

## 論文の内容の要旨

論文題目            ローヤルゼリーのホルモン制御機能に関する研究  
氏 名                成 田 幸 夫

ローヤルゼリー (royal jelly : RJ) はミツバチの下咽頭腺および大あご腺から分泌される乳白色のクリーム様物質で、女王蜂の成長に欠かせないものである。現在、RJ は機能性食品素材として広く利用されており、血圧降下作用、コレステロール低下作用、抗炎症作用など様々な機能が確認されている。また、臨床研究において RJ による更年期障害症状の改善が報告されており、RJ がホルモン様作用、ないしはホルモン制御機能に対する作用を介して、ホルモンバランスの改善を促す機能を持つ可能性がある。本研究では、RJ のホルモン様作用、ホルモン制御機能に対する作用の検証を行うとともに、そのメカニズムの解明を目的とした。

第 1 章では、RJ のエストロゲン様作用について *in vivo* での効果を検証するため、骨代謝への影響を調べた結果を述べてある。これまでに *in vitro* において、RJ のエストロゲン受容体結合活性などが確認されている。エストロゲンの機能は多岐にわたり、骨代謝にも深く関与している。その欠乏は骨吸収を促進し、これは閉経後骨粗鬆症の原因となる。

雌 SAMR1 マウスに RJ の凍結乾燥粉末を 4% 含む飼料を 9 週間自由摂取させた。陽性対照には、 $17\beta$ -estradiol ( $E_2$ ) を週 5 日  $3\mu\text{g}/\text{kg}$  皮下投与した。その結果、RJ を含まない飼料を与えた対照群と比較して、 $E_2$  群及び RJ 群で脛骨の骨灰分重量の増加が認められた。この効果の作用機序を調べるため、RJ、 $E_2$ 、対照群の大腿骨 RNA を用いて網羅的な遺伝子発現変動の解析を実施した。RJ 群で発現上昇した 317 遺伝子の約 70% は、 $E_2$  群においても共通して発現上昇がみられた。発現上昇した個々の遺伝子について注目すると、5 つのタイプのコラーゲン遺伝子が含まれていた。このうち、Procollagen type I, alpha 1 (Col1a1) 遺伝子は骨の

主要な基質タンパク質であり、定量 PCR によっても RJ 群で有意に発現上昇することが確認された。したがって、RJ 摂取によって骨組織の足場となるコラーゲンが増加し、そこに沈着するミネラル量が増すことにより骨灰分重量が増加したと考えられる。

マイクロアレイ解析の結果から、RJ の骨に対する作用の一部はエストロゲンに類似することが推測された。そこで、マウス骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 を用いて、RJ のエストロゲン様作用について検討した。MC3T3-E1 細胞は E<sub>2</sub> 添加により、その増殖が促進される。一方、RJ を添加した場合にも細胞増殖の促進が認められた。この RJ による増殖促進作用は、エストロゲン受容体阻害剤の同時添加によって抑制された。したがって、RJ はエストロゲン受容体を介して骨芽細胞に作用し、その増殖を促進すると考えられる。また、RJ 添加によって培地中のコラーゲン濃度の増加も確認された。この結果は、マウス骨における Col1a1 遺伝子の発現上昇とも一致する。

以上より、RJ は骨芽細胞に作用し、骨形成を促進することによって骨灰分量を増加させると考えられ、骨代謝の乱れにより骨量が減少する骨粗鬆症の予防、改善に役立つことが示唆された。

第2章では、これまでに *in vitro* 試験系において RJ 中に含まれるエストロゲン受容体結合活性を示す成分が同定されていることを受け、これら成分について *in vivo* におけるエストロゲン様活性を確認するため、未成熟ラットを用いた子宮肥大試験を実施した。

雌ラットは生後20日から27日にかけて血中E<sub>2</sub>濃度が低く、子宮は未発達ながらエストロゲン受容体が発現しており、外来性のエストロゲンに高感度に反応して重量増加を起こすことが知られている。RJ及びRJの各成分10-hydroxy-trans-2-decenoic acid (10HDA)、10-hydroxydecanoic acid (10HDAA)、trans-2-decenoic acid (2DEA)、4-methylenecholesterol (24MET) 1 g/kgを20日齢の未成熟雌ラットの背部に3日間皮下投与した。対照群と比較して、陽性対照である17 $\alpha$ -ethynylestradiol (17 $\alpha$ EE<sub>2</sub>) 0.1及び3 $\mu$ g/kg投与群では子宮重量の増加が認められたが、RJ及び各成分では子宮重量への影響はみられなかった。組織レベルでの影響を評価したところ、17 $\alpha$ EE<sub>2</sub> 3 $\mu$ g/kg群では子宮内膜上皮細胞の顕著な肥厚、17 $\alpha$ EE<sub>2</sub> 0.1 $\mu$ g/kg群では軽微な肥厚が観察された。一方、子宮重量の増加が認められなかったRJ及び4成分についても、子宮内膜上皮細胞の軽微な肥厚が認められた。4成分の肥厚の程度はいずれも同程度であった。

