ローヤルゼリータンパク質アピシンのヒト由来皮膚線維芽細胞株 およびマウス由来骨芽細胞様細胞株に及ぼす作用

鶴間佳美[§], 丸山広恵, 荒木陽子

アピ株式会社社長良川リサーチセンター

Effect of a Glycoprotein (Apisin) in Royal Jelly on Proliferation and Differentiation in Skin Fibroblast and Osteoblastic Cells

Yoshimi Tsuruma[§], Hiroe Maruyama and Yoko Araki

Nagaragawa Research Center, API Company Limited, 692-3 Yamasaki, Nagara, Gifu 502-0071

Royal jelly (RJ) has many biologically active ingredients: protein, sugar, lipid (e.g., 10-hydroxy-2-decenoic acid) and other chemicals. Apisin is a 350-kDa glycoprotein, which is the main protein component of RJ. We isolated and purified apisin from fresh RJ through a series of operations, i.e., dialysis, centrifuge separation and ion exchange column chromatography. We investigated whether RJ and purified apisin promote cell proliferation and the production of collagen in normal human neonatal skin fibroblasts, NB1 RGB cells. Moreover, we investigated whether apisin promotes the differentiation of MC3T3-E1, a mouse osteoblastic cell line with calcium and hydroxyapatite production. RJ and apisin induced proliferation and collagen production in NB1RGB cells, and promoted the differentiation of MC3T3-E1 into osteoblasts. These findings suggest that RJ has proliferation- and differentiation-inducing functions, and these effects may be partly mediated via the effects of apisin. (Received Aug. 4, 2010 ; Accepted Dec. 13, 2010)

Keywords : royal jelly, apisin, collagen, NB1RGB, MC3T3-E1

キーワード : アピシン, ローヤルゼリー, コラーゲン, ヒト由来皮膚線維芽細胞株, マウス由来骨芽細胞様細胞株

ローヤルゼリーとは、ミツバチの働き蜂が餌としてハチミツと花粉を食べ、体内で消化し、大顎腺と下咽頭腺から分泌した乳白色の物質である。女王蜂は、ローヤルゼリーのみを餌として食べ続け、働き蜂の約3倍の大きさ、さらには数十倍の寿命を有する。そのためローヤルゼリーには特異的な活性を持つ成分が含まれると考えられ、古くから伝承薬として用いられてきた。ローヤルゼリーは水分、脂質、糖質、タンパク質、ビタミン、ミネラルなど、種々の成分が含まれており、脂質中にはローヤルゼリーの指標成分である10-ヒドロキシ-2-デセン酸の含有量が高いことがわかっている。ローヤルゼリーについてはこれまでに様々な研究が実施されており、エストロゲン様作用¹⁾、血管拡張作用²⁾、血圧降下作用³⁾、高コレステロール症に対する作用⁴⁾、抗腫瘍作用⁵⁾などが報告されている。さらに、近年ではローヤルゼリーのコラーゲン産生促進による骨形成促進作用⁶⁾が報告され、注目を浴びている。

ローヤルゼリーにはタンパク質が10%以上含まれてお

り、水溶性タンパク質が全体の約75%を、水不溶性タンパク質が約25%を占めている⁷⁾。我々は、水溶性タンパク質から透析、遠心分離、陰イオン交換カラムクロマトグラフィーにより350 kDaの糖タンパク質であるアピシンを分離精製した。アピシンは、58 kDaのサブユニット6分子から構成されているオリゴマータンパク質と考えられている⁸⁾。

アピシンは、これまでにヒト単球培養細胞に対して細胞増殖促進作用ならびにラット肝臓の初代培養細胞の細胞死を抑制する作用(延命作用)を有することが報告されている⁹⁾¹⁰⁾。

しかしながら、これらの作用以外にアピシンの機能性についてはほとんど研究されていない。そこで、本研究ではヒト由来皮膚線維芽細胞株を用い、コラーゲン産生に必須であるビタミンC配糖体の存在下、細胞増殖ならびにコラーゲン産生に及ぼすアピシンの作用を調べた。さらに、ビタミンCと β -グリセロリン酸により分化誘導したマウス由来骨芽細胞様細胞株に対するアピシンのカルシウム沈着ならびにヒドロキシアパタイト産生促進作用を調べた。

