

Royal jelly dose not prevent bone loss but improves bone strength in ovariectomized rats

(ローヤルゼリーは卵巢摘出ラットにおいて骨量減少を抑制しないが骨強度を改善する)

(*Climacteric* 21(6): 601-606, 2018)

愛知医科大学大学院
臨床医学系 産婦人科学
清水 沙希

骨粗鬆症

定義

骨強度の低下を特徴とし、骨折のリスクが増大しやすくなる骨格疾患

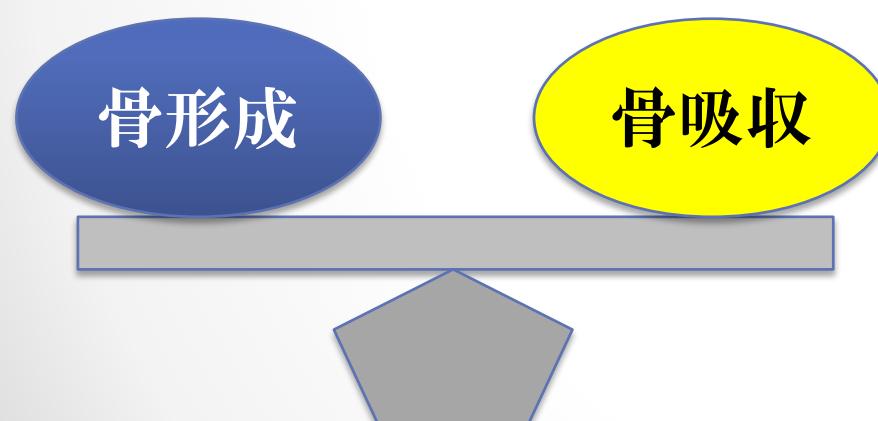
$$\text{骨強度} = \text{骨密度} + \text{骨質}$$

70% 30%

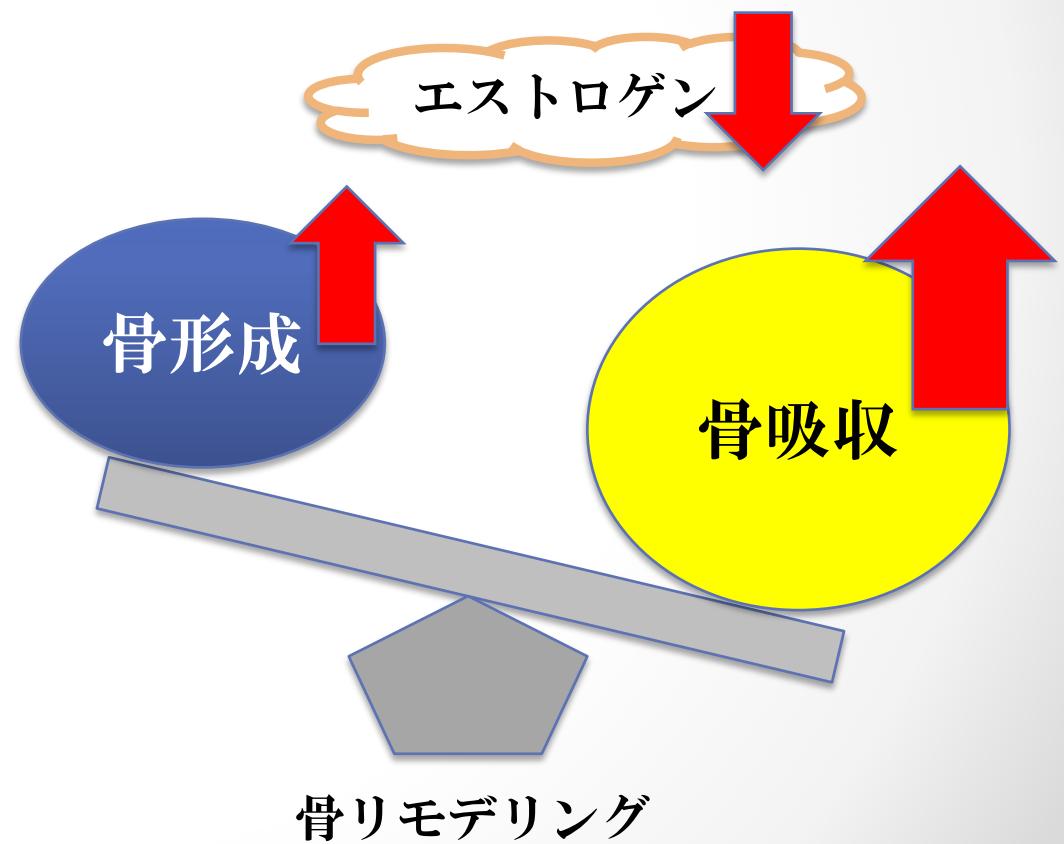
- 微細構造
- 骨代謝回転
- 微小骨折
- 石灰化
- コラーゲン架橋 etc

閉経後骨粗鬆症

正常

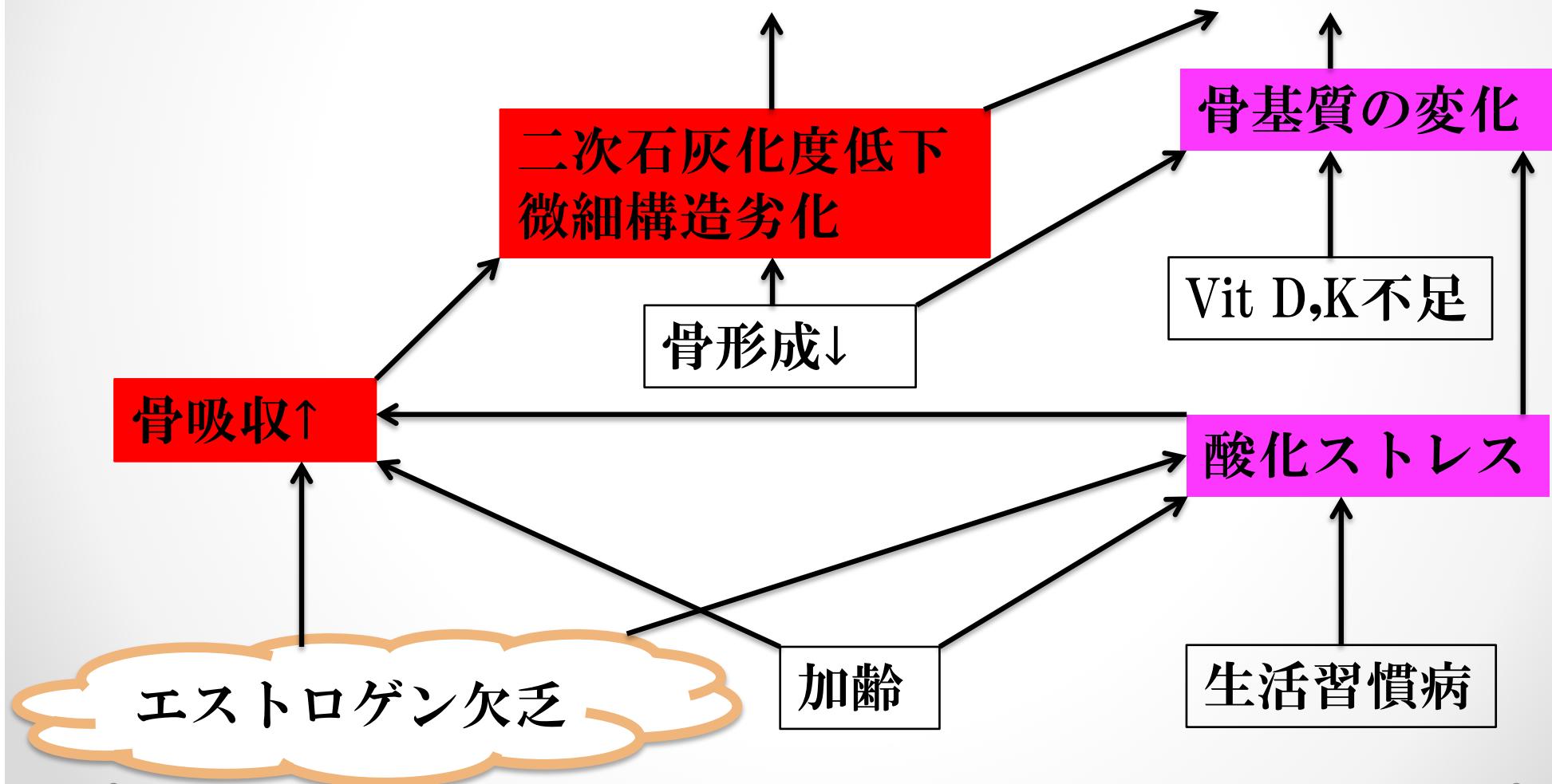


閉経後骨粗鬆症
(高回転型骨粗鬆症)



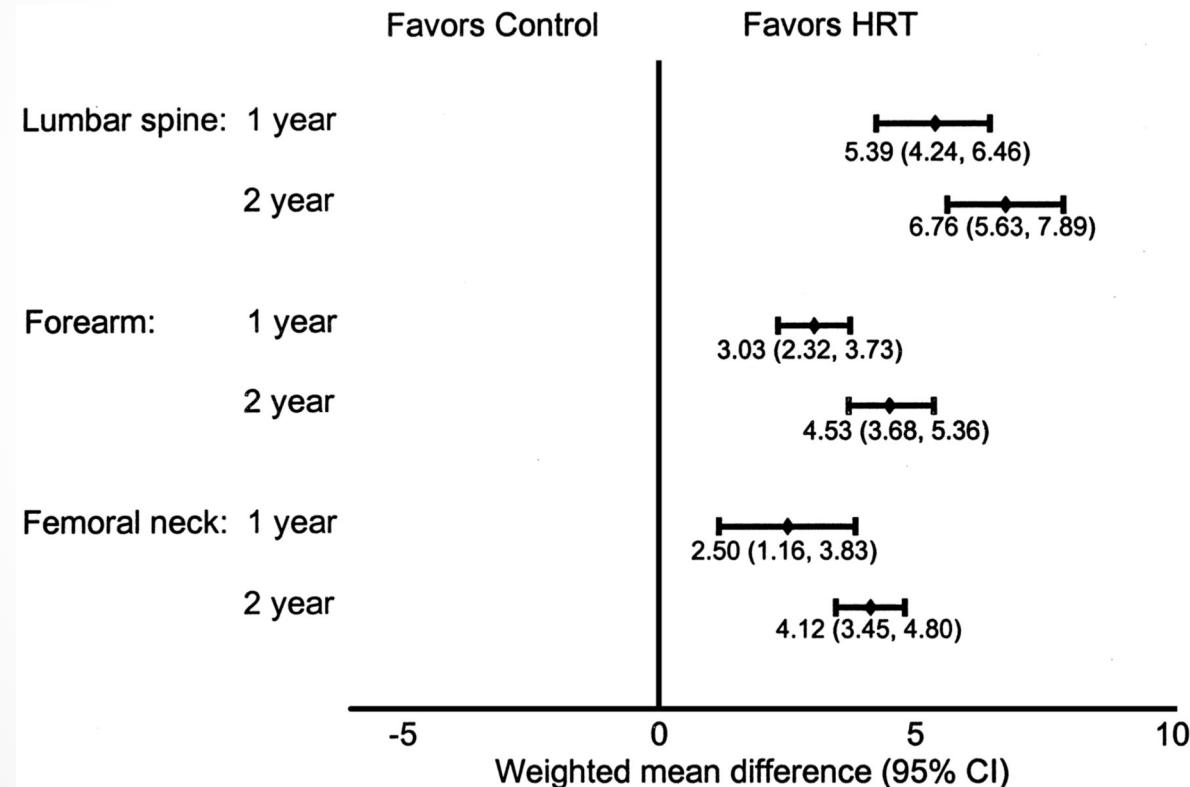
閉経後骨粗鬆症

骨強度↓ = 骨密度↓ + 骨質↓



背景

閉経後骨粗鬆症の治療において、ホルモン補充療法（HRT）は骨量減少や骨折の予防に有用である。



Weighted mean difference in percent change in bone density after treatment with HRT.

