

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26506004

研究課題名(和文)宇宙微小重力による骨量減少を予防・改善する天然キサントフィル類の有用性立証

研究課題名(英文) Natural citrus derived xanthophyll protects bone loss associated with the space microgravity.

研究代表者

平田 美智子 (HIRATA, MICHIKO)

東京農工大学・工学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：40544060

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：宇宙の微小重力環境下では、骨吸収の亢進と骨形成の低下が同時に起こり、短期間で激しい骨量減少に至る。本課題では、微小重力による骨量低下を阻止できるキサントフィルを決定した。最も活性が高かったルテインは骨芽細胞におけるRANKL遺伝子発現を抑制し、破骨細胞のアポトーシスを誘導すること、Bmp2の遺伝子発現を促進し、骨形成を亢進することを見出した。さらに、骨粗鬆症モデル動物と尾部懸垂モデルマウスにおいても大腿骨骨量の減少を回復させることを明らかとした。ルテインは宇宙微小重力による骨量減少や骨粗鬆症などの骨吸収性疾患における予防・改善効果を示し、今後の宇宙飛行士サプリメントの開発への検討が期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we evaluated the effects of xanthophyll on bone formation and bone resorption, in mouse models for OVX and tail suspension. The most of the functional compound was lutein, a member of the xanthophyll family of carotenoids, suppressed IL-1-induced osteoclast differentiation and bone resorption. The survival of mature osteoclasts was also suppressed by the treatment of lutein in cultures. When lutein was added to the cultures of osteoblasts, lutein enhanced the formation of mineralized bone nodules by elevating BMP2 expression. When OVX or tail suspension mice were orally administered lutein for 4 weeks, the femoral bone mass was enhanced in cancellous bone, as measured by bone mineral density in dual X-ray absorptiometry and micro-CT analyses. Lutein could be a natural compound that promotes bone formation that prevents bone loss associated with the space microgravity.

研究分野：生化学

キーワード：生物・生体工学 宇宙空間 骨粗鬆症 機能性食品

1. 研究開始当初の背景

宇宙の微小重力環境では、骨吸収の亢進と骨形成の低下が同時に起こることにより短期間で激しい骨量減少に至る。従って、微小重力による骨量低下を阻止するには、骨吸収抑制と骨形成促進の両方を短期間で促すことが必須である。さらに骨芽細胞と筋細胞の幹細胞は同一であり、骨量低下と筋肉萎縮は密接な関係を有することから、骨と筋の双方を活性化するアプローチが必要である。これまでに、宇宙飛行による骨量減少を防止することを目的とし、薬剤服用や運動療法の取組が試みられている。日米共同実験として、宇宙飛行士が骨粗鬆症治療薬であるビスホスホネートを服用する試験が実施され、宇宙飛行による骨量低下が軽減されることが報告された。しかし、微小重力の骨量減少は骨吸収亢進のみならず骨形成低下が同時に起こることに起因するため、骨形成を促進する取組が求められている。長期宇宙飛行の骨量低下と生体からのカルシウム喪失を阻止し、飛行士の健康を安全に支え、地上帰還後の骨代謝を正常に維持するためには、薬剤の服用に依存せず、安全な天然因子を活用して宇宙環境リスクを軽減する取組が必須となっている。

これまでの研究において、天然の果樹や野菜に含まれるキサントフィル類(図1)は多彩な健康増進作用が報告されているが、研究代表者は、温州ミカンに含まれるベータクリプトキサンチン、トマトに含まれるリコペンが骨を破壊する破骨細胞の形成を抑制して骨吸収を抑制することを報告した。また、最近、ホウレン草に含まれるルテインは骨吸収を抑制するのみならず、骨芽細胞の石灰化と骨形成を促すことを見出した。そこで、宇宙における骨量低下は、骨吸収亢進と骨形成抑制の両方に起因することを考えると、ルテインのように骨吸収と骨形成の双方に有効な因子を活用すれば、微小重力による骨量低下を予防・改善できるという着想に至った。