〒502-0071 岐阜市長良山先 692-3

[§] 連絡先 (Corresponding author), tsuruma-yoshimi@api3838.co.jp

実 験 方 法

1. 試料および試薬

ローヤルゼリーは、中国産生ローヤルゼリー（アピ株式会社製）を凍結乾燥して細胞試験に用いた。

DEAE-セルロファイン A-500 カラムは生化学工業、DC プロテインアッセイは Bio-Rad Laboratories、ペニシリン-ストレプトマイシン混合溶液、25% トリプシン溶液、 α -Modified Eagle Medium (α -MEM)、 β -グリセロリン酸 (β -GP)、アリザリンレッド S はナカライテスク、Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)、ウシ血清アルブミンは Sigma-Aldrich、Dulbecco's Phosphate Buffer Saline (D-PBS) は和光純薬、ビタミン C 配糖体 (Ascorbic Acid 2-Glucoside) は林原生物化学研究所、アスコルビン酸 (ビタミン C) は日興製薬、ウシ胎児血清 (Fetal Bovine Serum; FBS) は HyClone、Cell Counting kit-8 (WST-8) は同仁化学研究所、Procollagen type I C-peptide (PIP) EIA Kit、OsteoImage Mineralization Assay Kit はタカラバイオから購入した。

2. ローヤルゼリーからのアピシンの分離精製

生ローヤルゼリー 50 g を蒸留水で 2 倍希釈し、50 mmol/l リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.2) に対して分画分子量 10 000 の透析膜で 48 時間透析を行った。その後、遠心分離 (15 000 $\times$ g, 60 min, 4°C) し、得られた上清をローヤルゼリー可溶性タンパク質とした。これを、DEAE-セルロファイン A-500 (カラムサイズ: 2.6 cm $\times$ 28 cm, ベッドサイズ: 145 ml) カラムに添加し、非吸着画分を同緩衝液で溶出させた後、NaCl 濃度を 0 から 0.3 mol/l まで直線的に増加させることにより吸着画分 (アピシン) を溶出させ分離した。なお、流速は 90 ml/h で行い、280 nm における紫外吸収によりタンパク質を検出した。タンパク質量は DC プロテインアッセイを用いて測定した。なお、タンパク質量測定のスタンダードとしてウシ血清アルブミンを用いた。

3. アピシン含量の測定

陰イオン交換クロマトグラフィーを用いて分画したアピシン純度は高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて測定した。なお、HPLC 分析条件は以下の通りである。カラム: TOSO 社製 TSK-gel G3000SW_{XL}、カラムサイズ: 7.8 mm $\times$ 30 cm、移動相: 0.1 mol/l リン酸緩衝液 (0.1 mol/l 硫酸ナトリウム, 0.01% アジ化ナトリウムを含み、pH 7.0 に調整)、流速: 0.5 ml/min、カラム温度: 35°C。ローヤルゼリータンパク質に含まれるアピシン純度は、HPLC 分析のピークエリアから算出した。

4. 細胞株および細胞培養

ヒト由来皮膚線維芽細胞株 NB1RGB およびマウス由来骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 は、理化学研究所より購入した。NB1RGB は 10% FBS, 100 単位/ml ペニシリン, 0.1 mg/ml ストレプトマイシンを含む DMEM で、37°C, 5%

CO₂ の条件下で培養した。細胞の継代は 3-4 日毎に次のような方法で行った。培地を除去後、D-PBS で細胞を 2 回洗浄しトリプシン溶液を加え細胞を 3 分間浸して剥離した。さらに、DMEM/FBS 培地を加え数回ピペティングして回収後、1 000 $\times$ g で 5 分間遠心し、細胞塊を集めた。その後新たに DMEM/FBS 培地を加えて細胞を希釈し、新しいシャーレに播種した。MC3T3-E1 の培養および継代は、10% FBS, 100 単位/ml ペニシリン, 0.1 mg/ml ストレプトマイシンを含む α -MEM 培地を用いて、NB1RGB と同様に行った。