WELLS G, et al. (Endocr Rev 2002)

背景

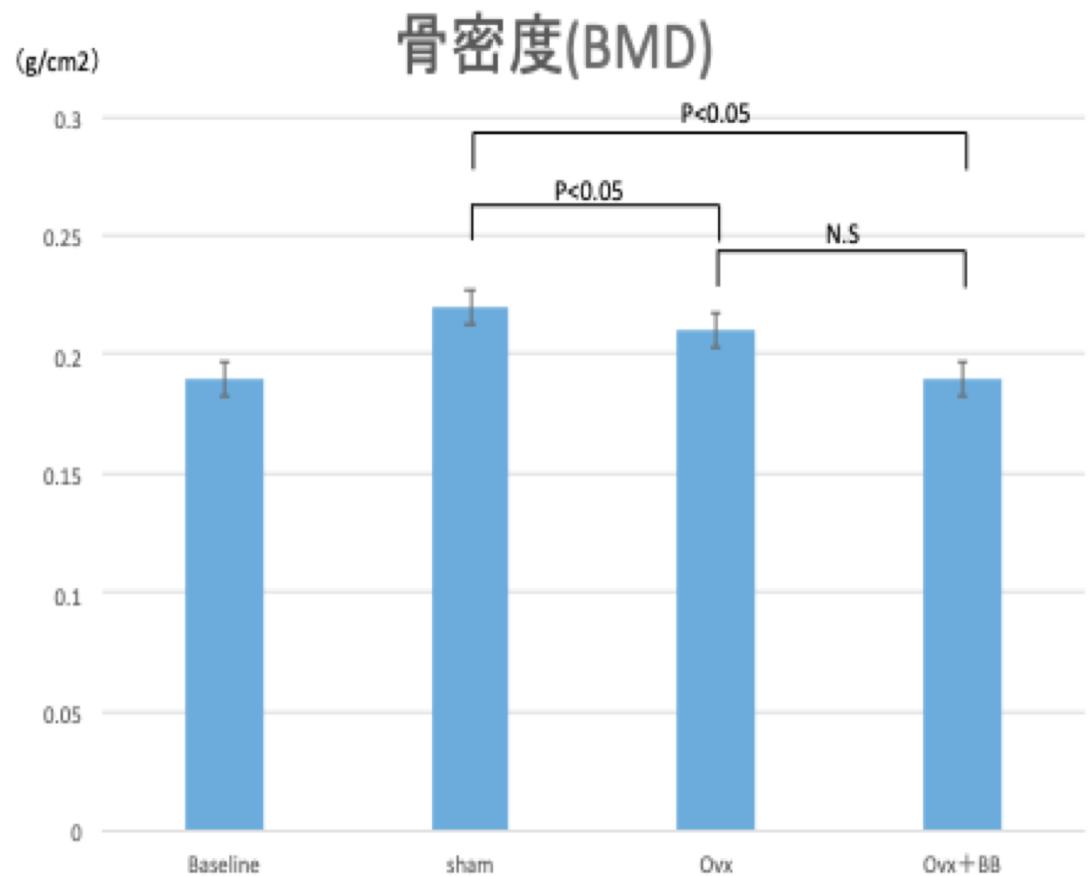
- 2002年に大規模臨床試験であるWomen's Health Initiative (WHI) 試験において、HRTは骨折予防効果のメリットよりも虚血性心疾患、乳癌、脳卒中のリスクが上回ると報告された。
(JAMA 2002)
- これらの背景から、運動や食事などの生活習慣の改善に关心が高まっている。
-

Bilberry

- ブルーベリーの一種であるビルベリー (*Vaccinium myrtillus L.*) は強力な抗酸化力を有するアントシアニンを豊富に含有している。



- 研究結果を見る限り、ビルベリーが閉経後骨粗鬆症モデルラットの骨密度に及ぼす影響は認めなかった。



Royal jelly (RJ)

- ・働き蜂 (*Apis mellifera L.*) の咽頭腺から分泌され、女王蜂の育成に用いられる物質。
- ・タンパク質、遊離アミノ酸、脂質、ビタミン、糖を豊富に含有。
- ・血管拡張作用、降圧作用、抗コレステロール作用、抗腫瘍作用などの多彩な薬理作用を有する。
- ・更年期症状の緩和にも有用であり、エストロゲン作用を有するとされている。



目的

- ・ 卵巣摘出ラットにおいてRJが骨代謝に及ぼす影響について調査し、閉経後骨粗鬆症に対する有用性について検討する。

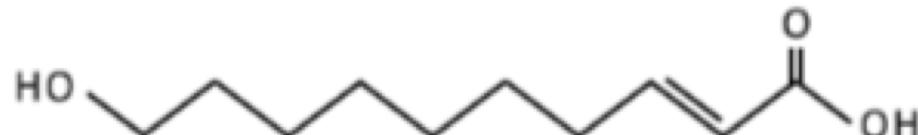
方法

酵素分解RJ

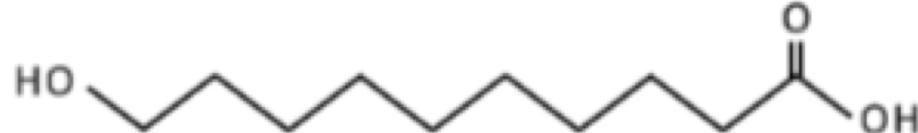
(乾燥粉末, 山田養蜂場より提供)

- 10-ヒドロキシ-2-デセン酸 (10H2DA) (>3.5% w/w)
- 10-ヒドロキシデセン酸 (10HDA) (>0.6% w/w)

10-Hydroxy-*trans*-2-decanoic acid (10H2DA)

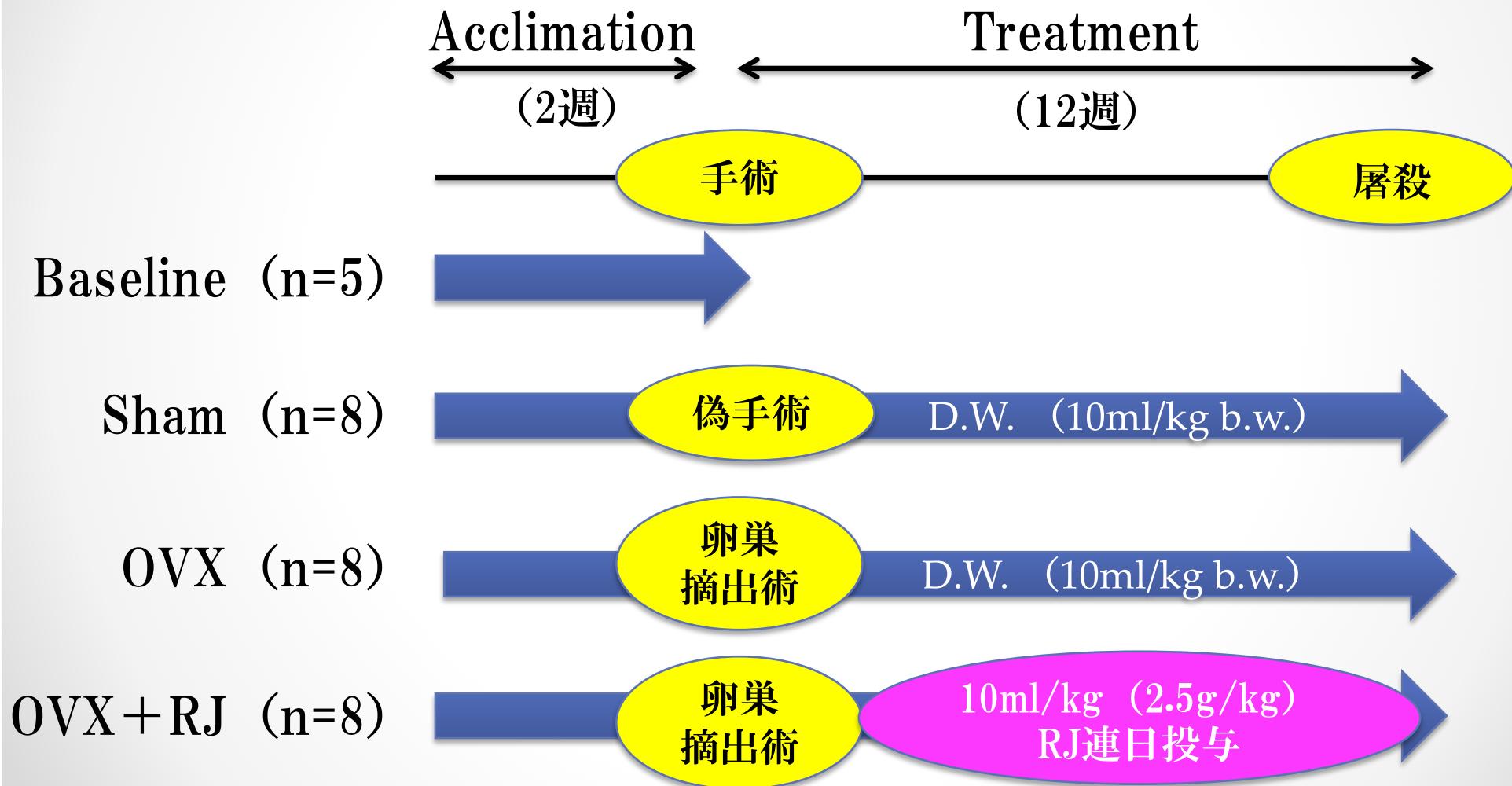


10-Hydroxydecanoic acid (10HDA)



方法

雌Wistarラット（10週令）



測定項目

- 1) 体重, 子宮重量
- 2) 骨密度測定 (右大腿骨)

DXA : QDR-4500A ; Hologic

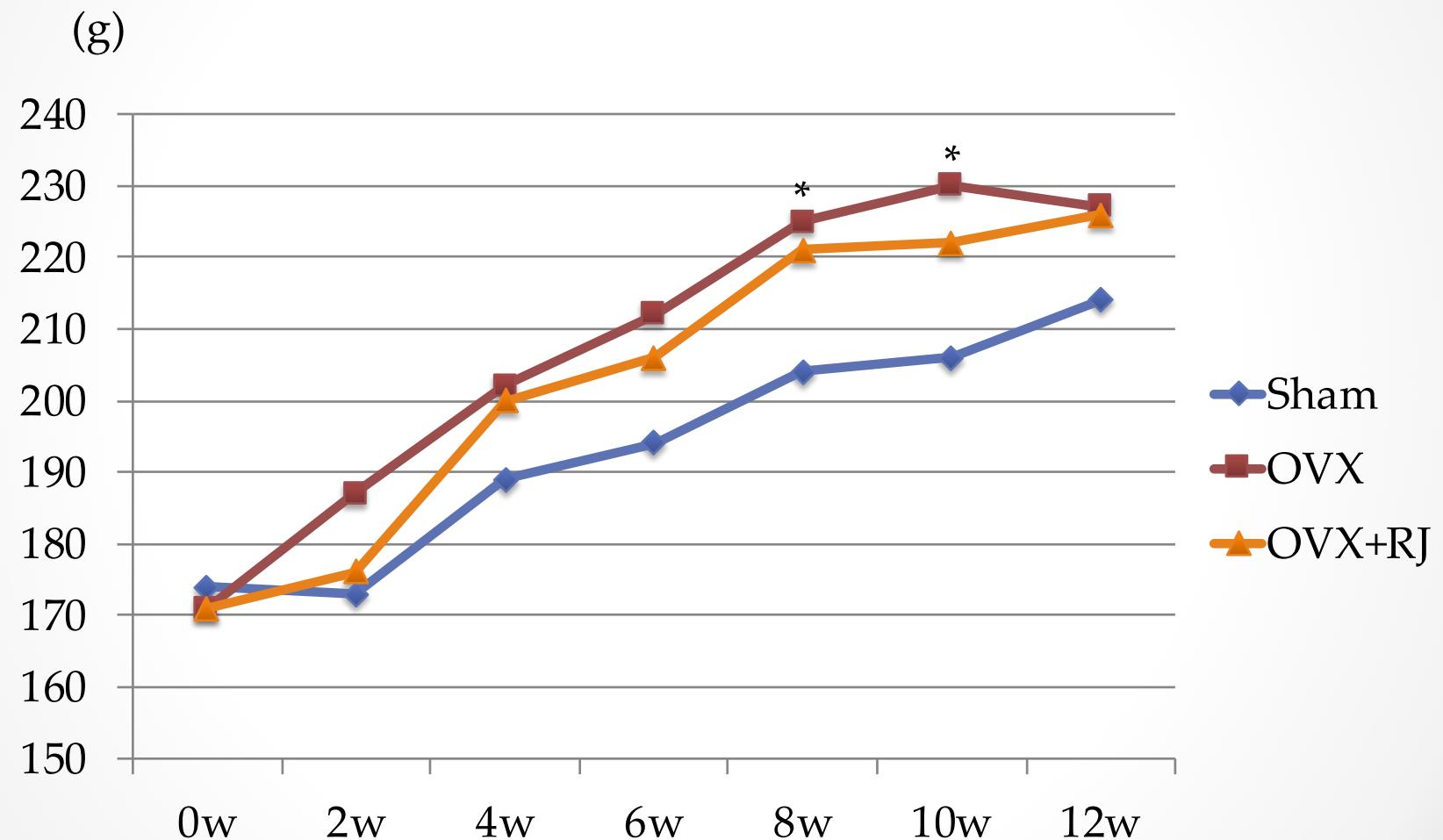
pQCT : XCT Research SA+ ; Stratec Biomedical

- 3) 骨形態計測
(左大腿骨遠位端前額断)

