

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：37401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590673

研究課題名（和文） アンチ・エイジング機能をもつローヤルゼリーの薬理学的研究

研究課題名（英文） Pharmacological study of royal jelly, anti-aging element

## 研究代表者

横溝 和美（YOKOMIZO KAZUMI）

崇城大学・薬学部・教授

研究者番号：80240919

## 研究成果の概要（和文）：

健康食品を的確に利用することで未病すなわち半健康状態を維持し治療することはこれからの医療を考える上で重要である。本研究では、ローヤルゼリーがエストロゲン様作用とグルココルチコイド様作用をもつことを提唱し、その合理性を基礎実験により検証した。また、その活性成分が 10-hydroxy 2-decenoic acid と 10-hydroxydecanoic acid であることを明らかにし、ローヤルゼリーの新しい作用を提唱した。

## 研究成果の概要（英文）：

Curing disease-oriented state, very early stage of diseases before they appear, by health supplements is important to preserve health and prevent illness. In this study, we found that royal jelly has estrogenic and glucocorticoid-like activities. We also found that the active components were 10-hydroxy 2-decenoic acid and 10-hydroxydecanoic acid. These finding may provide a new insight of royal jelly to care disease-oriented state.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

## 研究分野：医歯薬

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・内科学一般（含心身医学）

キーワード：東洋医学

## 1. 研究開始当初の背景

少子高齢化社会を迎え、労働寿命・健康寿を延ばし、活力ある長寿社会を実現することが不可欠である。この課題に対して、「医食同源」の視点に立脚した研究が国際的に展開されつつある。機能性や安全性が保証された天然薬物・食品・サプリメントの供給体制を確立しようという試みである。漢方薬の

polypharmacy としての薬効・薬能に関わる分子病態薬理学的研究により、従来不明な点が多かった疾患あるいは症状の分子レベルにおける傷害発生と修復の機序の一端が明らかになってきた。病態発生の本質的解明、疾病の予防と治療原理の確立、更には QOL を重視した次世代における新規高品位医薬品開発に貢献しようと考えている。天然エスト

ロゲン、特にロイヤルゼリー(RJ)についても同様の考えで研究を進めている。エストロゲンは、女性の生殖器系の機能維持に加え、骨、心血管系および中枢神経系などでも重要な役割を果たしている。それ故、閉経後(更年期)の女性では血管運動神経様症状や骨量低下、睡眠障害および萎縮性陰症状など、QOLに重大な影響を及ぼす障害をきたす。更年期障害に対する治療はホルモン補充療法が主流であるが、乳癌や子宮内膜癌のリスクが高まるなど、軽視できない副作用が知られている。このため、ホルモン補充療法に替わる新たな治療法の開発が望まれている。RJは脂質低下作用および成長促進作用などさまざまな薬理作用をもつことが報告されているが、更年期障害の種々の症状の軽減にも臨床上市著明な効果が認められている。従って、RJはエストロゲン様の物質を含有する可能性が示唆されているが、RJのエストロゲン様作用に関する薬理的な検討はされておらず、作用を裏付ける証拠は乏しい。そこで、RJのような天然物由来の健康食品の効果についても医薬品と同様に客観的な薬効評価によるトランスレーショナル・リサーチがなされるべきであると考え、RJのエストロゲン様作用について分子薬理学的手法を駆使して調べた。その結果、まず *in vitro* の実験系において、RJはエストロゲン受容体結合能をもつ。また、ルシフェラーゼアッセイによるエストロゲン感受性外来遺伝子の発現、内因性 mRNA 発現および乳癌細胞株の増殖により評価した細胞機能の全ての実験で、RJはエストロゲン様の作用を示した。また、卵巣摘出ラットを用いた *in vivo* の実験でも、RJは子宮の VEGF 発現低下を著明に回復させた。しかし、RJのエストロゲン様作用は脳では認められず、本作用に臓器選択性があることが示唆された。

