

研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2006～2009
 課題番号：19500610
 研究課題名（和文） 柑橘系フラボノイドであるヘスペリジンによる骨代謝調節機構の解明
 研究課題名（英文） Regulatory mechanism of hesperidin, a citrus flavonoid, in bone metabolism and prevention of osteoporosis
 研究代表者
 千葉 大成 (CHIBA HIROSHIGE)
 城西大学・薬学部・医療栄養学科・助教
 研究者番号：30337779

研究成果の概要（和文）：

柑橘系フラボノイドであるフラバノン配糖体のヘスペリジンはコレステロール合成の律速酵素である3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル CoA レダクターゼ(HMG-CoA)還元酵素を阻害し、肝臓のコレステロール合成を調節することが報告されている。一方、Mundy らはスタチン系薬剤のコレステロール低下作用だけでなく、骨形成促進および骨吸収について報告している。本研究ではヘスペリジンの骨代謝に及ぼす影響について骨粗鬆症モデルマウスである卵巣摘出マウスを用いて検討したところ、スタチンと同様なメカニズムで骨量減少を抑制する可能性が示唆され、低分子 GTP 結合タンパク質の Rho-A の活性化が抑制されることで骨代謝調節が行われることが推察された。

研究成果の概要（英文）：

Among the naturally occurring citrus flavonoids, hesperidin, a flavanon glycoside, also regulates hepatic cholesterol synthesis by inhibiting the activity of 3-hydroxy-3-methylglutanyl coenzyme A (HMG-CoA) reductase. On the other hand, Mundy et al. reported that statins, cholesterol lowering agents, induce bone formation and inhibit bone resorption both in vitro and in vivo. I examined the effects of hesperidin on bone metabolism in ovariectomized mice, animal models of osteoporosis. The results of my experiment suggest that hesperidin may act on bone by the same mechanism as that of statins, and hesperidin effects on bone metabolism which inhibit activation of Rho-A by mevalonate-GG-PP metabolic pathways.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
19年度	1,300,000	390,000	1,690,000
20年度	1,100,000	330,000	1,430,000
21年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学、応用健康科学

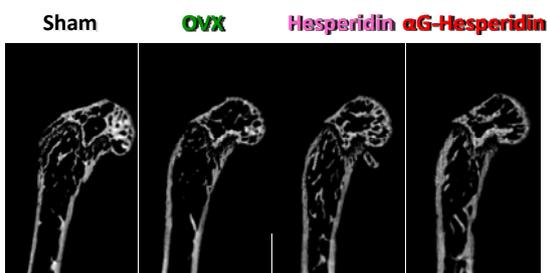
キーワード：骨粗鬆症、フラボノイド、ヘスペリジン、骨密度、骨吸収

科学研究費補助金研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

柑橘系の果皮などに含まれるヘスペリジンはコレステロール合成の律速酵素である HMG-CoA 還元酵素を阻害し、血漿および肝臓脂質の増加を抑制することが報告されている(Bok SH et al, J Nutr, 129:1182-5, 1999)。一方、高脂血症治療薬であるスタチン系製剤(商品名:メバロチン)の多機能性の一つとして骨代謝への作用が注目されている。Mundy Gらはスタチンをヒト骨肉種由来の骨芽細胞様細胞 MG63 に添加し、骨形成修飾因子である BMP-2 の遺伝子およびタンパクの発現促進を確認し、さらに、マウスの頭蓋骨の器官培養実験において、スタチン投与による骨芽細胞数と新生骨量増加を確認している(Mundy G et al, Science, 286:1946-9, 1999)。このメカニズムについては、骨芽細胞における BMP-2 産生がスタチンにより促進され、未分化細胞や前駆細胞に作用し、骨芽細胞への分化促進を推測している。また、*in vivo* の実験系においても卵巣摘出(OVX)ラットへのスタチン投与で、骨形成速度の増加および破骨細胞数の減少が確認され、スタチンは骨形成の促進のみならず、骨吸収抑制にも働くことが示唆されている。

申請者はこれらの二つの報告を考え合わせ、ヘスペリジンによる骨量減少抑制効果の可能性について推測し、動物実験を中心とした研究をこれまで進めてきた。これまでの実験で、申請者は骨粗鬆症モデルマウスである OVX マウスに通常のヘスペリジン(H) とヘスペリジンに水溶性を一万倍に高めた酵素処理をしたグルコシルヘスペリジン(α G)の 2 種類を用いて骨密度への効果について検討している。この結果、ヘスペリジンによって血中コレステロールを低下し、大腿骨における骨量減少を抑制する効果を確認している(Chiba H et al, J Nutr, 133:1892-7, 2003, 図 1)。



