

学位論文要約

老齡疾患に対する食品・栄養成分の予防効果と  
作用機構の解明

柴田 紗知

# 学位論文要約

## 【論文題目】

老齡疾患に対する食品・栄養成分の予防効果と作用機構の解明

## 【論文目次】

序章 研究の背景と目的

第1章 カルノシン酸の老齡疾患予防効果と作用機構の解明

第1節 研究の背景と目的

第2節 実験方法

第3節 結果

第4節 考察

第2章 ピシフェリン酸の新規生理活性と FoxO3a 及び軟骨細胞への影響

第1節 研究の背景と目的

第2節 実験方法

第3節 結果

第4節 考察

第3章 その他の食品・栄養成分の脳神経細胞保護作用機構と運動器疾患予防効果

第1節 研究の背景と目的

第2節 実験方法

第3節 結果

第4節 考察

終章 研究の総括と今後の展望

## 序章 研究の背景と目的

高齢化が進む現代において、健康上問題ない状態で日常生活を送ることができる「健康寿命」を延ばすことは、高齢者本人や家族にとってはもちろん、社会保障の点から国家的な課題である。実際、日本において、平均寿命と健康寿命は10年程度の差が見られる。今後平均寿命の延伸に伴って、さらにその差が拡大すると、医療や介護に必要な社会保障費は増加する。従って、高齢者の疾病予防や健康増進に取り組むことで、健康寿命と平均寿命の差の拡大を抑制することができれば、個々の生活の質（Quality of life）を向上することに加えて、医療費や社会保障費を削減することにつながる。

「健康寿命の短縮」や「要支援・介護状態」をもたらす三大要因として、認知症（神経変性疾患）・ロコモティブシンドローム（運動器症候群）・メタボリックシンドローム（内臓脂肪症候群）が知られている。これらの疾病の予防には、適度な運動といった日々の生活習慣が関わっており、食生活も重要な役割を果たすと考えられている。そこで、食生活を見直すと共に科学研究の成果を取り入れた食生活を送ることによる積極的な疾病予防が期待されている。しかしながら、明確な効果や作用機構が示されている成分は少ないことから、食品・栄養成分による疾病予防効果やその作用機構を明らかにしていく必要がある。

これまで、筆者は食品・栄養成分による神経変性疾患予防効果に着目し脳神経モデル細胞保護効果を検討してきた。そして、シソ科のハーブ ローズマリー由来カルノシン酸とブロッコリースプラウトに含まれるスルフォラファンが認知症と関連のある神経細胞死を抑制することを明らかにした[1, 2]。さらに、カルノシン酸が脳神経細胞保護効果を示す作用機構として、細胞の生存や機能発現に関わる細胞内情報伝達系タンパク質 Akt signaling (Akt) 及び extracellular signal-regulated kinase (Erk) のリン酸化促進作用と細胞内の恒常性維持に関わるオートファジーの活性化が関与していることを明らかにした[1]。この細胞内情報伝達系タンパク質への作用とオートファジー活性化作用は、神経変性疾患だけでなくロコモティブシンドロームやメタボリックシンドロームなど他の疾患に対しても有効であることが示唆されている[3-6]。

そこで、今後ますます進行する高齢化社会に役立つ食生活へ貢献するために、これまで研究を進めてきた神経変性疾患予防効果の検討をさらに進めた。加えて、ロコモティブシンドロームの代表的な疾患である変形性膝関節症やメタボリックシンドロームとの関連が明らかになっている肝臓の線維化等に対する食品・栄養成分の予防効果とその作用機構について検討を行った。

## 第1章 カルノシン酸の老齡疾患予防効果と作用機構の解明

### 第1節 研究の背景と目的

カルノシン酸は、シソ科のハーブ ローズマリーに含まれるポリフェノール成分で、様々な生体調節機能を有することが知られている[7, 8]。特に、Satoh らは脳虚血モデルマウスにおいてカルノシン酸が

虚血状態による脳損傷を軽減することを報告しており、カルノシン酸は認知症などの脳疾患に対して予防的に働く可能性が示唆されている[9]。

これまで、カルノシン酸が過酸化水素 ( $H_2O_2$ ) による酸化ストレスや Hank' s balanced salt solution を用いた飢餓処理に対してヒト神経芽細胞腫の SH-SY5Y 細胞を保護することを明らかにした。また、細胞内情報伝達系タンパク質リン酸化促進作用や、オートファジー活性化作用がその作用機構の一部であることを明らかにした[1]。そこで、本研究ではカルノシン酸が SH-SY5Y 細胞を保護する新たな作用機構を明らかにするために検討を行った。

