

《様式B》

研究テーマ	「ロコモティブシンドロームに対する蜂製品の予防的効果」		
研究責任者	所属機関名	岐阜薬科大学	生体機能解析学大講座・薬効解析学
	官職又は役職	講師	
	氏名	中村信介	メールアドレス nakamuras@gifu-pu.ac.jp
共同研究者	所属機関名	岐阜薬科大学	生体機能解析学大講座・薬効解析学
	官職又は役職	教授	
	氏名	原英彰	
共同研究者	所属機関名	岐阜薬科大学	生体機能解析学大講座・薬効解析学
	官職又は役職	准教授	
	氏名	嶋澤雅光	

(平成30年度募集) 第31回 助成研究 完了報告書

上記様式記載後

1. 実施内容および成果ならびに今後予想される効果の概要（1,000字程度）  
※産業技術として実用化の可能性や特許出願（予定も含む）の有無についてもご記載ください。

本助成で展開した研究により、ゼブラフィッシュ鱗再生デキサメタゾン障害モデルを確立し、その成果が2020年3月に *Journal of Pharmacological Science* に受理された。(in press) 本モデルは、他の骨粗鬆症モデルに認められる破骨細胞の延長が見られるなど、病態解明及び薬剤探索に有用であることが示唆された。蜂製品の中でも、ブラジル産グリーンプロポリス水抽出物は、その主要成分であるクロロゲン酸に関して閉経後骨粗鬆症ラットモデルに対して保護作用を示す報告が存在することから、ステロイド性骨粗鬆症にも有用であるだろうと仮説を立てている。今後、ブラジル産グリーンプロポリス水抽出物を中心とした蜂製品成分を用いて、ステロイド性骨粗鬆症の予防に有用なサプリメントの開発に繋がられる様、研究を進める予定である。

加えて、加齢や機械的負荷の減少によって生じる筋萎縮に着目して、筋分化に対する蜂製品の作用について検討した。今回の検討から、*trans*-フェルラ酸が筋分化(筋芽細胞から筋管細胞への分化)を有意に促進することを見出した。*trans*-フェルラ酸は筋線維肥大を引き起こすことが既に知られていることから、筋萎縮に対するサプリメントになり得ることが強く期待される。今後、*in vivo* モデルを含めた作用検証並びに明確な作用機序の検討が為されれば、商品開発に繋がる可能性が考えられる。

現状、骨及び筋共に有効な成分は見いだせていないが、ブラジル産グリーンプロポリス

水抽出物と trans-フェルラ酸を配合した化合物など、いくつかの成分を組み合わせた製品であれば、骨及び筋両面から効果的で、結果としてロコモティブシンドロームに有効なサプリメントの開発が可能と考える。

## 2. 実施内容および成果の説明 (A 4 で、5 ページ以内)

### 鱗再生デキサメタゾン障害モデルにおける破骨細胞活性のタイムコース評価

鱗除去後の再生期間中にデキサメタゾン投与により、どのような形態変化及び破骨細胞への影響が認められるかについて経時的な検討を行った (図 1A)。Von Kossa カルシウム染色及び TRAP 破骨細胞染色の結果、鱗のサイズ、真円度がデキサメタゾン投与により低下することが明らかとなった (図 1B-C)。定量的結果、面積及び真円度は鱗除去 8 日後以降にデキサメタゾン投与により有意に低下することが示唆された (図 1D-E)。また興味深い点として、デキサメタゾン非投与群では鱗除去 6 日目に、一過性の TRAP 活性上昇が認められたが、デキサメタゾン投与群では認められなかった (図 2C, F)。加えて、デキサメタゾン投与群では TRAP 活性の高い鱗の発生率が鱗除去 21 日目において有意に高かった (図 1 C, G)。

