

平成30年6月18日現在

機関番号：12605

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14921

研究課題名（和文）ルテインとカテキンのロコモティブシンドローム予防機能に関する研究

研究課題名（英文）The preventive effects of lutein and catechin on locomotive syndrome.

研究代表者

宮浦 千里 (MIYAURA, CHISATO)

東京農工大学・工学（系）研究科（研究院）・教授

研究者番号：20138382

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,800,000円

研究成果の概要（和文）：中高年齢者の健康を目的とし、ロコモティブシンドローム（ロコモ：運動器症候群）の予防に食品由来成分を活用する研究を実施した。ロコモは運動機能の低下によって発症し、加齢・骨量減少・筋萎縮・運動不足を原因とする。尾部懸垂マウスを用い、DEXAにより骨密度を3次元マイクロCTにより骨・筋形態計測を実施し、生体マウスで評価するロコモ解析法を確立した。尾部懸垂マウスにルテインを投与すると、不動による骨量低下が軽減した。質量分析イメージングによる解析を行い、ルテイン分子の同定とイメージングに成功した。本研究により、ルテインを活用したロコモ予防に有効な機能性食品の開発の基盤的データを獲得した。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study is the usage of food-derived components to prevent the locomotive syndrome (LOCOMO: Motor instrument syndrome) in middle-aged and aged persons. LOCOMO is caused by the decrease in motor function, aging, bone loss and muscle atrophy. Using tail suspension mice, the bone density was measured by DEXA, and the bone and muscle morphology were measured by three-dimensional micro-CT. We established the LOCOMO model to evaluate motor function using a live mouse. Using the LOCOMO model, we found that lutein recover the bone loss induced by tail suspension. Lutein was applied for mass identification using imaging mass spectrometry (IMS), and we identified the lutein molecule and its imaging. Our data may be useful for the development of functional foods using lutein to prevent LOCOMO.

研究分野：栄養生理学

キーワード：ロコモティブシンドローム

## 1. 研究開始当初の背景

骨や筋は四肢の運動機能を担っており、力学的刺激に応答して機能しているが、加齢・筋萎縮・骨量減少・運動不足等により運動器(骨・筋・関節・軟骨)の機能が低下すると、ロコモティブシンドローム(運動器症候群)となり、超高齢化に伴う社会問題となっている。高齢化が進展するわが国では、要介護者は560万人を超えて社会問題となっており、その原因の1位(25%)は運動器の障害である。中高年齢者の健康にはロコモティブシンドローム(ロコモ)の予防が不可欠である。また、高齢化社会の進展によって、食品に含まれる機能性成分を活用して健康寿命を延伸することが求められている。カロテノイド類の食品成分は抗酸化作用や抗がん作用があることが報告されている。骨組織は骨吸収(骨破壊)と骨形成のバランスで一定の骨量を保っており、研究代表者はホウレン草に含まれるルテインが骨形成を促進して骨量を増加すること、茶カテキンが骨吸収を抑制することを見出した。これら成分は筋への効能も示唆されており、ロコモ予防に有用であろうとの発想に至った。

## 2. 研究の目的

骨や筋は四肢の運動機能を担っており、加齢・筋萎縮・骨量減少・運動不足等により運動器の機能が低下すると、ロコモティブシンドロームとなる。研究代表者は、ルテインは骨形成を促進し、茶カテキンは骨吸収を抑制して、明瞭な骨量増加作用を発揮することを見出した。これら成分は筋への効能も示唆されている。本課題では、尾部懸垂の不動モデルマウスを用い、ルテインあるいは茶カテキンを摂取させ、ロコモティブシンドロームへの予防効果を立証する。さらに、質量分析イメージングを用いて、これら成分の骨・筋での組織内分布を解析できることを目指し、まず、その検出方法について基盤技術を確立する。国民のロコモ予防に有用な機能性食品への応用を目指す。ロコモ予防に有用で安全な機能性食品の開発は社会的要請が強く、介護予防を推進する社会的意義も大きいと考える。本研究を発展させて、ルテイン含有ホウレン草を活用したロコモ予防食品の開発を目指したい。

