

令和 3 年 5 月 18 日現在

機関番号：35409

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K17990

研究課題名（和文）変形性関節症と骨粗鬆症の双方に有効な食品機能成分の探索と作用機構の解明

研究課題名（英文）The effect of functional ingredient for osteoarthritis and osteoporosis and its mechanism

研究代表者

柴田 紗知 (Shibata, Sachi)

福山大学・薬学部・講師

研究者番号：90803940

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：健康寿命を縮める主な要因の一つである運動器疾患の患者数は増加傾向にある。運動器疾患の発症や進行抑制に食生活も重要な役割を果たすと考えられている。そこで、主要な運動器疾患のうち、変形性関節症と骨粗鬆症に対して有効に作用する食品機能成分の探索と作用機序の解明を行った。その結果、サワラの主成分ピシフェリン酸や酒粕含有成分による変形性関節症予防効果や骨粗鬆症予防効果を明らかにした。さらに、マウスへの投与実験を行い、ピシフェリン酸等の食品機能成分を経口摂取することによる運動器疾患予防効果を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

健康寿命を縮める主な要因である運動器疾患の患者数は増加傾向にある。現代の日本において、運動器疾患の患者数の大半を、変形性関節症と骨粗鬆症が占めている。本研究において、軟骨細胞保護効果を示すピシフェリン酸等の食品機能成分が破骨細胞の分化も抑制することや経口摂取による有効性を見いだすことができた。またこれらの作用機序に炎症性サイトカインの関与を明らかにした。これらの結果は、食品機能成分による運動器疾患の予防や進行抑制に応用できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：We investigated the effects of functional ingredient for osteoarthritis and osteoporosis. Our result suggests that Pisiferic acid (PA) and Sake cake have the beneficial effect on osteoarthritis and osteoporosis. Some compounds were evaluated by oral administration to senescence-accelerated mice prone 8. It is possible that some functional ingredient might exert an alleviation effect against the Locomotor disorders.

研究分野：食品機能学

キーワード：骨粗鬆症 破骨細胞分化抑制 食品・栄養成分

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

高齢化が進む現代において、健康寿命を延ばすことは重要な課題である。健康寿命の短縮をもたらす主な要因である認知症・メタボリックシンドローム・ロコモティブシンドローム(運動器疾患)の予防に、食生活も重要な役割を果たすと考えられており、科学研究の成果を取り入れた食生活による疾病予防が期待されている。運動器疾患は健康寿命を縮める主要因の一つであることから、予防や進行抑制が極めて重要である。そのため、運動器疾患の発症を未然に防ぎ進行を遅らせることが期待されており、食生活も重要な役割を果たすと考えられている。代表的な運動器疾患として、変形性関節症・骨粗鬆症が挙げられる。関節の老化現象に起因する変形性関節症は、生活の質を低下させるとともに、筋力の低下を引き起こすため、予防や進行抑制が重要である。しかしながら、食品機能成分による関節保護効果の報告はグルコサミン(Arthritis Rheum. 2013)等、わずかしかない。また、骨粗鬆症は、加齢による骨量の低下や骨質の劣化が過度に進行した疾患で、骨折等を招き要介護状態につながることから、高齢者の健康寿命を延ばすことに骨粗鬆症の予防は重要である。骨粗鬆症の予防について、さまざまな食品機能成分の効果が検討されているが、変形性関節症と骨粗鬆症の双方に効果を示す決定的な成分は見いだされていない。したがって、本研究において変形性関節症と骨粗鬆症の双方に有効な食品機能成分を見いだすことができれば、健康寿命の延伸へ大きく貢献できると考え研究するに至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、変形性関節症の予防効果を発揮する食品機能成分による骨粗鬆症の予防効果を明らかにし、双方に有効な食品機能成分を解明することである。そのため、軟骨細胞保護効果を有する食品機能成分の破骨細胞分化抑制効果を明らかにすることを目的に検討を行った。さらに、老化促進マウスへの投与実験を行い、経口摂取による両疾患への有効性を明らかにすることを目的に検討を行った。

3. 研究の方法

(1) 軟骨細胞保護効果と破骨細胞分化抑制効果を示す食品機能成分の探索

軟骨細胞保護効果を示す食品機能成分の破骨細胞分化抑制効果について明らかにすることを目的に検討を行った。試験はマウス大腿骨および脛骨から採取した骨髄細胞を用いて行った。骨髄細胞に対して、破骨細胞増殖因子であるマクロファージコロニー刺激因子と破骨細胞分化因子であるNF- κ B活性化受容体で処理し、破骨細胞へと誘導する培養細胞系を用いて検討した。食品機能成分が、破骨前駆細胞から破骨細胞への成熟や増殖を抑制するか、酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼを用いて評価した。検討した食品機能成分は、ピシフェリン酸・オレイルエタノールアミド・リノレイルエタノールアミド・フェルラ酸・S-アデノシルメチオニンや地域の特産品であるレモンに含まれるエリオシトリン等である。軟骨細胞保護効果が未検討の成分については、まず軟骨細胞保護効果についてスクリーニング試験を実施したのちに、軟骨細胞保護効果が明らかになった成分について、破骨細胞分化抑制効果を明らかにした。

