

平成 30 年 5 月 10 日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H02900

研究課題名(和文)大豆イソフラボン由来S-エクオールのアジア人型2型糖尿病予防作用に関する研究

研究課題名(英文)Effects of S-equol on the development of of type 2 diabetes mellitus

研究代表者

乾 博 (Inui, Hiroshi)

大阪府立大学・総合リハビリテーション学研究科・教授

研究者番号：20193568

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において、大豆イソフラボンに由来するS-エクオールがGタンパク質共役型受容体(Gsクラス)を介した作用により膵臓細胞の増殖の促進、細胞死の抑制、グルコース刺激に应答したインスリン分泌を促進することを明らかにした。さらに、マウスにおいてS-エクオールの摂取が細胞を損傷させることによる高血糖の誘発を緩和することが示された。これらの結果から、S-エクオールは細胞を標的とした抗糖尿病作用を持つことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we show that S-equol increased pancreatic beta-cell growth, viability, and insulin secretion through activation of G-protein coupled receptor (Gs class). Administration of S-equol suppressed against streptozotocin-induced hyperglycemia by preserving beta-cell mass in mice. These results suggest that S-equol may be useful for an anti-type 2 diabetic agent.

研究分野：代謝栄養学

キーワード：S-エクオール 膵細胞 糖尿病 cAMP/PKAシグナル ストレプトゾトシン

1. 研究開始当初の背景

2型糖尿病の発症は、QOLを著しく低下させる合併症に加えて、心疾患、脳血管疾患の発症に繋がる。欧米人では、肥満を伴ったインスリン抵抗性を特徴とすることに比して、日本人を含むアジア人では、非肥満型で、膵β細胞の減少に伴うインスリン分泌の低下が発症初期より観察されることが特徴である。現在、東アジア地域(日本、韓国、中国)における糖尿病患者数は全世界の糖尿病罹患患者数の約3割を占めるまで増加しており、今後も更なる増加が予想されている。

膵β細胞における protein kinase A (PKA) シグナルは、インスリン分泌の亢進作用のみならず、β細胞の細胞死の抑制と細胞増殖作用をもつ。PKAシグナル亢進作用を持つ内在性物質が、消化管から分泌されるインクレチン (glucagon-like peptide-1、GLP-1) である。GLP-1は、β細胞の細胞内cAMPを上昇させ、PKAシグナルを増加させることで抗2型糖尿病作用を発揮する。2009年より国内で使用され始めたGLP-1関連薬は、アジア人型2型糖尿病に特に有用であるのみならず、2型糖尿病の予防効果も注目されている。

我々は、β細胞培養系 (INS-1細胞) を用いて、PKAシグナルを増加させる食品成分のスクリーニングを行い、S-エクオールを見出していた。しかしながら、β細胞におけるS-エクオールPKAシグナル活性化メカニズムや動物レベルにおけるS-エクオールの効果については明らかでなかった。

2. 研究の目的

本研究では、これまでの研究成果に基づいて、S-エクオールによる糖尿病の予防・改善効果を明らかにすることを目的として、下記の(1)β細胞株を用いたS-エクオールの作用機構に関する検討、(2)S-エクオールの膵β細胞活性化を介した抗2型糖尿病作用に関する *in vivo* での検証を主たる目的とした。

3. 研究の方法

INS-1細胞およびICR雄性マウスを使用して、生化学・分子生物学・生理学・栄養学的手法により、S-エクオールのPKAシグナル活性化機構と *in vivo* における抗糖尿病作用について検討を行った。

4. 研究成果

(1)β細胞株を用いたS-エクオールの作用機構に関する検討

INS-1細胞において、S-エクオール(10 μM)は細胞膜画分でのcAMPの産生を促進したが、サイトゾル画分では促進しなかった。S-エクオールによるcAMP応答配列 (CRE) を介した転写活性の上昇は、細胞膜に局在するアデニル酸シクラーゼ (AC) 阻害剤である

2',5'-dideoxyadenosine (ddAdo) によって抑制されたが、サイトゾル局在型のAC阻害剤であるKH7による影響はみられなかった。また、細胞膜画分において、10 μMのS-エクオールはホスホジエステラーゼの活性に影響を与えなかった。細胞膜に局在するACはGタンパク質共役受容体 (GPCR) シグナルによって活性化される。そこで、S-エクオールが細胞膜上のGPCRに作用する可能性を評価するために、GPCRキナーゼ (GRK) の影響を検討した。GRKは、リガンドが結合したGPCRをリン酸化してGPCRを不活性化する。siRNAによりGRK3と6をsiRNAによりノックダウンすると、S-エクオールによるCREを介した転写活性がさらに上昇したが、GRK2のノックダウンによる影響はみられなかった。一方で、GRK2、3、および6の高発現はすべて、S-エクオールによるCREを介した転写活性を減弱させた。三量体Gタンパク質のGasサブユニットのGTPase活性を阻害することで恒常的にGasを活性化させるコレラ毒素は、S-エクオールと相乗的にCREを介した転写活性を増加させた。一方、ACを直接活性化するフォルスコリンとコレラ毒素の作用は相加的であった。さらに、siRNAによりGasサブユニットをノックダウンした結果、PKA阻害剤であるH89と同様にS-エクオールによるCREを介した転写活性の上昇が抑制されるとともに、S-エクオールによる増殖亢進、細胞死抑制、およびインスリン分泌促進作用がすべて消失した。以上の結果から、S-エクオールは細胞膜に局在するGPCRの作用を介してcAMPを産生することで、膵β細胞の量とインスリン分泌能を増加させると考えられる(図1)。