5. 生細胞数測定およびコラーゲン産生量測定

NB1RGB を 96 ウェルプレート中に 10 000 細胞/ウェルになるように播種し、37°C, 5% CO₂ の条件下で一晩培養した。無血清の DMEM により細胞を 2 回洗浄し、この培地に置き換えた。アピシンはイオン交換カラム後の溶出液を 0.45 μ m のフィルターでろ過後無血清の DMEM で希釈したものを添加し、ローヤルゼリーは凍結乾燥粉末を無血清の DMEM を用いて溶解、希釈後 0.45 μ m のフィルターでろ過したものを添加し、96 時間後に生細胞数およびコラーゲン産生量を測定した。また、線維芽細胞のコラーゲン産生量の測定の際には還元剤として必須であるビタミン C 配糖体を 250 μ M の濃度で試料と同時に添加した。生細胞数は Cell Counting kit-8 (WST-8) を用いて細胞内脱水素酵素により還元され生成したホルマザン量から算出した。ホルマザンは 492 nm における吸光度により測定した。コラーゲン産生量は細胞培養上清中に分泌された I 型プロコラーゲン量を定量した。定量には PIP EIA kit を用い、PIP に特異的なモノクローナル抗体を用いてペルオキシダーゼおよびテトラメチルベンジジンによる酵素・基質反応により発色させ、450 nm における吸光度により測定した。

6. 細胞の分化誘導およびヒドロキシアパタイト産生量の測定

MC3T3-E1 を 96 ウェルプレート中に 5 000 細胞/ウェルになるように播種し、37°C, 5% CO₂ の条件下でサブコンフルエントの状態になるまで 2 日間培養した後、培養液を 2% FBS を含む α -MEM により 2 回洗浄し、この培地に置き換えて実験 0 日とした。MC3T3-E1 の分化誘導因子としてアスコルビン酸および β -グリセロリン酸を含む培地を用いた。分化誘導因子添加と同時にアピシンおよびローヤルゼリーを添加した。アピシンはイオン交換カラム後の溶出液を 0.45 μ m のフィルターでろ過後無血清の DMEM で希釈したものを添加し、ローヤルゼリーは凍結乾燥粉末を無血清の DMEM を用いて溶解、希釈後 0.45 μ m のフィルターでろ過したものを添加した。培養液は 3 日毎に交換し、その都度アピシンおよびローヤルゼリーを添加した。分化誘導因子添加から 14, 21, 28, 35, 42 日目に MC3T3-E1 の分化はヒドロキシアパタイト産生量を分化の指標として OsteoImage Mineralization Assay kit を用いて測定

表 1 ローザゼリータンパク質のイオン交換クロマトグラフィーにおける回収率

	体積 (ml)	タンパク質濃度 (mg/ml)	タンパク質量 (mg)	回収率 (%)
ローザゼリー可溶性タンパク質	132	50.0	6600	100.0
D1	400	4.5	1816	27.5
D2	200	0.8	152	2.3
D3	150	0.7	101	1.5
D4	200	21.9	4384	66.4

図 1 ヒト由来皮膚線維芽細胞株の細胞増殖およびコラーゲン産生量に及ぼすアピシンの影響

(A) NB1RGB (10 000 細胞/ウェル) を播種し、24 時間後に培地交換と同時にアピシンもしくはローザゼリーを添加した。96 時間培養後、WST-8 添加により生存細胞数を測定した。無処置群の生存細胞数を 100% とし、平均値±標準偏差で表した。(n=6), **, $p < 0.01$, *, $p < 0.05$ vs. 無処置群。(B) 同条件で培地上清中のコラーゲン産生量を測定した。無処置群のコラーゲン産生量を 100% とし、平均値±標準偏差で表した。(n=10-12), **, $p < 0.01$ vs. コントロール群 (0 µg/ml)。

した。本キットでは蛍光 OsteoImage Staining Reagent が細胞に蓄積した骨様塊のヒドロキシアパタイトに特異的に結合する原理を用い、492 nm 励起、520 nm 蛍光波長で測定した。MC3T3-E1 の分化の指標の一つであるカルシウム沈着はアリザリンレッドにより染色し、写真撮影した。

7. 統計学的解析

実験結果はすべて平均値±標準偏差で表し、危険率 5% 未満 ($p < 0.05$) を有意とした。統計学的解析は Dunnett 多重比較検定により行った。

実験結果

1. ローザゼリーからのアピシンの分離精製

ローザゼリー可溶性タンパク質を DEAE セルロフアイン A-500 による陰イオン交換クロマトグラフィーによって分離した結果を表 1 に示した。ローザゼリー可溶性タンパク質を非吸着画分の D1, D2, D3 画分と吸着画分の D4 画分に分離した。D4 画分を HPLC により分析した結果、アピシン純度は 83.3% であることが分かった。