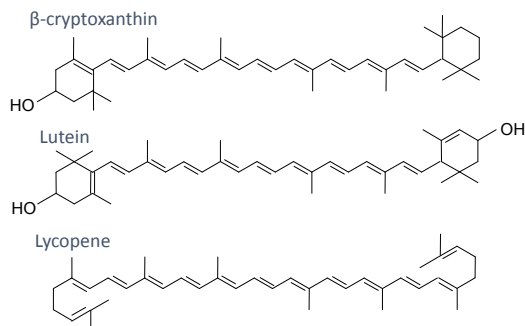


図1. キサントフィルの構造式

2. 研究の目的

国際宇宙ステーションの本格運用により宇宙での有人活動が活発化し、微小重力による

骨量低下や筋萎縮が問題となっている。微小重力による骨量低下を予防・改善する方策は宇宙飛行士の健康管理のみならず、高齢化により顕在化している骨粗鬆症の予防法に活用できる点でも意義深い。研究代表者は天然キサントフィル類であるベータクリプトキサンチン、ルテイン、リコペンが骨吸収を抑制し、骨形成を促進して骨量増加効果を示すことを見出した。そこで、本研究課題では、キサントフィル類を用い、微小重力による骨量低下を阻止できるキサントフィルを決定し、骨粗鬆症への予防効果とそのメカニズム解明も進め、宇宙飛行士サプリメントの開発を目指した。

宇宙滞在による骨量減少を予防し、地上帰還後も健全な骨量を維持するために、安全で食品として日常摂取が可能な天然キサントフィルを活用し、宇宙飛行士に適用する骨量低下予防サプリメントを開発への検討を試みた。本研究により、宇宙飛行士のリスク低減のみならず、骨粗鬆症の予防・治療法開発においても活用できると考えた。

3. 研究の方法

宇宙微小重力による骨量減少に予防・改善効果を発揮する天然キサントフィル類(ベータクリプトキサンチン、ルテイン、リコペン)の有効性を立証し、宇宙サプリメントを開発するため、以下の研究を実施した。

(1) キサントフィル類の骨吸収と骨形成への作用を解明

ベータクリプトキサンチン、ルテイン、リコペンの3種の天然キサントフィル類を用い、骨吸収抑制作用と骨形成促進作用について、培養系実験により作用強度の比較を行なった。骨吸収は、マウス骨髄細胞と骨芽細胞の共存培養系を用い、IL-1による破骨細胞形成への抑制効果を定量化した。骨形成はアスコルビン酸存在下で骨芽細胞を培養し、アリザリン染色性の骨石灰化への促進効果を調べた。

(2) キサントフィルの骨作用のメカニズム解明と骨粗鬆症への有効性

上記試験により、効果的なキサントフィルを選択し、その作用メカニズムを解析した。さらに、骨粗鬆症モデル動物への投与実験を行い、骨粗鬆症への有効性を立証した。

① キサントフィルの骨への作用メカニズムの解析

骨吸収へのキサントフィルの作用は破骨細胞誘導因子(RANKL)の遺伝子発現、破骨細胞のアポトーシス誘導、細胞内シグナル伝達を解析した。骨形成への作用は、骨形成関連因子(Bmp2, I型コラーゲン, アルカリホスファターゼ)の遺伝子発現調節および石灰化への作用を解析した。

② キサントフィルの骨粗鬆症への有効性

骨粗鬆症モデル動物は雌性マウスに卵巣摘出を施して作製し、キサントフィルを経口投与した。術後4週において、大腿骨の骨密度 (BMD ; bone mineral density) は DEXA を用いて定量化し、マイクロ CT 解析により大腿骨遠位部における海綿骨の3次元解析を行なった。

(3) 微小重力による骨量低下に対するキサントフィルの予防・改善効果の立証

宇宙微小重力による骨量低下モデルとして、尾部懸垂マウスを用いた。尾部懸垂マウスは、懸垂した大腿骨のみ力学的負荷が減少し、骨吸収亢進と骨形成抑制により著しく骨量が低下することから、宇宙環境の微小重力による骨量低下のモデル動物として知られている。このモデルマウスに絞り込んだ1種のキサントフィルを餌に混合して経口投与し、骨量低下への改善作用を解析した。骨解析方法は、上記の骨粗鬆症解析の場合と同様に行なった。

