

令和元年6月21日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10909

研究課題名(和文)日向夏みかんから分離した水溶性高分子生理活性多糖類の同定とその作用機序の研究

研究課題名(英文) Identification and functional analysis of water soluble polysaccharide isolated from Hyuganatsu orange

研究代表者

山口 昌俊 (Yamaguchi, Masatoshi)

宮崎大学・医学部・講師

研究者番号：90174630

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：活性分画のメチル化分析を行ったところ、結果活性成分は 3)-Gal-(1 と3)-Ara-(1 を主鎖としたアラビノガラクトサンであることを確認した。この糖をを3T3-E1細胞に作用させ、作用機序を検討したところ、アルカリフォスファターゼ活性を用量依存性に増加させることが分かった。また、BMP-2, Osteocalcin, Runx-2など、骨芽細胞に分化する際に誘導される遺伝子が発現することを確認した。以前より、アラビノガラクトサンが破骨前駆細胞の形成を抑制することがわかっていたので、骨芽細胞と破骨前駆細胞のクロストークに關与することを想定したが、そこまでは明らかにできなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究から、日向夏ミカンに含まれる骨代謝関連物質がアラビノガラクトサンであることが判明した。アラビノガラクトサンは、いろいろな生理活性を持つことが知られているが、骨代謝に対する影響は知られていない。今回の研究の成果をもとに、活性を持つアラビノガラクトサンを添加した日向夏ミカンジュースを企業と連携して作成した。現在、このジュースを使用したヒト試験を、企業との共同研究として計画している。もし、効果あるという結果を得ることができれば、機能性食品の認可を取得し、日向夏ミカンに付加価値をつけることにより、地域社会に貢献できると考えている。

研究成果の概要(英文)：Methylation analysis of active fraction showed polysaccharide was a arabinogalactan contained 3)-Gal-(1 and 3)-Ara-(1 as a main structure. We also identified arabinogalactan increased alkaline phosphatase activity in 3T3-E1 cell, dose dependent manner. Arabinogalactan also induced BMP-2, Osteocalcin and Runx-2 gene in 3T3-E1 cell. These gene is known to be induced when mesenchymal stem cell differentiate into osteoblast. In our previous study, arabinogalactan suppressed osteoclast formation. Therefore, we suspected arabinogalactan affect cross talk of osteoblast and osteoclast cells.

研究分野：産婦人科学

キーワード：アラビノガラクトサン 日向夏ミカン 骨芽細胞 破骨細胞 骨代謝マーカー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

日向夏みかんは宮崎特産の柑橘類である。我々は、この柑橘類に破骨細胞の形成を抑制し、骨芽細胞を刺激する可能性のある物質が含有されていることを発見し、特許を取得した(日向夏みかんを利用した骨代謝改善剤、特許第 4665152 号、登録 2011 年 1 月 21 日)。その後、この物質を利用した栄養食品・飲料の開発を試み、農林水産省の研究費を使用してヒトにおける初回の投与研究を平成 27 年に実施し、ある程度の成果が得られた。その結果、活性物質が多糖類でアラビノガラクトサンに属することを確認できたが、正確な構造を決定できないでいた。また、作用機序の解明が十分ではないため、本研究を計画した。

2. 研究の目的

これまで、我々が見出した水溶性多糖類がアラビノガラクトサンに属するらしいということにはわかっていたが、正確な構造が解明できなかった。そこで、構造決定を勧めることを第 1 の目標にした。また、アラビノガラクトサン類が種々の生理活性を持つという報告はあるが、骨代謝に関する研究はない。さらに、興味あることにこれまでの研究で破骨細胞と骨芽細胞の両者に作用する可能性が示されたが、これまで報告された物質では、両者に作用する物質の報告はほとんどない。そのため、その作用機序を明らかにすることを第 2 の目的とした。