Histometry RT CAMERA ; System Supply

- 4) 3点曲げ骨力学試験 (右大腿骨)
MZ-500S ; Maruto Instrument

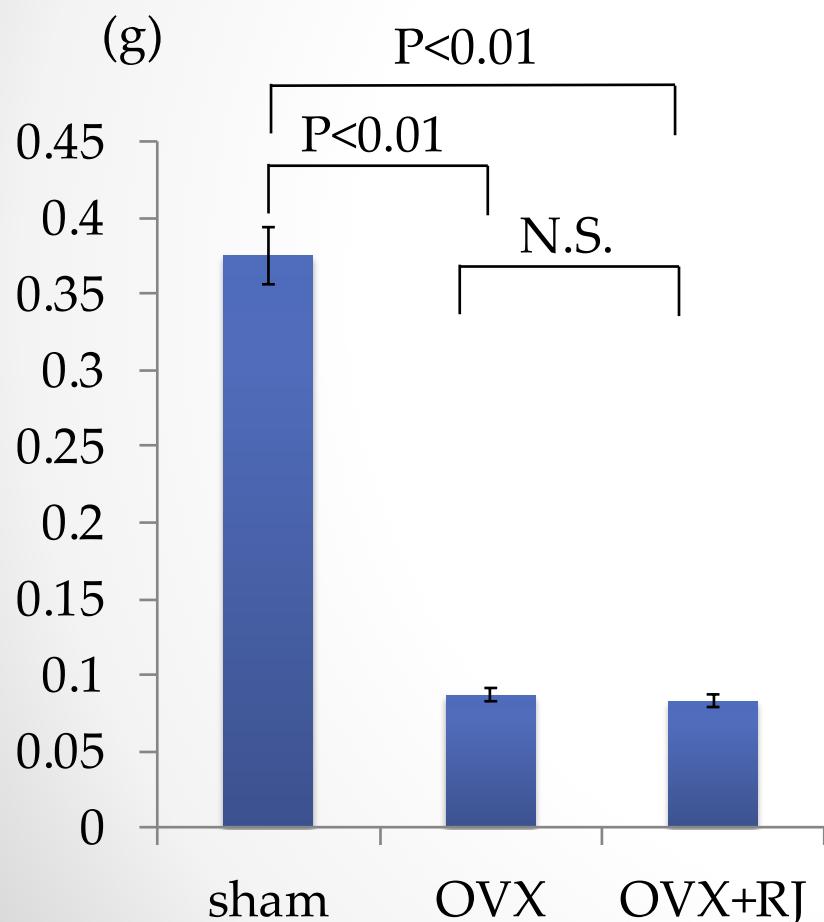
1) 体重の変化



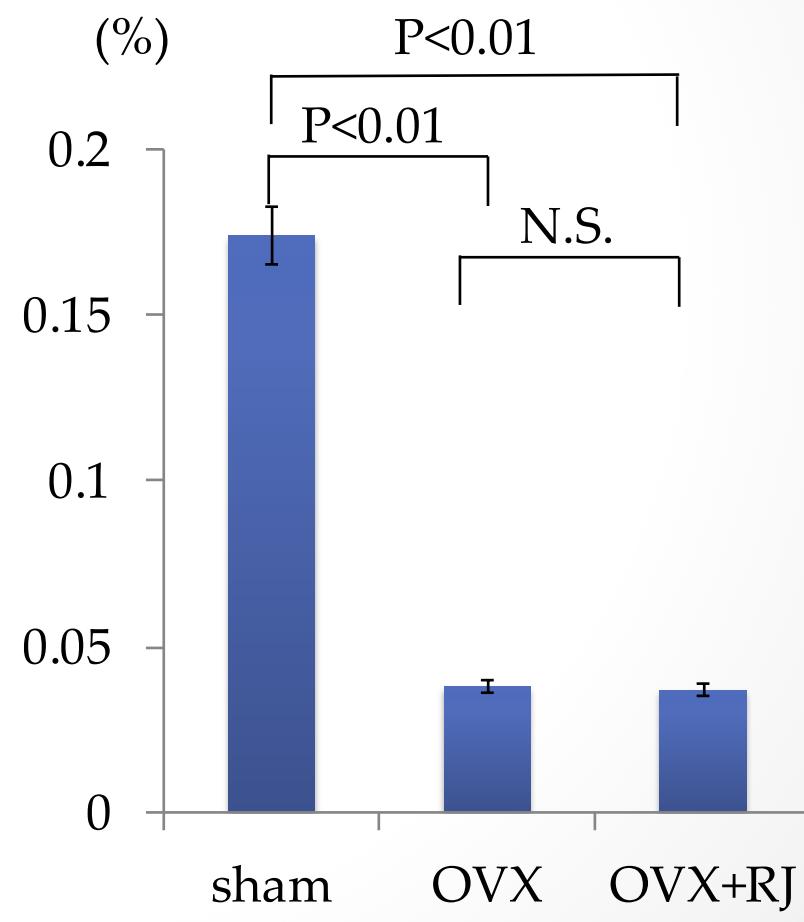
*P < 0.05 vs. Sham
(ANOVA with Tukey's HSD test)

1) 子宮重量, 子宮体重比

子宫重量



子宫体重比



ANOVA with Tukey's HSD test

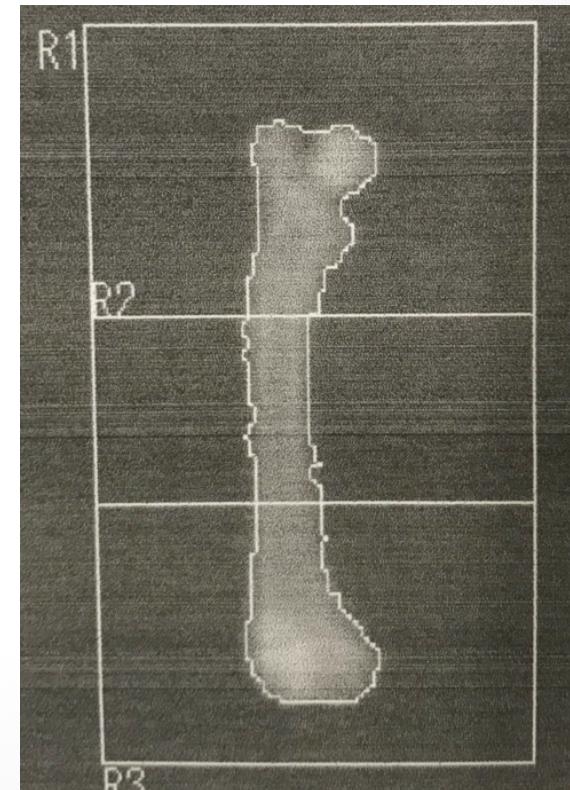
2) 骨密度測定

DXA法

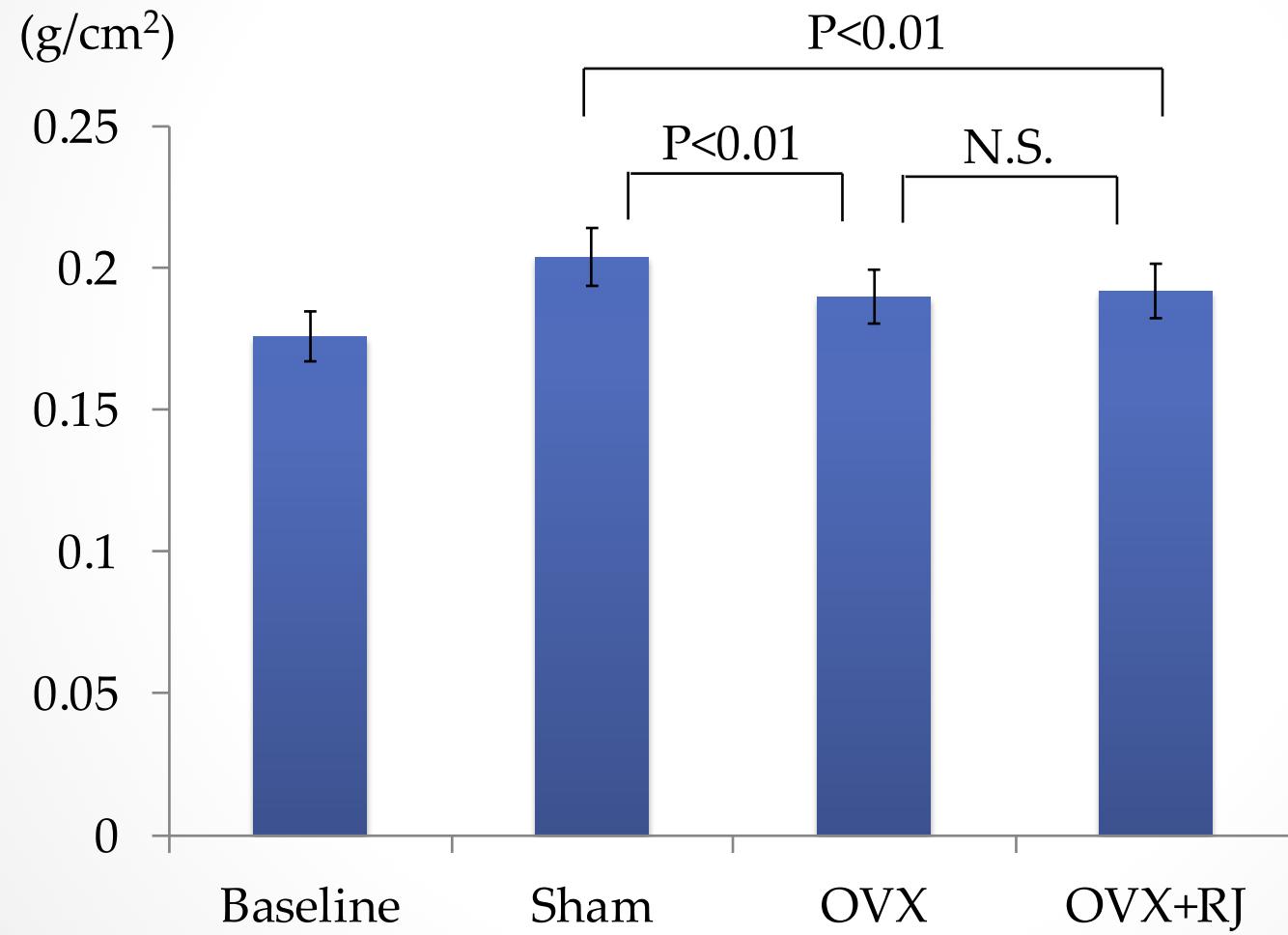
(dual-energy X-ray absorptiometry)

測定部位：右大腿骨全骨

- 2種の異なるエネルギーのX線を照射し、骨と軟部組織の吸収率の差で骨密度を測定する方法



2) 骨密度測定 DXA法（骨密度）



• ANCOVA with Tukey's HSD test •

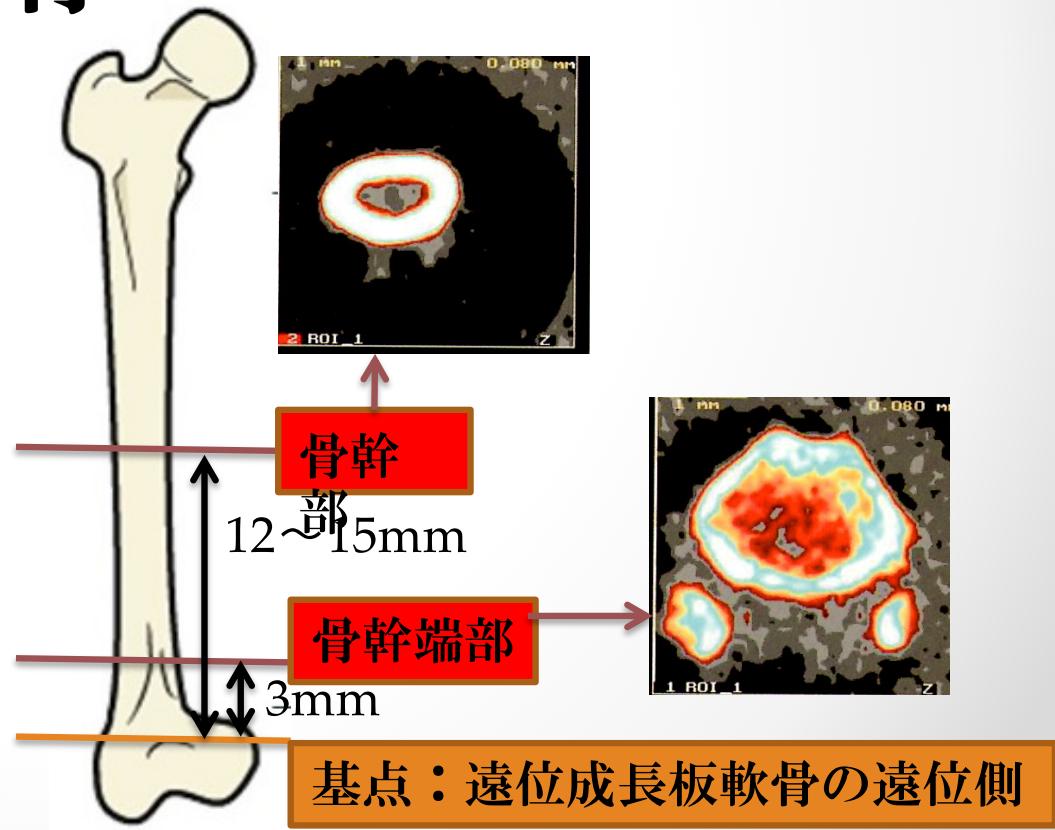
2) 骨密度測定

pQCT法

(peripheral quantitative computed tomography)

