

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）：

ヘ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。糖転移ヘ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、糖転移ヘ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ヘ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

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。

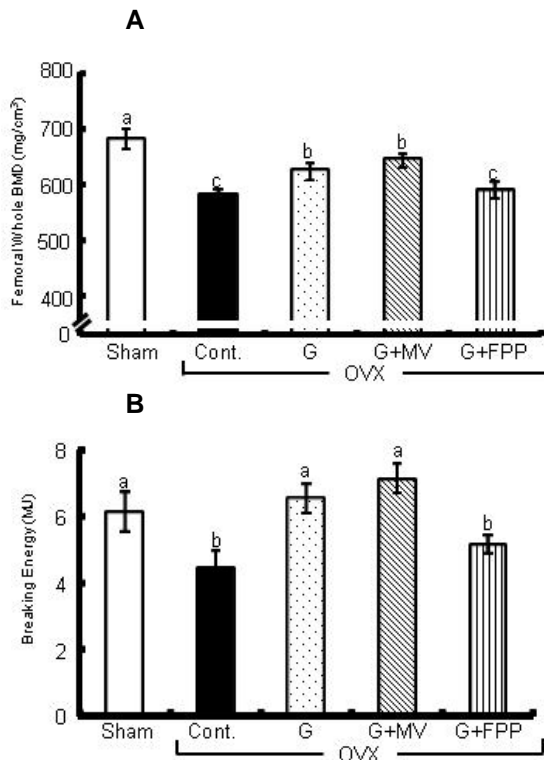


図2 大腿骨構造的解析
A: 大腿骨全骨密度 B: 破断エネルギー

(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 μ 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 μ M) した (図3)。

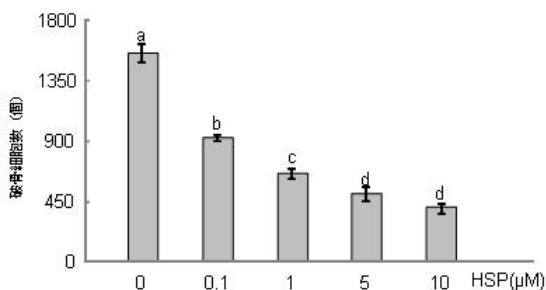


図3 破骨細胞分化に対するヘスペレチンの作用

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 μ 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、OVX 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 Osterix 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 BMP シグナル伝達系を刺激するばかりか、MAPK 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 (J Agric Food Chem, 2010 & J Nutr Biochem, 2010)。

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なっているが、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れなかった。

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。ヘスペ

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
- ② 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 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節作用の差異 第64回日本栄養食糧学会 (2010.05.21-23 徳島)
- ② 千葉大成 「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 千葉大成 メバロン酸合成経路に着目した糖転移ヘスペリジンによる骨代謝調節 シンポジウム 第2回糖転移ヘスペリジン・ビタミンP研究会(2010.12.08 京都)
- ④ 千葉大成、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reek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、千葉大成ら 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、千葉大成ら。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