

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580189

研究課題名(和文)大豆イソフラボンの食欲抑制効果の消化管を介した新規機構の解明

研究課題名(英文)Appetite decreasing effect of soy isoflavone by novel mechanism via intestine

研究代表者

岸田 太郎(Kishida, Taro)

愛媛大学・農学部・教授

研究者番号：80304658

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：ダイゼインを摂取した際、エコールは血中よりもはるかに多く胆汁中に存在することが見出された。ダイゼイン摂取時の胆汁を、他のラットの十二指腸より注入したところ、飼料摂取量が低下する傾向が見られた。この際、食欲抑制ホルモンコレシストキニンの小腸粘膜遺伝子発現が有意に上昇し、プレプログルカゴンおよびペプチドYYにも上昇の傾向が見られた。しかしコレシストキニン感受性欠損ラットでもエコールの摂取により飼料摂取量が有意に低下した。

研究成果の概要(英文)：Equol concentration in bile was higher than serum. The injected bile collected from rats fed daidzein significantly decreased food intake 12h after injection. After injection, the intestinal gene expression of CCK significantly increased and insignificant trend was observed in the gene expression of preproglucagon and peptide YY. Contrary to the result in (2), we found that dietary equol decreased food intake regardless of CCK receptor deficiency. CCK might not be a contributing factor in the mechanism of equol on decreased food intake in female rats.

研究分野：栄養科学

キーワード：食物繊維 摂取エネルギー レプチン 視床下部 ラット

1. 研究開始当初の背景

研究の学術的背景

大豆イソフラボンによる雌特異的な飼料摂取量の低下

過食は肥満をはじめ多くの生活習慣病のもっとも大きな原因のひとつであり、過食の防止は生活習慣病の予防・治療において重要である。先に我々は大豆イソフラボンを雌ラットに与えると(50~150 mg/kg 飼料)飼料摂取量が低下することを見出し1)2)、これが主要な大豆イソフラボンのひとつダイゼインに特有な効果であることを明らかにした3)。さらに血中濃度からダイゼインの腸内細菌代謝物エコールが活性本体である可能性を示唆するデータが得られた。植物性エストロゲンの構造はエストロゲンによく類似しているため、エストロゲンレセプターおよびDNAと相互作用し、標的遺伝子の発現を制御する事によりエストロゲン様の作用をもたらす。大豆イソフラボンのエストロゲン作用についてはエストロゲン欠乏による骨粗鬆症の改善効果等の機構として4)議論されている。しかし、大豆イソフラボンが卵巣摘出メスラットの飼料摂取量を低下させた際、卵巣摘出による子宮重量の萎縮は全く改善されなかった1)。また、エストラジオールの投与はオスおよび卵巣摘出メスの飼料摂取量を低下させたが、メスには効果はなかった1)。

1) Kishida T, Ebihara K, et. al. 上原記念生命科学財団研究報告集, 19: 121-123 2005.

2) Kishida T, Ebihara K, et. al. Obes. Res., in submission.

3) Kishida T, Ebihara K, et. al. Soy Protein Research, Japan 8, 56-62, 2005.

4) Kurzer MS, Xu X., Dietary phytoestrogens., Annu Rev Nutr;17:353-381, 1997.

ダイゼイン腸内細菌代謝物エコールは胆汁中に多量に存在する。経時的観察を伴わない予備知見ながらダイゼインを摂取した際、エコールは血中よりもはるかに多く胆汁中に存在することが見出された(図1)。大豆イソフラボンの食欲抑制効果には腸肝循環するエコールが関与している可能性がある。

5) Kishida T, Ebihara K, et. al. Soy Protein Research, Japan 8, 56-62, 2005.

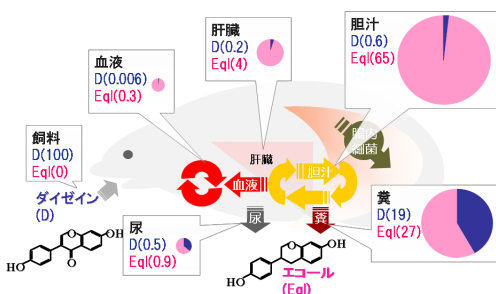


図1 1日のダイゼイン摂取量を100とした場合のダイゼインおよびエコールの体内分布の割合

ダイゼインは消化管ホルモンコレシストキニンの遺伝子発現を増加させる。

メスラットで、1日に3回一定時刻に一定時間の間だけ自由摂取させる食餌様式において、ダイゼインの飼料摂取量低下作用を検討したところ、毎日2回目の食餌の際にもっとも顕著な効果が認められ、この際小腸粘膜のコレシストキニン遺伝子発現がダイゼイン摂取により有意に増加することがわかった。食欲抑制ホルモンであるコレシストキニンが、ダイゼインの作用機構に関わっている可能性が、示唆された。