3. 研究の方法

上記の観点から、

- 活性成分と考えられる多糖類をメチル化、さらに加水分解して分解産物を HPLC で分離、どのような糖が分離させるか同定し、糖鎖の構成を解析した。
- 作用機序を明らかにする目的で、3T3-E1 細胞(間葉系幹細胞の細胞株)を使用して、アラビノガラクトサンを最終濃度で 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1mg/ml で添加、14 日間培養した。培養した細胞を固定後、アルカリフォスファターゼを染色して、染色濃度でアルカリフォスファターゼ産生を検討した。さらに、培養細胞から RNA を抽出し、Osteocalcin, BMP-2, RUNX-2 と type 2 コラーゲンの定量的 PCR を行い、18S-rRNA を対象として検討した。さらに、アラビノガラクトサンを 0.025, 0.05, 0.1 µg/ml で添加した細胞から、蛋白を分離し、アクチンを対象として、BMP-2, RUNX-2, Osterix, type 1a コラーゲン, p38, p.p38, JNK/SAPK と p. JNK/SAPK をウェスタンブロット法で検討した。
- 以前から日向夏みかん抽出物が破骨細胞産生を抑制することはわかっていた。今回の検討から、アラビノガラクトサンが間葉系幹細胞を骨芽細胞に分化誘導し、破骨前駆細胞から破骨細胞への分化を抑制する可能性が示された。その機序として、骨芽細胞と破骨細胞がお互いにクロストークすることが報告されているので、この部分に作用するのではないかと推定した。そのため、骨芽細胞と破骨細胞を共培養し、そこにアラビノガラクトサンを添加して効果を検討することを計画した。

4. 研究成果

a) 多糖類構造決定のためのメチル化解析:

1,3,5-tri-O-acetyl-2,4,6-tri-O-methylhexitol, 1,3,4-tri-O-acetyl-2,5-di-O-methylpentitol, 1,4,5-tri-O-acetyl-2,3-di-O-methylpentitol, 2,3,6-tri-O-methyl-D-galactopyranose, 2,3,6-tri-O-methyl-D-galactopyranose と 1,3,4,6-tetra-O-acetyl-2,4-di-O-methylhexitol が検出された。この結果より、3)-Gal-(1 もしくは 3)-Ara-(1 を含む糖鎖、もしくはこの 2 つの糖の繰り返し配列が主鎖となり、5)-Ara-(1 や 4)-Gal-(1 を含んだ側鎖を持つ、分子量が約 7.5 KDa の大きさを持つアラビノガラクトサンであることが判明した。

b) 作用機序に関する研究:

b)-1: 3T3E1 細胞のアルカリフォスファターゼ酸性に対する効果

我々が分離したアラビノガラクトサンは、0~0.5mg/ml の範囲で用量依存性にアルカリフォスファターゼ産生を増加させた。1mg/ml では細胞の変形を認めたため、細胞編成を起こしていると考えられる(図 1)。この結果は、アルカリフォスファターゼは骨芽細胞によって産生されるので、日向夏みかん由来のアラビノガラクトサンが、骨芽細胞としての機能を持ったことを想定させた。

% of ALP Activity

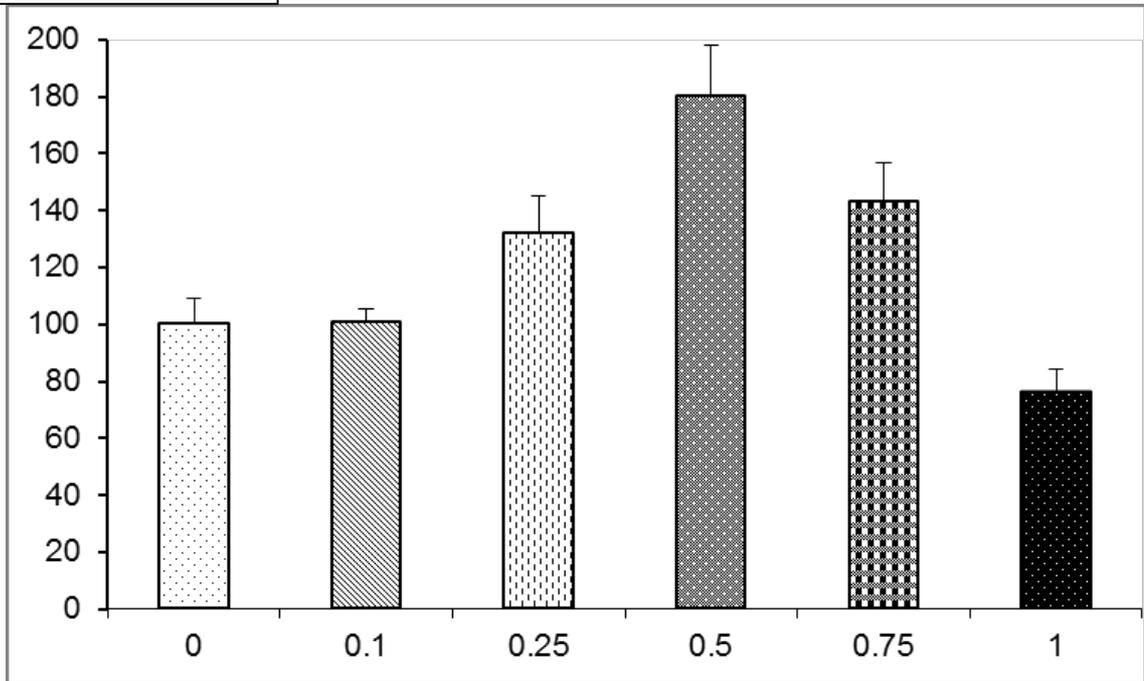


図 1 : 日向夏抽出物(アラビノガラクトサン)のアルカリフォスファターゼ活性に対する効果。0.1 ~ 0.5mg/ml の範囲で、用量依存性にアルカリフォスファターゼ産生を刺激した。

b)-2 : アラビノガラクトサンの 3T3-E1 細胞遺伝子発現に対する効果

アラビノガラクトサンはアルカリフォスファターゼと同様に Osteocalcin, BMP-2 と type2 コラーゲン遺伝子発現を 0~0.5mg/ml の範囲で用量依存性に増加させた。また、0.75mg/ml 以上では遺伝子発現が減少した。RUNX-2 に関しては 0.75mg/ml の濃度で増加させた(図 2)。今回検討した遺伝子は、間葉系幹細胞が、骨芽細胞に分化する際に発現する遺伝子であるので、3T3-E1 細胞(骨芽細胞以外に、脂肪細胞などにも分化する能力がある)が骨芽細胞に分化する方向に動いていることを示唆している。