さらに、細胞内情報伝達系タンパク質リン酸化促進作用やオートファジーの活性化作用を有するカルノシン酸は、認知症だけでなく変形性膝関節症や肝臓の線維化に対しても予防的に働く可能性が考えられた。そこで、軟骨細胞を用いた実験や老化促進マウス senescence accelerated mouse-prone 8 (SAMP8) への投与実験を行った。

加えて、食品機能成分を同時に摂取することによる相加・相乗効果を検討するために、カルノシン酸とアルファ-グリセロホスホコリン ( $\alpha$ -glycerophosphocholine ;  $\alpha$ -GPC) の老化促進マウス SAMP8 への複合投与実験を行い、カルノシン酸と  $\alpha$ -GPC を複合的に摂取することによる脳機能保護効果や運動器への影響についても検討を行った。

## 第2節 実験方法

脳神経細胞保護作用機構を明らかにするために、長寿との関連が示唆されている Forkhead box 03a (Fox03a) [10]への影響について SH-SY5Y 細胞を用いて検討を行った。

変形性膝関節症予防効果については、C57BL/6J マウスの大腿骨から単離した初代培養軟骨細胞を用いて、変形性膝関節症関連遺伝子の発現について検討を行った。

マウスへの経口投与実験での検討では老化促進マウス SAMP8 を用いて行った。まず予備投与実験を行った。飼育期間中には行動科学試験を行い、脳機能への影響を評価した。次に、予備投与実験を踏まえて、個体数を増やし再度検討を行った（以下、本投与実験と記述する）。飼育期間中には、行動科学試験や運動機能解析を行い、認知機能や運動機能を評価した。飼育終了後には、採血や臓器・組織等の摘出を行い、それらを組織化学解析や生化学解析を用いて評価した。

また、カルノシン酸と  $\alpha$ -GPC を複合的に摂取することによる効果についても、老化促進マウス SAMP8 を用いて検討を行った。対照群、カルノシン酸投与群、 $\alpha$ -GPC 投与群、カルノシン酸・ $\alpha$ -GPC 両成分投与群の 4 群で検討した。飼育期間中には、本投与実験と同様に行動科学試験や運動機能解析を行った。

## 第3節 結果

SH-SY5Y 細胞において、カルノシン酸処理が Fox03a に与える影響についてウエスタンブロット解析を用いて検討したところ、カルノシン酸処理した細胞でリン酸化 Fox03a が著しく減少していることが分

かった。また、蛍光免疫染色においても、カルノシン酸未処理の細胞では核内外にリン酸化 FoxO3a が存在するのに対して、カルノシン酸処理した細胞では核内のリン酸化 FoxO3a が消失していることが分かった。そこで、カルノシン酸経口摂取による脳機能低下に対する保護効果について検討したところ、いくつかの行動科学試験でカルノシン酸による脳機能維持効果が見られた。さらに、肝臓や腎臓などの各種臓器に対してもカルノシン酸投与による有効性が確認できた。

また、マウス軟骨細胞を用いた実験において、変形性膝関節症予防効果の可能性が示唆された。その一方で、マウスへの投与実験においては、カルノシン酸摂取による膝関節への明確な有効性は確認できなかった。

#### 第4節 考察

まず、カルノシン酸の新たな脳神経細胞保護作用機構を解明するため、SH-SY5Y 細胞を用いて検討を進めた。その過程で、転写因子 FoxO3a に着目するに至った。FoxO 遺伝子は、老化や寿命に関与していることが報告されている[10, 11]。加えて近年では、カロリー制限による長寿効果にも FoxO3a が関与していることが明らかになっている[12]。FoxO3a は SOD2 や catalase 等の発現を促し、酸化ストレス耐性を増強させる。また、FoxO3a はリン酸化されることで核外へ輸送され、その結果、転写因子としての働きを失う。そのため、転写因子として機能するためにはリン酸化されることを抑える必要がある。本研究において、カルノシン酸処理した細胞でリン酸化 FoxO3a が著しく減少しており、核内のリン酸化 FoxO3a が消失していることから、FoxO3a が転写因子として働いていることが示唆された。