## 3. 研究の方法

ロコモティブシンドローム(ロコモ)は加齢・骨量減少・筋萎縮・運動不足等が連鎖して発症する。本課題では、モデル動物(尾部懸垂(後肢不動)マウス)を用い、ルテインあるいは茶カテキンを投与して、経日的に、骨量・筋量の定量、生体用CTを用いた骨解析、筋解析と形態計測を解析した。さらに質量分析イメージングにより、ルテイン分子を

検出するための基盤技術を構築することとした。

### (1) ロコモモデルとしての尾部懸垂マウス

ロコモモデル動物として、尾部懸垂マウスを用いた。マウスの尾部を懸垂すると、懸垂から2~4週後に骨量と筋量が減少する。骨に影響が大きい女性ホルモンの影響を排除するために、実験では、雄性マウスを用いた。雄マウスを用いて尾部懸垂を実施し、対照マウスと尾部懸垂マウスの一部に、ルテインあるいはカテキン(EGCG)を単独で経口投与した。動物実験倫理委員会の承認を経て実験を実施した。尾部懸垂したマウスは独自の飼育ケージを用いることにより、行動自由度はある程度良好で、餌の摂取や飲水が自由に可能な環境を維持している。

### (2) 骨と筋の機能解析

経日的に、骨量と筋量は生体用3次元CTにより大腿骨を用いて同時測定し、尾部懸垂の影響が出る位置が骨と筋で一致しているかリアルタイムで相互解析した。尾部懸垂後、四肢の骨(大腿骨および脛骨)を採取して、DEXAにより骨密度を測定すると共に、小動物用の3次元マイクロCTにより骨形態計測を実施した。四肢の筋肉(腓腹筋・ヒラメ筋)を採取して、筋量および組織切片による形態計測を実施した。

### (3) “質量分析イメージング”を用いた解析

質量分析イメージング装置(iMS)を用いて、ルテイン純品を検出用スライドに添付し、その分子を質量分析解析した。その検出には、分子のイオン化効率を最適化することが必須であることから、複数のマトリックスを用いた解析を実施した。質量分析イメージングによるルテイン分子の検出像と光学顕微鏡像を重ね合わせ解析し、分子同定を実施した。

## 4. 研究成果

### (1) 尾部懸垂マウスのロコモモデルとしての確立

尾部懸垂マウスを用い、経日的に、骨量は生体用3次元CTにより大腿骨を用いて同時測定した。懸垂後、1週間ならびに2週間、四肢の骨(大腿骨および脛骨)を採取してDEXAにより骨密度を測定すると共に、小動物用の3次元マイクロCTにより骨形態計測を実施した。四肢の筋肉(腓腹筋・ヒラメ筋)を採取して、下腿の筋量および組織切片による形態計測を実施した。本解析により尾部懸垂による骨量と筋量の低下を定量化し、運動機能変化を生体マウスで評価するロコモ評価法を確立した(図1)。

