

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 31 年 5 月 3 日現在

機関番号：32403

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K16286

研究課題名(和文) 柑橘リモノイドによる骨粗鬆症予防機序の解明

研究課題名(英文) Elucidation of osteoporosis prevention mechanism by citrus limonoid

研究代表者

君羅 好史(Kimria, Yoshifumi)

城西大学・薬学部・助教

研究者番号：00635443

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：近年、様々な生理機能を示すことが報告されている柑橘リモノイドであるが、柑橘類の種子中に多く含まれるため、食品からの摂取効果はあまり期待できない。またリモノイドを多く含む柚子は生産量の約半分の重量が廃棄されていることから、申請者は柚子をまるごとすり潰し、柑橘リモノイドを多く含む柚子ペーストを開発し、機能性食品としての廃棄物活用を検討している。本研究では、骨粗鬆症の予防に貢献しうる、骨代謝に与える柑橘リモノイドの効果について検討したところ、柚子に多く含まれるリモノイドであるノミリンが骨吸収を担う破骨細胞の分化抑制作用を有することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ノミリンは苦味を呈する、食品としての研究および商品開発が困難であった。近年はその生理作用に着目した薬物としての利用を目的とした研究が盛んに行われ、抗腫瘍形成や抗肥満、血糖低下作用など臨床においての重要な知見も報告されている。

本研究により、柑橘リモノイドの骨代謝に対する作用機序が見出されたことから、申請者らが開発したリモノイドを多く含む柚子ペーストは、機能性食品として活用出来ることが期待でき、さらにその生産量の約半量が廃棄されている柚子の活用にもつながることも合わせて期待できることから、本研究の成果は、国民の健康および廃棄物活用による地域産業への貢献にもつながるものであったといえる。

研究成果の概要(英文)：Recently, it has been reported that a citrus limonoid has various physiological functions, however, it is contained in large amounts in citrus seeds, so the effects of intake from food can not be expected.

In addition, since about half of the weight of yuzu containing a large amount of limonoid is discarded, we develop a special paste containing a large amount of citrus limonoid, and aim to use waste effectively as functional food.

In this study, we examined the effects of citrus limonoids on bone metabolism that can contribute to the prevention of osteoporosis, and it was found that nomlin, which is a limonoid often contained in Yuzu, has inhibitory effect on osteoclast differentiation.

研究分野：食品機能学

キーワード：ノミリン 破骨細胞 骨芽細胞 柑橘リモノイド 柚子ペースト

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

柑橘リモノイドは柑橘類の種子中に多く含まれるため、食品からの摂取効果はあまり期待できない。また柑橘リモノイドは低濃度で強烈な苦味を呈する苦味成分であり、食品としての活用が困難な物質である。近年、柑橘リモノイドは抗がん作用、抗腫瘍形成作用、抗肥満および血糖低下作用といった生理機能を有することが報告されている。これら柑橘リモノイドによる生理機能は、薬理的濃度で効果を示すことから、柑橘リモノイドの薬品としての活用を目的としている研究が多い。

一方、柑橘類の骨代謝に関する報告は、リモノイド類の抗酸化作用による精巣摘出ラットの骨質改善作用を示したとする報告があるのみである。近年、骨代謝において活性酸素(Reactive Oxygen Species、ROS)が関与していることが報告されており、抗酸化作用を有する食品機能性成分による骨代謝制御メカニズムについても報告されている。柑橘リモノイド類の抗酸化作用については多くの報告があり、骨代謝においてもこの柑橘リモノイドの抗酸化作用による効果が考えられるが、骨代謝改善作用の詳細なメカニズムに関する報告はされていない。

また骨粗鬆症モデル動物を用いたリモノイド類の骨代謝に対する効果を検討した報告では男性の骨粗鬆症モデルである精巣摘出ラットのみで行われており、日本における骨粗鬆症要因の多くを占める閉経による骨粗鬆症モデルでの検討が行われていない。

以上のことから、柑橘リモノイドによる骨代謝制御メカニズムについて解明することは重要であると考えられる。

### 2. 研究の目的

柑橘リモノイド類にさらなる機能性を見出すことは、人々の健康への寄与に貢献するだけでなく、廃棄物活用の観点からも有意義であると考え、本研究では、柑橘リモノイドの新規機能性を見出すことで、国民の健康と廃棄物活用による地域産業への同時貢献につなげることを目的とし、骨粗鬆症の予防に貢献しうる、骨代謝に与える柑橘リモノイドの効果について検討する。