4. 研究成果

(1) キサントフィル類の骨吸収と骨形成への作用を解明

骨吸収は、マウス骨髄細胞と骨芽細胞の共存培養系を用い、骨形成は骨芽細胞を用いた。ベータクリプトキサンチン、ルテイン、リコペンの3種の天然キサントフィルについて、骨吸収抑制作用と骨形成促進作用の解析を実施し、作用強度の比較を行なった。その結果、ルテイン、ベータクリプトキサンチン、リコペンの3種全てにおいて、破骨細胞分化抑制作用ならびに骨吸収抑制作用が認められ、その強度はほぼ同程度であった(図2)。しかし、ルテインのみが骨形成促進作用を有していることが明らかとなった(図3)。従って、両方の作用を有し、かつ、最も作用が強力な1種の最適キサントフィルは、ルテインであると決定した。

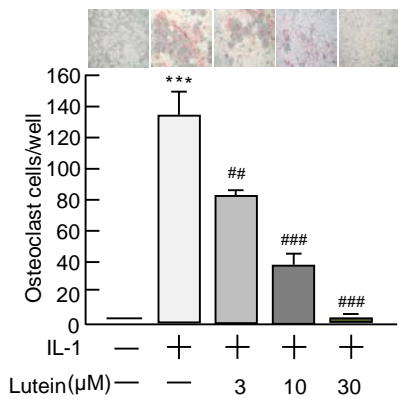


図2. ルテインの破骨細胞分化抑制効果

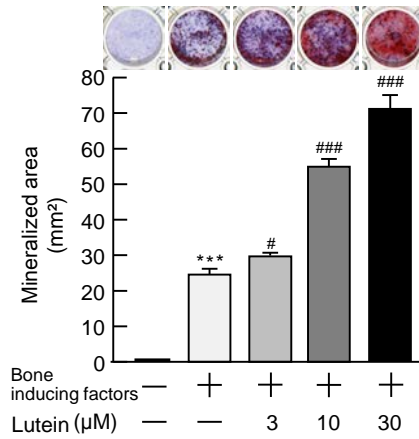


図3. ルテインの骨形成促進効果

(2) -① キサントフィルの骨への作用メカニズムの解析

キサントフィル (ルテイン、ベータクリプトキサンチン) の骨への作用メカニズムの解析について、骨吸収へのキサントフィルの作用を破骨細胞誘導因子 (RANKL) の遺伝子発現、破骨細胞のアポトーシス誘導について解析した。その結果、ルテインとベータクリプトキサンチン共に、骨芽細胞における RANKL 遺伝子発現を抑制し(図4)、破骨細胞のアポトーシスを誘導した。骨形成への作用は、ルテインが骨芽細胞に作用して骨形成関連因子 Bmp2 の遺伝子発現を促進し、石灰化を亢進することを見出した(図5)。

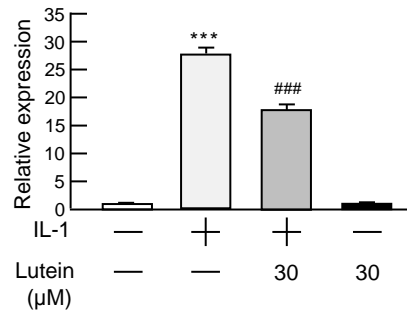


図4. 骨芽細胞における RANKL 遺伝子発現

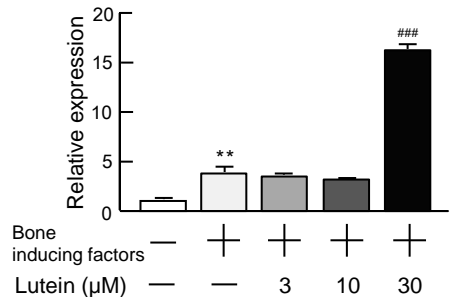


図5. 骨芽細胞における Bmp2 遺伝子発現

(2) -② キサントフィルの骨粗鬆症への有効性

骨粗鬆症モデル動物である卵巣摘出マウスにキサントフィルを投与する動物実験を実施した。その結果、ベータクリプトキサン

チンあるいはルテインを投与すると大腿骨の骨密度が回復傾向を示し、マイクロ CT 解析により大腿骨遠位部海綿骨が増大することを見出した(論文投稿中)。これら知見は、キサントフィルが骨吸収を抑制して骨量増加作用を発揮することを示唆した。