次に、老化促進マウス SAMP8 へのカルノシン酸の長期投与実験を行った。その結果、いくつかの行動科学試験において、カルノシン酸摂取による脳機能保護効果が示された。加えて、肝機能保護効果や腎機能保護効果も明らかになった。また、その作用機構として、細胞レベルで明らかにした FoxO3a の活性化作用の関与が示唆された。

さらに、変形性膝関節症予防効果について検討したところ、細胞レベルではカルノシン酸による変形性関節症予防効果が示唆されたものの、経口摂取による明確な有効性は見出せなかった。

今後は、より詳細な作用機構を解明すると共にヒトへの有効性を検討する必要がある。

## 第2章 ピシフェリン酸の新規生理活性と FoxO3a 及び軟骨細胞への影響

### 第1節 研究の背景と目的

カルノシン酸を合成する原料としても使用されるピシフェリン酸は、ヒノキ科 サワラの葉に含まれる生理活性成分の一つで、抗菌作用や抗酸化作用が知られている[13-15]。ピシフェリン酸は、無色・無臭であり化学的に安定した物質であるため、食品添加物として利用した際にも、食品の色や味、香りを損なわないという特徴がある。ピシフェリン酸と非常に類似した構造を持つカルノシン酸は様々な生理

活性作用が報告されているが、ピシフェリン酸の生体に対する生理作用の報告は僅かしかされていない。

そこで、ピシフェリン酸の生体調節機能を明らかにすることができれば、新たな食品機能成分として利用することができると考え、血管新生抑制作用、リンパ管新生抑制作用、変形性膝関節症予防効果について検討した。また、第1章でカルノシン酸について明らかにした FoxO3a のリン酸化阻害作用について検討した。

## 第2節 実験方法

血管新生抑制作用に関する実験は、ラット大動脈を用いる *ex vivo* 血管新生モデルと血管内皮細胞 (human umbilical vein endothelial cell ; HUVEC) を用いる *in vitro* 血管新生モデルで評価した。リンパ管新生抑制作用に関する実験は、ラットリンパ管を用いる *ex vivo* リンパ管新生モデルとリンパ管内皮細胞 (lymphatic endothelial cell ; LEC) を用いる *in vitro* リンパ管新生モデルで評価した。脳神経細胞保護作用機構については、SH-SY5Y 細胞を用いて検討した。変形性膝関節症予防効果については、マウス軟骨細胞を用いて変形性膝関節症関連遺伝子の発現について定量 RT-PCR 法で検討した。

## 第3節 結果

*Ex vivo* 血管新生モデルにおいて、ピシフェリン酸 50  $\mu\text{M}$  と 100  $\mu\text{M}$  で血管新生を完全に抑制した。また、*in vitro* 血管新生モデルではピシフェリン酸 50  $\mu\text{M}$  と 100  $\mu\text{M}$  で HUVEC の管腔形成を抑制し、25  $\mu\text{M}$  より高濃度で濃度依存的に増殖が抑制されることが分かった。一方で、遊走に対しては抑制作用を示さなかった。*Ex vivo* リンパ管新生モデルにおいて、ピシフェリン酸 50  $\mu\text{M}$  と 100  $\mu\text{M}$  でリンパ管新生を有意に抑制した。また、*in vitro* リンパ管新生モデルでは、ピシフェリン酸 50  $\mu\text{M}$  と 100  $\mu\text{M}$  で LEC の管腔形成と増殖を抑制することが分かった。

## 第4節 考察

ピシフェリン酸の生理活性について検討し、血管及びリンパ管内皮細胞の管腔形成と増殖を抑制することで血管新生とリンパ管新生を抑制することを明らかにした。そのため、ピシフェリン酸はこれらが関与する老齢疾患の予防に応用できる可能性が示唆された。ピシフェリン酸の毒性に関する報告は無いことから、安全性の高い機能成分であるといえ、本研究をさらに発展させることで安全性の高い食品機能成分として応用することが期待できる。また、ピシフェリン酸とカルノシン酸の構造上の違いは、11番目の炭素に水酸基が無いか結合しているかの差だけである。このような僅かな化学構造の違いが生物活性の違いとして現れることから、両物質は構造-生物活性相関について研究する良い材料であるとも考えられる。