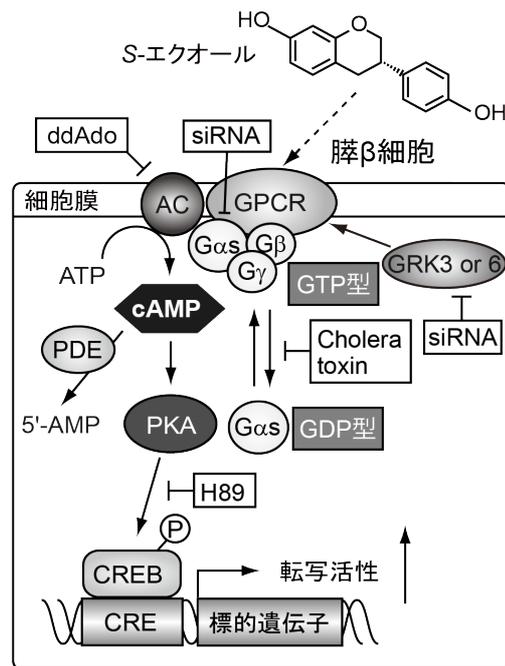


図1. 膵β細胞におけるS-エクオールの作用機構

(2) S-エクオールは膵β細胞活性化を介した抗2型糖尿病作用に関する *in vivo* での検証

S-エクオール (20 mg/kg 体重) を7日間1日2回経口投与した6週齢雄性ICRマウスの膵臓切片の解析により、インスリン陽性細胞のうち、細胞増殖マーカーであるKi67陽性細胞の比率がS-エクオール投与群で上昇した。つまり、S-エクオールは *in vivo* で膵β細胞の増殖促進作用を持つことが明らかとなった。

6週齢雄性ICRマウスにS-エクオールをストレプトゾトシン (STZ) 投与 (40 mg/kg 体重、5日間) 5日前から飼育期間を通して上記と同様の方法で経口投与し、STZ投与終了から5日後に腹腔内糖負荷試験を行った結果、糖負荷後の血糖値の上昇がS-エクオール投与群で有意に抑制された。糖負荷15分後の血中インスリン値は、S-エクオール投与群で上昇傾向であった。一方、インスリン負荷試験によりインスリン感受性を評価した結果、S-エクオール摂取による影響はみられなかった。膵臓切片の解析の結果、S-エクオール投与群でβ細胞量が有意に多く、TUNEL染色により検出されたアポトーシスが誘発されたβ細胞の割合が低下した。これらの結果から、S-エクオールは、膵β細胞に作用して、STZによる糖尿病の誘発を抑制することが示唆された。

以上の結果から、S-エクオールによるcAMP/PKAシグナルの活性化機構にはGαs共役型GPCRの活性化が関与することが明らかとなった。さらに、マウスにおいてβ細胞を損傷させることによる高血糖の誘発を緩和することが示された。これらの結果から、S-エクオールはβ細胞を標的とした抗糖尿病作用を持つことが示唆された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計5件)

(1) S-Equol activates cAMP signaling at the plasma membrane of INS-1 pancreatic β-cells and protects against streptozotocin-induced hyperglycemia by increasing β-cell function in male mice.

H. Horiuchi, A. Usamai, R. Shirai, N. Harada, S. Ikushiro, T. Sakaki, Y. Nakano, H. Inui, and R. Yamaji.

*J. Nutr.*, 147, 1631-1639, 2017. 査読有  
Doi: 10.3945/jn.117.250860

(2) 膵β細胞制御による糖代謝調節に関する食品機能学的研究

原田直樹

日本栄養・食糧学会誌、70、225-230、2017. 査読有

Doi: 10.4327/jsnfs.70.225

(3) Mogrol derived from *Siraitia grosvenorii* mogrosides suppresses 3T3-L1 adipocyte differentiation by reducing cAMP-response element-binding protein phosphorylation and increasing AMP-activated protein kinase phosphorylation.

N. Harada, M. Ishihara, H. Horiuchi, Y. Ito, H. Tabata, Y.A. Suzuki, Y. Nakano, R. Yamaji, and H. Inui.

*PLoS One*, 11, e0162252, 2016. 査読有

Doi: 10.1371/journal.pone.0162252

(4) Inhibitory effects of Eucalyptus and Banaba leaf extracts on nonalcoholic steatohepatitis induced by a high-fructose/high-glucose diet in rats.