(3) 微小重力による骨量低下に対するキサントフィルの予防・改善効果の立証

尾部懸垂モデルマウスにキサントフィルを餌に混合して経口投与し、骨量低下への改善作用を解析した。その結果、微小重力による大腿骨遠位部海綿骨量の減少が回復することをマイクロ CT 解析により明らかとした(論文投稿中)。

本研究により、キサントフィルが骨吸収を抑制して骨量維持作用を発揮することを明確に示した。食品として安全・安心で日常摂取が可能なキサントフィルは宇宙微小重力による骨量減少や骨粗鬆症などの骨吸収性疾患における予防・改善効果を示し、今後の宇宙飛行士サプリメントの開発への検討が期待される。

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 12 件 抜粋 7 件)

- ① 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
- ② 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
- ③ 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

- ④ 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
- ⑤ Inada M, Takita M, Yokoyama S, Watanabe K, Tominari T, Matsumoto C, Hirata M, Maru Y, Maruyama T, Sugimoto Y, Narumiya S, Uematsu S, Akira S, Murphy G, Nagase H, Miyaura C: Direct Melanoma Cell Contact Induces Stromal Cell Autocrine Prostaglandin E2-EP4 Receptor Signaling that Drives Tumor Growth, Angiogenesis and Metastasis. *J. Biol. Chem.* 290(50):29781-29793, 2015 doi: 10.1074/jbc.M115.669481. 査読有
- ⑥ Tominari T, Matsumoto C, Watanabe K, Hirata M, Florian M.W. Grundler, Miyaura C, Inada M: Epigallocatechin gallate (EGCG) suppresses lipopolysaccharide-induced inflammatory bone resorption, and protects against alveolar bone loss in mice. *FEBS Open Bio* 5: 522-527, 2015 doi: 10.1016/j.fob.2015.06.003. 査読有
- ⑦ Matsumoto C, Inoue H, Tominari T, Watanabe K, Hirata M, Miyaura C, Inada M: Heptamethoxyflavone, a citrus flavonoid, suppresses inflammatory osteoclastogenesis and alveolar bone resorption. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 79(1):155-158, 2014 doi: 10.1080/09168451.2014.952616. 査読有

[学会発表] (計 65 件 抜粋 24 件)

- ① Watanabe K, Hirata M, Tominari T, Maruyama T, Inada M, Miyaura C: Abrogation of prostaglandin E and its receptor EP4 signaling in osteoblasts prevents the bone destruction induced by human prostate cancer. Session: Poster Session II & Poster Tours[SU0048] September 18, 2016 ASBMR2016 Discovery Hall - Expo Hall A1/Georgia World Congress Center, Atlanta, USA
- ② Tominari T, Watanabe K, Hirata M, Miyaura C, Inada M: A gram positive bacteria membrane component derived lipoteichoic acid induces PGE2-mediated inflammatory periodontal bone resorption. Session: Poster Session II & Poster

Tours[SU0149] September 18, 2016
ASBMR2016 Discovery Hall - Expo Hall
A1/Georgia World Congress Center,
Atlanta, USA