### 第3章 その他の食品・栄養成分の脳神経細胞保護作用機構と運動器疾患予防効果

#### 第1節 研究の背景と目的

##### 1. スルフォラファンについて

スルフォラファンは、ブロッコリーのスプラウト等に含まれる。スルフォラファンの生理活性作用については、国内外で精力的に研究が行われており、ガン予防効果・抗酸化作用・関節保護効果など多彩な効果が明らかになっている[16-18]。加えて、カルノシン酸と同様に血管新生抑制作用や酸化ストレス防御システム活性化作用を有することが知られている[19, 20]。これまでに筆者は、SH-SY5Y細胞を用いた実験において、スルフォラファンが脳神経細胞保護作用を有すること、またその作用機構として、細胞内情報伝達系タンパク質リン酸化促進作用とオートファジー活性化作用を見出している[2]。さらに、HsuらもSH-SY5Y細胞を用いた別の実験系で、スルフォラファンがErk1/2を活性化することによって細胞の成長を阻害し、アポトーシスも誘導することを報告している[21]。また、Pawlikらはスルフォラファンによるオートファジー活性化作用が乳ガン細胞の増殖を抑制することを報告している[22]。加えて、近年の変形性膝関節症の発症機構に関する分子・病理解析の結果から、膝組織でのオートファジー誘導が変形性膝関節症の予防に繋がる可能性が示されている[5]。そこで、本研究では、スルフォラファンの脳神経細胞保護作用機構のさらなる解明と変形性膝関節症予防効果の検討を行った。

##### 2. エタノールについて

アルコール（エタノール）は様々な場面で嗜まれると共に、調味料としても使われることから、量的な差はあるが現在の食生活の様々な場面で摂取されている。エタノールは体内に摂り込まれた後、アセトアルデヒドを経て酢酸に代謝され、アセチル CoA になった後 TCA サイクルで水と二酸化炭素に完全分解される。また、高血糖時には脂質合成の原料となることから、エネルギー源としての栄養素ともいえる。

多量のアルコール摂取はガンや肝臓障害などの疾病に関与すると共に、アルコール依存症などの問題を生じさせるが[23]、少量のアルコール摂取はガン等の疾病リスクを低下させることが疫学研究で明らかになっている[24, 25]。これは「アルコールのJカーブ効果」と言われており、適量の飲酒、つまり少量のエタノール摂取が、相対的な死亡リスクや虚血性心疾患・脳梗塞・二型糖尿病等のリスクを下げるというもので、飲酒量と健康リスクの相関関係において適量があるという考え方である[26]。例えば、適度な飲酒習慣がある高齢者と飲酒習慣のない高齢者を比較した場合、適度な飲酒習慣のある高齢者の方が認知症患者の割合が少ないことが明らかになっている[25]。さらに、関節痛で整形外科を受診した患者の内、飲酒習慣がある患者の方がいない患者と比べ症状が軽いというデータも示されている[27]。これまで、アルコールは体にとってメリットのないものとされる考え方が一般的であったが、適量の飲酒によって心身共に良い効果があると考えられるようになり、その機能性に注目が集まっている。少量のエタノール摂取に関しては先述したような疫学研究に加え、動物実験によって低濃度エタノール摂取の

肝機能改善効果や、糖尿病等の危険因子と考えられている血中尿酸値を低下させる効果が報告されているが[28]、少量のエタノール摂取による運動器への影響については明らかにされていない。そこで本研究では、マウス軟骨細胞を用いて、エタノールの軟骨細胞への影響を調べると共に、SAMP8 へエタノールの投与実験を行い、膝や筋肉への影響を検討した。

## 第2節 実験方法

スルフォラファンの脳神経細胞保護作用機構については、SH-SY5Y 細胞を用いて検討した。また、変形性膝関節症予防作用に関する検討は、ヒト正常軟骨細胞及びヒト滑膜線維芽細胞を用いて検討した。

エタノールの運動器への影響については、マウス軟骨細胞を用いて変形性膝関節症関連遺伝子の発現について検討した。また、エタノールの経口投与実験では、老化促進マウス SAMP8 への少量エタノールの投与を行い、膝関節の状態を評価した。

## 第3節 結果

スルフォラファン処理により、SH-SY5Y 細胞で FoxO3a の脱リン酸化を促進することが分かった。また、スルフォラファン処理によりヒト正常軟骨細胞及びヒト滑膜線維芽細胞においてオートファジーが誘導されることが明らかになった。

低濃度エタノールがマウス軟骨細胞での変形性膝関節症関連遺伝子の発現に影響を与えることを明らかにした。さらに老化促進マウス SAMP8 への投与実験から、少量エタノールが変形性膝関節症の進行を抑制することを明らかにした。