さらに、RJのエストロゲン様活性成分として、10-ヒドロキシデセン酸および10-ヒドロキシデカン酸を同定した。一方、RJは免疫系賦活に基づく抗腫瘍作用や抗アトピー性皮膚炎作用など免疫調節作用をもつことが報告されている。また、RJが免疫系を Th2 から Th1 型へ移行させることも示されており、これらの作用はステロイドホルモンの中でもグルココルチコイドと類似の作用である。しかし、RJ中には cortisol が含まれることが示されてはいるが、その含有量は約 180 pg/g と、上記のグルココルチコイド様作用を説明するには不十分であり、RJによる免疫調節作用の詳細な機序については未だ不明である。骨芽細胞のコラーゲン産生を始め、一般にエストロゲンとグルココルチコイドとエストロゲンの両ステロイドホルモン様の生物活性を併せ持つとすれば、RJに特異的な性質であるとも考えられ非常に興味深い。これまで

にエストロゲン様作用が明らかとなった 10-ヒドロキシデセン酸および 10-ヒドロキシデカン酸は、直鎖脂肪酸に水酸基をもつ単純な分子構造であるが、エストロゲン受容体のみならずグルココルチコイド受容体にも作用し、上記の免疫調節作用を示している可能性が考えられる。また、RJがグルココルチコイドの受容体量を変化させるなど、受容体機能を促進的または抑制的に調節する可能性もある。また、難溶性のオリゴ糖、多糖、ある種のペプチド、タンパク質、脂質などが腸内の有用細菌のみを増殖したり、あるいはその代謝活性を高めることが報告されており、RJ成分のタンパク質、脂質、糖などがプレバイオティクスとして作用し、腸内フローラの改善の結果、細胞性免疫を賦活化している可能性も考えられる。

## 2. 研究の目的

RJはこれらの両ステロイドホルモンと類似の生理活性と、プレバイオティクスとしての機能を併せ持つことが示唆される。本研究では、先端のケミカルバイオロジーとバイオテクノロジーの手法を駆使して、RJの作用を追求し、RJによるエストロゲン様およびグルココルチコイド様という両ステロイドホルモン作用とプレバイオティクス作用の解明を目指す。

## 3. 研究の方法

### (1) グルココルチコイド様転写活性に関する検討

A549細胞(ヒト肺上皮細胞株)に、グルココルチコイド感受性の MMTV プロモーター遺伝子を上流にもつ luciferase プラスミドを導入し 24 時間培養後、薬物を加え 24 時間作用させた後に、細胞を可溶化し luciferase 活性を調べた。

### (2) 腸内フローラ改善効果の検討

10mg/kg/day 量の RJ を 14 日間、経口投与した BALB/CN マウス(雄、5 週齢)の腸内細菌の種類とその数の相対的な変化を検討した。マウスの糞便を無菌的に採取し、嫌気的な条件下で糞便希釈液を微生物検定培地に接種し、嫌気的に培養し、生じたコロニー数を計数し菌数を求めた。

## 4. 研究成果

### (1) グルココルチコイド様転写活性に関する検討

Dexamethasone (DEX) は濃度依存的に MMTV プロモーターを活性化したが、RJ 及び estradiol 単独では MMTV プロモーターを活性

化しなかった。RJ の濃度を 0.01, 0.1 及び 1 mg/ml と変えて、DEX (100 nM) と併用し、MMTV プロモーター活性に対する作用を調べると、RJ は濃度依存的に DEX による転写活性を亢進し 1 mg/ml において有意に亢進した (図 1)。

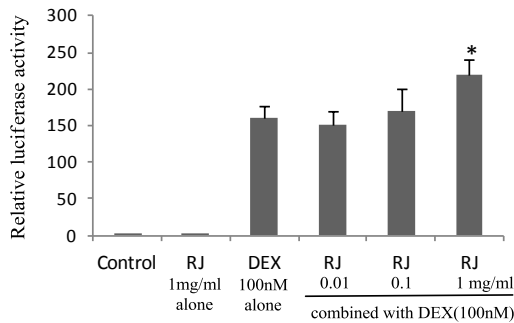


図 1. RJ による DEX 転写活性の亢進  
\*:p<0.05 vs DEX alone group

次に DEX 転写促進活性を指標に RJ より活性成分の分離精製を検討した。生ロイヤルゼリーを 25 倍量の精製水を加え溶解後、ダイヤイオン HP-20 カラムに吸着させ、水-メタノール溶媒で溶出した。80%メタノール溶出画分を濃縮後、ODS カラムクロマト、シリカゲルカラムクロマトを行ない、2 種の活性成分を分離精製した。機器分析による構造解析の結果、10-hydroxy 2-decenoic acid と 10-hydroxydecanoic acid と推定した(図 2)。