- ③ 富成司、渡邊健太、平田美智子、宮浦千里、稲田全規：Lipoteichoic acid (LTA) による PGE₂ を介した骨吸収の誘導作用 0-02 口演 1 骨吸収 1 第 34 回日本骨代謝学会学術集会・第 3 回アジア太平洋骨代謝学会議 2016 年 7 月 20~23 日 大阪国際会議場 (大阪府・大阪市)
- ④ 富成司、渡邊健太、平田美智子、宮浦千里、稲田全規：グラム陽性細菌由来 Lipoteichoic acid (LTA) による PGE₂ を介した骨吸収の誘導作用 第 2 回日本骨免疫学会 ポスター 9 「免疫 2」 2016 年 7 月 7 日 ホテルモントレ沖縄スパ&リゾート (沖縄県・国頭郡)
- ⑤ 渡邊健太、平田美智子、富成司、丸山隆幸、宮浦千里、稲田全規：前立腺癌の骨転移におけるプロスタグランジン E₂ の関与 第 2 回日本骨免疫学会 ポスター 6 「破骨細胞 2」 2016 年 7 月 7 日 ホテルモントレ沖縄スパ&リゾート (沖縄県・国頭郡)
- ⑥ 菅谷旬、渡邊健太、平田美智子、宮浦千里、稲田全規：I 型コラーゲン上における癌細胞増殖メカニズムの解明 2015 年 12 月 2 日 2P1087 ポスター発表 第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会 神戸ポートアイランド (神戸ポートピアホテル、神戸国際会議場、神戸国際展示場、神戸商工会議所) ポスター展示：神戸国際展示場 (兵庫県・神戸市)
- ⑦ 沼川悟、渡邊健太、平田美智子、宮浦千里、稲田全規：I 型コラーゲンによる細胞機能調節の検討 2015 年 12 月 2 日 2P1123 ポスター発表 第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会 神戸ポートアイランド (神戸ポートピアホテル、神戸国際会議場、神戸国際展示場、神戸商工会議所) ポスター展示：神戸国際展示場 (兵庫県・神戸市)
- ⑧ 丹羽貴之、渡邊健太、平田美智子、宮浦千里、稲田全規：ROS 経路を介したメラニン産生の制御 2015 年 12 月 2 日 2P1128 ポスター発表 第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会 神戸ポートアイランド (神戸ポートピアホテル、神戸国際会議場、神戸国際展示場、神戸商工会議所) ポスター展示：神戸国際展示場 (兵庫県・神戸市)
- ⑨ 金子雄大、富成司、松本千穂、平田美智子、稲田全規、宮浦千里：破骨細胞分化における mTOR 複合体の関与 2015 年 12 月 2 日 2P1241 ポスター発表 第 38

回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会 神戸ポートアイランド (神戸ポートピアホテル、神戸国際会議場、神戸国際展示場、神戸商工会議所) ポスター展示：神戸国際展示場 (兵庫県・神戸市)

- ⑩ 眞田歩美、富成司、松本千穂、平田美智子、稲田全規、宮浦千里：LTA による炎症性骨吸収の誘導作用 2015 年 12 月 2 日 2P1242 ポスター発表 第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会 神戸ポートアイランド (神戸ポートピアホテル、神戸国際会議場、神戸国際展示場、神戸商工会議所) ポスター展示：神戸国際展示場 (兵庫県・神戸市)
- ⑪ 市丸亮太、富成司、松本千穂、平田美智子、稲田全規、宮浦千里：破骨細胞分化に対する β クリプトキサンチンの効果 2015 年 12 月 2 日 2P1244 ポスター発表 第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会 神戸ポートアイランド (神戸ポートピアホテル、神戸国際会議場、神戸国際展示場、神戸商工会議所) ポスター展示：神戸国際展示場 (兵庫県・神戸市)
- ⑫ 福田菜摘、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カルシウムシグナリングの解析 2015 年 12 月 3 日 3P1227 ポスター発表 第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会 神戸ポートアイランド (神戸ポートピアホテル、神戸国際会議場、神戸国際展示場、神戸商工会議所) ポスター展示：神戸国際展示場 (兵庫県・神戸市)
- ⑬ Tominari T, Hirata M, Miyaura C, Inada M: A gram positive bacterial toxin lipoteichoic acid induces inflammatory bone resorption through PGE₂ production. October, 12 2015 M00191 ASBMR2015 Session: Poster Session III, Discovery Hall-Exhibit Hall 4B of the Washington State Convention Center in Seattle, USA.
- ⑭ Hirata M, Tominari T, Inada M, Miyaura C: Indole sulfate as a metabolite in CKD patients regulates low turnover of bone metabolisms through OAT-3 transporter. October, 11 2015 SU0010 ASBMR2015 Session: Poster Session III, Discovery Hall-Exhibit Hall 4B of the Washington State Convention Center in Seattle, USA.
- ⑮ Watanabe K, Hirata M, Miyaura C, Inada M: MMP13-induced type I collagen degradation plays a key role in the prostate cancer dependent bone metabolism. SU0067 October, 11 2015 SU0010 ASBMR2015 Session: Poster