2. アピシンのヒト由来皮膚線維芽細胞株 NB1RGB の増殖ならびにコラーゲン産生促進作用

アピシンを添加して、1 日目から 5 日目まで継続的に

NB1RGB に対する増殖促進作用を検討した結果、アピシン 100-300 µg/ml 添加群は 1 日目から無処置群と比較して増殖促進傾向にあり、4 日目において最も無処置群と有意差 ($p < 0.05$) が認められた (データ掲載なし) ことから、被検サンプル添加後 4 日目の生細胞数ならびにコラーゲン産生量を測定した。また、NB1RGB のコラーゲン産生に不可欠であるビタミン C 配糖体を添加し、ビタミン C 配糖体の生細胞数ならびにコラーゲン産生量に及ぼす影響を調べた。ビタミン C 配糖体は NB1RGB の増殖には影響を及ぼさなかったものの (図 1A)、ビタミン C 配糖体の添加によりコラーゲン産生量に約 1.6 倍の増加が認められた (図 1B)。両試験においてビタミン C 配糖体 (250 µmol/l) 含有培地もしくは非含有培地でローザゼリーならびにアピシンの NB1RGB に及ぼす影響を調べた。その結果、ビタミン C 配糖体存在下アピシン 100-300 µg/ml の添加により細胞増殖促進作用が有意に認められ、300 µg/ml の添加ではビタミン C 配糖体のみを添加した群と比較して約 1.3 倍の生細胞数の増加が認められた (図 1A)。また、ビタミン C 配糖体無添加培地においてもアピシン 100-300 µg/ml の添加により同様に増殖促進作用が認められ、ビタミン C 配糖体の有無に有意な差は認められなかった (データ

図 2 マウス由来骨芽細胞様細胞株の分化に及ぼすアピシンの影響

MC3T3-E1 (5000 細胞/ウェル) を播種し, 48 時間後に分化誘導因子 (アスコルビン酸+ β -グリセロリン酸) を含む培地へ交換と同時にアピシンを添加した. 培養液は 3 日毎に交換し, その都度分化誘導因子ならびにアピシンを添加した. 分化誘導因子添加から 35 日間培養後アリザリンレッド染色を行った (A-E). さらに, ヒドロキシアパタイトを蛍光染色した (F-J). 試験群は, 無処置群 (A, F), コントロール群 (0 μ g/ml) (B, G), 分化誘導 (アスコルビン酸+ β -グリセロリン酸)+アピシン添加群 (C, H: 20 μ g/ml, D, I: 100 μ g/ml, E, J: 300 μ g/ml) を設けた.

掲載なし). 同条件でヒト由来皮膚線維芽細胞株のコラーゲン産生量を測定したところ, 細胞増殖促進作用と同様にアピシンの添加によりコラーゲン産生量も濃度依存的に増加する傾向が認められた ($p < 0.1$) (図 1B). 一方, ローザゼリー 100 μ g/ml 処理群では NB1RGB の細胞増殖促進作用は認められなかったものの (図 1A), コラーゲン産生量はビタミン C 配糖体のみを添加した群と比較し, 促進される傾向が認められた ($p < 0.1$) (図 1B).

3. アピシンのマウス由来骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 の分化促進作用

MC3T3-E1 の増殖に対するアピシンの影響を調べた結果, アピシンは 20-300 μ g/ml の濃度範囲で MC3T3-E1 の増殖に影響を及ぼさなかった (データ掲載なし). MC3T3-E1 の分化に対するアピシンの影響を調べるために, 無処置群は 2% FBS を添加した α -MEM を培養液として, 分化誘導群と同期間培養を行い, アリザリン染色によるカルシウム沈着ならびに蛍光発色法によるヒドロキシアパタイトの産生を調べた. その結果, 無処置群には全くカルシウムの沈着ならびにヒドロキシアパタイトの蓄積が確認されなかった (図 2A, F). 一方, 培養液に分化誘導因子としてビタミン C および β -グリセロリン酸を含む培養液を用いて培養したところ, 28 日目まではどの処理による細胞でも極めて微小なカルシウム沈着しか観察されず, ヒドロキシアパタイトもほとんど観察されなかったが, 35 日目にはコントロール群においてアリザリンレッドにて染色される小さな粒状カルシウム沈着ならびにヒドロキシアパタイトの蓄積が培養ウェルの周辺部に観察された (図 2B, G). また, 分化誘導因子を含む培地にアピシン 20 μ g/ml を添加した群では 35 日目でカルシウム沈着が観察され, その数はコントロール群より多く, ヒドロキシアパタイトの蓄積も厚みが増した (図 2C, H). さらにアピシン 100 μ g/ml を