また、遺伝子レベルでの解析として、mRNA発現量を経時的に調べた。破骨細胞関連マーカーであるカテプシンK等の発現について、Real-time PCRを用いて検討した。さらに、破骨細胞を用いて、RNAシーケンスを実施しどのような系に影響を及ぼしているか、網羅的な解析を行った。

(2) 老化促進マウスへの投与実験

細胞レベルで破骨細胞分化抑制効果を示した食品機能成分について、老化促進マウス(senescence accelerated mouse prone 8; SAMP8)への経口投与実験を行った。SAMP8は10ヶ月齢前後で膝等の運動器に関する疾患を発症する。そのため、加齢による運動器疾患の検討を行うことに適したモデル動物であるといえる。10ヶ月にわたって食品機能成分の投与実験を行い、飼育期間中には運動機能測定を実施した。飼育終了後には血中の骨型アルカリフォスファターゼ値等を測定した。また、大腿骨のCTを撮影し骨密度について等を解析した。さらに免疫染色を行い変形性関節症予防効果と骨粗鬆症予防効果を組織化学的に解析した。

くわえて、運動機能と脳機能は密接にかかわることから、飼育期間中には新奇物体認識試験・明暗箱試験等の行動科学解析や握力測定等の運動機能解析を行った。

4. 研究成果

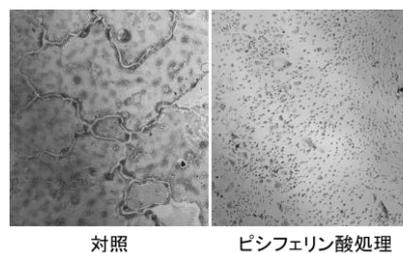
(1) 軟骨細胞保護効果と破骨細胞分化抑制効果を示す食品機能成分の探索

酒粕含有成分のうち、オレイルエタノールアミド、リノレイルエタノールアミド・フェルラ酸・S-アデノシルメチオニン等について、軟骨細胞保護効果を検討した。その結果、ヒト軟骨細胞においてオレイルエタノールアミド処理した細胞で、MMP13の発現が抑制されることが明らかになった。また、IL-6も発現を抑制することが分かった。破骨細胞分化抑制効果については酒粕含有成分について検討した結果、オレイルエタノールアミド処理した細胞で破骨細胞の分化を抑制する傾向が見られたものの、その他の酒粕含有成分では明確な差は見られなかった。ハーブ及び樹木成分由来の機能成分について検討した結果、破骨細胞を用いた実験において、ピシフェリ

ン酸が破骨細胞の分化を抑制することを明らかにした（右図）。エリオシトリンやカキ抽出液の軟骨細胞保護効果・破骨細胞分化抑制効果は示されなかった。

そこで、ピシフェリン酸による破骨細胞分化抑制効果の作用機序について検討したところ、化学構造が類似するローズマリー由来カルノシン酸の生理活性作用として知られている keap1-Nrf2 系の活性化作用やオートファジー活性化作用について検討したものの活性作用は示されなかった。そのため、RNA シークエンスで破骨細胞分化実験におけるパスウェイ解析をしたところ、ピシフェリン酸はケモカインファミリーの活性化に関与する可能性を見いだした。

さらに、破骨細胞分化実験での RNA シークエンスの結果を Gene Ontology 解析したところ、ピシフェリン酸処理した細胞は、ケモカインファミリーの活性化にくわえ、アミロイドの活性を抑制することがわかった。これらのことから、ピシフェリン酸はアミロイドの活性を抑制し、ケモカインファミリーを活性化することで破骨細胞の分化を抑制することが示された。

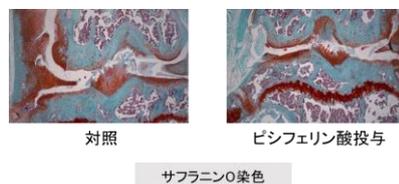


破骨細胞分化抑制効果
対照…破骨細胞分化が進行
ピシフェリン酸処理…破骨細胞分化が抑制

(2) 老化促進マウスへの投与実験

・ハーブ及び樹木由来機能成分

シソ科ローズマリーの主成分カルノシン酸の経口摂取による有効性を見いだしていることから、その構造類似体であるピシフェリン酸の経口摂取による有効性を検討した。その結果、ピシフェリン酸摂取により老化抑制効果や握力維持効果が明らかになった。飼育終了後にはサフラニンO染色や Trap 染色による組織化学解析や骨塩量・骨密度について実施した。その結果、対照と投与群の間に有意な差は見られなかった（右図）。