- Session III, Discovery Hall-Exhibit Hall 4B of the Washington State Convention Center in Seattle, USA.
- ⑩ 富成司、松本千穂、平田美智子、宮浦千里、稲田全規：インドール代謝性の尿毒性物質であるインドキシル硫酸による骨代謝調節作用の検討 第 33 回日本骨代謝学会学術集会 2015 年 7 月 25 日口頭発表 京王プラザホテル（東京都・新宿区）
- ⑪ 松本千穂、富成司、平田美智子、宮浦千里、稲田全規：グラム陽性細菌由来 LTA による TLR2 受容体を介した炎症性骨吸収の誘導作用 第 33 回日本骨代謝学会学術集会 2015 年 7 月 24 日 P2-28 ポスター発表 京王プラザホテル（東京都・新宿区）
- ⑫ Sugaya S, K Watanabe K, Kiuchi E, Hirata M, Miyaura C, Inada M: Glucose metabolism in prostate cancer cells is involved in its cell growth. PS-01-a-029 第 12 回アジア栄養会議 第 69 回日本栄養・食糧学会大会 2015 年 5 月 14 日～18 日 パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)
- ⑬ Ichimaru R, Tominari T, Matsumoto C, Hirata M, Inada M, Miyaura C : Beta-Cryptoxanthin inhibits osteoclast functions in inflammatory bone resorption. PS-01-p-067 第 12 回アジア栄養会議 第 69 回日本栄養・食糧学会大会 2015 年 5 月 14 日～18 日 パシフィコ横浜(横浜市・西区)
- ⑭ Matsumoto C, Tominari T, Hirata M, Inada M, Miyaura C : “Membrane-bound prostaglandin E synthase (mPGES)-1-mediated prostaglandin E2 (PGE2) production plays a critical role in the ligand for toll-like receptor 2 heterodimer (TLR1/2, TLR 2/6) induced bone resorption” ASBMR2014. Session: Poster Session III & Poster Tours 2014. 9. 15 Discovery Hall-Hall E/George R. Brown Convention Center, Houston, U. S. A)
- ⑮ Tominari T, Matsumoto C, Hirata M, Inada M, Miyaura C: “ Carbon-containing Polyhedral Boron-cluster Carborane BA321 acts on bone tissues as selective androgen receptor modulator (SARM)” ASBMR2014. Session: Poster Session III & Poster Tours 2014. 9. 15 Discovery Hall-Hall E/George R. Brown Convention Center, Houston, U. S. A)
- ⑯ Watanabe K, Matsumoto C, Hirata M, Maruyama T, Inada M, Miyaura C: “ Effects of PGE2 receptor EP4 antagonist on breast cancer-induced bone metastasis and bone destruction

- in the metastasis region” ASBMR2014 ASBMR2014. Session: Poster Session III & Poster Tours 2014. 9. 15 Discovery Hall-Hall E/George R. Brown Convention Center, Houston, U. S. A)
- ⑰ 松本千穂、富成司、平田美智子、稲田全規、宮浦千里 : Toll-like receptor 2 ヘテロ受容体 (TLR1/2, TLR 2/6) シグナルにより誘導される骨吸収亢進における膜型 PGE 合成酵素の関与 第 32 回日本骨代謝学会学術集会 0-062 口演 11 ホルモンおよび局所因子 2 2014 年 7 月 26 日 大阪国際会議場 (大阪府・大阪市)
- ⑱ 富成司、松本千穂、平田美智子、稲田全規、宮浦千里 : カルボラン化合物 BA321 の骨への SARM 作用は内因性アンドロゲンにより左右される 第 32 回日本骨代謝学会学術集会 P1-28 2014 年 7 月 24 日 ポスターセッション 2 大阪国際会議場 (大阪府・大阪市)

〔図書〕
なし

〔産業財産権〕
なし

〔その他〕
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

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

稲田 全規 (INADA, Masaki)

東京農工大学・大学院工学研究院・准教授
研究者番号：80401454

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし