

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 24 年 6 月 8 日現在

機関番号：32658

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580155

研究課題名（和文） 骨粗鬆症モデル動物における水溶性フラボノイドの機能性

研究課題名（英文） PHYSIOLOGICAL FUNCTIONS OF WATER-SOLUBLE FLAVONOID DERIVATIVES IN OSTEOPOROTIC RODENTS

研究代表者

上原 万里子（UEHARA MARIKO）

東京農業大学・応用生物科学部・教授

研究者番号：20211071

研究成果の概要(和文):通常フラボノイドは疎水性が高く、食品添加物としては汎用性が低い。そこで、酵素的な糖付加または環状オリゴ糖で包接し、水溶性を高めた大豆イソフラボンおよび柑橘系フラボノイド（ヘスペリジンまたはヘスペレチン）について、その生体内利用率と骨粗鬆症モデル動物への影響を検討したところ、生体内利用率は、特に環状オリゴ糖で包接された柑橘系フラボノイド上昇し、2型糖尿病モデルラットの続発性骨粗鬆症の症状が軽減された。

研究成果の概要(英文): Since native flavonoids are typical hydrophobic compounds, the compounds have not been frequently used as multipurpose food additives. Enzymatic modified- soy bean isoflavone and hesperidin, and cyclodextrin-clathrated (CD) hesperetin, a citrus bioflavonoid, have higher water-solubility than native corresponding flavonoids. Those water-soluble flavonoid derivates showed high bioavailability, and especially, CD-hesperetin improved secondary osteoporosis in both weanling and old type 2 diabetic rodents.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：イソフラボン、ヘスペリジン、水溶性フラボノイド、サイクロデキストリン、原発性骨粗鬆症、続発性骨粗鬆症、2型糖尿病

1. 研究開始当初の背景

(1) 高齢者人口の増加に伴い、骨粗鬆症はますます重要な疾患となり、その予防対策が必須となっている。骨粗鬆症発症には様々な要因が関与しているが、食習慣が大きく影響するといわれている。骨粗鬆症予防因子として、まず三大栄養素摂取が充足した上でのミネラルやビタミン類の適切な摂取が挙げられているが、非栄養性成分であり、エストロゲン様作用を有する大豆イソフラボンの骨粗

鬆症予防効果についても良く知られている。研究代表者らは、一定の量では子宮などの生殖器官に副作用を与えずエストロゲン様作用を示す天然の Selective Estrogen Receptor Modulator (SERM:選択的エストロゲン受容体作動薬)である可能性を有し、骨量減少を抑制する大豆イソフラボンと、その代謝産物であり強い生理活性をもつ equol に着目し、その骨量減少抑制作用を検討してきた。また、プレバイオティクスであるフラク

トオリゴ糖(FOS)が腸内細菌叢の改善を介してイソフラボン配糖体からアグリコンへの代謝を修飾し daidzein から equol の産生を促進することも確認してきた。

(2)さらに、イソフラボンとは異なる作用機序で骨量減少抑制作用をもつ柑橘系フラボノイドのヘスペリジンについてもその新規な機能性を解明してきた。HMG-CoA 還元酵素阻害剤であるスタチン系薬剤はコレステロール代謝を改善するが、骨量減少抑制作用を併せもち、研究代表者らはヘスペリジンにも同様な作用があることを確認している。近年、コレステロール合成に関わるメバロン酸代謝経路が破骨細胞と骨芽細胞の形成や機能に関与し骨代謝調節にも重要な役割を果たすことが示されている背景も、この研究には重要なポイントである。

2. 研究の目的

近年、このように生理機能が解明されつつあるイソフラボンおよびヘスペリジンであるが、共に疎水性が強く、食品添加物としての利用性には限界がある。イソフラボンは大豆およびその加工食品からの摂取が可能であるが、特にヘスペリジンは柑橘類の果皮に多く含有されるため、通常の食品形態からでは、その摂取効果があまり期待できない。αG イソフラボンおよび同ヘスペリジンは、酵素処理により糖付加を施し、その水溶性を一万倍に高めたものである。また、サイクロデキストリン(CD)-ヘスペレチンはヘスペリジンのアグリコンであるヘスペレチンを環状オリゴ糖の CD で包接したもので、化合物表面の水溶性を増加させており、いずれも食品添加物、サプリメントとしての可能性を広げたものである。これら水溶性フラボノイド摂取後の体内動態と生理作用については報告が少なく、特に骨代謝に関連したものは研究代表者らの報告のみであり、それも αG ヘスペリジンの効果しか評価されていない。