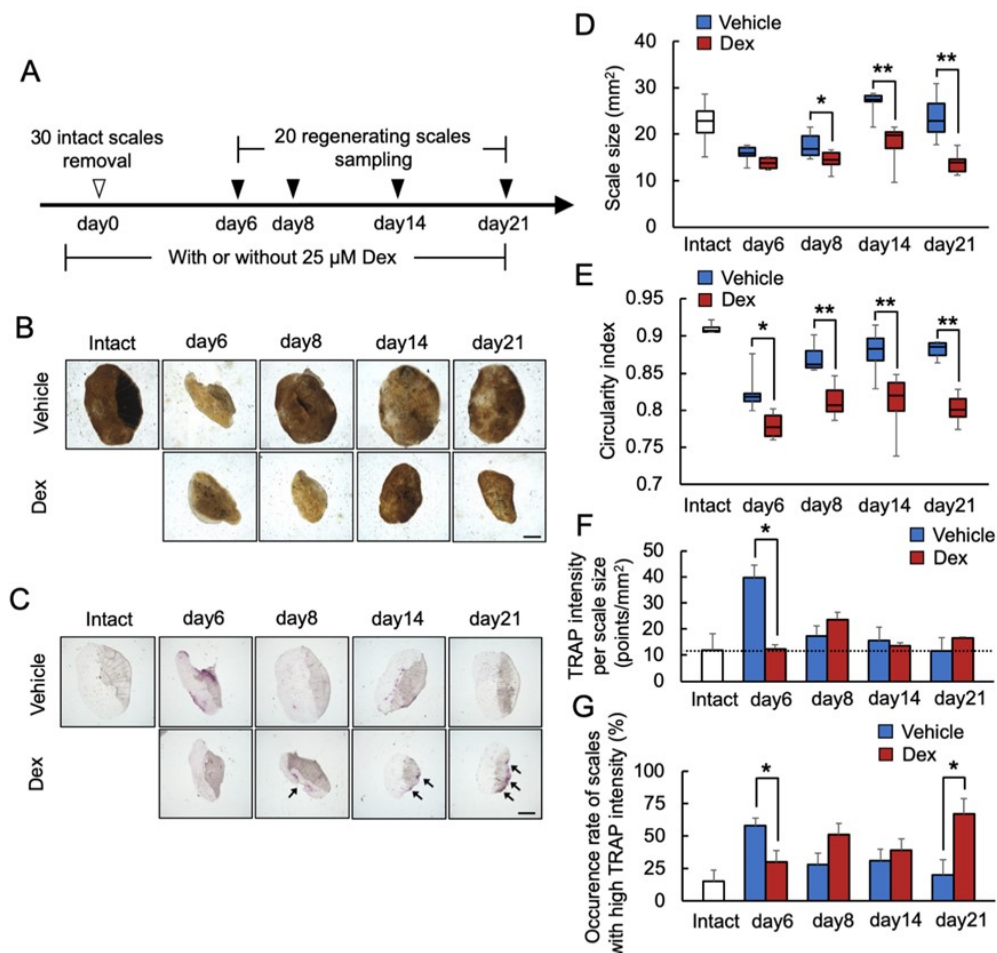
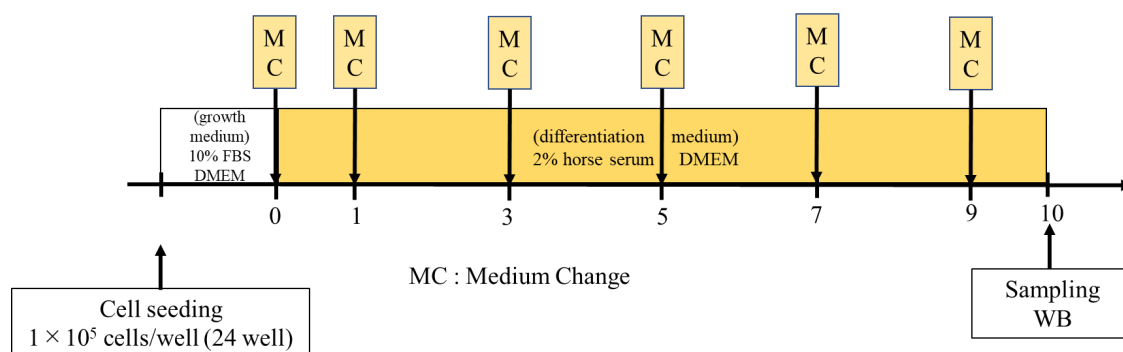


図1 鱗再生過程におけるデキサメタゾンによる鱗形態及び破骨細胞活性変化

(A) Protocol of this experiment. Intact means firstly removed original scales. (B, C) Representative images of stained scales. Scale bar = 500  $\mu\text{m}$ . (B) Scales are stained with von Kossa calcium stain as a calcium marker. (C) Scales are stained with TRAP as an osteoclast marker. Black arrows indicate TRAP remaining at malformed sites. (D–F) Quantitative data evaluated using stained scales. Box plots show the median  $\pm$  interquartile range, error bars indicate the full range ( $n = 4$  to  $6$ ). Statistical significance was determined using the Student's *t*-test. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , vs. vehicle. (D) Quantitative data of scale size ( $\text{mm}^2$ ). (E) Quantitative data of circularity indexes. A circularity index of 1.0 indicates a perfect circle; as the index approaches 0, it indicates an increasingly elongated polygon. (F) Quantitative data of TRAP intensity (number of maxima points) per each scale size ( $\text{mm}^2$ ). Detailed method for this analysis is described in Fig. S1. Dotted line indicates average value of intact group. (G) Occurrence rate of scales with high TRAP intensity in each fish. The high TRAP intensity defined as a value which greater than average value of TRAP intensity in intact group (shown by dotted line in Fig. 1F). Dex, dexamethasone; TRAP, tartrate-resistant acid phosphatase.