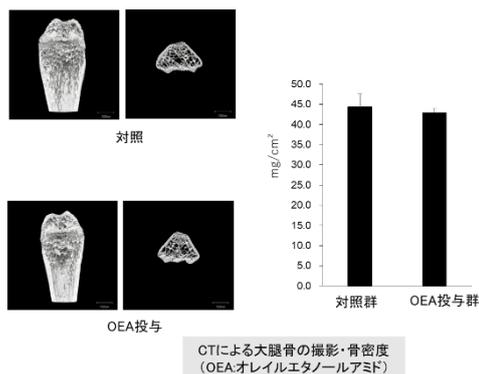


・酒粕含有成分

軟骨細胞保護効果と破骨細胞分化抑制効果が明らかになった酒粕含有成分について経口摂取による有効性を明らかにするために、オレイルエタノールアミドの老化促進マウス SAMP8 への経口投与実験を実施した。長期間オレイルエタノールアミドを経口摂取することによる運動器への影響を検討した結果、運動量測定において、運動量と立ち上がり回数の項目において、両群に有意な差はみられなかったが、運動量と立ち上がり回数共にオレイルエタノールアミド投与群の方が多結果となった。

また、握力測定について、四肢の握力が対照群と比べオレイルエタノールアミド投与群が有意に高い値を示した。このことから、オレイルエタノールアミドを経口摂取することは運動機能を維持する可能性が示された。飼育終了後に、ヒラメ筋と腓腹筋を摘出し重量を測定したが、両群に差はみられなかった。

さらに、高濃度オレイルエタノールアミドを経口摂取することによる有効性を検討するために、SAMP8 への経口投与実験を実施したが握力や筋肉量を測定した結果、両群に有意な差はみられなかった。くわえて、骨塩量や骨面積、骨密度について検討した結果、両群に有意な差はみられずCTによる大腿骨の撮影を行ったものの、両群に顕著な差はみられなかった（右図）。



・複合投与実験

2 種類の食品機能成分を同時に経口摂取することによる運動器への影響について検討を行った。その結果、カルノシン酸と α -グリセロホスホコリンを同時に経口摂取した群は、対照群や単独投与群と比べ握力が維持されていることが分かった。オレイルエタノールアミドとピシフェリン酸を同時に経口摂取した群でも同様のことが言え、複数の食品機能成分を経口摂取することで相加相乗効果が期待できることが明らかになった。

今後は詳細な作用機序を解明するとともに、変形性関節症や骨粗鬆症と並ぶ運動器疾患である関節リウマチへの食品機能成分の有効性について検討を進める必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Izu H, Shibata S, Fujii T, Matsubara K	4. 巻 23
2. 論文標題 Sake cake (sake-kasu) ingestion increases branched-chain amino acids in the plasma, muscles, and brains of senescence-accelerated mice prone 8	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1490-1497
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/09168451.2019.1621155	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ishitobi H, Sanada Y, Kato Y, Ikuta Y, Shibata S, Yamasaki S, Lotz MK, Matsubara K, Miyaki S, Adachi N	4. 巻 830
2. 論文標題 Carnosic acid attenuates cartilage degeneration through induction of heme oxygenase-1 in human articular chondrocytes.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Eur J Pharmacol.	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ejphar.2018.04.018.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 柴田紗知、海切弘子、伊豆英恵、越智順也、桜井奏慧、花崎未彩、藤井力、松原主典
2. 発表標題 オレイルエタノールアミドを経口摂取することによる有効性の検討
3. 学会等名 日本農芸化学会西日本・中四国支部合同大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 柴田紗知、萱島知子、川岡知博、味八木茂、松原主典
2. 発表標題 SAMP8におけるカルノシン酸の抗老化作用
3. 学会等名 老化促進モデルマウス（SAM）学会 学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sachi Shibata, Jyunya Ochi, kanae Sakurai, Kiminori Matsubara
2. 発表標題 The effect of orally administered carnosic acid and piciferic acid in the P/8 line of the senescence-accelerated mouse model (SAMP8)
3. 学会等名 FFC's 26th International Conference and Expo - 14th International Symposium of ASFFBC (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

福山大学 分子免疫学研究室HP https://www.fukuyama-u.ac.jp/pharm/pharmacy/labo-list/mol-immun/ 研究者情報 http://rdbv.fukuyama-u.ac.jp/view/5e4gA/
--

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------