そこで本研究では、3 種の水溶性フラボノイドの骨量減少抑制機能について、骨量減少の発症機序が異なる 3 種のモデル動物(卵巣摘出閉経後骨粗鬆症モデル(OVX)マウス、マグネシウム(Mg)欠乏ラットおよび 2 型糖尿病モデルラット)を用い、対応する疎水性の強い native なフラボノイドと比較し、骨代謝に連動する脂質代謝の変動とともに検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1)平成 21 年度

酵素処理により水溶性を高めた αG イソフラボンの体内動態について検討するため、ラットへの胃内単回投与を行い、血中アグリコン濃度の経時変化の曲線下面積(AUC)を計

算することより、また尿中排泄量を測定することにより、その吸収ピークポイントと吸収量を native なイソフラボン配糖体と比較し、体内利用率を把握した。

骨粗鬆症モデルとして OVX マウスもしくは Mg 欠乏ラットを用い、対照群(正常動物)、骨量減少モデル単独群、+ native イソフラボン、+ αG イソフラボン、OVX では positive control 群(エストロゲン投与)の計 4 もしくは 5 群に分け、各々 4 週間ずつ別の時期に飼育観察後、骨指標についての評価を行った。更に OVX もしくは Mg 欠乏状態で引き起こされる血清・肝臓脂質量増加に対する αG イソフラボン投与の影響も確認した。また、αG イソフラボン投与による daidzein 代謝産物 equol および O-DMA の動態についても評価した。試験実施項目としては、被験動物の飼育管理、代謝ゲージによる採糞尿、データ解析など。骨密度は DXA 法、骨強度は三点折り曲げ法、骨代謝(骨形成および骨吸収)マーカー(Osteocalcin(OC), deoxy-pyridinoline(DPD), I 型コラーゲン C 末端テロペプチド(CTX))は ELISA 法、血中・肝臓中の脂質量については市販のキットを用いて分光光度計にて測定した。骨・腎臓中 Ca、Mg 濃度を原子吸光光度計にて測定した。血・尿中イソフラボンおよびその代謝産物濃度は時間分解蛍光免疫測定法(TR-FIA)により測定した。尚、daidzein, genistein, equol は日本の当機関での測定が可能であるが、O-DMA は、現在ヘルシンキ大学でしか測定が行えないため、その測定法開発者であるヘルシンキ大学の Adlercreutz 教授の研究グループの協力を仰いだ。

(2)平成 22 年度

21 年度の αG イソフラボンと同様、αG ヘスペリジンの体内利用率を把握した。

骨量減少モデルとして OVX は以前用いたことから、この試験系では骨量減少モデルとして Mg 欠乏ラットを中心に用いた。試験群として対照群(Mg 正常動物)、Mg 欠乏単独群、+ native ヘスペリジン、+ αG ヘスペリジン群の計 4 群に分け、6 週間の飼育観察後、骨指標についての評価を行った。更に Mg 欠乏状態で引き起こされる血清・肝臓脂質量増加に対する影響も確認した。また、大腿骨から RNA を抽出し、DNA マイクロアレイ解析に供した。試験実施項目として被験動物の飼育管理、代謝ゲージによる採尿を行い、骨密度は DXA 法、骨強度は三点折り曲げ法、骨代謝マーカー(OC, DPD, CTX)は ELISA 法、血中・肝臓中の脂質量については市販のキットを用いて分光光度計にて測定した。骨・腎臓中 Ca、Mg 濃度を原子吸光光度計にて測定した。血中ヘスペレチン(ヘスペリジンアグリコン)量は、電気化学検出(ECD)-HPLC に

て測定を行った。

(3)平成 23 年度

22 年度の α G ヘスペリジンと同様、CD ヘスペレチンの体内利用率を把握した。この際、native のヘスペレチンおよび α G ヘスペリジンとの比較検討も行う。

Mg 欠乏ラットを用い、対照群(正常動物)、骨量減少モデル単独群、+ native ヘスペレチン、+ CD-ヘスペレチン、+ native ヘスペリジン、+ α G ヘスペリジンの計 6 群に分け、各々 4 週間ずつ別の時期に飼育後、骨指標についての評価を行った。更に Mg 欠乏状態で引き起こされる血清・肝臓脂質量増加に対する影響も確認した。さらに追加実験として OVX マウスにて native ヘスペリジンとスタチン投与の比較も行った。また、2 型糖尿病モデルの Goto-Kakizaki(GK)ラットを用い、Wistar ラットを対照に加えた同様な試験群とし、骨指標、血清・肝臓脂質量に加え、血糖値、血清インスリン、アディポネクチン濃度、糖代謝に關与する酵素活性などを測定し、糖尿病に対する効果も検討した。さらに脂質および骨代謝関連遺伝子発現について real-time PCR を用いて解析を行った。

