

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05457

研究課題名(和文)エクオール抱合代謝物がもたらす神経保護的活性物質としての新たな可能性

研究課題名(英文)The Potential of Equol Conjugated Metabolites as Novel Neuroprotective Agents

研究代表者

小原 映 (Aki, Obara)

杏林大学・保健学部・助教

研究者番号：40782701

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：Equol(Eq)は、daidzeinから腸内細菌により合成される化合物であり、神経保護作用を有するため、認知症予防効果が指摘されている。脳内においてEq抱合代謝物は存在するのか、神経保護作用を有するのかが不明である。それらを明らかにするため、本研究ではEq抱合代謝物の一斉分析法を開発した。その結果、脳内にはmonoG, monoS, Eq-7G-4'Sが存在することを明らかにした。神経保護作用について、マウスアストロサイトを初代培養し、LPS添加後のNO抑制率を検討した結果、Eq抱合代謝物はNO抑制作用を有すること、さらにEqよりも強いNO抑制作用を有する抱合代謝物の存在が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Equolはダイゼインやゲニステインといったイソフラボンより強い女性ホルモン様作用を有しているために、注目されている。本研究では、Equol抱合代謝物の一斉分析法を開発し、マウス脳内には、脳内にはmonoG, monoS, Eq-7G-4'SのEquol抱合代謝物が存在し、さらに、Equol抱合代謝物が神経保護作用を有する可能性を明らかにした。これらは、抱合代謝物の更なる有用性が期待出来る。また、脳内の抱合代謝物を明らかにすることにより、脳内におけるUGTやSULTが関与する代謝機構の解明にも繋がる。

研究成果の概要(英文)：Equol (Eq) is a compound synthesized from daidzein by intestinal bacteria and is suggested to have potential preventive effects against dementia due to its neuroprotective properties. However, it is unclear whether Eq conjugated metabolites exist in the brain and whether they possess neuroprotective effects. To clarify these questions, this study first developed a simultaneous analytical method for eight types of Eq conjugated metabolites, including Eq. Using this analytical method, quantification revealed the presence of monoG, monoS, and E-7G-4'S in the brain. Furthermore, to investigate the neuroprotective effects, primary cultures of astrocytes from mice were prepared, and the NO suppression rate after LPS addition was examined. The results suggested that Eq conjugated metabolites have NO suppression effects and that Equol-7,4'-diG, E-7-S, and E-4'-G have stronger NO suppression effects than Eq.

研究分野：分析化学

キーワード：Equol Isoflavone LC-MS/MS 抱合代謝物

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

大豆イソフラボン<sup>1</sup>は、認知機能の改善、認知症予防の効果が示唆されている。エクオール (Eq) は、大豆イソフラボンであるダイゼイン (Dein) から腸内細菌によって合成される。女性ホルモンである 17 $\beta$ -エストラジオールと立体構造が似ていることから、Dein やゲニステイン (Gein) よりも強い女性ホルモン様作用を有している。そのため更年期障害の予防などへの応用が期待される。Eq の合成には、Eq 産生菌を保有していることが必須であるが、その保有率は日本などのアジア圏では約 50% であり、欧米圏では約 30% である。この Eq 産生能の有無が、大豆食品摂取によるイソフラボン効果の有無に関与していると考えられている。

Eq は、摂取後主に肝臓の薬物代謝酵素(UDP グルクロン酸転移酵素(UGT)、硫酸転移酵素(SULT))により抱合反応を受け約 99%以上がグルクロン酸や硫酸に抱合された抱合代謝物となり、血中に存在している。抱合反応は役目を終えた物質を排泄しやすくするためであり、抱合代謝物は生理活性を持たないと以前まで考えられていた。しかし近年、Eq 抱合代謝物自身も女性ホルモン様作用や骨芽細胞形成促進作用などを持つことが報告されている。Eq が生体へ及ぼす作用を詳細に把握するためには、抱合代謝物を含めた研究が極めて重要である。しかし体内での存在量や機能評価の多くは、Eq のみが測定対象である。Eq は、認知機能の改善や認知症予防効果が示唆されている。脳内における Eq の効果は、in vitro (SH-SY5Y) では細胞毒性を減少させ、in vivo (線虫) では生存率を増加させ神経保護作用を示し、パーキンソン病やアルツハイマーなど神経変性疾患の改善予防効果としての利用が期待されている。しかし研究は専ら Eq を用いており、抱合代謝物に関する情報は無い。従って申請者は、『Eq は脳内でも UGT や SULT で代謝を受け抱合代謝物として存在し、それが神経保護作用を有するのではないか』と仮説を立て、実験を開始した。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、脳内に Equol 抱合代謝物が存在するのか、Equol 抱合代謝物が神経保護作用を有するのかを明らかにすることである。