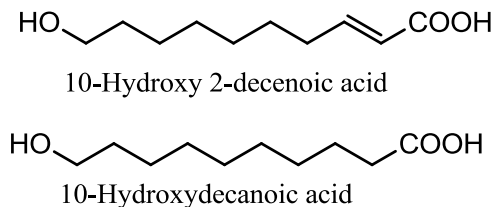


図 2. RJ 由来のグルココルチコイド様活性成分

10-hydroxy 2-decenoic acid 及び 10-hydroxydecanoic acid は単独では、MMTV プロモーターを活性化しなかった。濃度を 0.1, 1 及び 10  $\mu$ M と変えて、DEX (100 nM) と併用し、MMTV プロモーター活性に対する作用を調べると、10  $\mu$ M において DEX による転写活性を有意に亢進した (図 3)。

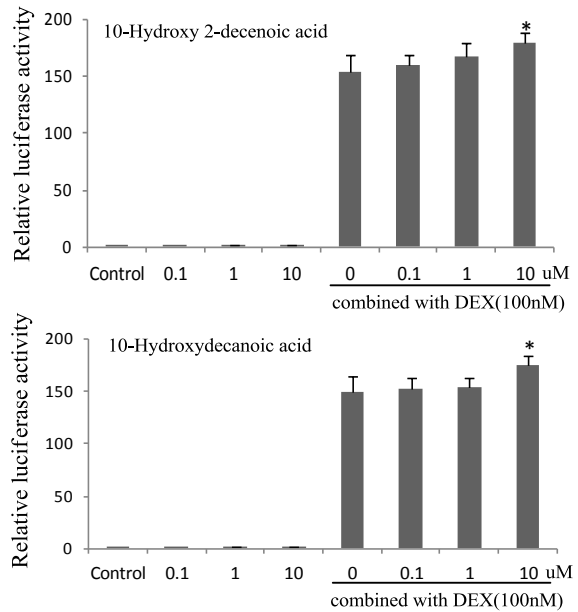


図 3. 10-hydroxy 2-decenoic acid 及び 10-hydroxydecanoic acid による DEX 転写活性の亢進  
\*:p<0.05 vs DEX alone group

## (2) 腸内フローラ改善効果の検討

コントロールのマウスの腸内細菌層はクロストリジウム属が多く (63%)、乳酸菌は 37%程度であったが、RJ を投与したマウスは乳酸菌が 72%と上昇し、一方クロストリジウム属は減少した。したがって RJ には腸内細菌叢の改善効果があることが確認できた。

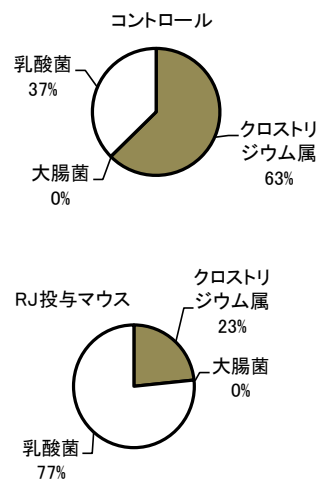


図 2. RJ による腸内細菌改善効果

以上の成績は、ローヤルゼリーが未病状態の患者において腸内細菌叢の改善と、エストロゲン様作用による骨形成の促進とグルコ

コルチコイド様作用による抗炎症反応の促進の可能性を示唆する重要な知見と考えられる。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 14 件)