4. 研究成果

(1)水溶性 α G イソフラボンの機能性

酵素処理による糖転移を施し、水溶性を高めた α G-イソフラボン(ISO)を用い、まずは体内動態について検討したところ、 α G-ISO 由来の daidzein, genistein および daidzein 代謝産物の equol, *O*-DMA は native なイソフラボン配糖体と比較し、早期に血中に検出される傾向を示した。また、OVX 及び Mg 欠乏の骨量減少モデル動物に対し、 α G-ISO は骨吸収抑制作用により骨量減少を抑制した。その際、native なイソフラボン配糖体投与と比較し、 α G-ISO 投与では *O*-DMA は高い bio-availability を示したものの、骨指標、体内脂質量において native な配糖体との顕著な差は認められなかった。

(2)水溶性 α G ヘスペリジンの機能性

α G ヘスペリジンの体内利用率を把握し、骨量減少モデルとしてマグネシウム(Mg)欠乏ラットを用いた。試験群として対照群(Mg 正常動物: N)、Mg 欠乏単独群(D)、+ native ヘスペリジン(DH)、+ α G ヘスペリジン(D α)群の計 4 群に分け、6 週間の飼育観察後、骨指標についての評価を行った。更に Mg 欠乏状態で引き起こされる血清・肝臓脂質量増加に対する影響も確認した。native ヘスペリジン及び α G ヘスペリジンは Mg 欠乏による体内脂質量増加および骨量減少を抑制した(図 1)。また、OVX マウスにおける native ヘスペリジンとスタチンは同等に OVX による骨

量減少を抑制し、増加した脂質量を改善した。

大腿骨の DNA マイクロアレイ解析では、Mg 欠乏により、Ca-sensing receptor、骨吸収に關わる TNF 受容体ファミリー関連遺伝子発現が増加し、骨形成タンパクである BMP ファミリーの遺伝子発現が減少し、Mg 欠乏による骨量減少の生化学値を反映する変動を示したが、変動遺伝子が少なかったため、ヘスペリジン類投与サンプルの解析は行わなかった。

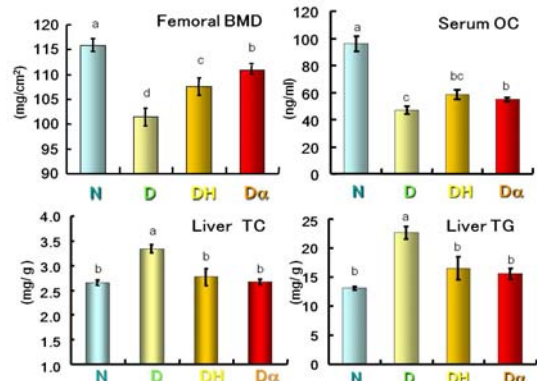


図 1. 大腿骨骨密度(BMD), 骨形成マーカー(OC)および肝臓コレステロール(TC)および中性脂肪(TG)濃度

(3)水溶性 CD ヘスペレチンの機能性

CD で包接させ水溶性を高めたヘスペレチン(CD)を正常ラットに投与したところ、native ヘスペリジン(Hes)、ヘスペリジンアグリコン(Ag)、 α G ヘスペリジン(α G)と比較し、明らかに高い血中濃度を示し AUC も高値となった(図 2)。次に 2 型糖尿病モデルの GK ラット(若齢)に CD-Hes を投与したところ、糖代謝関連酵素活性の変動により血糖値、インスリン濃度が改善され、血中アディポネクチン濃度、血中及び肝臓中性脂肪、コレステロール値が対照の正常群に近づく結果となった。

