

令和5年度 公益財団法人青森学術文化振興財団助成事業

「ハマナスが含有するティロロサイドの  
定量および機能性の解析」

研究報告書

青森県立保健大学  
健康科学部  
栄養学科  
七島 直樹

## 背景

ティリロサイドはローズヒップに含有される成分で、脂肪燃焼に効果があるということが報告されている。ローズヒップはバラ科植物の実の総称であり、これまでに報告されているティリロサイドはイヌバラ由来である。一方で、青森県で多く自生しているハマナスもローズヒップに属しているが、ティリロサイドの含有量や機能性については未知である。現時点では、ハマナス由来のシロップでは微量のティリロサイドが含有されていることが明らかになっているがハマナスの実そのものの含有量は未知である。

ハマナスは青森市の花として制定されており、本県ともゆかりも深い。現在、青森県内において、ハマナスを観光資源として活用したり、ハマナスのアロマオイルやお茶の開発を行っている企業もあり、徐々にハマナスにフォーカスが当てられている傾向にある。

本研究ではティリロサイドの植物性女性ホルモン（フィトエストロゲン）効果と皮膚美容効果に着目してこれらの機能性を評価した。本研究の遂行は、将来的にはハマナスを用いた産業の発展へと繋がることが期待されることから、地域の振興に寄与すると考えられる。

## 方法

### 1. ティリロサイドの定量

ハマナスをミルサーで粉砕、ペースト状にし、日本食品分析センターにティリロサイドを定量を委託した。

### 2. 細胞増殖アッセイ

10%ウシ胎仔血清、1%ペニシリン - ストレプトマイシン溶液を含む D-MEM 培地中で 5% CO<sub>2</sub>-95%、37°C の条件で MCF7 を培養した。次に、細胞を 96 穴プレートに 5000 個/well 播種した。ジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解したティリロサイドを最終濃度 0, 1.0, 10, 100, 1000, 10000nM となるようにフェノールレッド無含有 D-MEM (1%活性炭処理済牛胎児血清を含む) に添加した。なお、MCF7 では陽性コントロールとして 10nM  $\beta$ -estradiol (E2) を用いた。5 日間培養後、Cell Counting Kit-8 を添加しマイクロプレートリーダーを用い、450nm で吸光度を測定した。

### 3. リアルタイム PCR によるエストロゲン受容体下流遺伝子の発現評価

DMSO に溶解したティリロサイドを 0, 1.0, 10, 100, 1000nM となるように無血清フェノールレッド無添加培地に添加し、MCF7 を 24 時間培養した。培養後、全 RNA を RNeasy Mini Kit (QIAGEN) で抽出した。抽出した RNA を PrimeScript™ RT

Master Mix (タカラバイオ) で逆転写反応し、cDNA を作製した。TB Green® Premix Ex Taq™ II (タカラバイオ) を用い、cDNA を各種プライマーを用いリアルタイム PCR 法で増幅した。各種遺伝子の発現変動は glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) をハウスキーピング遺伝子とし、 $\Delta\Delta Ct$  法で求めた。PCR サイクルは 94° C 30 秒、55-60° C, 30 秒そして 72° 30 秒を 40 サイクル行った。プライマー配列は下記の通りである。すべてのプライマーは (5' → 3') に示している。trefoil factor 1 (TFF1), F-CATCGACGTCCCTCCAGAAGAG and R-CTCTGGGACTAATCACCGTGCTG; progesterone receptor (PGR), F-GAGTTGTGAGAGCACTGGATGCT and R-CAACTGTATGTCTTGACCTGGTGAA; GAPDH, F-AGAAGGCTGGGGCTCATTTG and R-AGGGGCATCCACAGTCTTC.

#### 4. ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) 法による I 型コラーゲンとヒアルロン酸の産生量の定量

美容関連因子の産生を検討する方法として、まず I 型コラーゲンとヒアルロン酸の産生量の定量を行った。DMSO に溶解したティリロサイドを 0, 1.0, 10, 100, 1000nM になるように HSF に添加し、72 時間培養した。培養上清を回収し、I 型コラーゲンはヒトコラーゲン I 型コラーゲン ELISA キット (ASEL) を用いて定量し、ヒアルロン酸はヒアルロン酸測定キット (岩井化学薬品) を用いて、産生量を定量し評価した。両キットでの定量はプロトコールに従って行った。

#### 結果・考察

定量の結果、ハマナス果実 100g あたり 6.1mg のティリロサイドが含有されていた。次にティリロサイドのフィトエストロゲン効果を検討するために、エストロゲンに依存して増殖する乳がん細胞 MCF7 にティリロサイドを投与して増殖度合を評価したところ、1.0 から 10000nM まで有意に増加した (図 1)。

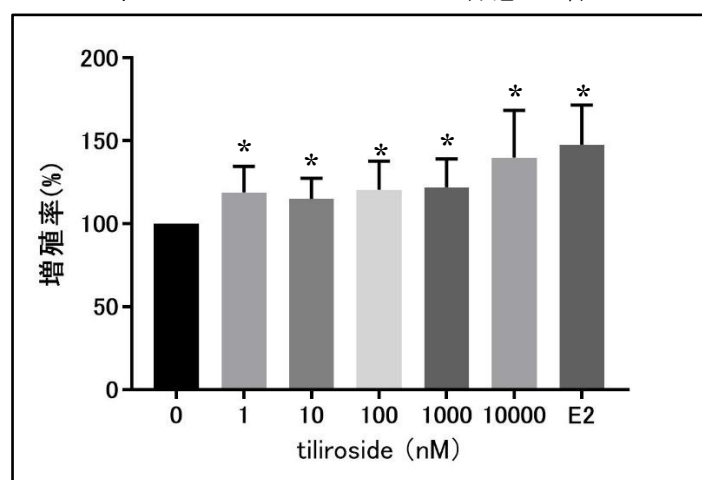


図 1. MCF7 細胞増殖アッセイ  
E2:10nM エストロゲン、(\*P<0.05)