- ① Inada C, Thi Le X, Tsuneyama K, Fujiwara H, Miyata T, Matsumoto K. Endogenous acetylcholine rescues NMDA-induced long-lasting hippocampal cell damage via stimulation of muscarinic M(1) receptors: elucidation using organic hippocampal slice cultures. *Eur J Pharmacol*, 査読有, 699, 2013, 150-159.
- ② Zhao Q, Niu Y, Matsumoto K, Tsuneyama K, Tanaka K, Miyata T, Yokozawa T. Chotosan ameliorates cognitive and emotional deficits in an animal model of type 2 diabetes: possible involvement of cholinergic and VEGF/PDGF mechanisms in the brain. *BMC Complement Altern Med*, 査読有, 12, 2012, 188.
- ③ Mibu N, Yokomizo K, Uchida W, Takemura S, Zhou J, Aki H, Miyata T, Sumoto K. Molecular symmetry and biological activities of new symmetrical tris(2-aminoethyl)amine derivatives. *Chem Pharm Bull*, 査読有, 60, 2012, 408-414.
- ④ Ohno M, Murakami K, El-Aasr M, Zhou JR, Yokomizo K, Ono M, Nohara T. New spirostanol glycosides from *Solanum nigrum* and *S. jasminoides*. *J Nat Med*, 査読有, 66, 2012, 658-663.
- ⑤ Zhao Q, Matsumoto K, Tsuneyama K, Tanaka K, Li F, Shibahara N, Miyata T, Yokozawa T. Diabetes-induced central cholinergic neuronal loss and cognitive deficit are attenuated by tacrine and a Chinese herbal prescription, kangen-karyu: elucidation in type 2 diabetes db/db mice. *J Pharmacol Sci*, 査読有, 117, 2011, 230-242.
- ⑥ Mibu N, Yokomizo K, Saisho M, Oishi M, Aki H, Miyata T, Sumoto K. Synthesis and antiviral activities of some N-acyl-2,6-diaminopyridines and related linker mode identical twin drugs. *Heterocycles* 査読有, 83, 2011, 385-393.
- ⑦ Yamada M, Hayashida M, Zhao Q, Shibahara N, Tanaka K, Miyata T, Matsumoto K. Ameliorative effects of yokukansan on learning and memory

deficits in olfactory bulbectomized mice. *J Ethnopharmacol*, 査読有, 135, 2011, 737-746.

- ⑧ Zhao Q, Yokozawa T, Tsuneyama K, Tanaka K, Miyata T, Shibahara N, Matsumoto K. Chotosan (Diao teng San)-induced improvement of cognitive deficits in senescence-accelerated mouse (SAMP8) involves the amelioration of angiogenic/neurotrophic factors and neuroplasticity systems in the brain. *Chin Med*, 査読有, 6, 2011, 33.
- ⑨ Takigawa A, Setoguchi H, Okawa M, Kinjo J, Miyashita H, Yokomizo K, Yoshimitsu H, Nohara T, Ono M. Identification and characterization of component organic and glycosidic acids of crude resin glycoside fraction from *Calystegia soldanella*. *Chem Pharm Bull*, 査読有, 59, 2011, 1163-1168.
- ⑩ Nishimoto Y, Hisatsune A, Katsuki H, Miyata T, Yokomizo K, Isohama Y. Glycyrrhizin attenuates mucus production by inhibition of *MUC5AC* mRNA expression in vivo and in vitro. *J Pharma Sci*, 査読有, 113, 2010, 76-83.
- ⑪ Miyata T. Novel approach to curatives of Mibyou (presymptomatic diseases). *Yakugaku Zasshi*, 査読有, 131, 2011, 1289-1298.
- ⑫ Yamakawa N, Suemasu S, Kimoto A, Arai Y, Ishihara T, Yokomizo K, Okamoto Y, Otsuka M, Tanaka K, Mizushima T. Low direct cytotoxicity of loxoprofen on gastric mucosal cells. *Biol Pharm Bull*, 査読有, 33, 2010, 398-403.
- ⑬ Yamashita Y, Hoshino T, Matsuda M, Kobayashi C, Tominaga A, Nakamura Y, Nakashima K, Yokomizo K, Ikeda T, Mineda K, Maji D, Niwano Y, Mizushima T. HSP70 inducers from Chinese herbs and their effect on melanin production. *Exp Dermatol*. 査読有, 19, 2010, 340-342.

[学会発表] (計 8 件)

- ① 横溝和美, 周建融, 宮田健, Roles of antioxidants and heat shock protein induces as an antifatigue effects induced by health supplements, BIT' s 8<sup>th</sup> Annual Congress of International Drug Discovery Sciences and Technology, 2010年10月26日, 北京(中国).

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

横溝 和美 (YOKOMIZO KAZUMI)  
崇城大学・薬学部・教授

研究者番号：80240919

(2)研究分担者

宮田 健 (MIYATA TAKESHI)

崇城大学・薬学部・客員研究員

研究者番号：90040310