

令和 2 年 4 月 19 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10824

研究課題名(和文) 植物性エストロゲンによる脳動脈瘤形成・破裂予防の研究

研究課題名(英文) Dietary Phytoestrogen Reduces Intracranial Aneurysm Formation in Ovariectomized Female Mice

研究代表者

平松 久弥 (Hiramatsu, Hisaya)

浜松医科大学・医学部・助教

研究者番号：70447803

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：女性ホルモンであるエストロゲンは血管保護効果が期待される物質である。脳動脈瘤は閉経前後の女性に多いことからエストロゲンの減少と脳動脈瘤の発生、破裂に影響していると考えられます。近年腸内細菌が注目されていて大豆が腸内細菌でエストロゲン類似物質に代謝されることが報告されたことから、我々の研究では閉経メスマウスに大豆イソフラボンを摂取させることで脳動脈瘤の形成を抑制する結果となりました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

閉経前後の女性はエストロゲンの減少があることからエストロゲンの補充することで血管の保護効果が期待できると考えられます。様々な炎症が血管壁に作用することで脳動脈瘤の発生や破裂が起こることが報告されており、大豆を摂取することで体内でエストロゲン物質を産生して血管壁への抗炎症作用が働き脳動脈瘤の発生を抑制することが期待されます。

研究成果の概要(英文)：Postmenopausal women have a higher incidence of intracranial aneurysmal rupture than men of the same age. While estrogen supplement may cause harmful effects in post-menopausal women, phytoestrogen from diet may reduce intracranial aneurysmal formation and rupture in post-menopausal women. Using a mouse model of intracranial aneurysm, we examined effects of equol, a phytoestrogen produced by the gut microbiota from dietary daidzein, in aneurysm formation and rupture in ovariectomized female mice. Equol is known to preferentially bind to estrogen receptor- α . Equol significantly reduced incidence of intracranial aneurysms compared with vehicle (53.3% versus 88.9%, $P=0.047$). Moreover dietary daidzein also significantly reduced incidence of intracranial aneurysms compared with isoflavone-free diet (52.6% versus 87.5%, $P=0.035$). Our data showed that dietary phytoestrogen reduces intracranial aneurysm formation in ovariectomized female mice.

研究分野：脳卒中

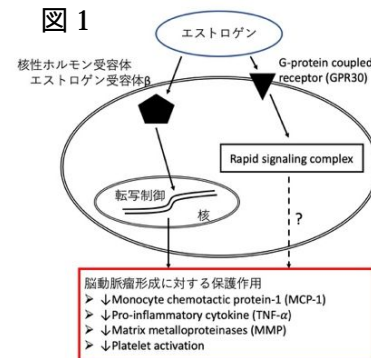
キーワード：植物性エストロゲン 腸内細菌 エストロゲン受容体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 現在高血圧、糖尿病、喫煙など脳動脈瘤形成、破裂のリスク因子が多数報告されているが、疫学調査において閉経前後の女性に脳動脈瘤破裂が多いことからエストロゲンが脳血管に対する保護的な役割を担っている可能性が指摘されている(de Rooij NK et al, J Neurol Neurosurg Psychiatry 2007)。すなわち血管内皮細胞、血管平滑筋細胞に発現するエストロゲン受容体が、内皮型一酸化窒素合成酵素(eNOS)を活性化し NO を産生することにより抗動脈硬化作用を有するとされている(図1)。マウス脳動脈瘤モデルにおいて卵巣摘出後メスマウスはオスマウスより脳動脈瘤発生率が有意に上昇し、一方非卵巣摘出メスマウスはオスマウスと脳動脈瘤発生率は同等であった(Tada Y et al, Neurosurgery 2014, Tada Y et al, Hypertension 2014)。以上よりエストロゲンによる脳動脈瘤の発生抑制効果が期待できることを示唆している。

(2) 植物性エストロゲン(phytoestrogen)は内分泌系より分泌されたエストロゲンではなく、植物に含まれるエストロゲン様活性をもつ外因性エストロゲンを指す。特に我々の身近にある食物で、大豆イソフラボン類の一部である Daidzein はエストロゲン様活性を持つと提唱されている。Daidzein は腸内細菌叢による代謝を受け、活性を変化させた誘導体(Equol)としてエストロゲン受容体に作用すると考えられる。



2. 研究の目的

(1) 植物性エストロゲンの摂取により Equol がエストロゲン受容体 beta (ERbeta) に結合することで脳動脈瘤の発生、破裂に影響する炎症を抑制することを3年の研究期間もしくはそれ以下で検証を行う。植物性エストロゲンを多く含有しているイソフラボン類の一部である Daidzein を経口摂取することで腸内細菌叢により代謝され Equol を生成することからイソフラボンに含まれる植物性エストロゲンを補充することで脳動脈瘤の発生、破裂の抑制へ寄与できることを解明する。マウス脳動脈瘤モデルにて植物性エストロゲンの補充、すなわち腸内細菌叢による植物性エストロゲンの代謝による非侵襲的な脳動脈瘤の発生および破裂予防の開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) Equol の脳動脈瘤形成および破裂抑制効果の検証
Equol 投与群および Vehicle 投与群で脳動脈瘤形成率および破裂率に有意差があるかを検証する。C57/BL6 6週齢メスマウスを用いて片腎および両側卵巣を摘出後よりイソフラボンを含まない食餌を開始する。2週間後より Equol を osmotic pump に充填して皮下に埋め込み持続注入(0.5mg/day)を開始する。さらに1週間後にエラスターゼを髄液脳底槽に注入およびデオキシコルチコステロンを皮下に埋め込み、1%食塩水を飲料水として与えて高血圧を誘導する。その後3週間の観察期間で脳動脈瘤の発生および破裂の評価を行う。