### 3. 研究の方法

#### 1) LC-MS/MS を用いた Equol 抱合代謝物の定量分析法の開発

##### 対象物質

Equol および Equol 抱合代謝物 (7 種); Equol-4',7-diglucuronide (E-4',7-diG), Equol-4',7-disulfate (E-4',7-diS), Equol-4'-sulfate-7-glucuronide (E-7G-4'S), Equol-7-glucuronide (E-7-G), Equol-4'-glucuronide (E-4'-G), Equol-7-sulfate (E-7-S), Equol-4'-sulfate (E-4'-S)とした。

##### サンプル採取～前処理 (脳および血漿)

8 週齢 C57BL/6 マウスに 1 日 2 回 3 日間連続、Equol を経口投与(30 mg/kg/day)し、4 日目に灌流したのち脳を摘出した。血漿は、心臓穿刺により採血し、1500 $\times$ g、5 分間遠心し得た。なお、マウスは 4 週間大豆イソフラボンフリーの飼料を与えたのちに経口投与を行った。脳の前処理は組織重量の 10 倍量のアセトン/エタノール (1:1) 溶液および水を加え、超音波破碎を 10 分間行い、11,900 $\times$ g、4 で 10 分間遠心し、上清を回収した。この操作を 2 回行い、上清全てを固相抽出 (Oasis HLB cartridge, 150 cc) した。N<sub>2</sub> ガスにて溶媒流去した。血漿は、100  $\mu$ L を固相抽出 (Oasis HLB cartridge, 150 cc) した後に N<sub>2</sub> ガスにて溶媒流去した。その後アセトニトリル: 10 mM 酢酸アンモニウム = 1:3 の溶液で再溶解し、そのうち、4  $\mu$ L を LC-MS/MS に供した。

##### LC/MS 条件

LC 装置には、Thermo Fisher SCIENTIFIC 社の Vanquish Flex UHPLC システムを使用した。LC 測定条件には、カラムは coretecs T3, 150 $\times$ 2.1, 3 $\mu$ m (waters)、流速は、0.3 mL/min、移動相は、10 mM 酢酸アンモニウムとアセトニトリル: メタノール: 10 mM 酢酸アンモニウム = 6:3:1 のグラジエントモードとした。カラム温度は、45 とした。MS 装置には、Thermo Fisher SCIENTIFIC 社の TSQ Quantis Plus を使用した。MS 測定条件は、Spray Voltage: Positive Ion 3500 V / Negative Ion 2500 V、Vaporizer Temperature: 350、Sheath Gas: 50 Arb、Aux Gas: 10 Arb、Ion Transfer Tube Temperature: 325 とした。各抱合代謝物は、Polarity, Precursor ion, Product ion, Collision Energy, RF lens を最適化し、測定を実施した。

#### 2) 初代培養細胞を用いた NO 抑制効果の検証 (神経保護作用の検証)

## 細胞培養

C57BL/6 マウス生後 1~4 日までの仔マウス的大脑を採取し、パパイン酵素処理したのち、Poly-D-lysine をコートしたフラスコに  $1 \times 10^6$  個/cm となるように播種した。播種後は、 $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  インキュベーター内にて、培養した。5 日後アストロサイトがコンフルエント (100%) になったことを確認し、200 rpm にて 1 時間振とうさせ、ミクログリアを回収した。この方法にてアストロサイトとミクログリアを分離培養し、NO Assay に用いた。

## NO Assay

初代培養にて得られたアストロサイトに、リポ多糖 (LPS)  $1 \mu\text{g}/\text{mL}$  を添加した。そこに、Equol および Equol 抱合代謝物 7 種類をそれぞれ  $1 \mu\text{M}$ 、 $10 \mu\text{M}$  加え、24 時間、 $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  にてインキュベートした。処置した 96 well プレートを、 $1000 \times g$ 、室温にて 15 分間遠心した。その後、上清  $100 \mu\text{L}$  を、測定用の 96 well ブラックプレートに移し入れた。そこに、DAN 試薬 ( $0.1 \text{ mg}/\text{mL}$  in  $0.62 \text{ M HCl}$ )  $10 \mu\text{L}$  を加え、室温にて 20 分間インキュベートした。反応停止のため、 $0.28 \text{ M NaOH}$  を加え、プレートリーダーにて測定した。測定条件は、励起波長  $365 \text{ nm}$ 、蛍光波長  $450 \text{ nm}$  とした。また、培地のみをブランク、LPS のみ添加したものをコントロールとした。

