

研究課題名：高齢性ホルモン疾患予防効果を有する「食」の開発



清水邦義¹(研究代表者、左写真)・立花宏文²(研究分担者)・佐藤
匡央²(研究分担者)・島崎洋平²(研究分担者)
(¹森林資源科学部門、²生物機能科学部門)

はじめに：我が国では、高齢化社会の深刻化や生活習慣病者の若年化、及び医療費負担額の増大などに伴い、デイケア・セルフケアに利用可能な機能性食品への需要が増大している。本研究では、古くからその薬効が知られているキノコの機能性食品としての開発を指向した。

骨粗鬆症をはじめとする女性の加齢及び老年性疾患の原因は、更年期における女性ホルモンの急激な減少に由来し、女性ホルモン補充療法(ERT)が治療法として用いられている。しかしながら、内因性のエストロゲンは、その作用が強力であり、副作用の懸念もあるために、それに代わる安全・安価な食用・薬用キノコからエストロゲン様活性を有する素材を探索した。

その結果、マンネンタケ(霊芝、*Ganoderma lucidum*)に顕著なMCF-7細胞増殖促進活性(エストロゲン様活性)が観察された。さらに、このようなエストロゲン様活性を示すマンネンタケ抽出物の *in vivo* での効果を検証するために、骨粗鬆症モデル動物として、卵巣摘出ラットを用いて、骨密度低下抑制効果について検討した。

【マンネンタケのエタノール(EtOH)抽出物のエストロゲン様活性】

(背景)マンネンタケ(学名：*Ganoderma lucidum* (Fr.) Krast)はヒダナシタケ目サルノコシカケ科に属する担子菌であり、その子実体を「霊芝」という。古くから、和漢薬、民間薬(生薬、煎薬)の上薬(神薬、仙薬)にランクされ、その煎薬(エキス)には、数々の薬効が伝承されてきている。特に、癌に効くキノコとして珍重されてきた。また、中国には、古来より、植物や動物、鉱物などの薬効を研究する本草学と呼ばれる学問があり、16世紀の明の時代の李時珍が、これらの薬物の解説書として『本草綱目』を著した。この著書の中で、マンネンタケの更年期障害改善・予防効果についての記載がある¹⁾。更年期障害は、エストロゲン欠乏によるほてりなどの症状に代表される。筆者らは、この知見を元に、マンネンタケ抽出物が、エストロゲン様活性を有するがゆえに、更年期障害改善・予防効果があると予想し、エストロゲン依存的に増殖するヒト乳癌由来MCF-7細胞を用いてエストロゲン様活性²⁾を評価した。

(1) マンネンタケ EtOH 抽出物のヒト乳癌由来 MCF-7 細胞を用いたエストロゲン様活性評価

(実験)

供試材料：大分県玖珠町で栽培されたマンネンタケ（有微創研多孢子株 9049 株）15kg を 95% EtOH で抽出後、凍結乾燥させた。これを dimethylsulfoxide (DMSO) に溶解させ、実験に供した。

細胞培養：10% FBS (fetal bovine serum) PRF DMEM で 90 mm 組織培養シャーレで培養した MCF-7 細胞を、培地を除去した後、0.2% trypsin/PBS を 1 ml 添加し、剥離した。CO₂ インキュベータ (37 °C、5%CO₂) で約 1 分間インキュベートした後、培地を添加して細胞を回収し、遠心処理を行い、培地を除去して沈殿した細胞を回収した。培地 (1% FBS 添加 PRF DMEM) で 4×10^4 cells/ml に調製し、1ml/well で 24 well plate (FALCON) に播種した。24 時間培養後、血清無添加の培地で培地 well を 1 回洗浄し、1% cFBS (charcoal treated FBS) PRF DMEM で培地交換すると共に試料 (溶媒は dimethylsulfoxide, 系内 0.1% 添加) を添加した。さらに 48 時間もしくは 96 時間培養後、血球計算盤を用いた細胞数測定を行った。コントロールには dimethylsulfoxide (DMSO) を用いた。ポジティブコントロールとして 17 β -エストラジオール (E2) を用いた。