2. 研究の目的

申請の研究は次のプロセスにより大豆イソフラボンが、腸肝循環しながら消化管を介して食欲を抑制する機構を解明することを目指した。

(1) ダイゼイン摂取時のエコールの体内動態の解析

(2) 腸管循環エコールの飼料摂取量低下への関与の検証

(3) 感受性欠損動物を用いたコレシストキニンの作用機構への関与の検証

3. 研究の方法

(1) ダイゼイン摂取時のエコールの体内動態の解析

7週令SD系雌ラットにダイゼインまたはエコールを0~150 mg/kg 飼料で混餌投与し、0、3、7日目に麻酔下でカニューレションして30分間胆汁を採取した。血液、尿、糞、肝臓、腎臓も採取した。体重から求めた全血液重量を用いて血中イソフラボン量を求めた。解剖前1日間に採取した尿、糞重量からイソフラボン排泄量を求めた。予備実験の結果(麻酔下で6時間の胆汁エコール分泌量を調べた)をもとに、30分間に分泌された胆汁中イソフラボン量から推測した。

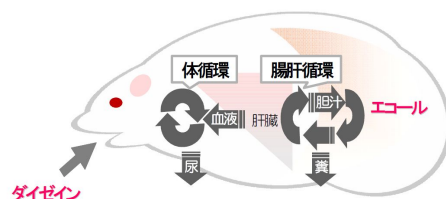


図2 ダイゼインの体内および腸肝循環

(2) 腸管循環エコールの飼料摂取量低下への関与の検証

コントロール飼料(AIN93G)を与え、暗期のみ飼料摂取可能とした。この間暗期開始から3時間ごとに飼料摂取量を測定した。予備飼育開始6日目に十二指腸への胆汁注入用カテーテルを埋め込む手術を行い、術後4日間の回復期間を置いた(レシピエント)。あらかじめコントロール飼料またはダイゼイン飼料(300 mg/kg 飼料)を与えて2週間飼育した

ラット(ドナー)から、胆汁を採取しておき、その胆汁を十二指腸カテーテルより生理的な速度で 12 時間注入した。これを各々 C 胆汁群、D 胆汁群とした。D 胆汁群では 15 μ mol の胆汁中エコールが注入されるようにした。解剖は注入終了 2 時間後に行った。注入終了 2 時間後の 2:00 に断頭し、採取した血液を 4、1,700 g、15 分間遠心分離し、血清を分析まで -50 で保存した。また小腸を摘出し、上部と下部に分け、生理食塩水で内容物を洗い出した後、それぞれ小腸粘膜を採取した。

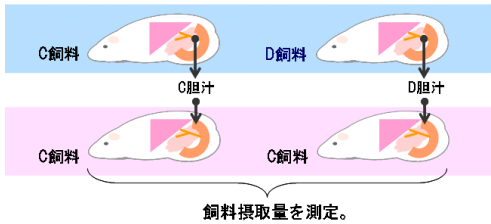


図 3 ダイゼインの体内および胆汁循環

(3) コレシストキニン感受性欠損動物を用いた両ホルモンの作用機構への関与の検証

(+)および(-)エコールの調製

先の検討で、OLETF ラットは SD ラットよりもダイゼインよりのエコール変換能が著しく低いことが明らかになっている。このため(3)の検討ではエコールを直接混時投与する必要がある。エコールは光学異性体を持ち、腸内細菌がダイゼインより変換できるのは(-)体のみだが、市販されているのは(-)および(+)体の混合物(ラセミ体)である。本研究ではラセミ体を光学分割カラム(OJ-D、ダイセル社)で分離精製して用いた。