### (2) ルテインのロコモへの効果

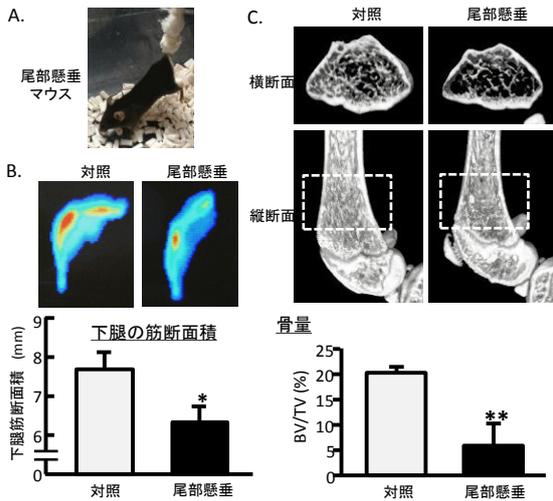


図1. ロコモティブシンドロームのモデル動物尾部懸垂マウスにおける骨量低下と筋量低下  
A. 尾部懸垂マウス B. 筋量 C. 骨量

次に、尾部懸垂マウスにルテインを経口投与する実験を実施した。尾部懸垂マウスでは、軽度な体重低下が認められるが、ルテインを投与したマウスでは、有意な体重低下が認められないことから、ルテインが尾部懸垂によって低下する全身状態も正常化していることが示唆された(図2)。なお、餌の摂取量は群間で有意な差は認められなかった(図2)。

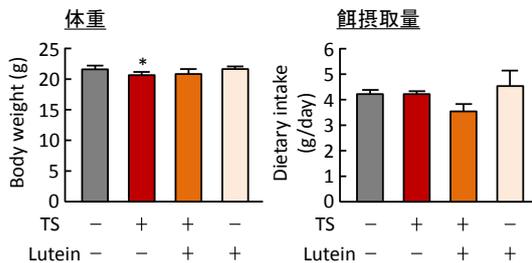


図2. 尾部懸垂マウスへのルテイン投与実験  
TS: 尾部懸垂、Lutein: ルテイン経口投与

尾部懸垂マウスにルテインを経口投与すると、尾部懸垂により低下した四肢の骨量がルテイン投与により有意に改善することをDEXAによる骨密度解析、ならびに3次元CTによる骨形態計測により、明らかにした(図3)。

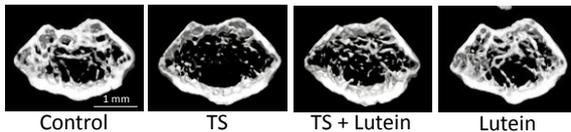


図3. 尾部懸垂マウスの骨量減少へのルテイン投与効果  
TS: 尾部懸垂、Lutein: ルテイン経口投与

従って、ルテインが骨組織に作用して、不動によって亢進する骨吸収を抑制、低下する骨形成を増大して、骨量減少を阻止する効果を発揮すると考えられる。尾部懸垂により低下する筋量について、ルテイン投与の効果は明瞭でなかった。さらに、投与量を変動させた検討が必要である。

### (3) “質量分析イメージング”を用いたルテインの検出

質量分析イメージング装置を用いて、ルテイン純品の検出を目指して解析した。本解析における分子の検出には、各分子のイオン化に最適なマトリックスを決定することが極めて重要である。そこで、複数のマトリックスを検討した結果、Matrix X (知的財産確保の点から明記を避ける)を用いるとルテイン分子同定が可能であることを見出した。検出面にルテインを添付し、イオン化して、質量分析イメージングに適用した。その結果、質量分析とイメージング像の取得に成功した。光学顕微鏡像との重ね合わせにより、分布解析の成功も確認できた(図4)。今後は、骨や筋の組織切片を用いたイメージング解析に進むことが可能となる。

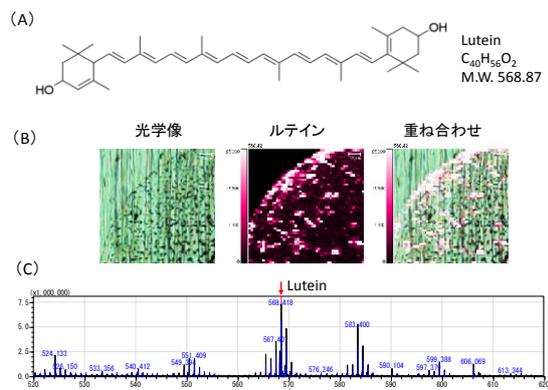


図4. 質量分析イメージングによるルテインの同定  
(A) ルテインの構造 (B) Matrix Xによるルテインの質量分析イメージング像 (C) (B)から得たルテインの分子同定