(結果及び考察)

結果と考察 マンネンタケ EtOH 抽出物を最終濃度 0.1、1 ppm 添加すると、ヒト乳癌由来 MCF-7 細胞の増殖が促進された (Fig.1)。MCF-7 細胞はエストロゲン濃度依存的に増殖する細胞であることから、マンネンタケ EtOH 抽出物にはエストロゲン様活性を有する物質が含有されることが示唆された。また、抗エストロゲン剤である ICI182,780 を同時に添加すると、細胞増殖促進効果が抑制されたため、マンネンタケ EtOH 抽出物による MCF-7 細胞増殖促進効果はエストロゲンレセプターを介した経路に由来することが推察された (Fig.

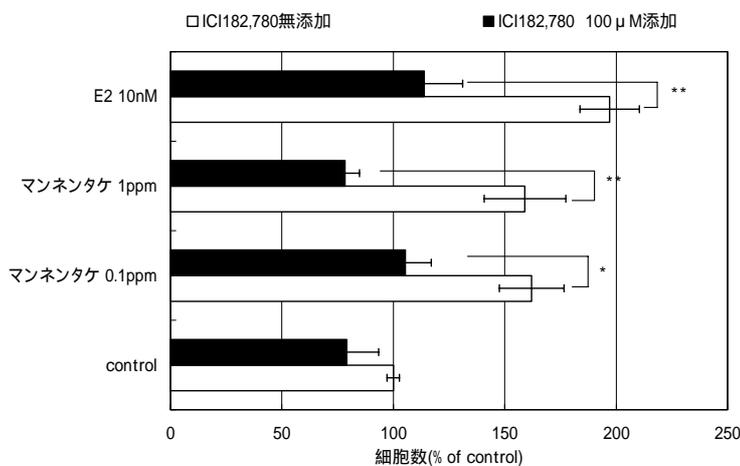


Fig. 1 マンネンタケ EtOH 抽出物の MCF-7 細胞増殖効果 (mean \pm SD, n=3, *p<0.05, **p<0.01)

1)。また、マンネンタケの EtOH 抽出残渣の熱水抽出物の効果も検討したが、細胞増殖促進効果は観察されなかった (data not shown)。したがって、活性本体は、多糖類などの高極性成分ではな

く、EtOHにより抽出される比較的疎水性の成分であることが示唆された。

(2) CoA-BAP system を用いたエストロゲン様活性評価

目的 MCF-7 細胞を用いた検討によってエストロゲン様活性が示唆されたマンネンタケ EtOH 抽出物に対して、エストロゲン様活性をより直接的に検討するため、エストロゲンレセプターとの結合を CoA-BAP system³⁾を用いて検討した。

結果と考察

高濃度のマンネンタケ EtOH 抽出物を添加すると、エストロゲンレセプターとの結合が観察された(Fig. 3、4)。このことからマンネンタケ EtOH 抽出物にはエストロゲンレセプター ならびに への結合を介して発現するエストロゲン様活性を有する物質が含まれる事が示唆された。このことから MCF-7 細胞の増殖促進効果を誘導した要因の一つとしてマンネンタケ EtOH 抽出物のエストロゲンレセプターを介したメカニズムが寄与していることが確認された。

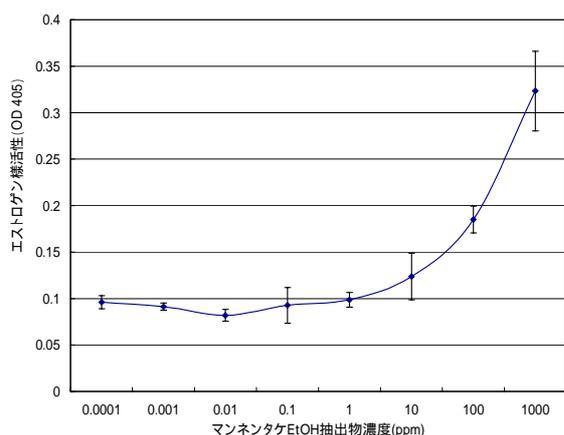


Fig. 3 CoA-BAP systemを用いたエストロゲン様活性評価
(mean ± SD, n=3; ER-)