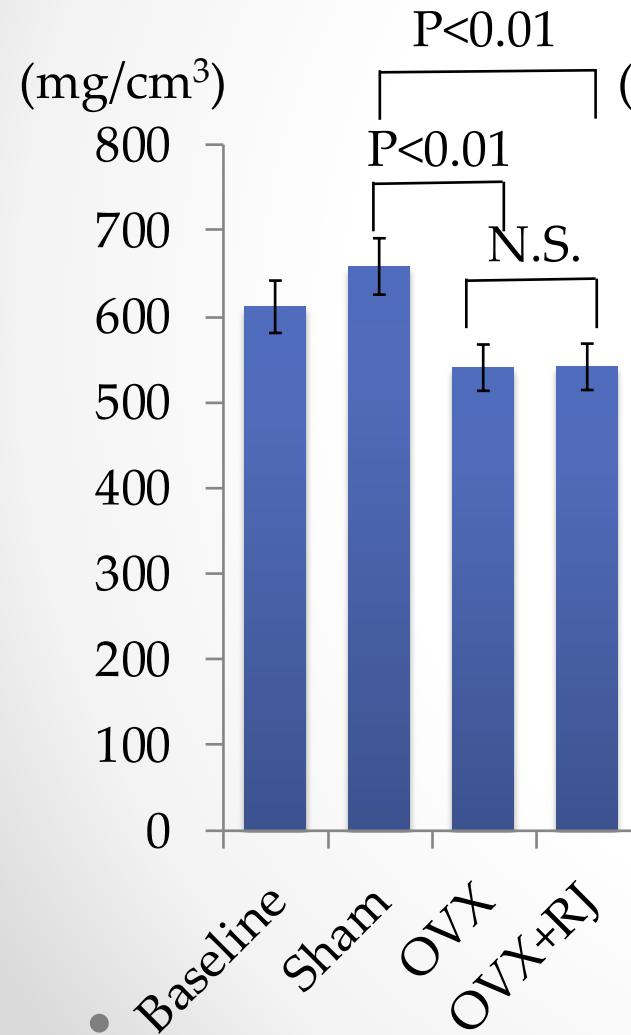
測定部位：右大腿骨

- ・ 海綿骨と皮質骨の体積密度と巨視的な幾何学的性質を非破壊的に測定・解析する方法

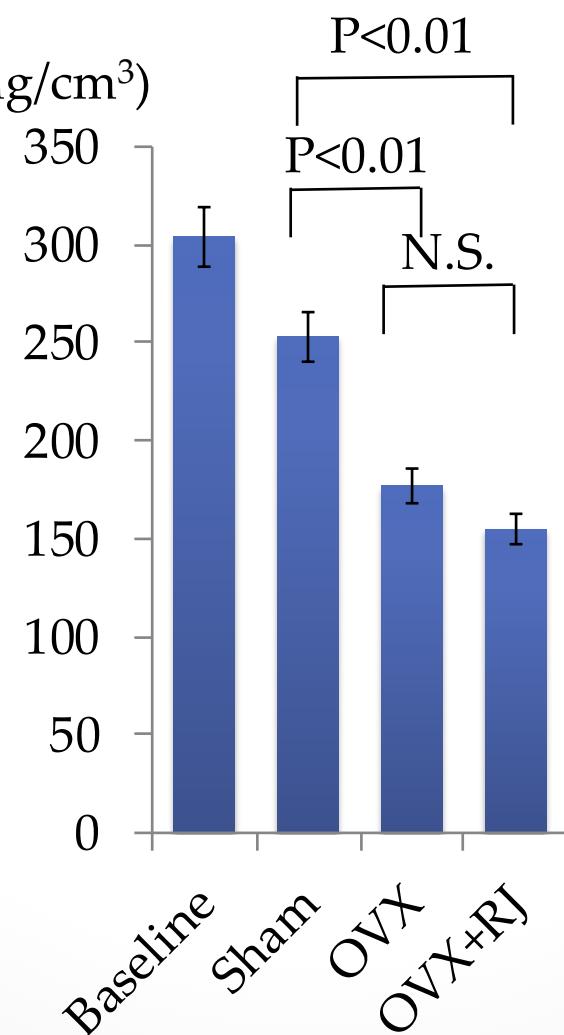


2) 骨密度測定 pQCT法

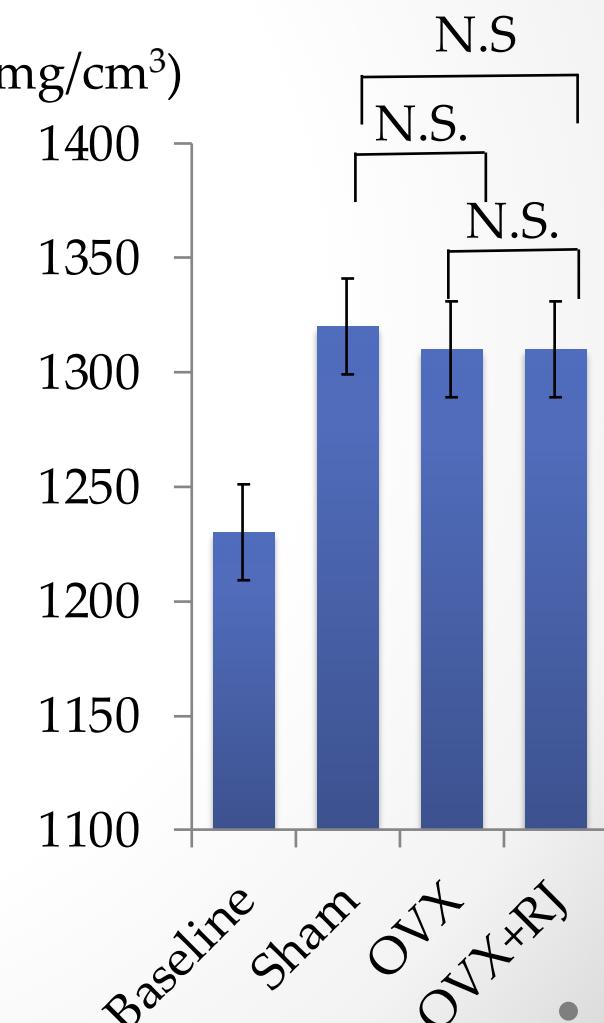
全骨密度



海綿骨骨密度



皮質骨骨密度

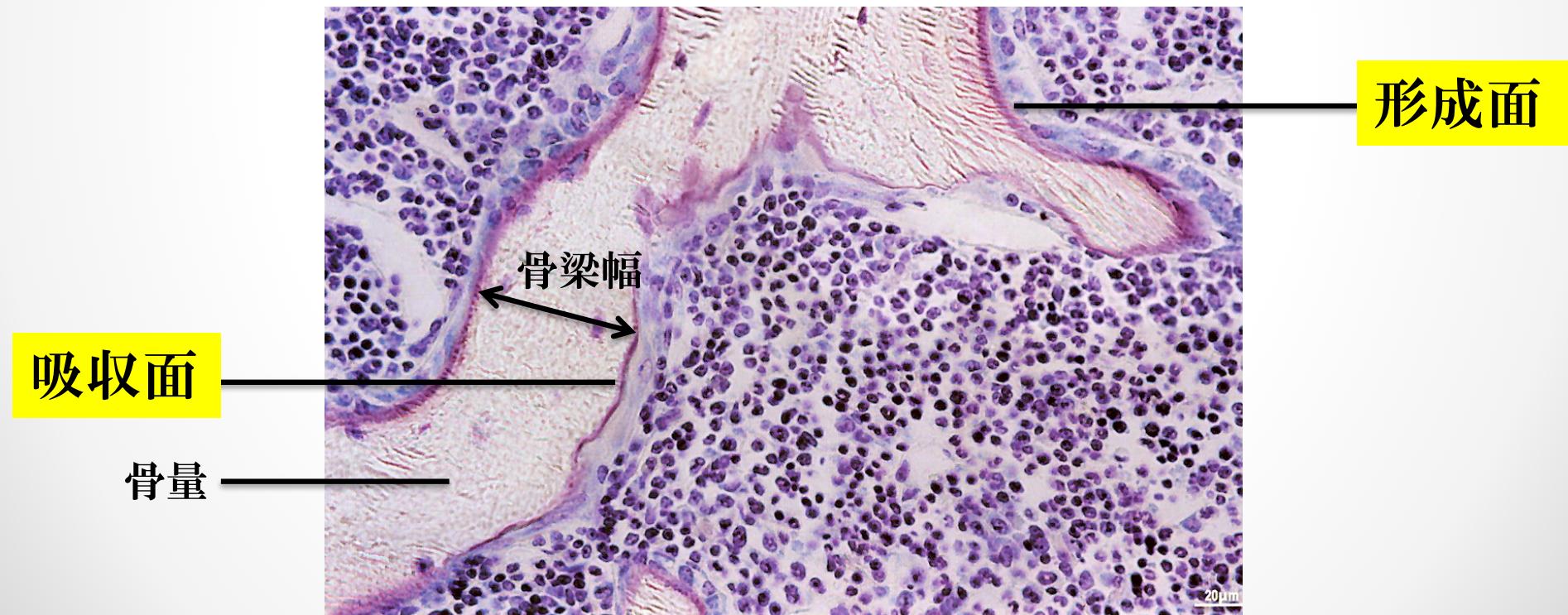


ANCOVA with Tukey's HSD test

3) 骨形態計測

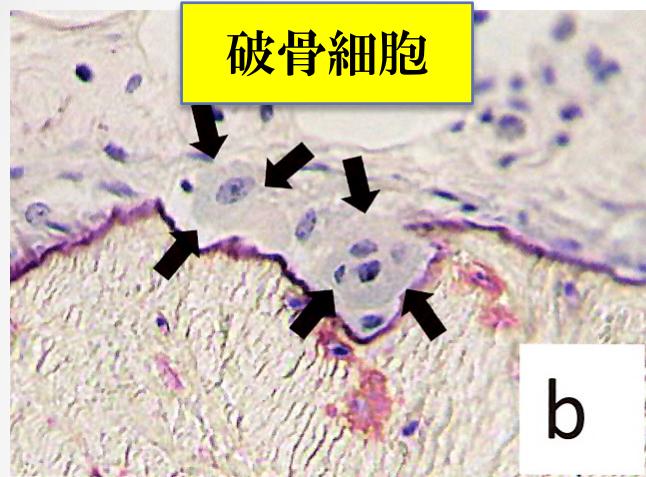
測定部位：左大腿骨遠位端前額断

破骨細胞・骨芽細胞・骨細胞・辺縁細胞によって表現された組織の変化を数値化する方法

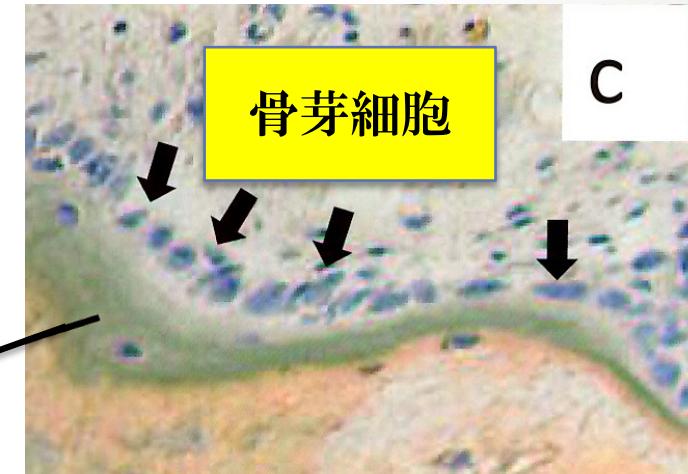


Villanueva Bone Stain

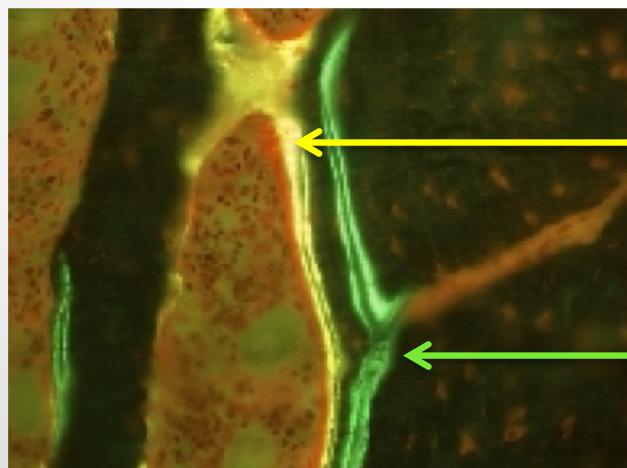
3) 骨形態計測



侵食面（骨吸収パラメータ）



形成面（骨形成パラメータ）



3) 骨形態計測

	Baseline	Sham	OVX	OVX+RJ
構造指標				
骨量(%)	28.5 ± 1.2	28.8 ± 1.3	15.0 ± 0.9 †	16.0 ± 2.2 †
骨梁幅 (μm)	55.4 ± 1.0	62.0 ± 1.5	64.2 ± 2.2	67.5 ± 3.3
骨梁数 (/mm)	5.15 ± 0.20	4.63 ± 0.17	2.34 ± 0.12 †	2.33 ± 0.22 †
類骨量 (%)	4.09 ± 0.44	2.03 ± 0.23	4.36 ± 0.61 †	5.09 ± 0.58 *
類骨面 (%)	26.2 ± 2.4	15.7 ± 1.4	32.8 ± 2.5 †	38.0 ± 1.9 †
骨芽細胞面 (%)	13.39 ± 2.21	3.97 ± 0.54	7.34 ± 1.23	9.38 ± 2.54
浸食面(%)	7.32 ± 0.60	5.89 ± 0.49	5.61 ± 0.47	6.78 ± 0.53
破骨細胞面 (%)	3.65 ± 0.44	2.20 ± 0.23	3.10 ± 0.26	2.73 ± 0.58

骨形成パラメータ

骨吸収パラメータ

*P < 0.05, †P < 0.01 compared with Sham
(Sham vs. OVX vs. OVX+RJ, ANCOVA with Tukey's HSD test).