## 4. 研究成果

### 1) LC-MS/MS を用いた Equol 抱合代謝物の定量分析法の開発

Equol および Equol 抱合代謝物の各検量線 (range:  $0.818 \sim 104.0 \text{ ng}$ ) は、血漿中において相関係数  $r=0.9719$  以上、脳中においては相関係数  $r=0.9963$  以上であり、良好な直線性を得ることができた。

血漿  $100 \mu\text{L}$  中では、E-7G-4'S;  $21.5 \pm 16.5 \text{ ng}$ 、E-4'-G;  $7.47 \pm 2.85 \text{ ng}$ 、E-7-G;  $18.0 \pm 9.95 \text{ ng}$ 、E-4' S;  $23.0 \pm 3.26 \text{ ng}$ 、E-7-S;  $125 \pm 16.5 \text{ ng}$ 、Eq;  $1.06 \pm 0.67 \text{ ng}$  であった。E-4',7-diG は検出されず、E-4',7-diS は検出されたが定量限界以下であった。脳中では、E-7G-4'S;  $2.14 \pm 0.736 \text{ pg}/\text{mg}$  (組織重量)、E-4'-G;  $9.66 \pm 0.519 \text{ pg}/\text{mg}$  (組織重量)、E-7-G;  $5.26 \pm 1.49 \text{ pg}/\text{mg}$  (組織重量)、E-4' S;  $2.88 \pm 0.638 \text{ pg}/\text{mg}$  (組織重量)、E-7-S;  $11.3 \pm 0.888 \text{ pg}/\text{mg}$  (組織重量) Eq が  $2.06 \pm 0.0 \text{ pg}/\text{mg}$  (組織重量) であった。E-4',7-diG、E-4',7-diS は検出されなかった。血漿中において、最も多い抱合代謝物は、血漿中および脳内ともに E-7-S であった。さらに、血漿中と脳内における存在分布には、違いがあることが明らかになった (Fig. 1)。

これらの結果より、Equol 抱合代謝物は血漿中だけでなく、脳内にも存在すること、マウスにおいては主要な抱合代謝物が E-7-S であること (ヒト血漿中での主要な抱合代謝物は、E-7G-4'S)、血漿中と脳内における存在分布が異なることを明らかにした。特に E-7G-4'S については血漿中と異なることから、脳内において代謝を受けている可能性がある。

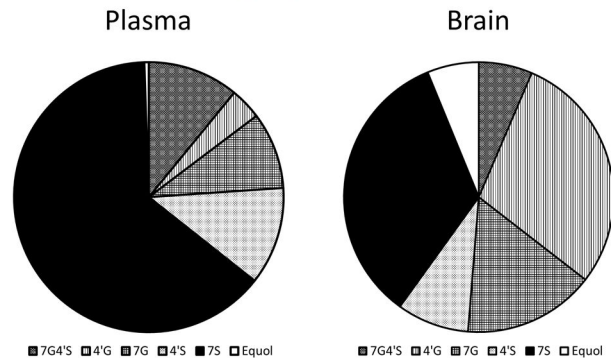


Fig. 1 血漿および脳中における Equol 抱合代謝物の分布

### 2) 初代培養細胞を用いた NO 生成抑制効果の検証 (神経保護作用の検証)

LPS のみを添加したコントロールと比較し、Equol 抱合代謝物の NO 生成抑制作用を検証した。その結果、全ての Equol 抱合代謝物 (添加濃度  $10 \mu\text{M}$ ) では、コントロールよりも NO の生成は抑制された (有意差  $p < 0.05$ )。また添加濃度  $1 \mu\text{M}$  の場合も、E-7-S を除き全て NO の生成が抑制された (有意差  $p < 0.05$ )。Equol と比較した場合、その抑制作用が強くみられたものは、E-4',7-diG、E-7-S、E-4'-G、E-4',7-diS であった。この結果より、抱合代謝物自身にも NO の生成抑制作用すなわち神経保護作用を有することが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小原 映, 高津 博勝, 石井 さなえ, 島田 厚良, 岡田 洋二
2. 発表標題 生体内におけるEquolおよびその抱合代謝物のLC-MS/MSを用いた一斉分析
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------