次に、遺伝子レベルでの影響を調べるため、RJ、10HDA、17 $\alpha$ EE<sub>2</sub>、対照群の子宮 RNA を用いて網羅的な遺伝子発現解析を実施した。10HDA は RJ に特有の脂肪酸で、上記 4 成分の中では RJ 中の含有量が最も多い。17 $\alpha$ EE<sub>2</sub> 群では子宮重量の増加を裏付けるような細胞周期、細胞増殖に関連する遺伝子が多数発現変化していたが、RJ 及び 10HDA 投与群では、変動候補遺伝子が特定のカテゴリーに分類されることはなかった。しかしながら、RJ 群と 17 $\alpha$ EE<sub>2</sub> 群では、共通して insulin-like growth factor binding protein 1 (IGFBP1) 遺伝子の発現低下が認

められた。IGFBP1 は IGF の活性制御に関与し、その発現低下により IGF が活性化し、これが子宮内膜上皮細胞の肥厚に働く可能性が考えられる。なお、IGFBP1 はタンパク質栄養状態の悪化に伴って血中濃度および肝臓中での mRNA が増加することが知られており、RJ 投与によって栄養学的に有利な状態になった事が IGFBP1 の発現低下を引き起こしたのかもしれない。

エストロゲン様作用は、有用性がある反面、強すぎればリスクにもなりうる。RJ および 4 成分に関しては、高用量を皮下投与しても子宮重量の増加は認められず、子宮内膜上皮細胞の軽微な肥厚が認められるのみであった。したがって、これらの子宮に対する作用は非常に弱く、エストロゲン様作用としてのリスクは極めて低いと考えられる。

第 3 章では、直接的なエストロゲン様作用以外に、RJ がホルモン制御機能を担う下垂体や視床下部に対して影響を及ぼすかを調べるため、加齢ラットの内分泌系機能への作用について検討した。

約 11 ヶ月齢の雌ラットに、RJ 凍結乾燥粉末を 5% 含む飼料を 7 ヶ月間自由摂取させた。成熟雌ラットは 4 日ごとに発情期を示すが、老化に伴い発情周期に乱れが生じるようになる。対照群、RJ 群とも発情周期数は月齢が進むにつれて低下し、RJ は発情周期には影響を与えなかった。また、体重及び肝臓、脾臓、子宮、卵巣の体重あたりの組織重量にも顕著な違いは認められなかった。しかしながら、下垂体重量は対照群と比較して RJ 群で有意に小さかった。

そこで、下垂体についてより詳細に検討するため下垂体から分泌されるホルモン、prolactin (PRL)、growth hormone (GH)、pro-opiomelanocortin (POMC)、thyroid-stimulating hormone (TSH $\beta$ )、luteinizing hormone (LH $\beta$ )、follicle-stimulating hormone (FSH $\beta$ ) 遺伝子の相対発現量を測定した。その結果、RJ 群の PRL mRNA の発現量は対照群の 74% であり、発現低下傾向を示した。加齢に伴う下垂体重量の増加は、PRL 分泌細胞の増加に起因すると考えられている。したがって、RJ は加齢に伴う PRL 分泌細胞の増加を抑え、これにより下垂体重量の増加が抑制されたと推察される。また、TSH $\beta$  mRNA は対照群と比較して、RJ 群では 1.4 倍の発現上昇を示した。TSH は甲状腺に作用し、甲状腺ホルモンの分泌を促す。甲状腺機能の低下により視床下部からの Corticotropin-releasing hormone (CRH) 分泌が亢進するとの報告がある。そこで、間脳 CRH 遺伝子の発現解析を行ったところ、若いラットと比較して加齢ラットでは CRH mRNA の発現上昇が認められた。一方、対照群に対して RJ 群では CRH の発現抑制が認められ、RJ による甲状腺機能の低下抑制作用が示唆された。なお、下垂体 GH、POMC、LH $\beta$ 、FSH $\beta$  mRNA については群間で顕著な差はみられなかった。一方、血清中 PRL 及び甲状腺ホルモン T<sub>4</sub> (thyroxine) 濃度については、RJ 摂取による明確な影響はみられなかった。この mRNA と血清タンパク質との結果の乖離は、転写後調節や分泌の制御、血液採取のタイミングなどによるものと考えられる。

下垂体重量や遺伝子発現の変化から、RJ が下垂体及び甲状腺の加齢に伴う機能低下を抑制する可能性が示唆された。

以上を要するに本研究において、RJ の骨形成促進作用、下垂体・甲状腺の機能低下抑制作用が示唆された。すなわち、RJ はホルモン制御系の維持機能を有する可能性がある。また、子宮に対するRJのエストロゲン様作用は限定的で、リスクは極めて低いと考えられた。したがって、高齢化社会を迎えた日本において、RJ はより多くの人々の健康維持、QOLの向上に貢献するものと期待される。