(図 1 大腿骨遠位部海綿骨の μ CT スキャン画像)

さらに、申請者は男性骨粗鬆症モデルである精巣摘出(ORX)マウスにおいてヘスペリジン投与により骨量減少を抑制し、ポジティブコントロールに設定したスタチン投与群とほぼ同等の効果が示される事も確認した(投稿中)。また、OVX により予め骨量を大幅に低下させてからヘスペリジンを投与した実

験を行ったところ、骨量回復効果が示された(投稿中)。すなわち、ヘスペリジンはスタチンと同様な効果を示すことから、HMG-CoA 還元酵素阻害と骨代謝の関係に着目することで、薬剤を使用しない骨粗鬆症を予防する食品物質としての可能性が推測され研究計画を構築した。

2. 研究の目的

骨代謝とフラボノイドに関する研究では、世界的に活発に行われ、特に大豆イソフラボンが骨に対してエストロゲン様作用を發揮することで骨量減少を抑制することが確認されている(Ishimi et al, Endocrinology 140:1893-1900, 1999)。また、フラボノイドの中でルチンによる卵巣摘出ラットの骨量減少抑制効果も報告されている(Horcajada-Molteni MN et al, J Bone Miner Res, 15: 2251-8, 2000)。さらに健康女性 62 名において、果物や野菜の摂取が骨の健康と深く関与することが示唆(New SA et al, Am J Clin Nutr, 71: 142-151, 2000)された。しかし、これまでのフラボノイドによる骨代謝調節に関する研究報告は「エストロゲン様作用」を介した知見が多く、HMG-CoA 還元酵素の阻害剤に着目した骨代謝に関する研究は全くみられていない。

一方、側鎖に窒素を含有するビスホスホネートがメバロン酸合成経路の阻害により破骨細胞の機能低下を誘導することが報告されている(Thompson K et al, Biochem Biophys Res Commun, 287, 337-342, 2001)。この機序は低分子量グアノシン三リン酸(GTP)結合タンパク質(Rho, Ras, Rab, Rac など)のプレニル化を抑制し、細胞膜への結合を阻害することで、破骨細胞骨格の破壊による波状縁の消失やアポトーシス誘導によって制御していることを推察している。また、低分子量 GTP 結合タンパク質ファミリーである Rho-A はグラニルピロリン酸(GG-PP)により活性化となり、骨芽細胞における骨形成修飾因子である BMP-2 発現を抑制することが報告されている。

以上のことから、食品成分による新たな骨代謝調節機構として、コレステロール合成経路を介したヘスペリジンの骨代謝調節を推測し、「ヘスペリジンによる骨代謝制御メカニズムの解明」を検討した。

3. 研究の方法

(1) メバロン酸-GG-PP 代謝経路に及ぼすヘスペリジンの効果

8 週齢 ddY 雌性マウスに卵巣摘出術(OVX)および偽施術(Sham)を施し、卵巣摘出骨粗鬆症モデル動物を作製した。AIN-93G 組成を基準食とした精製飼料に酵素処理を行っていないヘスペリジン(H)または酵素処理を行っ

たヘスペリジン(α G)を含む飼料(*ヘスペリジン含有量として両成分とも 0.5%のヘスペリジン)を作成した。

被験動物は AIN-93G 食を投与した Sham 群および OVX 群と OVX+H 投与群、OVX+ α G 投与群の計 4 群を設け、2 ヶ月間飼育した。一方、骨形成に対する作用を検討するため、屠殺 6 日前および 2 日前にカルセインを皮下投与して骨を蛍光ラベルさせた。解剖後、大腿骨を摘出し、X 線 CT 法により骨密度を測定するとともに、大腿骨骨幹部および遠位部の組織切片を作製した。骨幹部は骨形成、遠位部は骨吸収に関する骨形態計測を行った。

さらに、血清中骨代謝マーカーである I 型コラーゲン C 末端テロペプチド(骨吸収マーカー)やオステオカルシン(骨形成マーカー)も測定を行った。また、脛骨より総 mRNA を抽出し、骨形成修飾タンパクである BMP-2、破骨細胞と骨芽細胞のリモデリングサイクルに関する receptor activator of NF- κ B (RANK) / receptor activator of NF- κ B Ligand : NF- κ B 活性化受容体リガンド(RANKL) の mRNA 発現量を RT-PCR にて測定した。