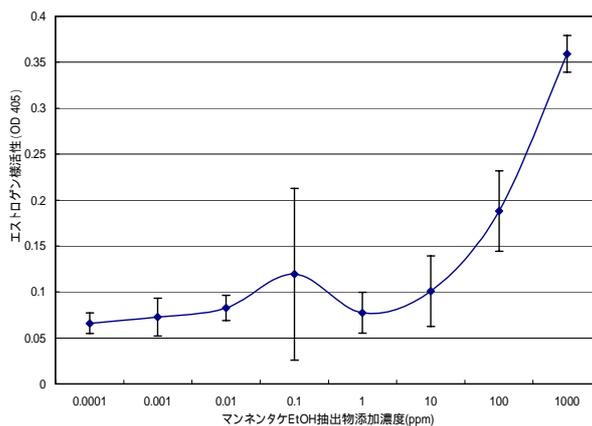


Fig. 4 CoA-BAP systemを用いたエストロゲン様活性評価
(mean ± SD, n=3; ER-)

(3) 卵巣摘出ラットを用いた検討

(目的)上記検討によりマンネンタケ EtOH 抽出物が、エストロゲン様活性を有することが確認された。そこで、その効果を *in vivo* で検証するために、エストロゲン欠乏卵巣摘出ラットを用いて検討した。

(実験方法)骨粗鬆症モデル動物として生後 11 週齢の SD 系卵巣摘出ラット(OVX)を購入し、2 日間予備飼育後、マンネンタケ投与群には、マンネンタケ EtOH 抽出物を 0.3% (MH 群)、0.03% (ML 群)の濃度にそれぞれ調製した飼料を摂食させた。ポジティブコントロールとして用いた 17β-estradiol (E2)投与群には E2 を週に 2 回の皮内注射によって 60 μg/Kg body weight/week で投与した。投与期間は 75 日間とした。これらの投与を行った後、骨密度及び骨代謝マーカーへの影響を評価した。

《結果と考察》

マンネンタケ投与群（飼料混合割合 0.03% ML 群、0.3% MH 群）において、エストロゲンの標的器官である子宮重量の若干の増加が観察された (Fig. 5)。このことから、マンネンタケ EtOH 抽出物は、*in vivo* においても、エストロゲン様活性を示すことが確認された。子宮重量の増加は E2 投与群に比べ微弱であったが、マンネンタケ投与群における骨密度の改善効果 (Fig. 6)、骨代謝マーカーの改善効果 (Fig. 7) は同等に観察された。以上の結果からマンネンタケ EtOH 抽出物はエストロゲンと同様の挙動を示す化合物群を含有していることが示唆された。しかしながら、もし、マンネンタケ EtOH 抽出物の骨密度改善作用が、E2 と同様なエストロゲン作用のみだと考えると、子宮重量増加作用が微弱であることを説明できない。また、骨代謝マーカーであるオステオカルシン濃度は、E2 投与以上に減少させている。このことを考慮すると、今回の動物実験の結果は、単純なエストロゲン様活性のみに、起因するとは考えにくい。近年、ラロキシフェンに代表されるような、生殖器への刺激が少ないが、骨粗鬆症の治療薬として有用であるとされる選択的エストロゲン受容体モジュレーター (SERM) が着目されている⁴⁾。マンネンタケ EtOH 抽出物の挙動は、SERM と一部類似していることから興味深い。また、マンネンタケ EtOH 抽出物は、非常に多くの薬理活性が報告されており¹⁾、生体内に取り込まれると様々な機能を発現すると予想される。したがって、少なくとも一部は、骨代謝（例えば、骨芽細胞や破骨細胞など）にも、直接的に影響していることが考えられる。今後、骨代謝に関連する様々な機構を考慮に入れ、メカニズム解析を進めていくとともに、活性成分を明らかにしていく予定である。