また、エストロゲン受容体が活性化すると発現が亢進する遺伝子である TFF1、PGR はティリロサイドを添加するといずれも発現が亢進した(図 2)。

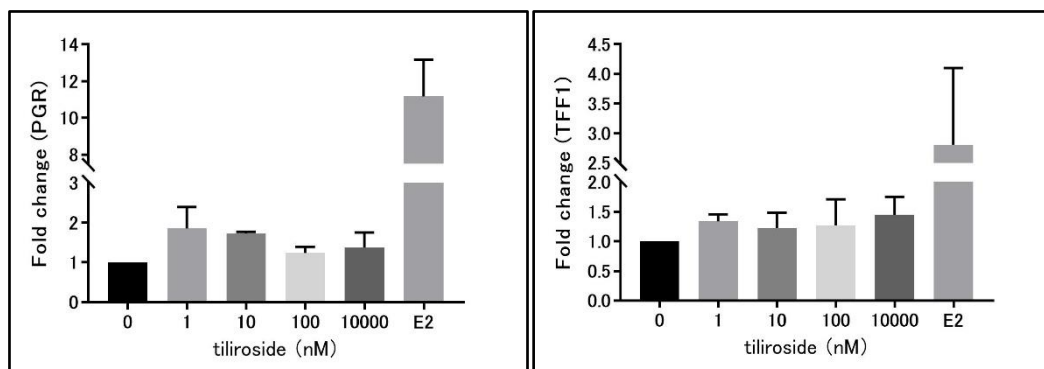


図 2. リアルタイム PCR による遺伝子発現解析

E2:10nM エストロゲン

図 1 と図 2 の結果よりティリロサイドはフィトエストロゲンの活性を有することが示唆された。フィトエストロゲンは、植物が含有するエストロゲン活性を有する分子であり、様々な植物から検出されている。ティリロサイドのフィトエストロゲン効果については本研究結果だけでは不十分であり、今後詳細な解析が必要である。

I 型コラーゲンとヒアルロン酸産生量について ELISA 法で定量した。I 型コラーゲンはティリロサイドを添加したものは増加傾向が見られ、ヒアルロン酸は 1 および 10nM においてやや増加していた (図 3)。

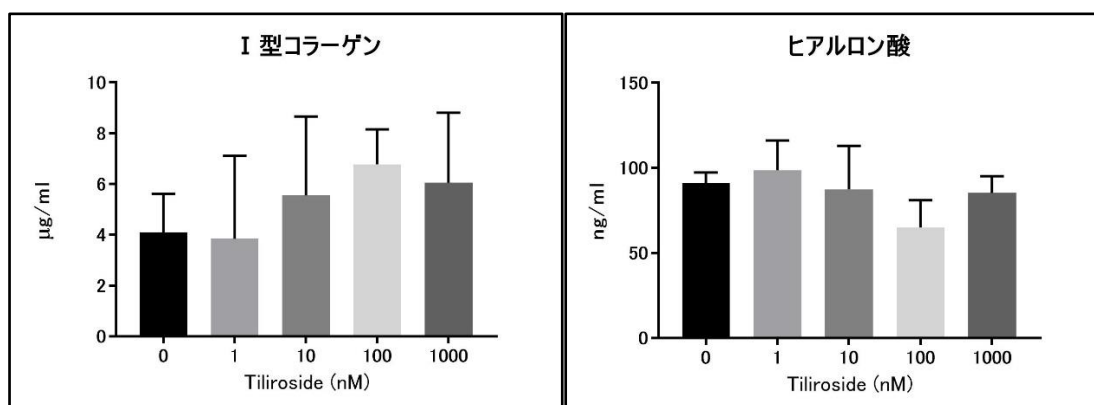


図 3. I 型コラーゲンおよびヒアルロン酸の定量

しかし、今回の研究では実験回数が少なく統計処理ができなかったため、今後再検討する必要がある。また、これらの成分の増加メカニズムの解明として、線維芽細胞の増殖効果によるのか、コラーゲンやヒアルロン酸の合成遺伝子の

発現亢進あるいはマトリックスメタロプロテアーゼのような分解系の酵素の発現現象なのか詳細に検証する必要がある。

皮膚における線維芽細胞はコラーゲンやヒアルロン酸などのいわゆる美肌成分を生み出す細胞である。コラーゲンは繊維状のタンパク質であり、肌の弾力性を保つ役割を果たしており、複合多糖の一種であるヒアルロン酸は、肌の保水力を高める役割を果たしている。歳を重ねるごとに線維芽細胞の増殖や機能が衰えていき、コラーゲンやヒアルロン酸が減っていくことで、しわやたるみの原因に繋がっていることが知られている。ティリロサイドがフィトエストロゲン活性を有していることも考慮すると、ティリロサイドはエストロゲンの分泌量が減少した更年期女性における皮膚の美容効果に、より効果を発揮する可能性を有していることが考えられた。

### 結論

本研究によって、ハマナス果実にはティリロサイドが 6.1mg/100g 含有されていること、さらに、ティリロサイドにはフィトエストロゲン活性がある可能性とヒト皮膚線維芽細胞において I 型コラーゲンとヒアルロン酸の産生を促す可能性があることが明らかになった。

### 謝辞

本研究は、令和 5 年度 公益財団法人青森学術文化振興財団助成金を受けて行われたものである。