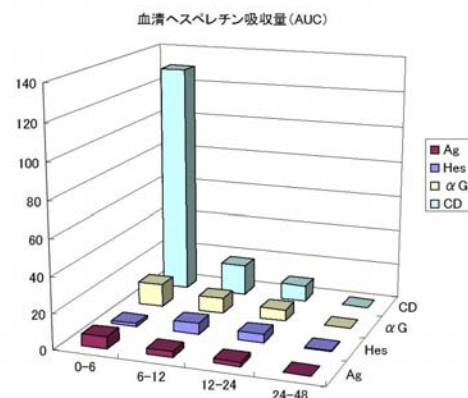


図 2. 血清曲線下面積 (AUC) によるヘスペレチン吸収量

骨指標については、ミネラル吸収促進が観察された CD-Hes の骨量減少抑制効果は認められたが、非包接型の native ヘスペリジンでは変化がみられなかった。

次に、これまでの若齢に対し、高齢型糖尿病モデル(GK)ラット(G群)を用い、AIN93G 組成の対照食、native ヘスペリジン(HES:H)または CD-Hes(CH)添加食を投与し、正常動物の Wistar ラット(W群)にも同様の飼料を 8 週間投与した。その結果、GK 群において上昇した血糖値、インスリン濃度、血・肝臓中脂質量、変動した糖代謝関連サイトカイン・酵素は、HES および CD-Hes 投与により正常ラットに近づく改善効果が観察された。また GK ラットでは糖尿病による続発性骨粗鬆症が引き起こされ、低下した骨密度・骨強度、骨代謝マーカの変動も HES および CD-Hes 投与により改善された。このメカニズムを検討するため、肝臓および大腿骨から RNA を抽出し、関連遺伝子発現変動を定量したところ、HES による肝臓での糖・脂質代謝改善は PPAR- γ 遺伝子発現の変動を介したインスリン抵抗性改善に関与することが示唆され、大腿骨では炎症系サイトカインである TNF- α 、IL-1 β などの骨吸収関連遺伝子発現が抑制され、破骨細胞分化・活性化抑制にはたらき、型コラーゲン遺伝子の Col1A、IGF-1 (インスリン様成長因子)などの骨形成関連遺伝子発現は逆に促進されたため、骨芽細胞活性化に寄与する可能性が示唆され、大腿骨・BMD、骨強度(Breaking Force)が改善された(図 3)。水溶性 CD-Hes と疎水性 HES との差異は血中 Hes 濃度、血・肝臓中コレステロール濃度、Ca 吸収率、骨代謝マーカ、肝臓の HMG 還元酵素遺伝子発現などに現れ、いずれも CD-Hes 投与で強く作用した。

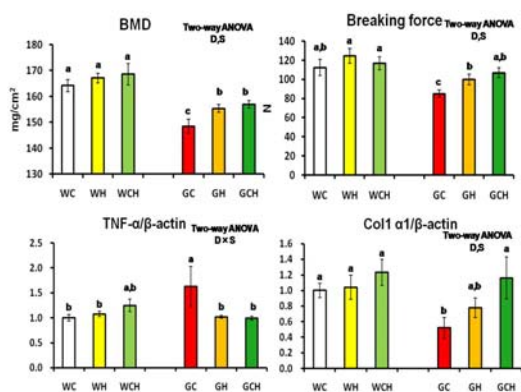


図 3. 大腿骨・骨密度(BMD), 骨強度(Breaking force)および骨吸収(TNF- α)・骨形成(Col1A1)関連遺伝子(mRNA)発現

以上より、水溶性を高めた大豆イソフラボ

ンでは顕著な影響が認められなかったが、ヘスペリジン類では、とくに環状オリゴ糖で包接した CD-Hes の bioavailability が高く、いくつかの測定項目で優れた機能性が発揮され、添加物としての付加価値を高めた。

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 13 件)

Kimira Y, Tajima K, Ohta A, Ishimi Y, Katsumata SI, Suzuki K, Adlercreutz H, Uehara M. Synergistic effect of isoflavone glycosides and fructooligosaccharides on postgastrectomy osteopenia in rats. *J Clin Biochem Nutr*, Advance Publication (査読有) DOI: 10.3164/jcfn.D-12-00010

Tousen Y, Abe F, Ishida T, Uehara M, Ishimi Y. Resistant starch promotes equol production and inhibits tibial bone loss in ovariectomized mice treated with daidzein. *Metabolism* 60: 1425-1432, 2011 (査読有) DOI: 10.1016/j.metabol.2011.02.009

Uchida R, Chiba H, Ishimi Y, Uehara M, Suzuki K, Kim H, Matsumoto A. Combined effects of soy isoflavone and fish oil on ovariectomy-induced bone loss in mice. *J Bone Miner Metab* 29: 404-413, 2011 (査読有) DOI: 10.1007/s00774-010-0234-8

上原万里子、石島智子、松本一朗、岡田晋司、荒井綜一、阿部啓子、勝間田真一、松崎広志、鈴木和春. 栄養素代謝におけるマグネシウムの重要性. 日本海水学会誌 29 巻, pp.202-210, 2010 (査読無)