本研究では、ルテインが骨組織に作用して、不動によって亢進する骨吸収を抑制、低下する骨形成を増大して、骨量減少を阻止する抗ロコモ効果を発揮すると考察した。茶カテキンについては、卵巣摘出による骨粗鬆症発症を軽減することが認められたが、同等の摂取量では、尾部懸垂の骨量低下に対しては明瞭な作用が認められず、更なる検討が必要である。ルテインはホウレン草に豊富に含まれることから食品から摂取してロコモ予防に活用する可能性も重要であるが、サプリメント等による摂取法も検討する必要がある。今後、本研究の成果を活かして、ロコモ予防効果へのルテインの活用について、検討を進めたい。

### 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12件)

- ① Aizawa M, Watanabe K, Tominari T, Matsumoto C, Hirata M, Grundler FM, Inada M, Miyaura C: Low molecular-weight curdian, (1 → 3)-β-Glucan suppresses TLR2-induced RANKL-dependent bone resorption. *Bio. Pharm. Bull.* In Press, 2018
- ② Matsumoto S, Tominari T, Matsumoto C,

- Yoshinouchi S, Ichimaru R, Watanabe K, Hirata M, Grundler FM, Miyaura C, Inada M: Effects of Polymethoxyflavonoids on Bone Loss Induced by Estrogen Deficiency and by LPS-Dependent Inflammation in Mice. *Pharmaceuticals* 2018, 11(1), 7; doi:10.3390/ph11010007, 2018. 査読有
- ③ Ichimaru R, Tominari T, Yoshinouchi S, Matsumoto C, Watanabe K, Hirata M, Numabe Y, Murphy G, Nagase H, Miyaura C, Inada M: Raloxifene reduces the risk of local alveolar bone destruction in a mouse model of periodontitis combined with systemic postmenopausal osteoporosis. *Arch. Oral Biol.* 85:98-103, 2018 doi:10.1016/j.archoralbio.2017.09.017. 査読有
- ④ Tominari T, Ichimaru R, Yoshinouchi S, Matsumoto C, Watanabe K, Hirata M, Grundler FM, Inada M, Miyaura C: Effects of *O*-methylated (-)-epigallocatechin gallate (EGCG) on LPS-induced osteoclastogenesis, bone resorption, and alveolar bone loss in mice. *FEBS Open Bio.* 7(2017):1972-1981, 2017 doi:10.1002/2211-5463.12340. 査読有
- ⑤ Takeda H, Tominari T, Hirata M, Watanabe K, Matsumoto C, Grundler FM, Inada M, Miyaura C: Lutein enhances bone mass by stimulating bone formation and suppressing bone resorption in growing mice. *Bio. Pharm. Bull.* 40(5):716-721, 2017 doi:10.1248/bpb.b16-00897. 査読有
- ⑥ Watanabe K, Tominari T, Hirata M, Matsumoto C, Hirata J, Murphy G, Nagase H, Miyaura C, Inada M: Indoxyl sulfate, a uremic toxin in chronic kidney disease, suppresses both bone formation and bone resorption. *FEBS Open Bio.* 7(8):1178-1185, 2017 doi:10.1002/2211-5463.12258. 査読有
- ⑦ Tominari T, Matsumoto C, Watanabe K, Hirata M, Grundler FM, Inada M, Miyaura C: Lutein, a carotenoid, suppresses osteoclastic bone resorption and stimulates bone formation in cultures. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 81(2):302-306, 2017 doi:10.1080/09168451.2016.1243983. 査読有