### 3. 研究の方法

柚子に多く含まれる柑橘リモノイドであるノミリンについて、破骨細胞および骨芽細胞に対する作用およびそのメカニズムについて抗酸化作用を中心として解析、検討していく。また閉経後骨粗鬆症モデルである卵巣摘出マウスを用いた柑橘リモノイドの骨代謝改善作用についても検討していく。

#### 破骨細胞形分化に対するノミリンの影響

マウス大腿骨を無菌的に摘出し、マウス骨髄細胞を分離し、RANKL と Macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) 存在下で培養し、破骨細胞へと分化させる。培養時にノミリン(0.1  $\mu$ M $\sim$ 10  $\mu$ M)を添加し、破骨細胞の分化特異的な遺伝子(NFAT-c1, DC-STAMP)の mRNA 発現量の測定、細胞内シグナル伝達について検討する。

#### 骨芽細胞分化に対するノミリンの影響

骨芽細胞株 MC3T3-E1 培養時にノミリン(0.1  $\mu$ M $\sim$ 10  $\mu$ M)を添加し、骨芽細胞の分化指標である ALP 活性、細胞外マトリックスの石灰化、分化に關与する骨芽細胞特異的遺伝子(Runx2, Osterix, Col1a1)の測定により検討する。

#### 閉経後骨粗鬆症モデルマウスにおけるノミリンの影響

我が国において骨粗鬆症の主な原因となるのは、閉経に伴うエストロゲンの低下による骨代謝バランスの崩壊である。またエストロゲンの低下に加えて酸化ストレスの増大も骨粗鬆症の発症に關与しており、閉経後骨粗鬆症モデル動物において酸化ストレスが増加していることも報告されている。酸化ストレス増大時の閉経後骨粗鬆症モデル動物におけるリモノイドの作用について抗酸化作用を中心に検討する。

### 4. 研究成果

骨髄細胞からの破骨細胞分化時において、ノミリンは濃度依存的に破骨細胞の分化を抑制し、NFATc1 の mRNA 発現量を低下させた。また破骨細胞分化時に RANKL 刺激により活性化される MAPK(ERK、JNK、P38MAPK)のリン酸化も抑制した。ノミリンの添加は、破骨細胞内 ROS 産生量を有意に低下させた。これらの結果はマウスマクロファージ株細胞である RAW264.7 細胞を用いて行なった実験においても同様の結果であった。骨芽細胞の分化時において、ノミリンの添加は影響を与えなかったことから、骨芽細胞の分化および閉経後骨粗鬆症モデル動物にしてノミリンは影響を与えなかった。

以上のことから、本研究により柑橘リモノイドの一つであるノミリンは、破骨細胞の分化制御を介して骨代謝に影響を与える可能性が見出された。

### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

Yoshifumi Kimira, Elucidation of osteoporosis prevention mechanism by citrus limonoid, Impact, 2019, in press 査読無し

Uekawa Atsushi, Yamanaka Hitoki, Lieben Liesbet, Kimira Yoshifumi, Uehara Mariko, Yamamoto Yoko, Kato Shigeaki, Ito Kosei, Carmeliet Geert, Masuyama Ritsuko, Phosphate-dependent luminal ATP metabolism regulates transcellular calcium transport in intestinal epithelial cells, The FASEB Journal, 2018, Vol.32, 1903-1915 査読有り

Yuusuke Sekiguchi Hiroshi Mano Sachie Nakatani Jun Shimizu Aya Kataoka Kana Ogura Yoshifumi Kimira Midori Ebata Masahiro Wada, Mangiferin positively regulates osteoblast differentiation and suppresses osteoclast differentiation, Molecular Medicine Reports, 2017, Vol.16(2), 1328-1332 査読有り

Yoshifumi Kimira, Haruka Odaira, Kaho Nomura, Yuri Taniuchi, Naoki Inoue, Sachie Nakatani, Jun Shimizu, Masahiro Wada and Hiroshi Mano, Collagen-derived dipeptide prolyl-hydroxyproline promotes osteogenic differentiation through Foxg1, Cellular & Molecular Biology Letters, 2017, 22:27 査読有り

〔学会発表〕(計2件)

君羅 好史、菊地 秀与、西村 良夫、袁 博、須永 克佳、真野 博、Vitex agnus-castus 果実由来 casticin の破骨細胞分化抑制作用、日本フードファクター学会、2017

君羅 好史、清水 美好、大平 はる香、大山 恵里奈、真野 博、柚子ペースト抽出物および柑橘リモノイドによる破骨細胞形分化制作用、第70回日本栄養・食糧学会大会、2016

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2)研究協力者  
研究協力者氏名：  
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。