3) 骨形態計測

	Baseline	Sham	OVX	OVX+RJ
動的指標				
骨石灰化面 (%)	33.1 ± 1.5	17.7 ± 2.1	31.9 ± 2.4 †	30.5 ± 2.6 †
骨石灰化速度 (μm/day)	2.50 ± 0.17	1.27 ± 0.05	1.45 ± 0.10	1.62 ± 0.08 *
骨形成速度 (mm ³ /mm ² /year)	0.302 ± 0.023	0.081 ± 0.010	0.173 ± 0.023 *	0.184 ± 0.024 *
骨形成速度(%/year)	1097 ± 97	261 ± 35	536 ± 73 *	548 ± 68 *

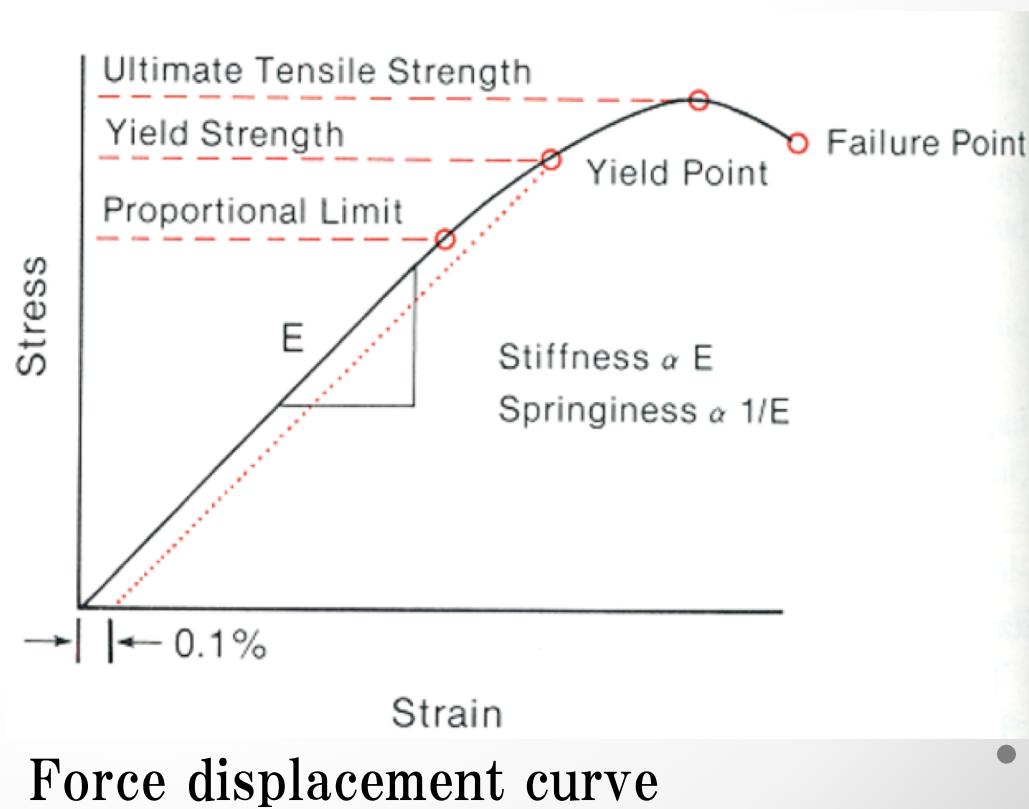
*P < 0.05, †P < 0.01 compared with Sham
(Sham vs. OVX vs. OVX+RJ, ANCOVA with Tukey's HSD test).

4) 3点曲げ骨力学試験

測定部位：右大腿骨

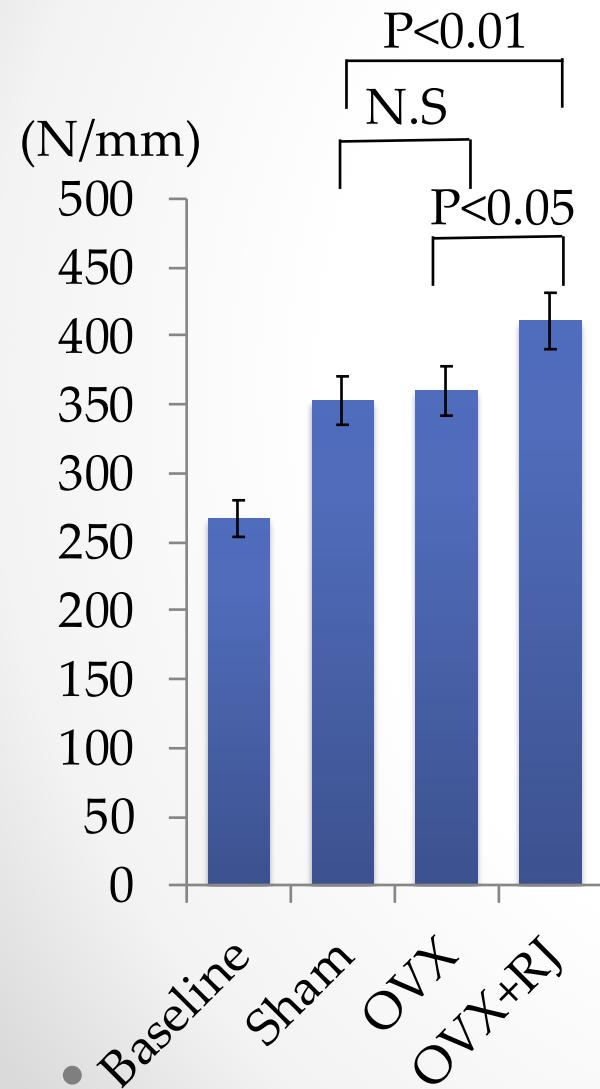
骨強度試験

骨組織の力学的特性を実験的に評価する方法

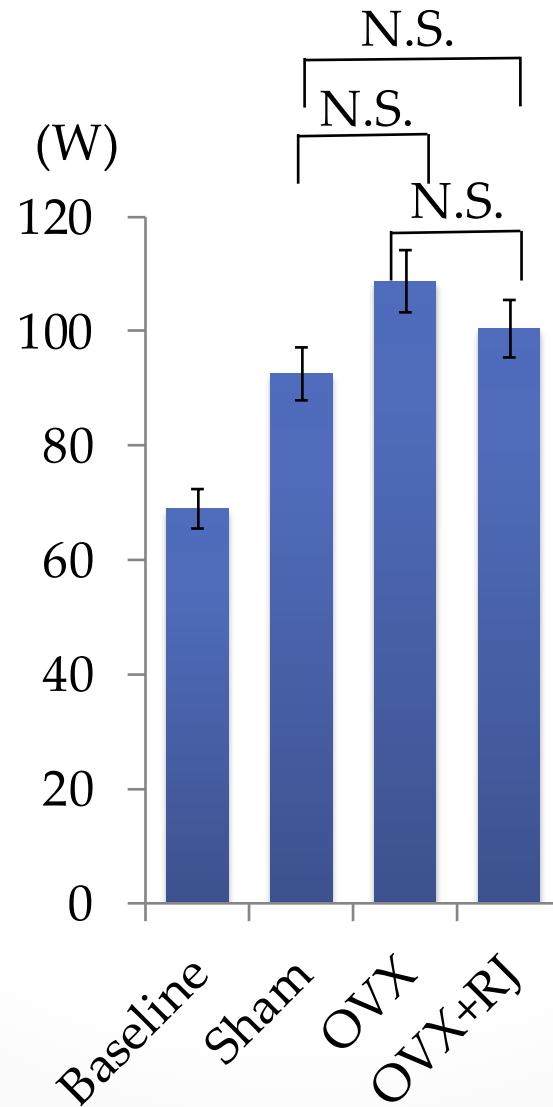


4) 3点曲げ骨力学試験

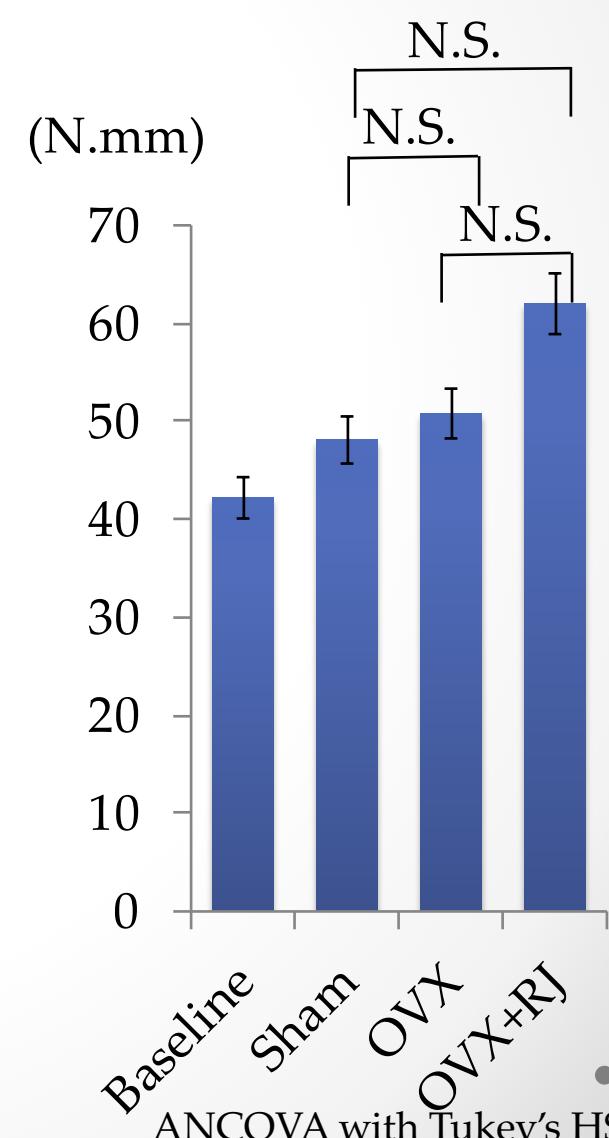
剛性



最大荷重



破断エネルギー



ANCOVA with Tukey's HSD test

考察 (1)

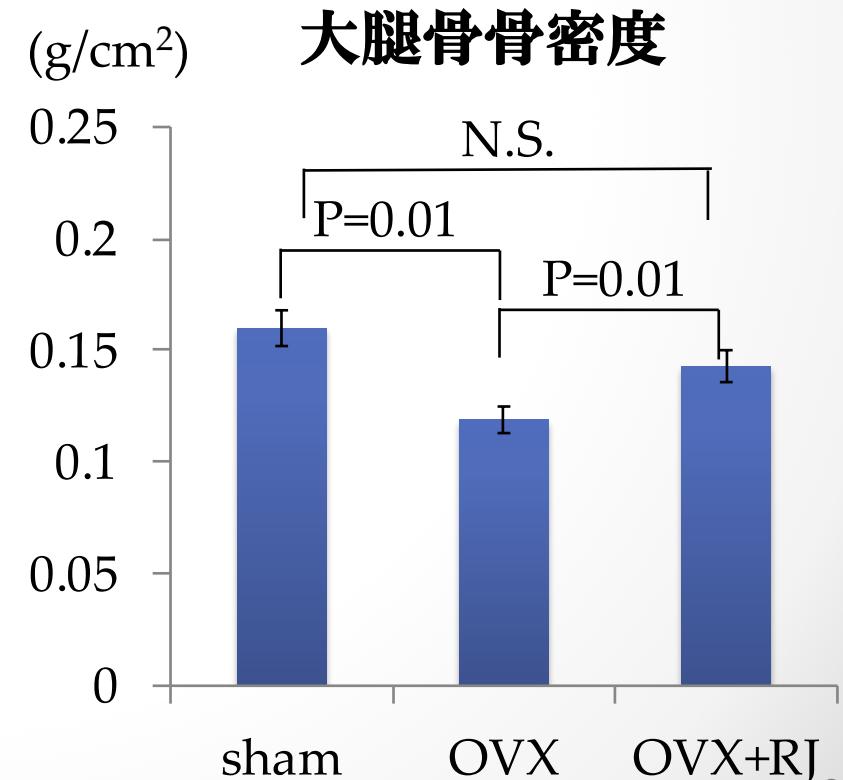
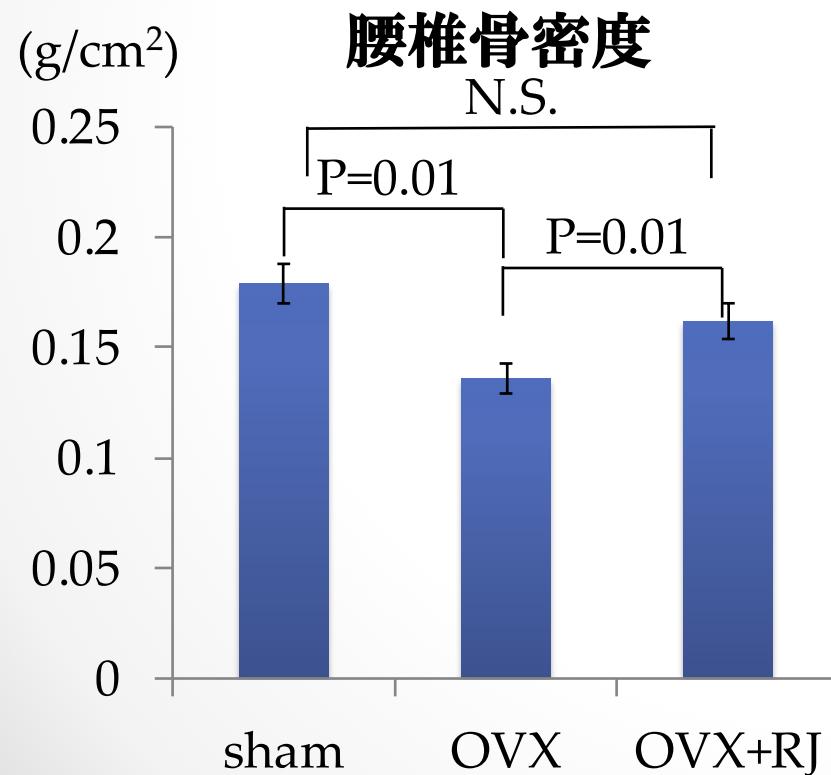
なぜRJ投与により骨量減少
が抑制できなかったか？

Kafadar IH, et al.

