

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 6月10日現在

機関番号: 3 2 7 1 4 研究種目: 基盤研究(C) 研究期間: 2010~2012

課題番号: 2 2 5 0 0 6 7 4

研究課題名(和文) メバロン酸合成経路に着目したヘスペリジンによる

骨代謝制御メカニズムの解明

研究課題名(英文) Effect of hesperidin on bone metabolism and the elucidation of

its mechanism, through mevalonate synthesis

研究代表者

千葉 大成 (CHIBA HIROSHIGE)

神奈川工科大学・応用バイオ科学部・准教授

研究者番号:30337779

研究成果の概要(和文):

へスペリジンによるメバロン酸合成経路を介した骨代謝への作用とその作用機序に関して検討を行った。糖転移へスペリジンを含む飼料にメバロン酸またはファルネシルピロリン酸を添加し、2ヶ月間飼育観察を行ったところ、糖転移へスペリジンとメバロン酸併用により大腿骨骨密度の骨量減少を糖転移へスペリジン単独より抑制した。さらに、ヘスペレチンはRAW264細胞から破骨細胞への分化を用量依存的に抑制した。これらの結果から、ヘスペリジンはコレステロール合成経路の下流を調節し、骨吸収を抑制することで骨代謝を改善する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文):

The purpose of this study was to examine effect of hesperidin on bone metabolism and the elucidation of its mechanism, through mevalonate synthesis. The concomitant intake of glucosylhesperidin and mevalonic acid had better effects in femur bone mineral density (BMD) and bone quality than glucosylhesperidin alone in ovariectomized mice. Hesperetin inhibited the osteoclast formation induced by RANKL in a dose-dependent manner in RAW 264 cells. These results indicate that hesperidin regulates the downstream signaling pathway of cholesterol synthesis, and the inhibition of bone resorption may contribute to the improvement bone metabolism.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合 計
2010年度	1, 400, 000	420, 000	1, 820, 000
2011年度	800, 000	240, 000	1, 040, 000
2012年度	1, 100, 000	330, 000	1, 430, 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

1. 研究開始当初の背景

柑橘系フラボノイドであ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(J Nutr, 1999)。一方、コレステロール低下薬剤であるスタチン系製剤による骨代謝への作用が報告されている。Mundy G ら

(Science, 1999)はスタチンによる骨形成修飾 因子(BMP-2)の遺伝子およびタンパクの発現 促進を確認している。すなわち、卵巣摘出 (OVX)ラットにおいて、骨形成速度の増加および破骨細胞数の減少によって、骨形成の促進のみならず、骨吸収の抑制にも働くことを示唆している。

これまで、申請者は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、卵巣摘出骨粗鬆症モデルマウス(OVX マウス)において骨量減少を抑制し、血中コレステロール低下作用について報告(J Nutr, 2003)している。また、男性骨粗鬆症モデル(ORX)マウスにおいても同様な結果を見出し、ポジティブコントロールに設定したスタチン投すとほぼ同等の効果であったことも報告している(Phytother Res, 2013)。これらの同様ないら、ヘスペリジンはスタチン製剤と同様なから、ヘスペリジンはスタチン製剤と同様な効果を示すことから、骨粗鬆症予防物質としての可能性を広げ、臨床への応用が期待される。

2. 研究の目的

これまで、ヘスペリジンの骨代謝調節への関与に関して検討しているが、骨代謝制御メカニズムに関して検討を行っていない(図 1)。そこで本研究では①ヘスペリジンによる骨代謝制御とメバロン酸代謝経路などとの関連を明らかにし、②ヘスペリジンによる骨代謝調節に関わる制御因子に着目して検討した。

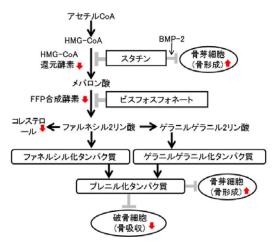


図1 メバロン酸合成経路を介する骨代謝調節

3. 研究の方法

(1) メバロン酸合成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する。AIN-93G 組成を 基準食とした精製飼料に配糖体で通常のへ スペリジンよりも吸収が高い糖転移へスペリジン(G群)を含む飼料にメバロン酸(MV群)

またはファルネシルピロリン酸(FPP 群)を添加し、2ヶ月間飼育観察を行った。

骨動態を検討するため、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し、大腿骨を摘出後、qCT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、遠位部海綿骨の骨形態計測を行い、骨動態を検討した。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)の解析も行った。