図 3 マウス由来骨芽細胞様細胞株のヒドロキシアパタイト産生量に及ぼすアピシンの影響

MC3T3-E1 (5000 細胞/ウェル) を播種し, 48 時間後に分化誘導因子 (アスコルビン酸+ β -グリセロリン酸) を含む培地へ交換と同時にアピシンを添加した. 培養液は 3 日毎に交換し, その都度分化誘導因子ならびにアピシンを添加した. 分化誘導因子添加から 35 日間培養後ヒドロキシアパタイトの産生量を蛍光染色により定量した. 値は, 相対蛍光強度 (励起波長: 492 nm/吸収波長: 520 nm) を平均値土標準偏差で表した. ($n=4-5$), **: $p < 0.01$, *: $p < 0.05$ vs. コントロール群 (0 μ g/ml). β -GP: β -グリセロリン酸.

添加した群ではカルシウム沈着が大きな塊となって観察されるとともにその数も増加し, ヒドロキシアパタイトの蓄積も増大した (図 2D, I). 一方, アピシン 300 μ g/ml を添加した群では, 分化誘導因子を含むにも関わらずカルシウム沈着ならびにヒドロキシアパタイトの蓄積がほとんど確認されなかった (図 2E, J). さらに, 細胞に蓄積したヒドロキシアパタイトと特異的に結合する蛍光色素を用いてヒドロキシアパタイトの産生量を定量した結果, アピシン 100 μ g/ml を添加した群において, 産生促進作用が有意に認められた ($p < 0.05$) (図 3). また, ローザゼリーも濃

図 4 マウス由来骨芽細胞様細胞株のヒドロキシアパタイト産生量に及ぼすローヤルゼリーの影響

MC3T3-E1 (5000 細胞/ウェル) を播種し、48 時間後に分化誘導因子 (アスコルビン酸+β-グリセロリン酸) を含む培地へ交換と同時にローヤルゼリーを添加した。培養液は 3 日毎に交換し、その都度分化誘導因子ならびにローヤルゼリーを添加した。分化誘導因子添加から 42 日間培養後ヒドロキシアパタイトの産生量を蛍光染色により定量した。値は、相対蛍光強度 (励起波長: 492 nm/吸収波長: 520 nm) を平均値±標準偏差で表した。(n=4), **; $p < 0.01$, *; $p < 0.05$ vs. コントロール群 (0 µg/ml). β-GP: β-グリセロリン酸。

度依存的にヒドロキシアパタイトの産生を増加させ、ローヤルゼリー 100 µg/ml を処理した群において、ヒドロキシアパタイト産生促進作用が有意に認められた ($p < 0.05$) (図 4)。ヒドロキシアパタイト産生促進作用において、アピシン 100 µg/ml を添加した群はコントロール群に対して約 40%、ローヤルゼリー 100 µg/ml を添加した群はコントロール群に対して約 30% の促進作用が認められた (図 3, 4)。なお、MC3T3-E1 のカルシウム沈着の染色ならびにヒドロキシアパタイトの産生量測定は、顕微鏡下で分化誘導を確認した時点で行った。本試験では平均して 35-42 日で分化誘導が認められた。

考 察

本研究では、ローヤルゼリーに含まれるタンパク質「アピシン」がビタミン C 配糖体存在下において、ヒト由来皮膚線維芽細胞株の増殖ならびにコラーゲンの産生を促進することを示した。さらに、アピシンは分化誘導剤であるビタミン C と β-グリセロリン酸存在下、マウス由来骨芽細胞様細胞株の分化を促進する作用を有した。

アピシンは、58-kDa のサブユニット 6 個からなるオリゴマータンパク質であり、高マンノース型糖鎖を有する糖タンパク質であることが報告されている⁸⁾。一方で、アピシンの機能性に関してはほとんど知られておらず、本研究報告はアピシンの新しい機能性として期待できる。