Nakaya Y, Uehara M, Katsumata S, Suzuki K, Sakai K, Ohnishi R, Akiyama S, Ohta A. The frequency of magnesium consumption directly influences its serum concentration and the amount of elutable bone magnesium in rats. *Magnes Res*, 23: 48-56, 2010(査読有)

[URL:http://www.jle.com/en/revues/bio_rech/mrh/e-docs/00/04/55/45/resume.ph.tml](http://www.jle.com/en/revues/bio_rech/mrh/e-docs/00/04/55/45/resume.ph.tml)

Akiyama S, Katsumata S, Suzuki K, Ishimi Y, Wu J, Uehara M. Dietary hesperidin exerts hypoglycemic and hypolipidemic effects in streptozotocin-induced marginal type 1 diabetic rats. *J Clin Biochem Nutr* 46:87-9, 2010 (査読有)

DOI:http://dx.doi.org/10.3164/jcfn.

09-82

Akiyama S, Katsumata S, Suzuki K, Nakaya Y, Ishimi Y, Uehara M. Hypoglycemic and hypolipidemic effects of hesperidin and cyclodextrin-clathrated hesperetin in Goto-Kakizaki rats with type 2 diabetes. *Biosci Biotechnol Biochem* 73:2779-82, 2009 (査読有)

DOI: <http://dx.doi.org/10.1271/bbb.90576>

Otaki N, Kimira M, Katsumata S, Uehara M, Watanabe S, Suzuki K. Distribution and major sources of flavonoid intakes in the middle-aged Japanese women. *J Clin Biochem Nutr* 44:231-238, 2009 (査読有).

DOI: <http://dx.doi.org/10.3177/jnsv.55.332>

上原万里子、ヘスペリジンの骨粗鬆症予防作用、FOOD STYLE 21、13 巻 pp.32-34、2009 (査読無)

上原万里子、秋山聡子、骨リモデリングと骨質を高める食品、食品と開発、44 巻、pp.12-15、2009 (査読無)

〔学会発表〕(計 18 件)

Uehara M, Kimira Y, Katsumata SI, Akiyama S, Ishimi Y, Chiba H, Suzuki K, Possible roles of phytochemicals on bone quality in rodent models of osteoporosis International Conference of Food Factors (ICoFF) 2011, 2011 年 11 月 22 日, International Conference Center (Taipei, Taiwan)

Uehara M, Food diversification in Japan: Recent development in functional foods, International Society for Southeast Asian Agricultural Science (ISSAAS) 2011, 2011 年 11 月 7 日, IPB International Convention Center (Bogor, Indonesia)

Uehara M, Kimira Y, Katsumata SI, Suzuki K, Ueno T, Uchiyama S, Adlercreutz H, Wu J, Ishimi, Y, Risk-benefit assessment of soy isoflavones and their metabolites, PACIFICHEM2010, 2010 年 12 月 17 日 Hawaii Convention Center (USA)

千葉大成、上原万里子、石見佳子、鈴木和春、金賢珠、松本明世、糖転移ヘスペリジンと未処理ヘスペリジンによる骨代謝調整作用の差異 . 第 46 回日本栄養・食糧学会大会、2010 年 5 月 23 日、アステイ徳島(徳島県)

Uehara M, Akiyama S, Katsumata SI, Ishimi Y, Suzuki K. Hypoglycaemic and

hypolipidaemic effects of hesperetin glycosides prevent diabetic osteopathy in type 2 diabetic rats. International Conference on Polyphenols and Health 2009 (ICPH2009), December 9, 2009, Harrogate, UK

Uehara M, Nemoto T, Matsumoto I, Okada S, Arai S, Abe K, Katsumata SI, Suzuki K, Magnesium status affects nutrient metabolism. 9th International Symposium on Salt, September 6, 2009, Beijing, China

〔図書〕(計 2 件)

上原万里子、石見佳子 監修(第 編 第 5 章総論～骨と機能性食品～(pp.47-54) および第 18 章ブラム、ブルーベリー、オリーブなど(pp.180-186)を上原が執筆)、シーエムシー出版、機能性食品素材の骨と軟骨への応用、2011、総ページ数 252 . 五十嵐喜治、上原万里子、長田恭一、駒井三千夫、八村敏志、福島道弘、三共出版、食品機能栄養学、5. ミネラル (pp.98-119)、2010、総ページ数 167

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

上原 万里子 (UEHARA MARIKO)
東京農業大学・応用生物科学部・教授
研究者番号：20211071

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：