(Eklem Hastalik Cerrahisi 2012)

OVXラットに50mg/kg/dayのRJを12週間投与

OVX群と比較し、腰椎・大腿骨骨密度減少は有意に抑制

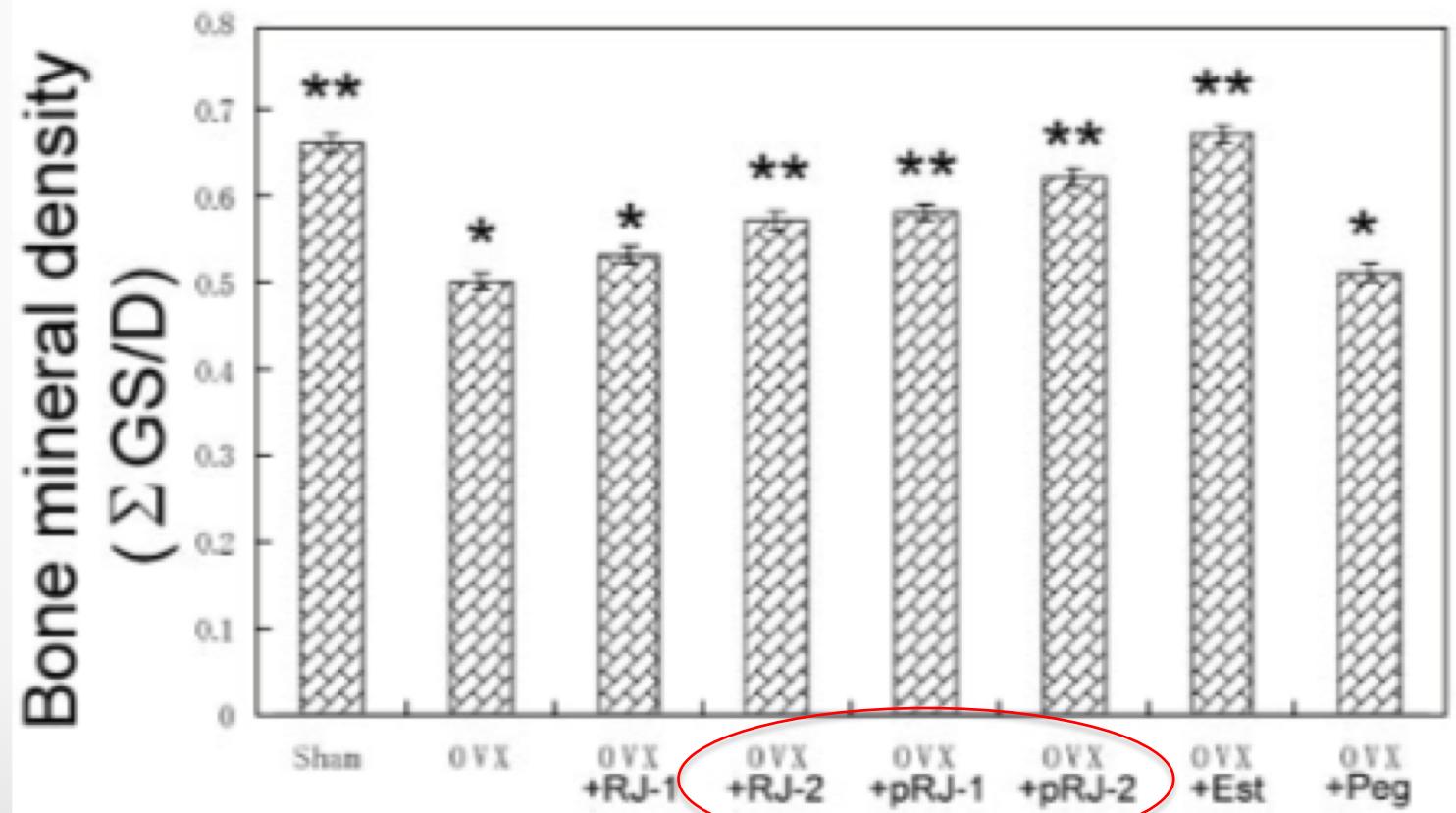


Hidaka S, et al.

(Evid Based Complement Alternat Med 2006)

OVXラットに0.5-2.0% (w/w) RJ, 0.5-2.0% (w/w) 酵素分解RJを7週間投与

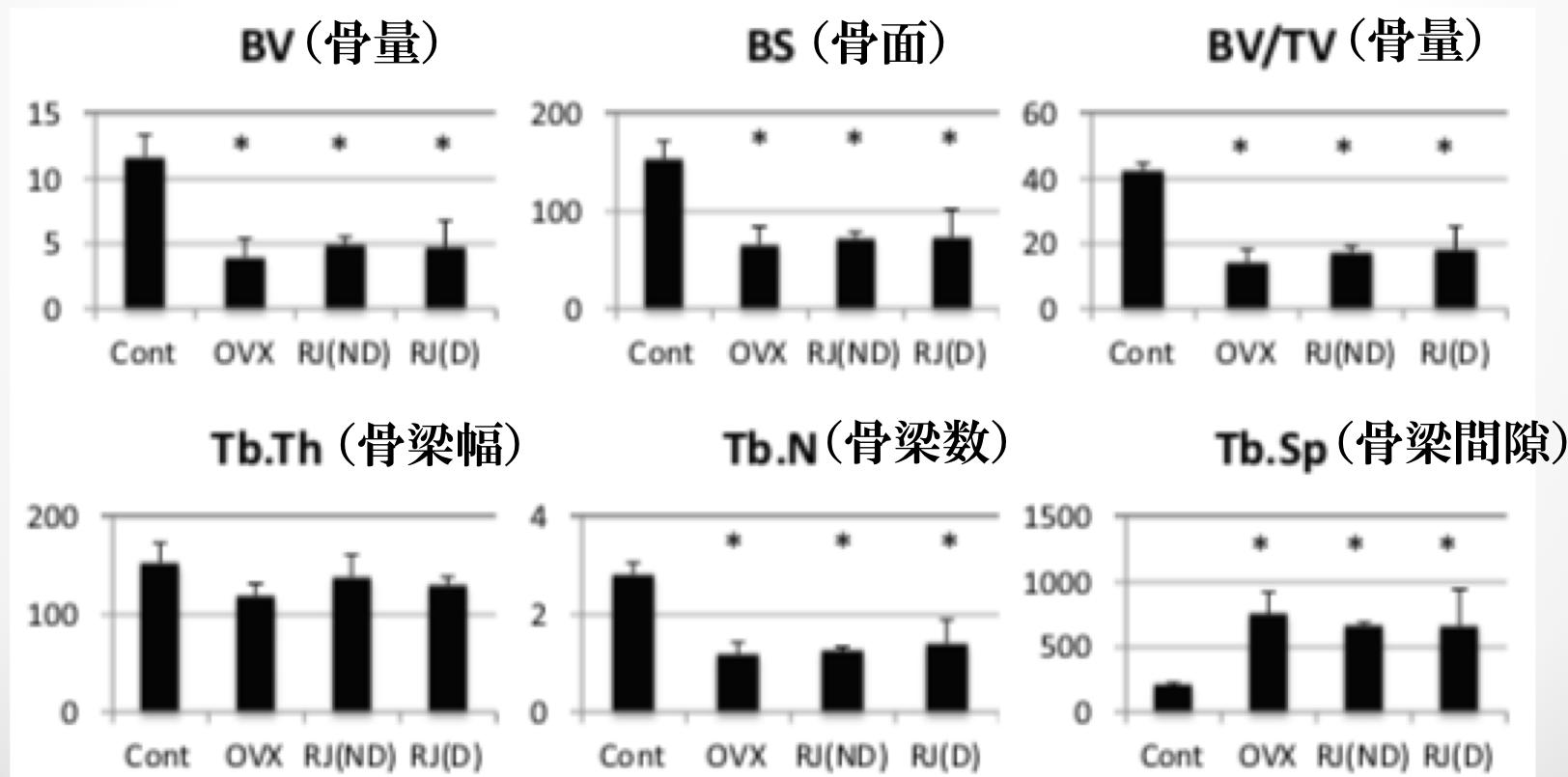
脛骨骨密度の減少はOVX+17 β -estradiol群の15%以下に抑制



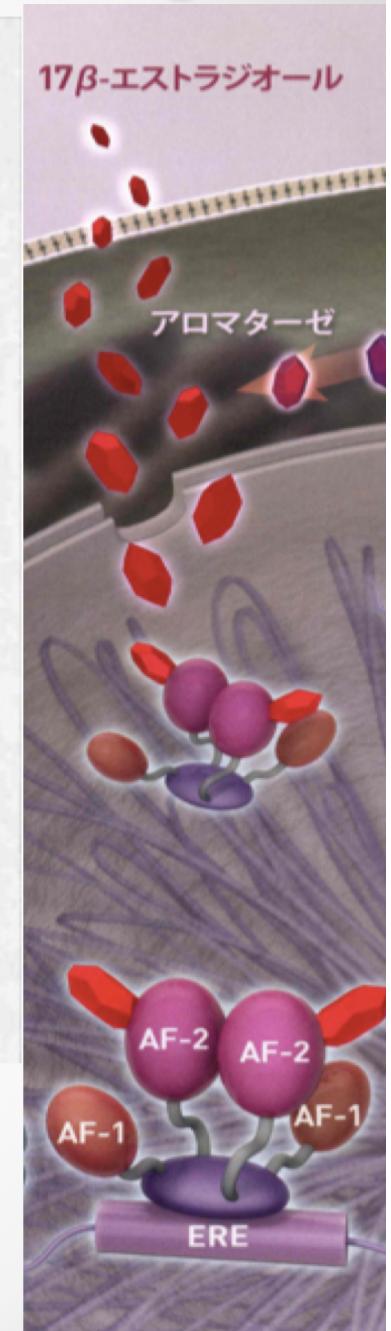
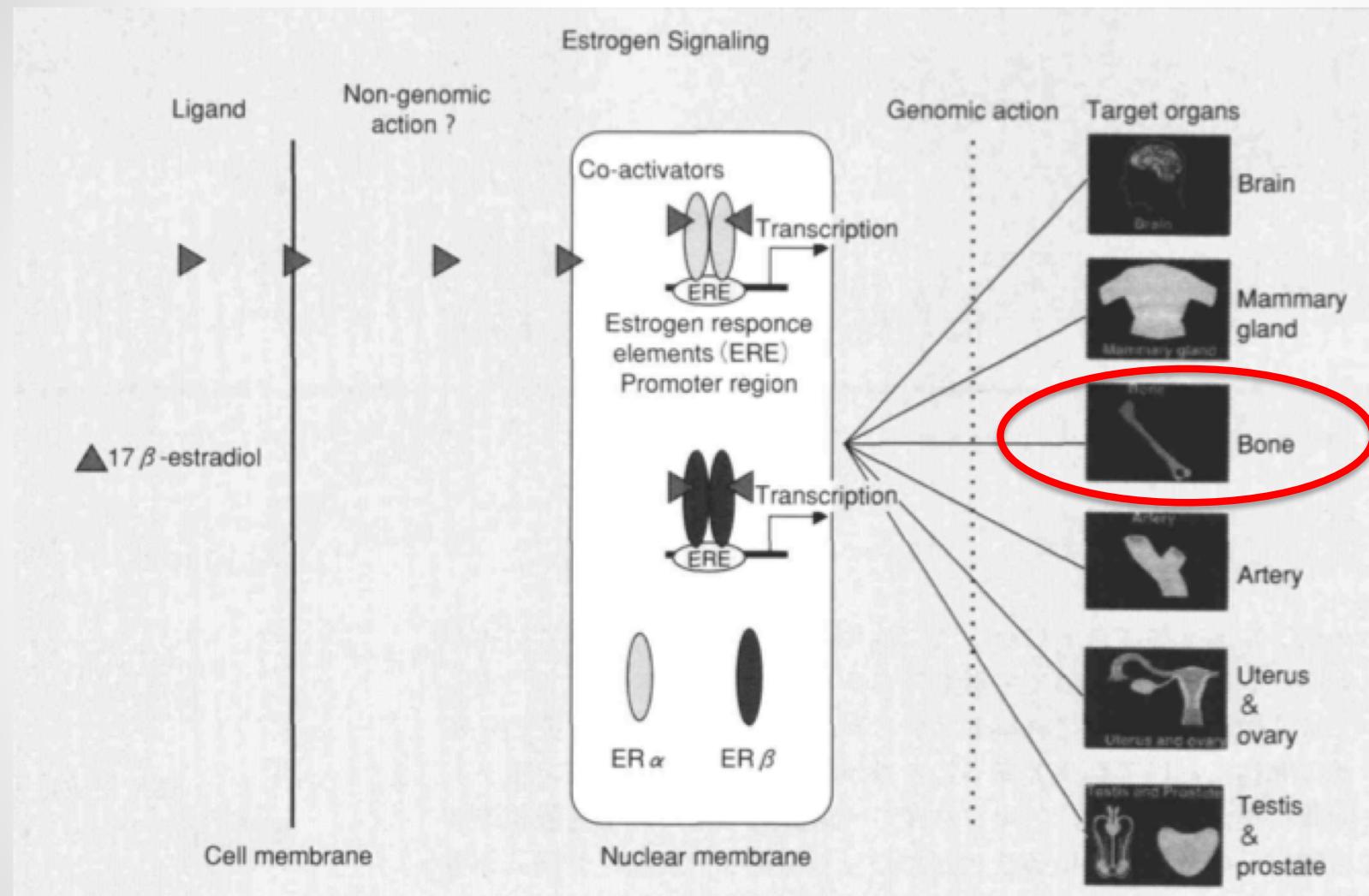
Kaku M, et al. *(J Funct Foods 2014)*