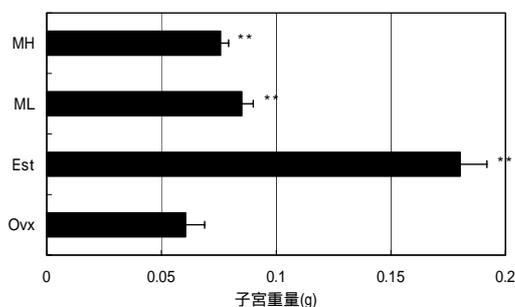


Fig. 5 マンネンタケEtOH抽出物が子宮重量へ及ぼす影響
(Ovx: n=8, Est: n=9, ML: n=7, MH: n=8, mean ± SE, **p<0.01 vs control)

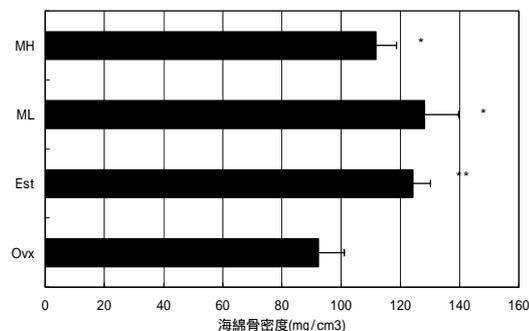


Fig. 6 海綿骨密度 骨幹端部
(mg/cm³, mean ± SE, *p<0.05, **p<0.01 vs control)

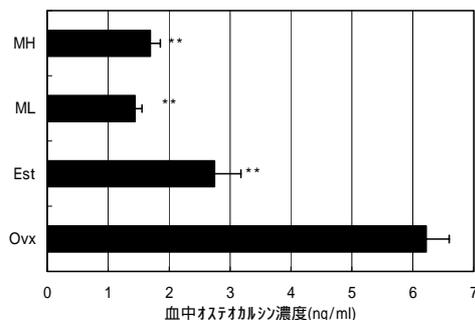


Fig. 7 血中オステオカルシン濃度に及ぼす影響

【まとめ】本研究では、マンネンタケ EtOH 抽出物が、骨粗鬆症モデル動物である卵巣摘出ラットの骨密度を改善することを明らかにした。また、その作用機構の少なくとも一部は、同抽出物のエストロゲン様活性が関与していることが示唆された。このことから、エストロゲンが欠乏することによって引き起こされる疾患である骨粗鬆症へのマンネンタケ抽出物の予防・改善効果が期待された。

謝辞：本研究は、平成 15 年度農学研究院教育研究特別経費の資金を得て行ったものである。

論文：

Ichiko Miyamoto, Kuniyoshi Shimizu, Masao Sato, Ryuichiro Kondo: Estrogenic activity and prevention effect of bone loss in calcium deficient ovariectomized rats by the ethanol extract of *Ganoderma lucidum*, Submitting.

学会発表：

1 .(九大院生資環) 宮本以智子、(九大院農) 清水邦義、佐藤匡夫、近藤隆一郎、マンネンタケ抽出物の骨密度改善効果、2004 年 8 月 2 - 5 日、日本木材学会、札幌

2 .(九大院生資環) 宮本以智子、(九大院農) 清水邦義、佐藤匡夫、近藤隆一郎、マンネンタケエタノール抽出物の骨密度改善効果 2004 年 8 月 31 日～9 月 2 日、日本キノコ学会第 8 回大会近畿大学農学部、奈良

【参考文献・図書】

- 1) 水野 卓、藤原 弘：“キノコの化学・生化学”、水野卓、川合正充 編、学会出版センター、東京、1995、pp. 214.
- 2) Han DH, Denison MS, Tachibana H, Yamada K. Relationship between estrogen receptor-binding and estrogenic activities of environmental estrogens and suppression by flavonoids. Biosci. Biotechnol. Biochem., 66, 1479-1487 (2002)
- 3) Kanayama T, Mamiya S, Nishihara T, Nishikawa J. Basis of a high-throughput Method for nuclear receptor ligands. J. Biochem., 133, 791-797 (2003)
- 4) Turner CH, Sato M, Bryant HU. Raloxifene preserves bone strength and bone mass in ovariectomized rats. Endocrinology, 135, 2001-2004 (1994)