Y. Takahashi, K. Sugimoto, Y. Soejima, A. Kumagai, T. Koeda, A. Shojo, K. Nakagawa, N. Harada, R. Yamaji, H. Inui, T. Yamanouchi, and T. Fukusato.

*Biomed. Res. Int.*, 296207, 2015. 査読有

Doi: 10.1155/2015/296207

(5) 膵β細胞のインスリン分泌能におよぼすポリフェノール類の作用。

堀内寛子、原田直樹、山地亮一。

ビタミン、89、341-347、2015. 査読有

Doi: 10.20632/vso.89.7\_341

[学会発表](計15件)

(1) 食品成分による膵β細胞機能制御

原田直樹

第61回 日本糖尿病学会年次学術集会 (2018)。

(2) GPCRとそのシグナル伝達を促進する食品因子の組合せの探索。

奥山真衣、原田直樹、五島直樹、乾博、山地亮一。

日本ビタミン学会第69回大会 (2017)。

(3) 膵β細胞制御による糖代謝調節に関する食品機能学的研究

原田直樹

第71回 日本栄養食糧学会大会 (2017)。

(4) S-エクオールによるストレプトゾトシン誘発糖尿病の抑制について

原田直樹、宇佐美敦子、堀内寛子、乾博、山地亮一。

第71回 日本栄養食糧学会大会 (2017)。

(5) 膵β細胞におけるS-エクオールのcAMP産生作用にはGPCRが関与する。

堀内寛子、原田直樹、乾博、山地亮一。

2017年度 日本農芸化学学会大会。

(6) S-Equolはストレプトゾトシンによる糖尿病発症を緩和する。

宇佐美敦子、堀内寛子、原田直樹、乾博、山地亮一。

第 55 回 日本栄養・食糧学会 近畿支部大会 (2016)。

(7) *S*-エクオールによる膵  $\beta$  細胞の PKA シグナル活性化には細胞膜画分が関与する。

原田直樹、堀内寛子、乾博、山地亮一。  
日本ビタミン学会第 68 回大会 (2016)。

(8) 非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) モデルマウスにおけるユーカリ葉抽出物の抑制作用。

乾博、杉本圭一郎、塚本啓太、原田直樹、中川一弥、高橋芳久、福里利夫、山内俊一、中野長久、山地亮一。  
第 70 回 日本栄養・食糧学会大会 (2016)。

(9) 膵  $\beta$  細胞における *S*-エクオールの Gas-cAMP-PKA シグナル活性化について。

堀内寛子、原田直樹、乾博、山地亮一。  
第 70 回 日本栄養・食糧学会大会 (2016)。

(10) 膵  $\beta$  細胞において *S*-エクオールは細胞膜で cAMP を産生して protein kinase A シグナルを活性化する。

堀内寛子、原田直樹、乾博、山地亮一。  
2016 年度 日本農芸化学会。

(11) Effects of *S*-equol and related compounds on the proliferation of INS-1 pancreatic  $\beta$ -cells.

H. Horiuchi, A. Usami, N. Harada, S. Ikushiro, T. Sakaki, Y. Nakano, H. Inui, and R. Yamaji.  
The 6<sup>th</sup> International Congress of Food Factors (2015)。

(12) *S*-Equol とその関連化合物が膵  $\beta$  細胞の増殖に及ぼす作用について

宇佐美敦子、堀内寛子、原田直樹、生城真一、榊利之、中野長久、乾博、山地亮一。  
第 54 回 日本栄養・食糧学会 近畿支部大会 (2015)。

(13) *S*-エクオールによる膵  $\beta$  細胞の維持・増加作用とそのメカニズムの解明。

原田直樹、堀内寛子、中野長久、乾博、山地亮一。  
第 490 回 日本農芸化学会関西支部例会 (2015)。

(14) 膵  $\beta$  細胞における *S*-エクオールの cAMP/protein kinase A シグナル活性化機構について。

原田直樹、堀内寛子、中野長久、乾博、山地亮一。  
日本ビタミン学会第 67 回大会 (2015)。

(15) *S*-Equol increases the production of cyclic AMP at the plasma membrane of INS-1 pancreatic beta-cells.

H. Horiuchi, N. Harada, Y. Nakano, H. Inui, and R. Yamaji.

12th Asian Congress of Nutrition (2015)。

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.biosci.osakafu-u.ac.jp/NC/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

乾博 (INUI, Hiroshi)

大阪府立大学・大学院総合リハビリテーション学研究科・教授

研究者番号：20193568

(2) 研究分担者

原田直樹 (HARADA, Naoki)

大阪府立大学・大学院生命環境科学研究科・講師

研究者番号：00529141

甲斐建次 (KAI, Kenji)

大阪府立大学・大学院生命環境科学研究科・講師

研究者番号：40508404