- ⑧ Watanabe K, Hirata M, Tominari T, Matsumoto C, Fujita H, Yonekura K, Murphy G, Nagase H, Miyaura C, Inada M: The MET/VEGFR-targeted tyrosine kinase inhibitor also attenuates FMS-dependent osteoclast differentiation and bone destruction induced by prostate cancer. *J. Biol. Chem.* 291(40):20891-20899, 2016 doi:10.1074/jbc.M116.727875. 査読有
- ⑨ Watanabe K, Tominari T, Hirata M, Matsumoto C, Maruyama T, Murphy G, Nagase H, Miyaura C, Inada M: Abrogation of prostaglandin E-EP4 signaling in osteoblasts prevents the bone destruction induced by human prostate cancer metastases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 478(1):154-161, 2016 doi:10.1016/j.bbrc.2016.07.075. 査読有
- ⑩ Watanabe K, Hirata M, Tominari T, Matsumoto C, Endo Y, Murphy G, Nagase H, Inada M, Miyaura C: BA321, a novel carborane analog that binds to androgen and estrogen receptors, acts as a new selective androgen receptor modulator of bone in male mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 478(1):279-285, 2016 doi:10.1016/j.bbrc.2016.07.027. 査読有
- ⑪ Anjam MS, Ludwig Y, Hochholding F, Miyaura C, Inada M: Siddique S, Grundler FM.: An improved procedure for isolation of high-quality RNA from nematode-infected Arabidopsis roots through laser capture microdissection. *Plant Methods* (2016) 12:25:2-9, 2016 doi:10.1186/s13007-016-0123-9. 査読有
- ⑫ Shimizu M, Noda H, Joyashiki E, Nakagawa C, Asanuma K, Hayasaka A, Kato M, Nanami M, Inada M, Miyaura C, Tamura T: The optimal duration of PTH(1-34) infusion is one hour per day to increase bone mass in rats. *Biol Pharm Bull.* 39(4):625-630, 2016 doi: 10.1248/bpb.b15-00756. 査読有
- [学会発表] (計 17 件)
- ① 秋田みゆき、富成司、松本千穂、平田美智子、宮浦千里、稲田全規：炎症性骨吸収に対する TLR3 シグナリングの関与 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (第 40 回日本分子生物学会年会第 90 回日本生化学会大会) ポスター (1P-1144) 2017
- ② 猪股恭子、富成司、松本千穂、平田美智子、宮浦千里、稲田全規：破骨細胞の分化に対するリポカリン 2 の作用 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (第 40 回日本分子生物学会年会第 90 回日本生化学会大会) ポスター (1P-1145) 2017
- ③ 志賀颯一郎、富成司、松本千穂、平田美智子、稲田全規、宮浦千里：破骨細胞形成における ADAMs の関与 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (第 40 回日本分子生物学会年会第 90 回日本生化学会大会) ポスター (1P-1146) 2017
- ④ 野村美沙、渡邊健太、平田美智子、稲田全規、宮浦千里：飢餓条件下における前立腺癌の細胞応答解析 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (第 40 回日本分子生物学会年会第 90 回日本生化学会大会) ポスター (2P-0866) 2017
- ⑤ 藤井裕紀、渡邊健太、平田美智子、宮浦