CCK レセプター欠損ラットによる作用機構の検討

CCK レセプター欠損により過食性の肥満を引き起こす OLETF ラットの 7 週令雌動物に(-)-エコールを 0~150 mg/kg 飼料で混餌投与し、食欲抑制に関連する液性成分の機構への関与を検討した。解剖時脳および血液をサンプリングし、視床下部での食欲制御に関わる神経伝達物質および CCK レセプターの遺伝子発現、および CCK 他食欲制御に関わる血中シグナルを調べた。

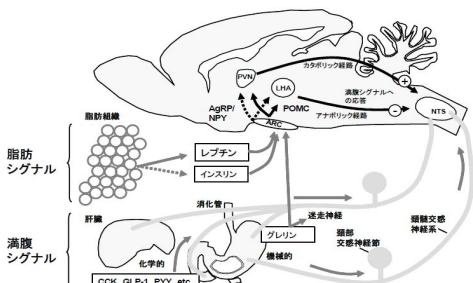


図 4 消化管および中枢の食欲制御シグナルの連絡

4. 研究成果

ダイゼインを摂取した際、エコールは血中よりもはるかに多く胆汁中に存在することが

見出された(表 1)。

表 1 ダイゼイン摂取時のエコールの体内・消化管内分布の経時変化

	Serum	Bile	Urine	Feces
	(μ M)	(μ M)	(μ mol/day)	(μ mol/day)
Day 0.5	0.48 \pm 0.07	277 \pm 27	0.02 \pm 0.01	0.05 \pm 0.01
Day 1.5	0.85 \pm 0.11	709 \pm 56	0.17 \pm 0.02	0.33 \pm 0.06
Day 2.5	1.71 \pm 0.29	1035 \pm 65	0.31 \pm 0.04	1.58 \pm 0.19
Day 4.5	1.74 \pm 0.16	971 \pm 87	0.61 \pm 0.05	3.76 \pm 0.73

¹⁾Rats were fed the diet including dai-zein (150 mg/kg diet) diets for 1, 2, 3 and 5 days. Each value represents the mean \pm SEM, n=6.

ダイゼイン摂取時に採取した胆汁を、ダイゼインを摂取させていないラットの十二指腸より注入したところ、注入開始 12 時間目以降飼料摂取量が低下する傾向が見られた。この際、食欲抑制ホルモンコレシストキニン(CCK)の小腸粘膜遺伝子発現が有意に上昇し、プレプログルカゴン(PPG)およびペプチド YY(PYY)にも上昇の傾向が見られた(図 5)。

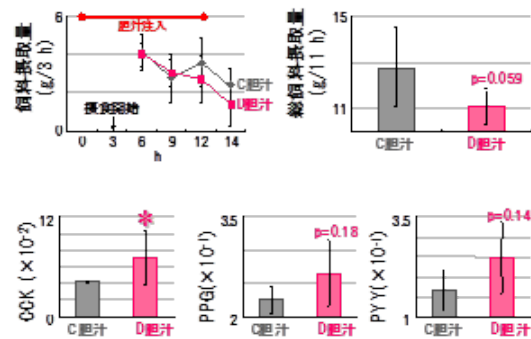


図 5 エコール高含有胆汁をラット十二指腸に注入すると飼料摂取量が低下し食欲抑制ホルモンの小腸粘膜遺伝子発現が上昇した。

しかし、コレシストキニン感受性を欠損することにより過食性の肥満を引き起こす OLETF ラットにおいてもダイゼインおよびエコールの混餌投与により飼料摂取量の低下が認められ、コレシストキノンの関与は否定された(図 6)。

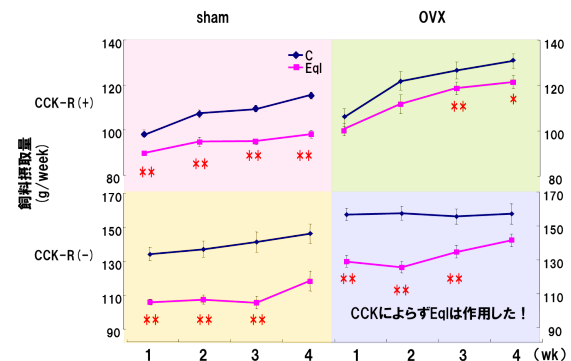


図 6 エコールはコレシストキニン感受性を欠損したラットにおいても、通常動物と同様に飼料摂取量を低下させた。

先の胆汁注入実験とまったく同様の系で遊離エコールを注入したが、飼料摂取量が低下することは無かった。この際血中の総エコール濃度はダイゼイン混餌投与で飼料摂取量の低下が観察された際と同レベルに速やかに上昇していた(データ無)。