(2) アグリコンであるヘスペレチンによる破骨細胞および骨芽細胞に及ぼす作用

常法に従い、RAW264 細胞を破骨細胞に分化誘導するため、RANKL を添加した。骨芽細胞様の細胞に分化する細胞株である ST2 細胞はコンフルエントとなる播種 3 日後にヘスペレチン (HSP)を添加した。これらは 37 $^{\circ}$ $^{\circ}$ $^{\circ}$ で培養を行った。さらに、細胞増殖性を確認するため、RAW264 細胞は播種 $^{\circ}$ $^{\circ}$ 4 時間後にRANKL と同時に HSP を添加し、添加 $^{\circ}$ $^{\circ}$ 4 時間後にHSP を添加し、48 時間後に MTT 分析を行った。

また、破骨細胞への分化を評価するため、分化誘導3日後にTRAP染色を行い、染色された3つ以上の核を持つ多核細胞数をカウントした。ST細胞から骨芽細胞への分化を評価するため、HSP添加10日後にALP染色を行った。

4. 研究成果

- (1) メバロン酸合成経路に及ぼすヘスペリジンの効果
 - ①子宮重量、最終体重、飼料摂取量 子宮重量は Sham に比べ、OVX-Cont で著 しく減少するが、実験食投与による影響は みられなかった。また、最終体重、飼料摂 取量は全ての群において差は認められな
 - かった。 ②大腿骨全骨密度、破断エネルギー

大腿骨全骨密度は Sham に比べ、OVX-Cont で低下し、G 群および MV 群で Sham レベルまで改善した。骨質の指標となる破断エネルギーも同様な結果を示した(図 2)。

③血清中骨代謝マーカー

骨吸収マーカーである CTx および骨形成マーカーであるオステオカルシンは Sham に比べ、OVX-Cont で上昇し、実験食投与により Sham 群レベルまで回復した。

④破骨細胞分化誘導因子

RANKL/OPG 比は Sham に比べ、OVX-Cont で上昇し、G 群、MV 群で上昇を抑制した。 ⑤大腿骨遠位部海綿骨形態計測

破骨細胞数は OVX-Cont で増加したが、G 群および MV 群でその増加を抑制したが、 FPP 群は OVX-Cont と同程度だった。石灰化速度および骨吸収速度は MV 群で最も高値を示したが、FPP 群は顕著な差は認められなかった。

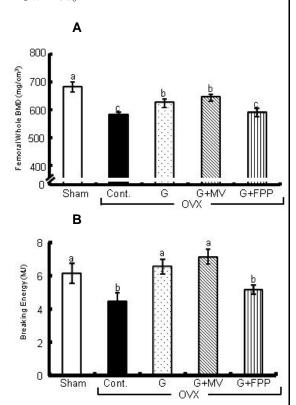


図 2 大腿骨構造的解析 A; 大腿骨全骨密度 B; 破断エネルギー

(2) アグリコンであるヘスペレチンによる破骨細胞および骨芽細胞に及ぼす作用 ①破骨細胞分化への影響

RAW264 細胞に RANKL と同時にヘスペレチン (HSP) を添加させたところ、細胞増殖は容量依存的に抑制 $(0.1、1、5、10、25 \mu M)$ された。また、TRAP 染色において、HSP はRAW264 細胞から破骨細胞分化への誘導を用量依存的に抑制 $(0.1-10 \mu M)$ した (図 3)。

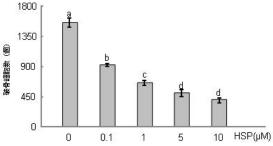


図3 破骨細胞分化に対するヘスペレチンの作用

②骨芽細胞分化への影響

ST2 細胞は対照に対して、ヘスペレチン $25\,\mu$ M で細胞増殖が抑制された。また ALP 染色において、ST2 細胞にヘスペレチンを

添加し、骨芽細胞分化に対する影響を検討したところ、顕著な差は認められなかった。

(3) まとめ

これまでの研究で、若齢期および成熟期のOVXラットにおいて、大腿骨骨密度が正常食投与ラットに比べ、ヘスペリジン投与群で高値を示したことが報告されている(J Appl Physiol 2008)。また、施術なし(Intact)ラットにおいては、成熟期では変化がみられなかったとしている。これはすでに成熟期を迎え、最大骨密度に達しているため、ヘスペリジンの影響がなかったと推察されている。