## 第4節 考察

スルフォラファンによる脳神経細胞保護効果の作用機構として、新たに FoxO3a のリン酸化抑制作用を示すことができた。加えて、スルフォラファンによる変形性膝関節症予防効果にオートファジーの活性化が関与していることを明らかにした。本研究を遂行した時期と同じ頃に、スルフォラファンの経口摂取が変形性膝関節症に対して予防的に働くことが報告された[29]。以上のことから、スルフォラファンはヒトにおいても経口摂取によって変形性膝関節症予防効果が期待でき、その作用機構としてオートファジー活性化作用が関与していることが明らかとなった。

また、低濃度エタノールが変形性膝関節症関連遺伝子の発現を抑制することを明らかにした。さらに、マウスへの少量エタノール投与実験でも有効性を確認した。その濃度は、ヒトでは日本酒 0.5 合に相当する量であり、日本酒 1 合未満が最も相対的死亡率が低いという報告[30]と近い濃度であると言える。大量のエタノールは変形性膝関節症悪化の要因であることが報告されていたが[31]、本研究によって少量のエタノールを摂取することで変形性膝関節症の進行を抑制する可能性が示された。



## 終章 研究の総括と今後の展望

高齢化が進む現代において健康寿命を延ばすことは重要であり、健康寿命を延ばすためには疾病の発症を防ぐこと、また発症した後も進行を抑制することが必要である。一方で、健康寿命を縮める要因である疾病の中にはガン、糖尿病、認知症など発症後の治療が難しいものもあることから、発症を未然に防ぐことが非常に重要である。これらの疾病の予防には、食生活も重要な役割を果たす。そのため様々な取り組みや研究が行われているが、学校教育で実施されている食育活動も適切な食習慣を若齢時から身につけることに一定の役割を果たしている。このように疾病の予防には、医学・栄養学だけでなく様々な分野の連携が重要である。

本研究においては、特に栄養学や食品学の視点から、食品・栄養成分による老齡疾患予防効果とその作用機構を明らかにすることを目的に検討を行い、細胞レベルや個体レベルでの有効性を明らかにした。今後はヒトへの投与実験や疫学研究等で実際にヒトが摂取した際の有効性を明らかにしていくことが必要である。

高齢化が進む現代において、健康寿命を延ばすことに貢献するためには、本研究をさらに発展させていくことに加え、本研究で得られたような食と健康に関する最新の成果や関連する情報を学校教育や生涯教育に取り入れ社会に還元していくことが必要である。

## 参考・引用文献

1. Shibata S, et al. (2016) Carnosic acid protects starvation-induced SH-SY5Y cell death through Erk1/2 and Akt pathways, autophagy, and FoxO3a. *International journal of food sciences and nutrition* 67 : 977-82.
2. 柴田紗知 (2014) 生体内酸化ストレス防御システムに作用する食品機能成分の新規機能に関する研究. 広島大学大学院教育学研究科修士論文.
3. David-Raoufi M, et al. (2009) Chondroitin sulfate increases hyaluronan production by human synoviocytes through differential regulation of hyaluronan synthases : Role of p38 and Akt. *Arthritis and rheumatism* 60 : 760-770.
4. Choi SS, et al. (2011) Honokiol enhances adipocyte differentiation by potentiating insulin signaling in 3T3-L1 preadipocytes. *Journal of natural medicines* 65 : 424-430.
5. Carames B, et al. (2012) Autophagy activation by rapamycin reduces severity of experimental osteoarthritis. *Annals of the rheumatic diseases* 71 : 575-581.
6. Gelino S, et al. (2016) Intestinal autophagy improves health span and longevity in *C. elegans* during dietary restriction. *PLoS genetics* 12 : e1006135.
7. Gao L, et al. (2016) Carnosic acid alleviates chronic alcoholic liver injury by