ローヤルゼリー中のアピシン量を測定した結果、アピシンは生ローヤルゼリー中に 6.9%、凍結乾燥ローヤルゼ

リー中に 19.6% 含有されていた (データ掲載なし)。そこで、アピシン処理群におけるアピシン添加量はローヤルゼリーに含まれる濃度を考慮して最低濃度を設定した (100 µg 凍結乾燥ローヤルゼリー中に 20 µg アピシンを含有)。

コラーゲンは細胞内でプロコラーゲンとして生合成され、細胞外に分泌されて重合してコラーゲン繊維となる。線維芽細胞は I 型コラーゲンを分泌する特性を有し、皮膚細胞のコラーゲン産生の評価試験に用いられる。ローヤルゼリーはこれまでにヒト由来皮膚線維芽細胞株 NHDF に対してビタミン C 配糖体存在下でコラーゲン産生を促進し、その作用には 10-ヒドロキシ-2-デセン酸が関与していることが報告されている¹¹⁾。本研究では NHDF よりもコラーゲン産生の高い細胞特性を有するヒト皮膚線維芽細胞株 NB1RGB¹²⁾ を用い、ビタミン C 配糖体存在下のコラーゲン産生に対するローヤルゼリーならびにアピシンの影響を検討した。その結果、ローヤルゼリーは NB1RGB 細胞においてコラーゲン産生を増加させる傾向にあり、さらにアピシンも濃度依存的なコラーゲン産生促進作用を示した。このことから、ローヤルゼリーのコラーゲン産生促進作用には 10-ヒドロキシ-2-デセン酸の関与とともに、ローヤルゼリーに多く含まれる糖タンパク質であるアピシンにもその作用がある可能性が示唆された。

現在、日本では骨粗しょう症の患者数が約 1000 万人にのぼると言われ、その 8 割が閉経後の女性である。閉経による女性ホルモン (エストロゲン) の急激な減少が骨粗しょう症の主な原因であることが報告されている¹³⁾。そこで、骨粗しょう症予防に対してローヤルゼリーのエストロゲン様作用¹⁾ が有効と考えられ、ローヤルゼリーの骨に対する研究が進められている。これまでにローヤルゼリーは、卵巣摘出手術によるラット骨粗しょう症モデルにおいて 17β-エストラジオールと同等の骨密度ならびに骨内ミネラル減少の抑制効果¹⁴⁾ を示し、さらにマウス由来骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 のコラーゲン産生をタンパク質レベルで促進することが報告されている⁶⁾。

本研究では、マウス由来骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 の分化に対するローヤルゼリーならびにアピシンの作用を検討した。ローヤルゼリーおよびアピシンは MC3T3-E1 の細胞増殖に影響のない濃度範囲 (20-300 µg/ml) を用いた。その結果、アピシンは 20 µg/ml および 100 µg/ml 処理によりカルシウム沈着およびヒドロキシアパタイトの産生を促進したが、アピシン 300 µg/ml 処理群においては分化誘導がビタミン C+β-GP のみ添加した群と同等、もしくはそれ以上に阻害された。このことからアピシン 100 µg/ml までは濃度依存的にマウス由来骨芽細胞様細胞株の分化を促進する作用を有することが示された。この分化の阻害原因として、アピシンの過剰量添加では細胞の増殖過程には影響を及ぼさないが、分化は誘導しない可能性が示唆され、マウス由来骨芽細胞様細胞株の分化促進作用には

アピシンの至適濃度があると考えられる。

今回、ヒト由来皮膚線維芽細胞株 NB1RGB を使用した *in vitro* の試験系で、アピシンが増殖促進作用ならびにコラーゲン産生促進作用を有すること、さらにマウス由来骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 を使用した *in vitro* の試験系で、アピシンが MC3T3-E1 の分化促進作用を有することが明らかとなり、美容効果ならびに骨粗しょう症予防・改善効果が期待される。

要 約

本研究は、ローヤルゼリー中の主要タンパク質であるアピシンを対象としてヒト由来皮膚線維芽細胞株に対する増殖促進作用およびコラーゲン産生促進作用を定量的に検討した。さらにマウス由来骨芽細胞様細胞株に対する分化促進作用を定性的もしくは定量的に検討し、以下の知見を得た。

