されなかったことからエストロゲン様作用は非常に弱いと考えられた。

以上のことより、プエラリンはエストロゲンと非常に類似した構造を持つがエストロゲン様作用はほとんど示さず、ERを介さないNFATc1やNFκB、IKBを介する経路に影響を及ぼし、破骨細胞への分化を抑制することで昂進した骨吸収レベルを正常化させていることが明らかとなった。

本論文は、クズ抽出物を骨粗鬆症モデルマウスに経口投与すると、骨代謝を改善する事を示し、それがクズの特有の主要イソフラボノイドであるプエラリンに依る事を示した。次に、プエラリンを同じくマウスに投与した時同じく骨代謝改善作用を示す事を明らかにした。その作用機構が、NFκB経路の調節による事、またエストロゲン受容体を介さない事を証明したものである。

クズは古くから伝統医学の中で痛み止め、解熱剤、風邪薬として用いられ、近年では更年期症状にも用いられるようになってきた。骨研究において、フラボンのような自然由来成分が破骨細胞の分化抑制や閉経による骨量の減少を阻止することが報告されている。しかしながら、そのメカニズムは依然不明のままである。本研究では骨粗鬆症に有効な葛部位を特定し、骨粗鬆症モデルマウスへの影響を検証した。また、有効な成分を特定し、マウスへの検証とそのメカニズムの解明を破骨細胞前駆細胞であるRAW264.7細胞を用いて行った。

RAW264.7細胞はRANKL刺激により破骨細胞に分化する細胞であるが、クズ各部位(根、蔓、一年生蔓、種子、葉、花)のエタノール抽出物を作用させた。骨吸収マーカーの酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼであるTRAPの活性と遺伝子発現を検討した結果、骨吸収阻害認められ、細胞毒性がなく、使いやすい抽出部位は蔓部位であった。そこで、蔓抽出物を骨粗鬆症モデルマウスに投与したところ、昂進した骨吸収レベルを正常化し、尿中骨代謝マーカーを改善した。また、その安全性も確認された。

クズに含まれる各イソフラボンの検討を行ったところ、クズ抽出物にはグリコシド型のダイジン(daizin)、グリシチン(glycitin)、ゲニスチン(genistin)、6"-O-マロニルダイジン(6"-O-malonyldaizin)、6"-O-マロニルグリシチン(6"-O-malonylglycitin)、6"-O-マロニルゲニスチン(6"-O-malonylgenistin)、6"-O-アセチルゲニスチン(6"-O-acetylgenistin)、6"-O-アセチルダイジン(6"-O-acetyldaizin)、6"-O-アセチルグリシチン(6"-O-acetylglycitin)、アグリコン型のプエラリン(puerarin)、ダイゼイン(daizein)、ゲニステイン(genistein)、グリシテイン(glycitein)、ホルモノネチン(formononetin)があることがわかり、中でもイソフラボノイドを多く含有する根と蔓にはプエラリンとダイジンが多く含まれていることがわかった。これらのイソフラボノイドの細胞毒性と破骨細胞への分化抑制作用を検討したところ、プエラリンが細胞毒性がなく、破骨細胞分化抑制作用を有することがわかった。

そこで、プエラリンが動物の骨組織に影響があるかを検討した。プエラリンは昂進した骨吸収を下げ、骨吸収マーカーのTRAP・カテプシンK・mmp9の遺伝子発現レベルを低下させた。また、組織観察からその骨梁の変化を視覚的に確認できた。

プエラリンの骨吸収メカニズムを探るため、RANKL刺激RAW264.7細胞にプエラリンを添加し、遺伝子および、タンパク質発現を検討した。プエラリンはTRAPやカテプシンKの遺伝子レベルだけでなく、その上流の転写因子であるNFATc1やNFκBの発現レベルの低下、p38MAPK、IκBやIkkのリン酸化レベルの低下を促すことが示された。このことはRANKL刺激により、破骨細胞前駆細胞が破骨細胞への分化シグナルの中でIκB、p38MAPK経路に影響を及ぼしていることが判明した。つまり、プエラリンはRANKL-TRAF-NFκB-NFATc1経路とp38MAPK経路を阻害することで、破骨細胞の分化を抑制することがわかった。

更年期障害はエストロゲンの急激な低下によりおこり、更年期骨粗鬆症も例外ではない。プエラリンは骨粗鬆症モデルマウスである卵巣摘出マウスで骨吸収抑制を示したことより、プエラリンにエストロゲン様作用があるかを確認した。エストロゲン依存的に増殖するMCF-7細胞とエストロゲンレセプター結合性試験の結果、プエラリンはエストロゲン様作用が弱いことが確認された。また、プエラリン長期投与マウスにおいても子宮の肥大がなく、同様の見解が得られた。

以上のことより、プエラリンはエストロゲンと非常に類似した構造を持つがエストロゲン様作用はほとんど示さず、ERを介さないNFATc1やNFκB、IκBを介する経路に影響を及ぼし、破骨細胞の分子を抑制することで昂進した骨吸収レベルを正常化させていることが明らかとなった。

よって、本論文は博士(農学)の学位論文として価値あるものと認める。なお、審査に当たっては、論文に関する専攻内審査および修士論文発表会など所定の手続きを経たうえ、平成24年2月9日、農学研究科教授会において、論文の価値ならびに学位を授与される学力が十分であると認められた。