### 筋分化に有効な蜂製品の探索

蜂製品成分がマウス筋芽細胞株 C2C12 における MHC (半成熟筋細胞マーカー) 発現に及ぼす影響を検討した。



#### 【群構成】 (n = 6)

- Control 群
- ローヤルゼリー 投与群 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$
- p-クマリン酸 投与群 100  $\mu\text{M}$
- クロロゲン酸 投与群 100  $\mu\text{M}$
- カフェ酸 投与群 100  $\mu\text{M}$
- trans-フェルラ酸 投与群 100  $\mu\text{M}$
- IGF-1 10  $\text{ng}/\text{mL}$

各種蜂産品成分の MHC 発現促進作用をウェスタンブロット法にて検討した。

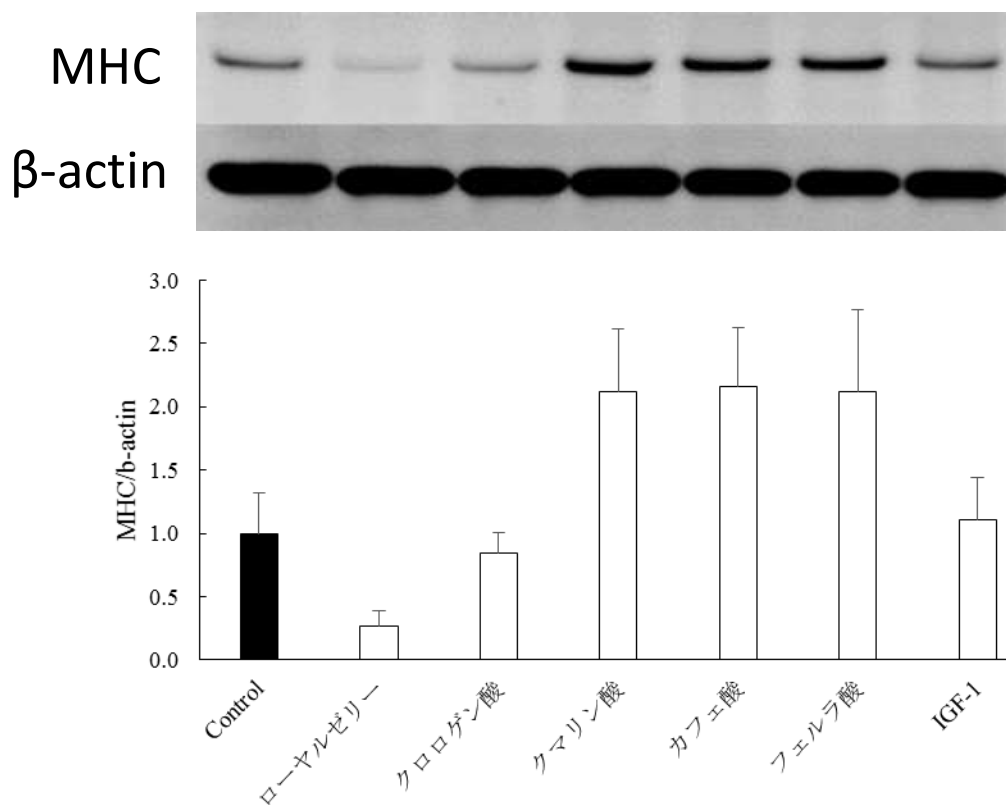
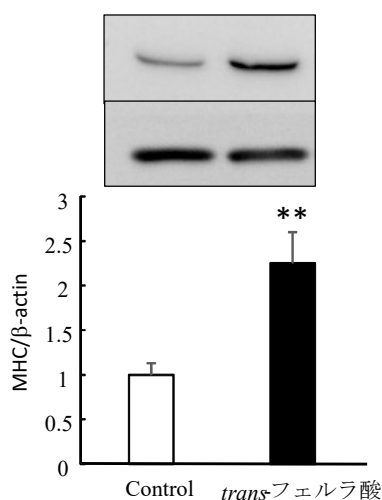


図 2. 筋芽細胞から筋管細胞への分化促進作用を有する蜂産品成分の探索

It was clarified that *p*-coumaric acid, *trans*-caffeic acid and *trans*-ferulic acid increased the expression of MHC in C2C12 cells. n=4-6.

*p*-クマリン酸、カフェ酸、*trans*-フェルラ酸ともに MHC の発現上昇傾向が見られた。(図 2)



ゼブラフィッシュを用いた実験系で *trans*-フェルラ酸が筋線維肥大を引き起こすことが報告されており (Ya Wen *et al.*, *Nutrients*. 2017)、筋萎縮に対するサプリメントになり得ることが期待される。そこで、*trans*-フェルラ酸を用いて、再度同様の試験を実施したところ、有意に筋分化が促進されることが明らかになった。(図 3) *trans*-フェルラ酸は抗酸化作用によって筋芽細胞の分化が促進された可能性が考えられる。

図 3 *trans* フェルラ酸の筋分化作用

This graph shows that *trans*-caffeic acid significantly increased MHC proteins.

本研究成果は下記の研究会及び論文で発表済みである。

○学会発表

第 10 回岐阜薬科大学機能性健康食品研究講演会（岐阜 12 月）

第 15 回アスタキサンチン研究会（札幌、9/20）

○論文公表

*Journal of Pharmacological Science, in press*（2020 年 3 月 3 日アクセプト、図 1 の結果を掲載）

Title; Effects of anti-osteoporosis drugs against dexamethasone-induced osteoporosis-like phenotype using a zebrafish scale-regeneration model

Yuichi Saito, Shinsuke Nakamura, Naoki Chinen, Masamitsu Shimazawa, Hideaki Hara

※本論文には本助成のサポートを受けたことを明記している。