(1) アピシンはヒト由来皮膚線維芽細胞株 NB1RGB の増殖を促進し、さらにコラーゲン産生量を促進する傾向を示した。

(2) アピシンはマウス由来骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 に対して、分化誘導剤と併用して添加することにより、分化の指標であるカルシウム沈着ならびにヒドロキシアパタイトの産生を促進した。

文 献

- 1) Mishima, S., Suzuki, K.M., Isohama, Y., Kuratsu, N., Araki, Y., Inoue, M. and Miyata, T., Royal jelly has estrogenic effects *in vitro* and *in vivo*. *J. Ethnopharmacol.*, **101**, 215-220 (2005).
- 2) 篠田雅人, 中陣静男, 及川隆幸, 佐藤和憲, 鴨川 旭, 秋山義郎, ローヤルゼリー中の血流増加性因子について, 薬誌, **98**, 139-145 (1978).
- 3) Tokunaga, K.H., Yoshida, C., Suzuki, K.M., Maruyama, H., Futamura, Y., Araki, Y. and Mishima, S., Antihypertensive effect of peptides from royal jelly in spontaneously hypertensive rats. *Biol. Pharm. Bull.*, **27**, 189-192 (2004).
- 4) Madar, J., Maly, E., Neubauer, E. and Moscovici, F., Effect of bee royal jelly (gelee royale) on the cholesterol level, total lipids in the serum and on the fibrinolytic activity of plasma of elderly arteriosclerotic patients. *Z. Alternsforsch.*, **18**, 103-108 (1965).
- 5) 藤井 彰, ローヤルゼリーの薬理作用, ミツバチ科学, **16**, 97-104 (1995).
- 6) Narita, Y., Nomura, J., Ohta, S., Inoh, Y., Suzuki, K.M., Araki, Y., Okada, S., Matsumoto, I., Isohama, Y., Abe, K., Miyata, T. and Mishima, S., Royal jelly stimulates bone formation : physiologic and nutrigenomic studies with mice and cell lines. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **70**, 2508-2514 (2006).
- 7) 竹中哲夫, ローヤルゼリーの一般化学成分について, ミツバチ科学, **3**, 69-74 (1982).
- 8) 米倉政実, ローヤルゼリータンパク質の特徴と機能, ミツバチ科学, **19**, 15-22 (1998).
- 9) Fujii, M., Yonekura, M., Higuchi, T., Morimitsu, K., Yoshino, I., Mukai, S., Aoki, T., Fukunaga, T., Inoue, Y., Sato, M. and Kanaeda, J., Effect of 350 kDa glycoprotein in royal jelly on primary culture of rat hepatocytes. *Food Sci. Technol. Int.*, **2**, 223-225 (1996).
- 10) Kimura, M., Kimura, Y., Tsumura, K., Okihara, K., Sugimoto, H., Yamada, H. and Yonekura, M., 350-kDa royal jelly glycoprotein (apisin), which stimulates proliferation of human monocytes, bears the β -1-3galactosylated *N*-glycan : analysis of the *N*-Glycosylation site. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **67**, 2055-2058 (2003).
- 11) Koya-Miyata, S., Okamoto, I., Ushio, S., Iwaki K., Ikeda, M. and Kurimoto, M., Identification of a collagen production-promoting factor from an extract of royal jelly and its possible mechanism. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **68**, 767-773 (2004).
- 12) Shibayama, H., Hisama, M., Matsuda, S., Ohtsuki, M. and Iwaki, M., Effect of a novel ascorbic derivative, disodium isostearyl 2-*O*-L-ascorbyl phosphate on human dermal fibroblasts : Increased collagen synthesis and inhibition of MMP-1. *Biol. Pharm. Bull.*, **31**, 563-568 (2008).
- 13) Compston, J.E., Sex steroids and bone. *Phys. Rev.*, **81**, 419-447 (2001).
- 14) Hidaka, S., Okamoto, Y., Uchiyama, S., Nakatsuma, A., Hashimoto, K., Ohnishi, T. and Yamaguchi, M., Royal jelly prevents osteoporosis in rats : beneficial effects in ovariectomy model and in bone tissue culture model. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.*, **3**, 339-348 (2006).

(平成 22 年 8 月 4 日受付, 平成 22 年 12 月 13 日受理)