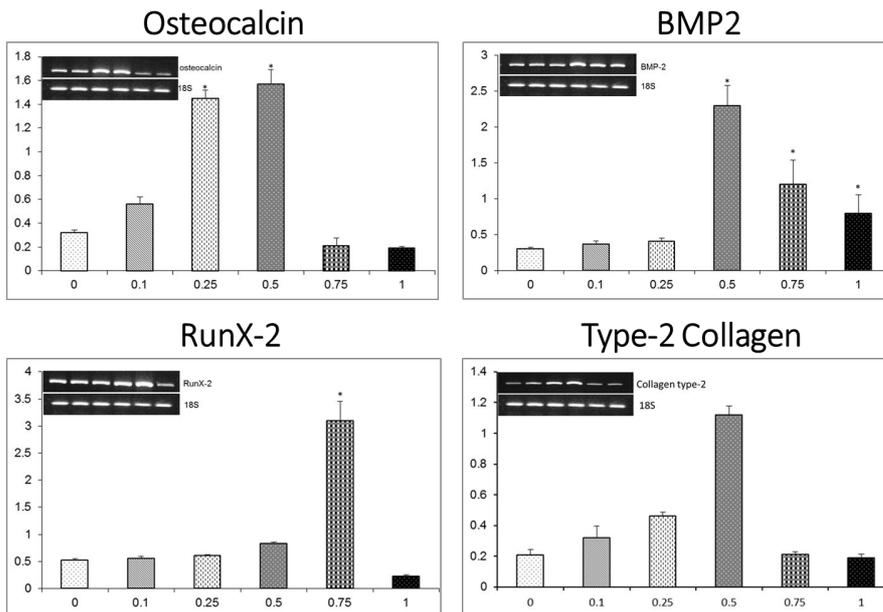


図 2 : アラビノガラクトサンの各種遺伝子発現に対する効果。Osteocalcin, BMP2 や type-2 コラーゲンなど、間葉系幹細胞が骨芽細胞に分化する際に発現する遺伝子が誘導された。

b)-3 : アラビノガラクトサンの各種タンパクに対する効果

アラビノガラクトサンは 0.025, 0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で各種タンパクの産生を用量依存性に増加させた(図 3)。BMP-2, RUNX2, Osterix, type 1a コラーゲンは間葉系幹細胞が骨芽細胞に分化する際に産生されるタンパクなので、単に遺伝子が誘導されるだけではなく、タンパクレベルでも変化があることが明らかになった。また p38 タンパクや JNK/SAPK タンパクとそのリン酸化タンパクも上昇するので、その作用機序として MAP キナーゼ系を介していることが想定された。