- regulating the SIRT1/ChREBP and SIRT1/p66shc pathways in rats. *Molecular nutrition and food research*: [Epub ahead of print].
8. Ibarra A, et al. (2011) Carnosic acid-rich rosemary (*Rosmarinus officinalis L.*) leaf extract limits weight gain and improves cholesterol levels and glycaemia in mice on a high-fat diet. *The British journal of nutrition* 106 : 1182-1189.
  9. Satoh T, et al. (2008) Carnosic acid, a catechol-type electrophilic compound, protects neurons both in vitro and in vivo through activation of the Keap1/Nrf2 pathway via S-alkylation of targeted cysteines on Keap1. *Journal of neurochemistry* 104 : 1116-1131.
  10. Ogg S, et al. (1997) The fork head transcription factor DAF-16 transduces insulin-like metabolic and longevity signals in *C. elegans*. *Nature* 389 : 994-999.
  11. Cabodi S, et al. (2009) Convergence of integrins and EGF receptor signaling via PI3K/Akt/FoxO pathway in early gene Egr-1 expression. *Journal of cellular physiology* 218 : 294-303.
  12. Shimazu T, et al. (2013) Suppression of oxidative stress by beta-hydroxybutyrate, an endogenous histone deacetylase inhibitor. *Science* 339 : 211-214.
  13. Yatagai M (1994) Antimite, antifly, antioxidative, and antibacterial activities of pisiferic acid and its congeners. *Mokuzai gakkaishi* 40 : 1355-1362.
  14. Xiao D, et al. (2001) Studies on constituents from *chamaecyparis pisifera* and antibacterial activity of diterpenes. *Chemical and pharmaceutical bulletin* 49 : 1479-1481.
  15. Tada M, et al. (2010) Syntheses of carnosic acid and carnosol, anti-oxidants in rosemary, from pisiferic acid, the major constituent of sawara. *Chemical and pharmaceutical bulletin* 58 : 27-29.
  16. Wiczak A, et al. (2012) Sulforaphane, a cruciferous vegetable-derived isothiocyanate, inhibits protein synthesis in human prostate cancer cells. *Biochimica et biophysica acta* 1823 : 1295-1305.
  17. Fahey JW & Talalay P (1999) Antioxidant functions of sulforaphane : a potent inducer of Phase II detoxication enzymes. *Food and chemical toxicology* 37 : 973-979.
  18. Davidson RK, et al. (2013) Sulforaphane represses matrix-degrading proteases and protects cartilage from destruction in vitro and in vivo. *Arthritis and rheumatism* 65 : 3130-3140.
  19. Nishikawa T, et al. (2010) The inhibition of autophagy potentiates anti-angiogenic effects of sulforaphane by inducing apoptosis. *Angiogenesis* 13 : 227-238.

20. Yang L, et al. (2016) Frugal chemoprevention: targeting Nrf2 with foods rich in sulforaphane. *Seminars in oncology* 43 : 146-153.
21. Hsu YC, et al. (2013) Growth inhibition and apoptosis of neuroblastoma cells through ROS-independent MEK/ERK activation by sulforaphane. *Cell biochemistry and biophysics* 66 : 765-774.
22. Pawlik A, et al. (2013) Sulforaphane inhibits growth of phenotypically different breast cancer cells. *European journal of nutrition* 52 : 1949-1958.
23. Higuchi S, et al. (2007) Japan: alcohol today. *Addiction* 102:1849-1862.
24. Inoue M & Tsugane S (2005) Impact of alcohol drinking on total cancer risk: data from a large-scale population-based cohort study in Japan. *British journal of cancer* 92:182-187.
25. Mukamal KJ, et al. (2003) Prospective study of alcohol consumption and risk of dementia in older adults. *Jama* 289 : 1405-1413.
26. 独立行政法人酒類総合研究所. (2014) お酒と健康・微生物. *酒類総合研究所広報誌 NRIB* 25 : 1-2.
27. 川村秀哉 他. (1994) 変形性膝関節症の病態-患者調査結果の検討-. *日関外誌* XIII : 333-340.
28. Osaki A, et al. (2014) Beneficial effect of a low dose of ethanol on liver function and serum urate in rats fed a high-fat diet. *Journal of nutritional science and vitaminology* 60 : 408-412.
29. Davidson RK, et al. (2013) Sulforaphane represses matrix-degrading proteases and protects cartilage from destruction in vitro and in vivo. *Arthritis & rheumatology* 65:3130-3140.
30. Holman CD, et al. (1996) Meta-analysis of alcohol and all-cause mortality: a validation of NHMRC recommendations. *Medical journal of Australia* 164 : 141-145.
31. Roper PM, et al. (2016) Alcohol-related deficient fracture healing is associated with activation of FoxO transcription factors in mice. *Journal of orthopaedic research* doi : 10.1002/jor.23235. [Epub ahead of print]