一方、ヘスペリジンの生体利用率に関して、生体利用性が 3 倍高いとされるヘスペリジン7-配糖体(H-7-glc)を用いて、0VX ラットに投与したところ,顕著に骨量減少抑制効果がみられたことが報告されている (Br J Nutr, 2009 & J Nutr, 2006)。 $in\ vitro$ の実験系においては、この H-7-glc が、骨形成に必須な骨芽細胞分化と軟骨細胞の成熟を担っている Runx2 や 0sterix の転写因子を介して骨芽細胞を制御していたことやヘスペリジンのアグリコンであるヘスペレチンが 0BMP シグナル伝達系を刺激するばかりか、0MAPK 経路にも影響して骨形成を促進させることを報告されている (0J Agric Food Chem, 0010 & 0J Nutr Biochem, 0010)。

このように、ヘスペリジンによる骨粗鬆症 の予防効果について,動物実験や細胞実験を 用いて、そのメカニズムが徐々に明らかにさ れているが、どのような作用機序によって骨 代謝調節に作用するは明らかになっていな い。本研究の結果より、ヘスペリジンとコレ ステロール合成経路に関わる因子物質との 併用実験によって、ヘスペリジンの骨量減少 抑制作用はコレステロール合成経路の上流 よりも下流で作用する可能性が考えられた。 すなわち、ヘスペリジン摂取によってファル ネシルピロリン酸合成を阻害して、骨代謝を 調節する可能性が示唆された。一方、アグリ コンであるヘスペレチンによる破骨細胞ア ポトーシス促進により破骨細胞に対して抑 制的に作用したことが示唆される。また、本 研究では骨芽細胞への分化に関しては顕著 な差は認めらなかった。

これらのことから、ヘスペリジンの骨代謝 調節はファルネシルピロリン酸が低下した ことによって、破骨細胞または骨芽細胞の分 化になんらかの影響を及ぼす可能性が考え られ、骨吸収抑制薬のビスフォスフォネート と同様な作用を示すことが示唆された。

これまでフラボノイドによる骨代謝調節 に関する研究は主に「エストロゲン様作用」を介した知見が多く、脂質代謝と骨代謝を結びつけたメバロン酸合成経路に着目した骨代謝に関する研究はみられていない。へスペ

リジンの骨粗鬆症予防に関する研究は、まだ 不明な点が多く詳細な情報の集積が必要で あるが、今後、ヘスペリジンが骨粗鬆症改善 薬のような特異的な副作用が緩和された新 たな骨代謝を改善する機能性食品として検 討が必要であると考えられた。

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2件)

- ① Wang Xi, Zhang Yl, Wu J, Chiba H, Yamada K & Ishimi Y. Effects of puerariae radix on bone density and bone microarchitecture in castrated mice with osteoporosis. J Clin Rehabil Tissue Engineering Res 14: 1262-6, 2010
- Chiba H, Kim HJ, Matsumoto A, Akiyama S, Ishimi Y, Suzuki K, Uehara M Hesperidin prevents androgen deficiency induced bone loss in male mice Phytother Res 2013 (In press)

〔学会発表〕(計4件)

- ① <u>千葉大成</u>、上原万里子、石見佳子、鈴木 和春、金賢珠、松本明世 糖転移へスペ リジンと未処理へスペリジンによる骨 代謝調節作用の差異 第64回 日本栄養 食糧学会(2010.05.21-23 徳島)
- ② <u>千葉大成</u> 「骨と脂質の科学〜食品成分による骨・脂質代謝の同時調節〜」シンポジウム 6 ヘスペリジンによるコレステロール合成阻害を介した骨量減少抑制作用 第 64 回 日本栄養食糧学会(2010.05.21-23 徳島)
- ③ <u>千葉大成</u> メバロン酸合成経路に着目 した糖転移へスペリジンによる骨代謝 調節 シンポジウム 第2回糖転移へス ペリジン・ビタミンP研究会(2010.12.08 京都)
- ④ <u>千葉大成</u>、丸山優美、宮田智美、村木悦 子、星野彰平、 武谷圭子、柘植信昭、 金賢珠、松本明世 成長期に及ぼす苦味 低減化フェヌグリークシードによる骨 量増加効果 第65回日本栄養・食糧学会 大会(2011.05.13-15 東京)

[図書] (計2件)

- ① 上原万里子、石見佳子、真野博、<u>千葉大</u> <u>成</u>ら 機能性食品素材の骨と軟骨への 応用 株式会社シーエムシー出版、東京; 2011; 133-140
- ② 上野川修一、上原万里子、石見佳子、<u>千</u> <u>葉大成</u>ら。機能性食品の作用と安全性 百科丸善株式会社、東京; 2012

6. 研究組織

(1)研究代表者

千葉 大成 (CHIBA HIROSHIGE) 神奈川工科大学 応用バイオ科学部 准教 授

研究者番号:30337779