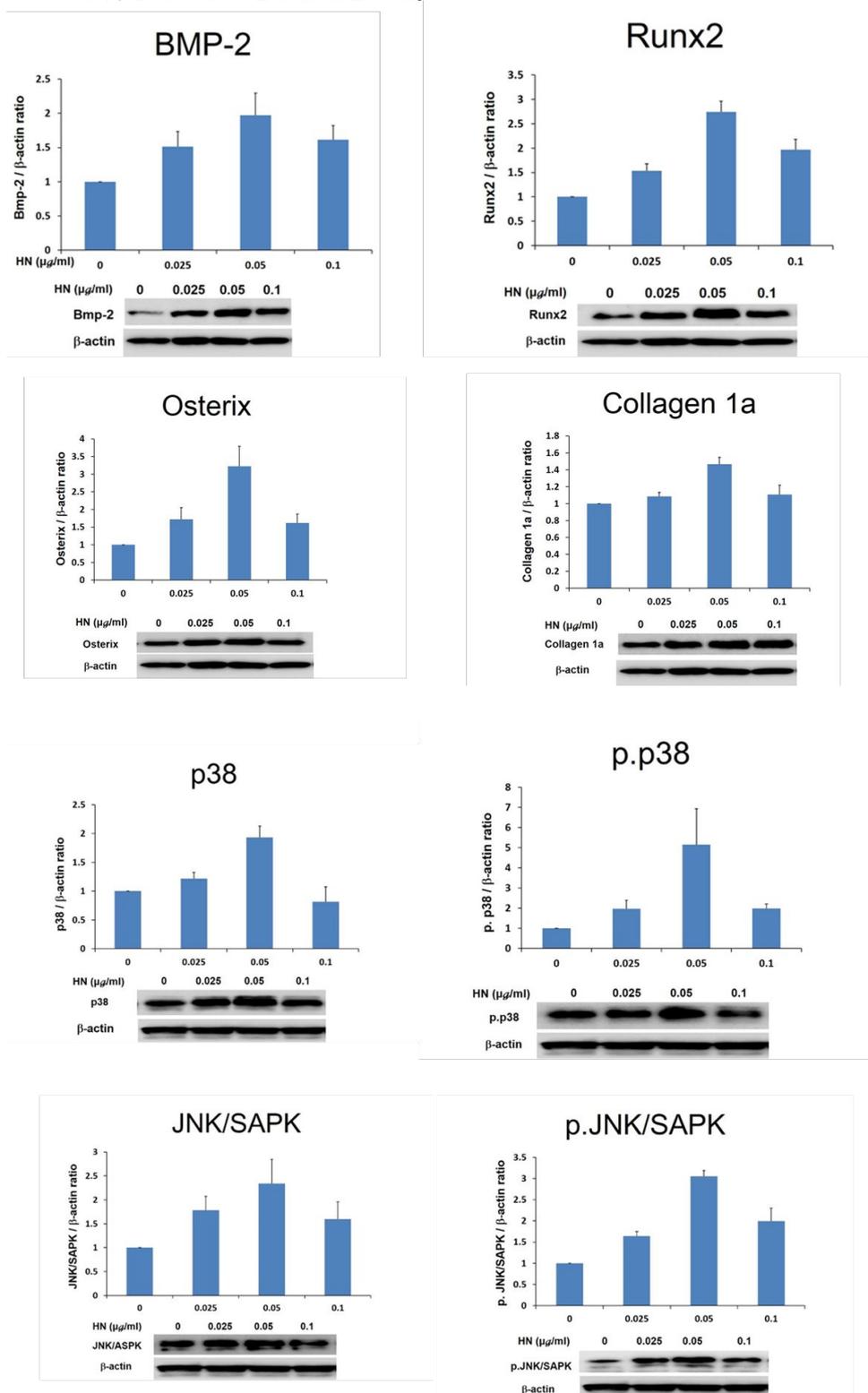


図 3 : アラビノガラクトサンの各種タンパクに対する効果。BMP-2 など骨芽細胞で誘導されるタンパクが増加しており、3T3-E1 細胞が骨芽細胞に分化していることが示唆された。さらに p38 タンパクも増加しており、その機序として MAP キナーゼ系を活性化していることが想定された。

c) 共培養に関する研究：

破骨前駆細胞と骨芽細胞のクロストークに対する効果を検討する目的で破骨前駆細胞と、骨芽細胞の共培養実験を試みたが、条件設定が困難で研究機関内に結果が得られなかった。その理由として、破骨前駆細胞が primary culture 細胞で安定していないことが想定された。今後は、細胞株を用いた検討を継続する予定である。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1件)

Shoko Nishizono, Ayako Matsumi, Hiroko Hata, Munetoshi Miyatake, Taichi Kobayashi, Junko Matsubara, Kenichi Ito Makoto Tsuboi, Yoichiro Sakatani, Masatoshi Yamaguchi, Hiroshi Sameshima
Mechanism underlying the preventative effect of Hyuganatsu orange (*Citrus tamurana* Hort. ex Tanaka) on osteoporosis
Food Science and Technology Research in press

〔学会発表〕(計 5件)

1. Yamaguchi M, Hata H, Sameshima H
Polysaccharaide isolated from Hyuganatsu orange that suppressed rat osteoclast formation should be an arabinogalactan
日本産科婦人科学会第70回学術講演会, H30年5月
2. 山口昌俊, 秦 博子, 鮫島 浩, 宮武宗利, 西園祥子
日向夏みかんに含まれるアラビノガラクトサンの骨代謝マーカーに対する効果
第19回日本骨粗鬆症学会 H29年10月
3. 山口昌俊, 鮫島 浩
日向夏みかんの機能性食品開発に関する研究
第71回日本栄養・食料学会大会 H29年5月
4. Yamaguchi M, Hata H, Sameshima H, Ikenoue T
Effect of Hyuganatsu orange extract containing drink on serum osteogenic parameter.
日本産科婦人科学会第69回学術講演会 H29年4月
5. 山口昌俊
医食農連携による日向夏搾汁残渣を用いた骨代謝改善素材、飲料の実用化開発
第28回さんわかセミナー H29年1月

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
なし

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名(1)：マデュエスタ ハリシャクマール

ローマ字氏名：Harishkumar Madhyastha

所属研究機関名：宮崎大学

部局名：医学部

職名：助教

研究者番号（8桁）：00543951

研究分担者氏名(2)：宮武 宗利

ローマ字氏名：MIYATAKE MUNETOSHI

所属研究機関名：宮崎大学

部局名：工学部

職名：助教

研究者番号（8桁）：40315354

(2)研究協力者

研究協力者氏名：なし

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。