OVXラットに1%(w/w)RJ, 1%酵素分解RJを12週間投与

OVX群と比較し、大腿骨海綿骨量は有意差なし



エストロゲン受容体 α , β



エストロゲンによる骨に対する作用はER α を介して発揮され、ER β は重要な役割を果たしていない

エストロゲン受容体 α , β

<ER α >

- OVXラットの体重増加, 子宮重量減少はER α を介して軽減される

本研究では体重は上昇, 子宮重量は減少
→RJはER α 活性作用を有さない

<ER β >

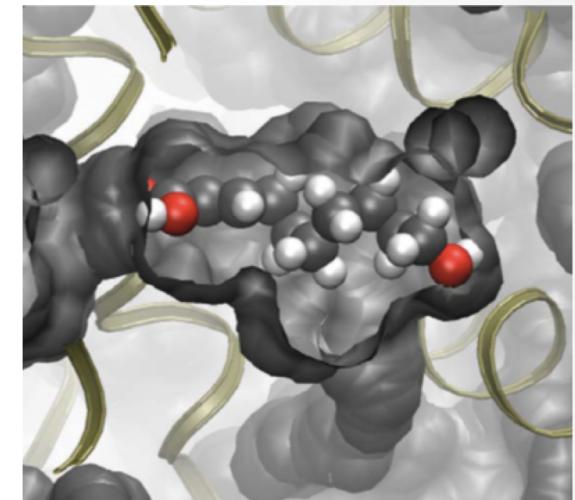
- OVX+RJラットで抑うつ行動・記憶障害が改善
(エストロゲンの抑うつ行動・記憶障害改善効果はER β を介して発揮される)
- RJに含有される物質 (10H2DA, 10HDA, 2DEA, 24MET) はER β を活性化する

RJによるエストロゲン作用は主にER β を介して発揮される

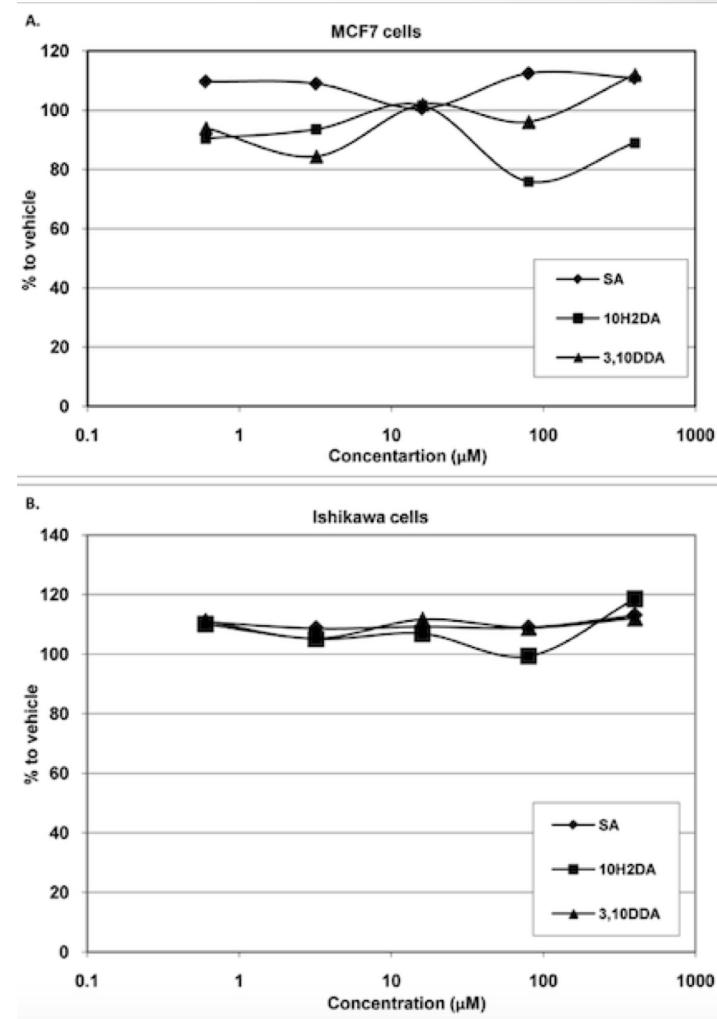
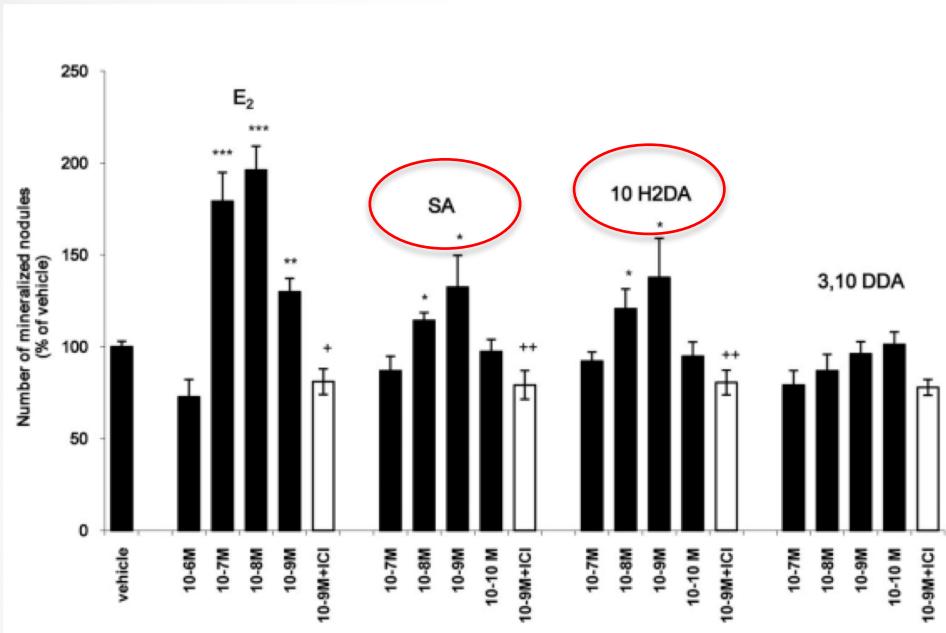
考察 (1)

なぜRJ投与により骨量減少が抑制 できなかったか？

- RJはER α 活性を有さないため、卵巣摘出による骨量減少を抑制できなかつたのではないか？
- 一方、RJはER β 活性作用を有することが報告されており、選択的エストロゲン受容体モジュレーター (selective estrogen receptor modulator : SERM) の様に作用しているのではないか？
-



Moutsatsou P, et al. (PLoS ONE 2010)



10H2DA, SA (RJに含有される脂肪酸)

- ・骨芽細胞：アゴニスト作用
- ・乳癌細胞，子宮癌細胞：不变

RJはSERMとして作用するのではないか？

考察 (2)

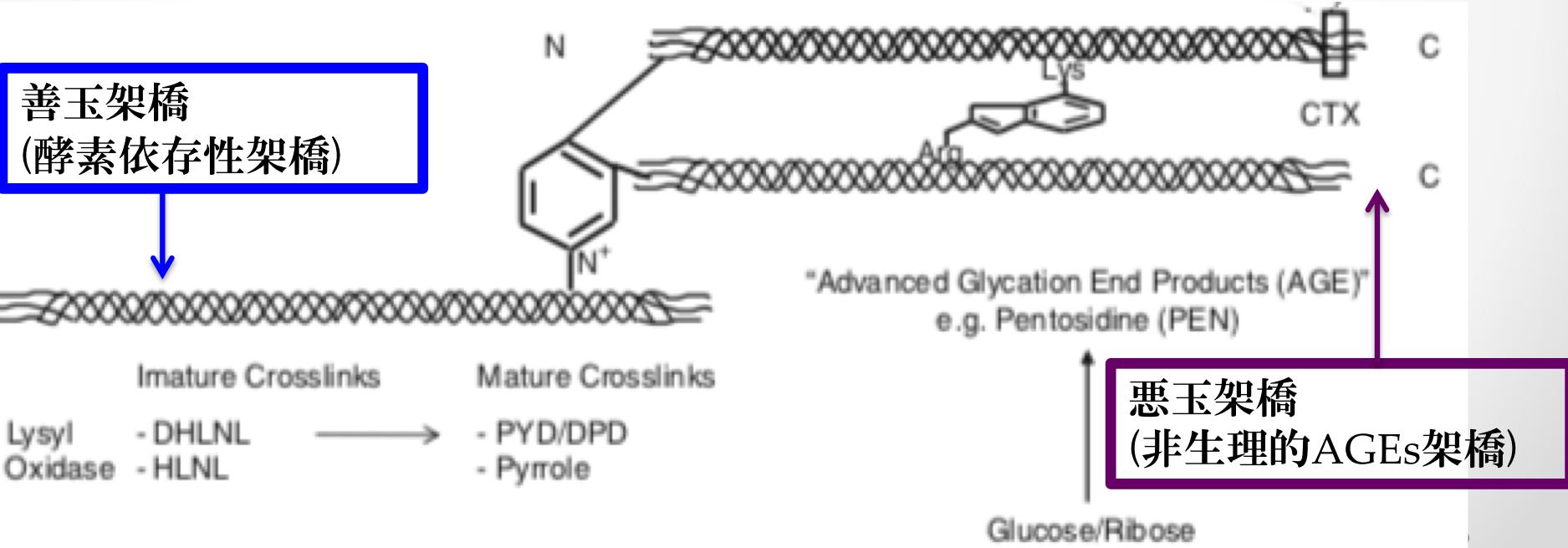
RJによる骨強度改善の機序

コラーゲン架橋

骨強度 = 骨密度 + 骨質

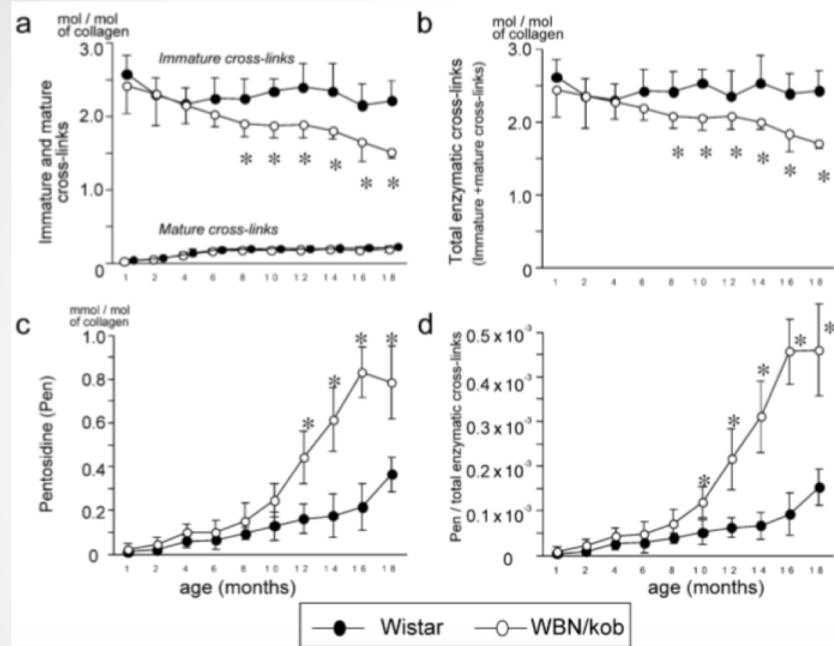
I型コラーゲン
(骨基質蛋白質の90%)

- ・ 微細構造
- ・ 骨代謝回転
- ・ 微小骨折
- ・ 石灰化
- ・ コラーゲン架橋 etc

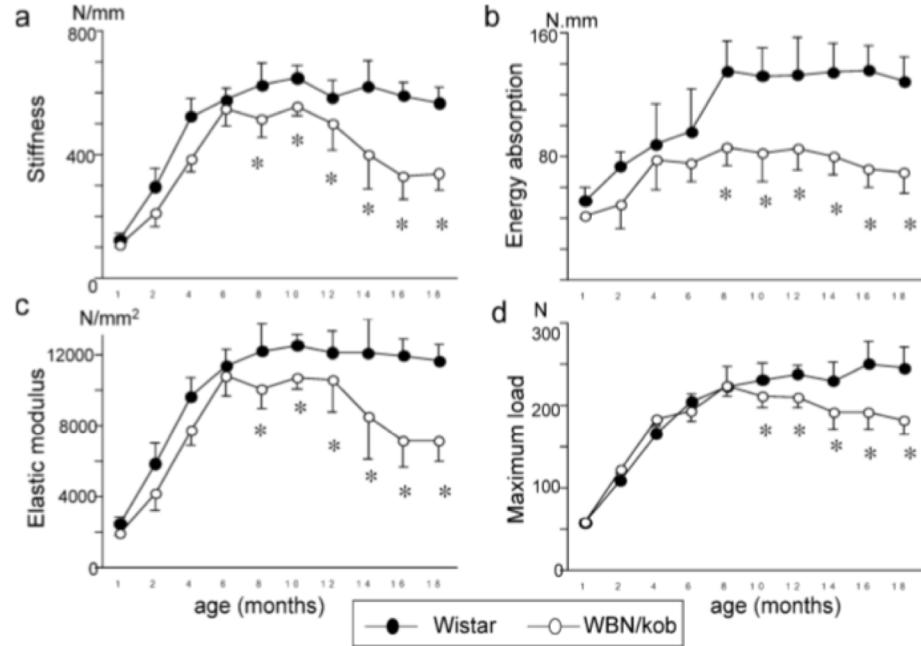


Saitou M, et al. (Osteoporos Int 2006)