(2) 破骨細胞形成・分化に対するヘスペレチンの抑制効果

骨代謝は破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成により維持されている。破骨細胞はマクロファージ系前駆細胞から分化されるが、その分化は骨芽細胞による骨形成により維持されている。RANKL は TNF- α スーパーファミリーに属する膜結合型のサイトカインであり、主に骨芽細胞上に発現する。破骨細胞は RANKL が必須で、IL-1、PGE2、 $1 \cdot 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ などの骨吸収因子が骨芽細胞に作用する RANKL 発現が亢進し、マクロファージは RANKL の受容体である RANK を有し、RANKL の結合により破骨細胞への分化が促進されることが知られている。

まず、骨細胞培養を行うために、マウス大腿骨を無菌的に摘出し、0.25M ショ糖液で洗浄後、皮質骨と海綿骨に分け、ヘスペリジンのアグリコンであるヘスペレチン等を含む培養液中で、上記骨組織片を 37°C 条件下で 48 時間、5%CO₂ インキュベーター中で培養した。なお、培養液のみで培養したものを control とした。インキュベーター中で培養した後、組織片を 0.25M ショ糖液で洗浄、乾燥後、骨重量を測定し、組織片に濃硝酸を加えて 120°C で 12 時間灰化し、骨カルシウム量を定量した。一方を超音波処理した後、遠心分離して上清を酵素液として定法にて骨アルカリ性ホスファターゼ活性を調べた。また、骨組織中の細胞数の指標として、DNA 量を定量した。培養後、組織片を 0.25M ショ糖液で洗浄し、湿重量を測定後、粉碎し、4°C で 24 時間浸透させた。この液を遠心分離し、上清を試料として定量した。

さらに、頭蓋冠器官培養を行うために、マウス骨髄細胞と新生児マウス頭蓋骨より採取した骨芽細胞の共存培養系に $1 \cdot 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 、PTH、PGE2、IL-1、などを添加し、この共存培養系で形成される破骨細胞にヘスペレチン(10^{-8} – 10^{-6}M)を添加し、酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ(TRAP)活性および象牙質の吸収を指標にし、破骨細胞への分化・形成に対するヘスペレチンによる抑制作用も評価した。

以上の方法によって網羅的にヘスペリジンによる骨代謝調節に関して検討した。

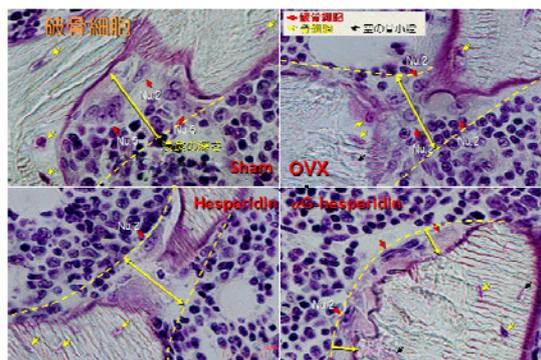
4. 研究成果

(1) 構造学および生理学的評価

ヘスペリジン投与によって子宮重量、体重増加量に影響することなく大腿骨の骨密度(BMD)およびカルシウム含量を増加させた。血中骨吸収マーカーである CTx は OVX により増加したが、ヘスペリジン投与によりその増加が抑制された。一方で、骨形成マーカーである OC はヘスペリジンの影響を受けなかった。

(2) 組織学的評価

大腿骨遠位部海綿骨の形態計測の結果、ヘスペリジン投与により、破骨細胞数が減少し、骨吸収速度の低下が示された。一方、骨のリモデリングを表す動的パラメーターの指標は OVX で大きく骨の浸食された状態を α G 投与によって骨吸収速度および骨形成速度を Sham レベルまで改善させた(図 2)。また、骨質の指標である骨細胞の所見をみると(図 2)、 α G 投与によって類骨中に埋入したばかりの骨細胞が認められ、骨基質中にも多くの骨細胞が存在することから、骨芽細胞から骨細胞に誘導している可能性が考えられた。



(図 2 破骨細胞における骨の浸食状態)

(3) 分子生物学的評価

破骨細胞の分化抑制に関与する RANKL mRNA 発現量を測定したところ、Sham に比べ、OVX で顕著に増加するものの、 α G 投与によって低下し、破骨細胞形成抑制因子の OPG mRNA 発現量が逆に増加した。さらに、脛骨由来の骨髄を採取し、ELISA 法により、