- 千里、稲田全規：酸化ストレスによる血管形成誘導メカニズムの解析 2017 年度生命科学系学会合同年次大会（第 40 回日本分子生物学会年会第 90 回日本生化学会大会）ポスター（2P-1023）2017
- ⑥ 古川愛也佳、渡邊健太、平田美智子、宮浦千里、稲田全規：前立腺癌細胞による骨形成促進メカニズムの解析 2017 年度生命科学系学会合同年次大会（第 40 回日本分子生物学会年会第 90 回日本生化学会大会）ポスター（2P-0864）2017
- ⑦ 森井優輝、渡邊健太、平田美智子、稲田全規、宮浦千里：前立腺癌細胞の細胞増殖におけるグルコース代謝調節 2017 年度生命科学系学会合同年次大会（第 40 回日本分子生物学会年会第 90 回日本生化学会大会）ポスター（2P-0863）2017
- ⑧ 山崎基、渡邊健太、平田美智子、稲田全規、宮浦千里：乳癌細胞におけるグルタミン代謝と細胞増殖 2017 年度生命科学系学会合同年次大会（第 40 回日本分子生物学会年会第 90 回日本生化学会大会）ポスター（2P-0889）2017
- ⑨ 宮浦千里：「ロコモティブシンドロームの予防と食品機能」アグロメディカルフーズ研究機構 平成 29 年度第 1 回セミナー 2017
- ⑩ Watanabe K, Hirata M, Tominari T, Matsumoto C, Fujita H, Yonekura K, Murphy G, Nagase H, Miyaura C, Inada M: MET/VEGFR/FMS signaling contributes prostate cancer-induced osteoclast differentiation and bone resorption., ASBMR2017 Poster 2017
- ⑪ Yoshinouchi S, Watanabe K, Tominari T, Hirata M, Matsumoto C, Maruyama T, Inada M, Miyaura C: Roles of prostaglandin E2 in prostate cancer induced angiogenesis and bone metastasis., ASBMR2017 Poster 2017
- ⑫ 芳之内翔成、渡邊健太、富成司、平田美智子、松本千穂、丸山隆幸、稲田全規、宮浦千里：前立腺癌の転移と血管新生におけるプロスタグランジン E2 の関与 第 35 回日本骨代謝学会 口演 2017
- ⑬ 渡邊健太、平田美智子、富成司、松本千穂、藤田英憲、米倉和比古、宮浦千里、稲田全規：MET/VEGFR/FMS シグナリングは前立腺癌が誘導する破骨細胞分化と骨破壊に関与する 第 35 回日本骨代謝学会 口演 2017
- ⑭ 渡邊健太、平田美智子、富成司、松本千穂、藤田英憲、米倉和比古、宮浦千里、稲田全規：MET/VEGFR 阻害は前立腺癌が誘導する FMS 依存的な破骨細胞分化と骨破壊を抑制する 口頭発表 第 26 回日本がん転移学会学術集会・総会 2017
- ⑮ 芳之内翔成、渡邊健太、富成司、平田美智子、松本千穂、丸山隆幸、稲田全規、宮浦千里：前立腺癌の転移と血管新生におけるプロスタグランジン E2 の関与 口演 2 第 26 回日本がん転移学会学術集会・総会 2017
- ⑯ 宮浦千里：高齢化社会における骨の健康を科学する：骨疾患の予防と治療 平成 29 年度上期 第 4 回先端科学技術戦略早朝討論会 一般社団法人未踏科学技術協会 2017
- ⑰ 富成司、松本千穂、渡邊健太、平田美智子、宮浦千里、稲田全規：TLR2/6 を介した炎症性骨吸収の誘導作用 第 3 回日本骨免疫学会 ポスター 2017
- 〔図書〕（計 3 件）
- ① 富成 司, 松本 千穂, 宮浦 千里, 稲田 全規. 柑橘由来ポリメトキシフラボノイドの骨代謝調節作用. *Funct Food Res.* 2018, In press 第 14 回ファンクショナルフード学会 学術集会事務局
- ① 富成 司, 宮浦 千里, 稲田 全規: 骨代謝調節におけるバニロイド・カプサイシンの作用 「内分泌・糖尿病・代謝内科」第 45 巻第 2 号 (2017 年 7 月号) 特集/臨床研究の壺 Vol. 45 No. 1 45-50, total84, 2017 科学評論社
- ② 稲田全規、松本千穂、宮浦千里: 第 2 編 第 8 章 骨強化作用 機能性食品開発のための初期評価試験プロトコール集 1. 骨芽細胞培養系における骨形成促進試験 2. マウスマクロファージ様細胞 RAW264.7 培養系による破骨細胞形成試験 3. 閉経後骨粗鬆症モデルマウスにおける骨量減少を利用したスクリーニング試験 148-156/全 366 ページ 2017 シーエムシー出版

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

宮浦 千里 (MIYAUURA, Chisato)  
東京農工大学・大学院工学研究院・教授  
研究者番号：20138382

### (2) 研究分担者

平田 美智子 (HIRATA, Michiko)  
東京農工大学・大学院工学研究院・講師  
研究者番号：40544060