コラーゲン架橋



3点曲げ骨力学試験



	Energy absorption	Stiffness	Elastic modulus	Maximum load
Total enzymatic cross-links	0.229	0.557 ^c	0.521 ^c	0.285
Pentosidine	<u>0.312^a</u>	<u>0.677^c</u>	<u>0.579^c</u>	<u>0.448^b</u>
Pentosidine/total enzymatic cross-links	<u>0.332^a</u>	<u>0.699^c</u>	<u>0.603^c</u>	<u>0.460^b</u>

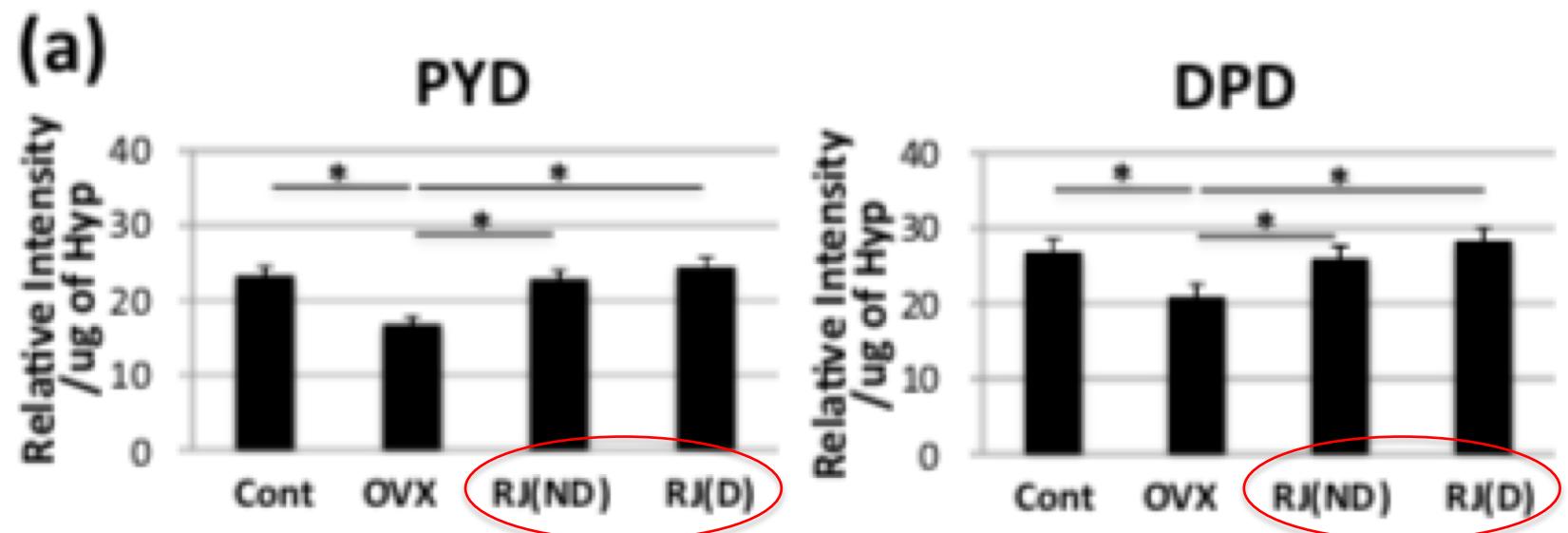
糖尿病は骨密度が正常でも骨折リスクが上昇する。糖尿病モデルラットにおいて、コラーゲン架橋の変化は骨強度と関連している。

Kaku M, et al.
(J Funct Foods 2014)

OVX+RJ群の脛骨抽出液

コラーゲン纖維架橋分子

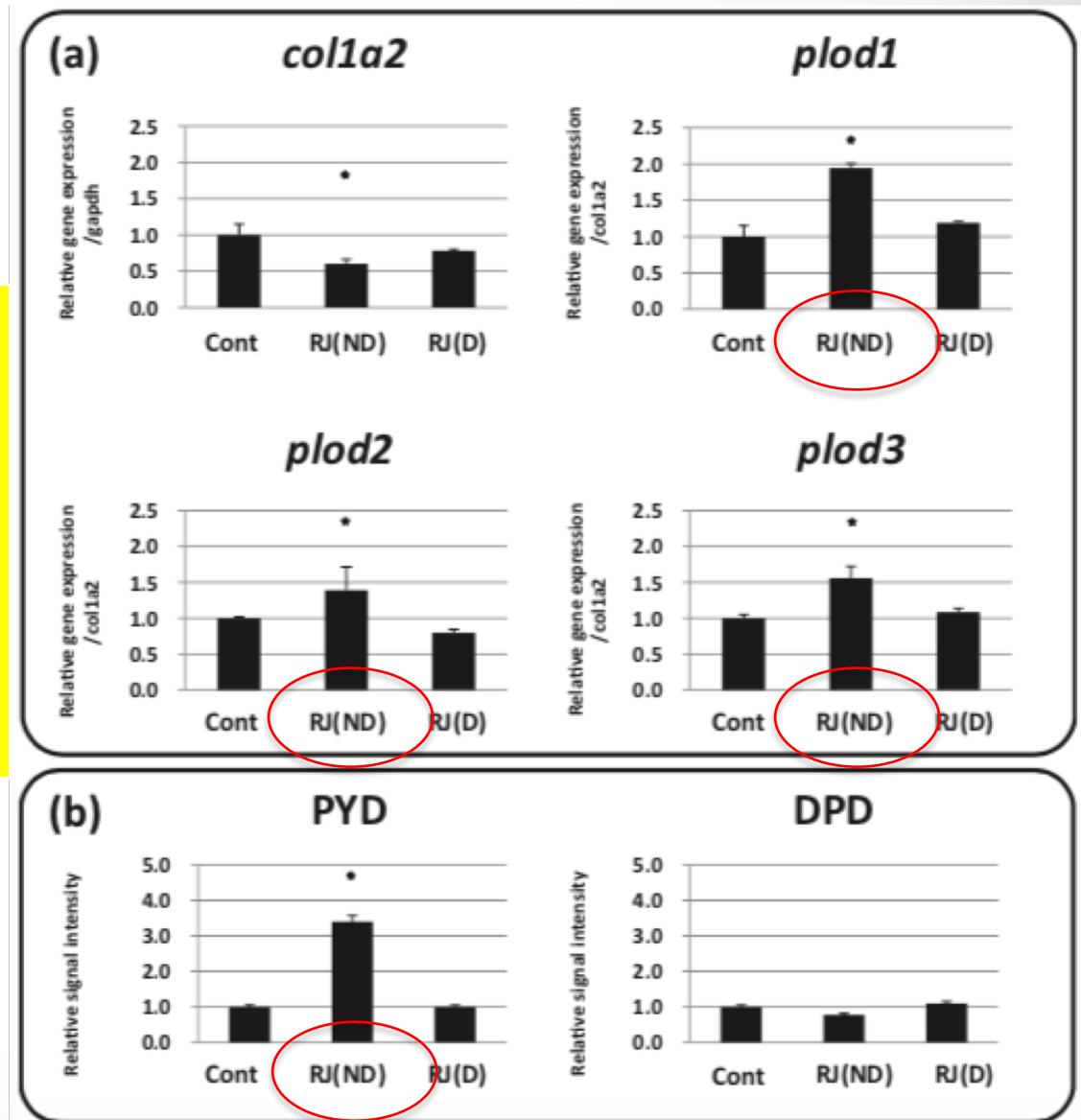
- ・ ピリジノリン (PYD) ↑
- ・ デオキシピリジノリン (DPD) ↑



Kaku M, et al. (J Funct Foods 2014)

in vitro
骨芽細胞様細胞 + RJ

- Plod遺伝子 ↑
(コラーゲン修飾酵素リジルヒドロキシラーゼをコードする遺伝子)
- PYD ↑



Narita Y, et al. (Biosci Biotechnol Biochem 2006)

RJを9週間投与したラット大腿骨のDNAマイクロアレイ解析

Lox gene 

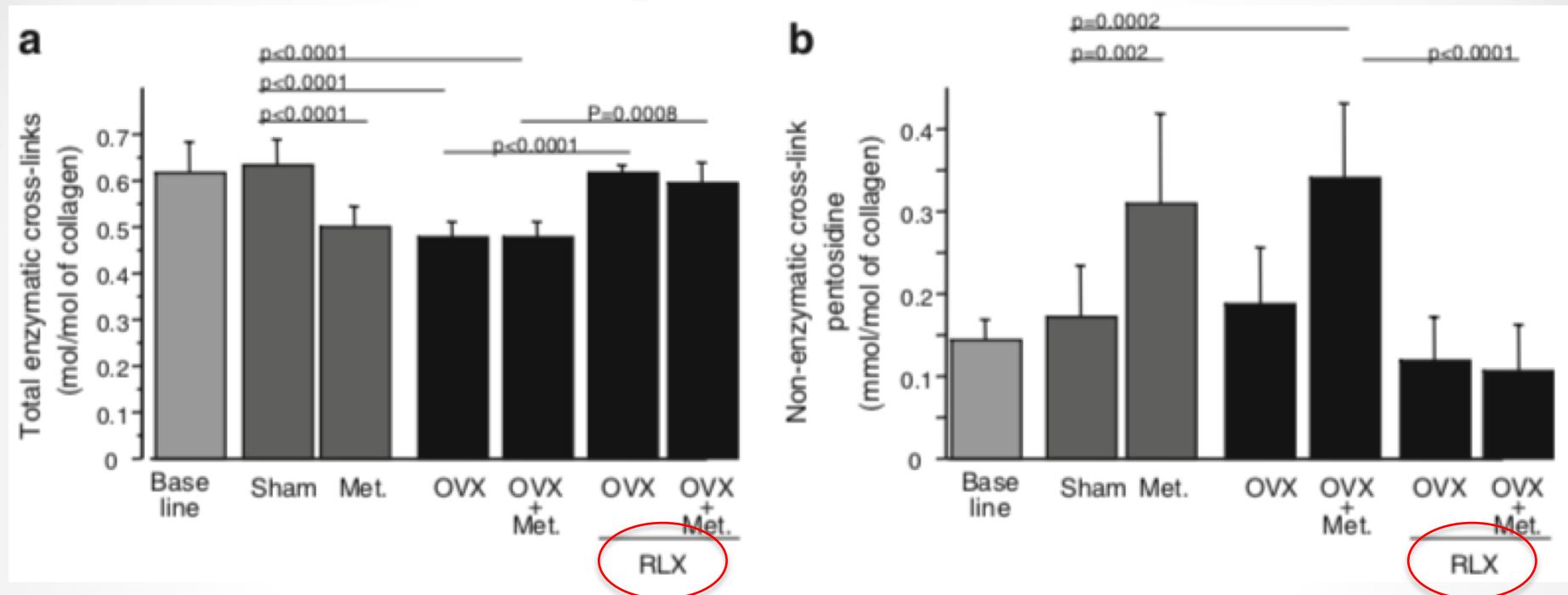
(lysyl oxidase : コラーゲン架橋を秩序立って形成する酵素)

Table 4. Royal Jelly- and E₂-Induced Upregulation of Particular Genes Encoding Proteins Classified in the Extracellular Matrix

NCBI RefSeq accession nos.	Gene name	Gene symbol	Log ₂ ratio	
			RJ*	E ₂
NM_007399	a disintegrin and metalloprotease domain 10	Adam10	0.7	0.8
NM_025711	asporin	Aspn	0.8	1.1
NM_007993	fibrillin 1	Fbn1	0.6	0.9
NM_010576	integrin alpha 4	Itga4	1.0	1.0
NM_010728	lysyl oxidase	Lox	0.4	0.4
NM_007742	procollagen, type I, alpha 1	Col1a1	0.5	0.5
NM_009930	procollagen, type III, alpha 1	Col3a1	0.5	0.8
NM_009931	procollagen, type IV, alpha 1	Col4a1	0.4	0.6
NM_009932	procollagen, type IV, alpha 2	Col4a2	0.5	0.8
NM_007729	procollagen, type XI, alpha 1	Col11a1	0.4	1.2
NM_011580	thrombospondin 1	Thbs1	0.6	1.0
NM_011595	tissue inhibitor of metalloproteinase 3	Timp3	0.8	1.6

*Royal jelly

Saitou M, et al. (Osteoporos Int 2010)



高ホモシスティン血症を誘発したOVX家兎モデルにおいて、塩酸ラロキシフェン（閉経後骨粗鬆症治療薬のSERM）はコラーゲン架橋を改善することによって骨質を高める。

RJはSERM様のメカニズムを介し善玉架橋を増加させ、骨質を改善するのではないか？

結論

- RJは卵巣摘出ラットにおいて骨量減少を抑制しないが、骨剛性（骨強度）を改善する。

骨強度↑ = 骨密度 + 骨質↑