低分子量 G 蛋白質を測定したところ、Sham に比べ、OVX によって増加した。一方で、未処理ヘスペリジン投与では影響はみられなかったものの、 α G 投与によって低下した。これらの結果から動物実験ではヘスペリジンによる低分子量 G 蛋白質を介した骨代謝調節機構が示唆された。

(4) 骨形成増進作用の評価

これらの結果に基づき、骨細胞培養実験を行ったところ、ヘスペリジンのアグリコンであるヘスペレチン(10^{-8} – 10^{-6} M)を含有する培養液中で、大腿骨の骨幹部と骨幹部組織を 48 時間培養した。骨組織中のカルシウム量、アルカリ性ホスファターゼ活性(骨石灰化促進酵素)および DNA(骨組織中細胞数の指標)量を測定した。その結果、ヘスペレチン(10^{-8} – 10^{-6} M)は、皮質骨である骨幹部および海綿骨である骨幹部組織のカルシウム量が増加した。また、ヘスペレチン(10^{-8} – 10^{-6} M)は、皮質骨および海綿骨のアルカリ性ホスファターゼ活性を有意に増加させた。さらに、皮質骨部および海綿骨部の DNA 量は、ヘスペレチン(10^{-8} – 10^{-6} M)の存在下で増加した。

(5) 破骨細胞形成・分化に対する評価

PTH 存在下で骨組織を培養すると、カルシウム量が減少したが、この減少は、ヘスペレチン(10^{-8} – 10^{-6} M)の存在下で有意に抑制された。同様に、生理的な骨塩溶解をひき起こす PGE_2 (10^{-5} M)においても、骨組織中カルシウム量が減少したが、この減少はヘスペレチン(10^{-8} – 10^{-6} M)の存在下で抑制された。

(6) 得られた成果の社会へのインパクト

ヘスペリジンは、メバロン酸合成経路を介して、骨形成を促進するとともに、骨吸収を抑制することにより、骨量減少を抑制し骨量維持に働くことが推察された。

近年、フラボノイドには生活習慣病予防効果が期待されているが、野菜や果物の成分がその一端を担うのであれば幸いである。ヘスペリジンの骨量減少抑制作用については動物では明らかにされているが、今後はヘスペリジンによる骨代謝調節に関わる詳細な制御部位を確かめる必要がある。また、骨密度改善効果が報告されたスタチン系薬剤には重篤な副作用(横紋筋融解作用)が報告されているが、スタチン系薬剤の副作用が緩和された形で骨に対してより特異的な作用を示す抗骨粗鬆症因子として期待できる新たな食品素材である可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 0 件)

*現在、投稿中

[学会発表] (計 5 件)

- ・ **千葉大成**、上原万里子、石見佳子、鈴木和春、金賢珠、松本明世、ヘスペリジンによる高齢期マウスに対する骨代謝調

節への効果、第 61 回 日本栄養食糧学会、2007 年 5 月 17-20 日、国立京都国際会館
・ **Hiroshige Chiba**, Mariko Uehara, Yoshiko Ishimi, Kazuharu Suzuki, Kim Hyounju, Akiyo Matsumoto, Hesperidin, a citrus flavonoid, prevents bone loss in ovariectomized old-aged mice., 3rd International Conference on Polyphenols and Health, November 25-28, 2007, Kyoto International Conference Center, Kyoto, Japan

- ・ **千葉大成**、上原万里子、石見佳子、鈴木和春、金賢珠、松本明世、閉経後骨粗鬆症モデルマウスにおけるヘスペリジンの骨代謝調節機構の解析、第 62 回 日本栄養食糧学会、2008 年 5 月 2-4 日、女子栄養大学
- ・ 南良祐、**千葉大成**、清水純、上原万里子、石見佳子、鈴木和春、金賢珠、松本明世、食物繊維または難消化性糖類とヘスペリジンの併用摂取による骨密度に対する影響、第 62 回 日本栄養食糧学会、2008 年 5 月 2-4 日、女子栄養大学
- ・ **千葉大成**、上原万里子、石見佳子、鈴木和春、金賢珠、松本明世、閉経後骨粗鬆症モデルマウスにおけるヘスペリジンの骨代謝調節作用、第 13 回 日本フードファクター学術集会(JSoFF)、2008 年 11 月 17-18 日、タワーホール船橋

[図書] (計 1 件)

- ・ **千葉大成**、丸善株式会社、機能性食品の作用と安全性 百科「骨系に作用する成分—骨密度などとの関係」、上野川修一編集、2010 年発行予定

6. 研究組織

(1) 研究代表者

(1)

研究者番号 : 30337779