大豆イソフラボン摂取時血中に存在するイソフラボンはグルクロン酸または硫酸抱合体であることが報告されている。エコールについてはまだ報告はほとんど無いが、我々が酵素による脱抱合処理の有無により検証したところほとんどが抱合型であった(データ無)。ダイゼイン摂取時にオスラットでは尿中排泄されたダイゼインの約3分の2がダイゼイン硫酸抱合体、の約3分の1がダイゼイングルクロン酸抱合体であったが、メスラットではほとんどがグルクロン酸抱合体であり、硫酸抱合体はごく僅かであったことが報告されている。エコールでも抱合タイプが雌雄で異なる可能性は高い。

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 4 件)

1) Fujitani M, Mizushige T, Bhattarai K, Iwahara A, Aida R, Segawa T, Kishida T. Dynamics of appetite-mediated gene expression in daidzein-fed female rats in the meal-feeding method. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2015, in press. (査読有)

2) Fujitani M, Mizushige T, Bhattarai K, Iwahara A, Aida R, Kishida T. The daidzein- and estradiol- induced anorectic action in CCK or leptin receptor deficiency rats. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2015, in press. (査読有)

3) 岸田太郎, 水重貴文, 瀬島浩一, 海老原清: ビート食物繊維はラットの体脂肪を低下させ、視床下部レプチンレセプター遺伝子発現を増加させる., *ルミナコイド研究*, 16(2), 89-93, 2012. (査読有)

4) 水重貴文, 藤谷美菜, 山下由起, 山内佳也, 村上聖, 岸田太郎, 海老原清, エクオールの食欲抑制効果に関する機構解明 - エクオールの抱合代謝産物の解析 -, *大豆たん白質研究*, 15, 165-169, 2012. (査読無)

[学会発表](計 7 件)

1) 岸田太郎: 摂食調節と肥満抑制、日本食物繊維学会第18回学術集会、越前、11月23-24日、講演要旨集、s 26- s 27. (2013)

2) Kishida, T., Mizushige, T., Osada-Ohtsu, Y., Ishikawa, S., Nagamoto, M., Ebihara, K., Dietary Soy Isoflavone Daidzein Lowers the Food Intake, Body Weight and Body Fat in Female Rats with and without Ovariectomy. INUS 20th International Congress of Nutrition, Granada, Spain, Sep.11th-19th, *Ann. Nutr. Metab.*, 63(suppl 1), 1708. (2013)

3) 岸田太郎, 藤谷美菜, 水重貴文, 山内佳也, 村上聖, 山内聡, 海老原清: 大豆イソフラボン腸内細菌代謝物エコールの飼料摂取量低下効果への腸肝循環の関与、日本農芸化学会2013年度大会、仙台、3月25-28日、講演要旨集、1528. (2013)

4) 村上聖, 山内佳也, 本永芳恵, 梶原秀平, 山内聡, 岸田太郎, 海老原清: ダイゼインの雌特異的飼料摂取量抑制作用はCCK-1レセプター欠損により消失しない、日本農芸化学会中四国支部会第33回講演会(例会)、松山、6月2日、講演要旨集、35. (2012)

5) 柿原文耶, 小原佑香, 藤田悠祐, 森裕貴, 水重貴文, 岸田太郎, 海老原清: 3食制条件化におけるビートファイバーの摂取エネルギー低下効果、日本農芸化学会中四国支部会第33回講演会(例会)、松山、6月2日、講演要旨集、21. (2012)

6) 村上聖, 山内佳也, 本永芳恵, 梶原秀平, 山内聡, 岸田太郎, 海老原清: ダイゼインのメスラット特異的飼料摂取量低下はCCK-1レセプターの欠損により消失しない。第66回日本栄養食糧学会大会、仙台、5月18-20日、講演要旨集、164. (2012)

7) 岸田太郎, 藤田悠祐, 小原佑香, 柿原文耶, 海老原清: ラットにおけるビートファイバーのエネルギー摂取低下作用に迷走神経は関与するか? 第66回日本栄養食糧学会大会、仙台、5月18-20日、講演要旨集、164. (2012)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岸田 太郎 (Kishida Taro)

愛媛大学・農学部・教授

研究者番号: 80304658