(2) Daidzein による脳動脈瘤形成および破裂率抑制効果の検証
Daidzein 摂取群(0.1% Daidzein)および Isoflavone free diet 摂取群で脳動脈瘤脳動脈瘤形成率および破裂率に有意差があるかを検証する。
C57/BL6 6週齢メスマウスを用いて片腎および両側卵巣を摘出し、Daidzein 摂取する群とイソフラボンを含まない食餌を摂取する群(Isoflavone free diet 群)で開始する。3週間後にエラスターゼを髄液脳底槽に注入し、デオキシコルチコステロンを皮下に埋め込みを1%食塩水を飲料水として与えて高血圧を誘導する。その後3週間の観察期間で脳動脈瘤の発生および破裂の評価を行う。

4. 研究成果

脳動脈瘤の作成に関して再現性の検証を行い、脳動脈瘤発生率は概ね80%前後、破裂率に関しても80%前後と安定した結果を得た(図2)。マウス脳動脈瘤モデルの再現性の検証を終えて本実験を開始とした。

(1) Equol の脳動脈瘤形成および破裂抑制効果の検証

メスマウスはオスマウスに比べて個々の体重が少なく、侵襲のあるエラスターゼ投与後に衰弱するマウスが散見された。当初卵巣摘出から1週間後にエラスターゼの髄腔内投与を検討したがマウスの回復は芳しくないため卵巣摘出後から3週間経過して状態が回復した段階でエラスターゼ投与をするプロトコールとした。また Equol の投与

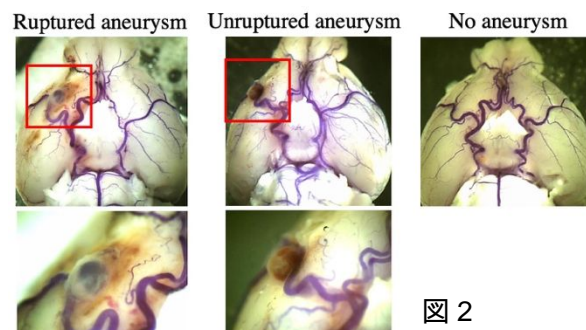


図2

量に関しては過去の文献を参照して行なった。

Equol 投与群(n=15)と vehicle control 群(n=18)での実験にて Equol 群は動脈瘤形成が有意に減少を示した (Equol 群 vs Vehicle 群: 53% vs 89%, $P < 0.05$, 図 3)。ただし脳動脈瘤破裂に関しては有意差は認めなかった (Equol 群 vs Vehicle 群: 61% vs 50%)。

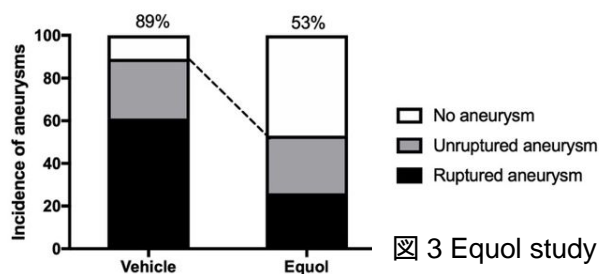


図 3 Equol study

(2) Daidzein による脳動脈瘤形成および破裂率抑制効果の検証
Equol 投与での実験プロトコルを参照して実験を行なった。

Daidzein 摂取群(n=19)は isoflavone free diet 摂取群(n=16)と比較して脳動脈瘤形成が有意に減少を示した (Daidzein 群 vs isoflavone free diet 群: 52% vs 87%, $P < 0.05$, 図 4)。ただし脳動脈瘤破裂に関しては有意差は認めなかった (Daidzein 群 vs isoflavone free diet 群: 70% vs 78%)。

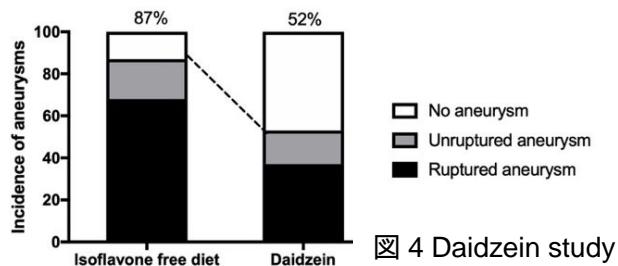


図 4 Daidzein study

Equol 投与により脳動脈瘤の形成を抑制することができ、さらに Equol の前駆物質である daidzein を摂取することで Equol 同様に脳動脈瘤の形成を抑制することを示した。イソフラボンである daidzein が腸内細菌により equol に代謝されることで脳血管への抗炎症効果により脳動脈瘤の形成を抑制したと考えられる。

* 腸内細菌叢の改変によりの脳動脈瘤形成、破裂率に影響を与えるかの検討
バンコマイシン投与により腸内細菌叢を改変させて daidzein の代謝を抑制することが報告されており、バンコマイシンを経口投与することで daidzein の腸内での代謝を抑制し equol の産生を抑えることで脳動脈瘤の形成、破裂が上昇するかどうかを現在実験を行なっている。まずバンコマイシンの経口投与(50mg/kg/day)を行い、腸内細菌叢を抑制することを確認した。抗生物質の効果に関しては便培養を行い確認した。
研究期間内に研究を完成させることができなかったため Daidzein+バンコマイシン投与群と Daidzein+vehicle 投与群で脳動脈瘤形成、破裂率に関して実験を行なっている段階である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 鈴木智	4. 巻 45
2. 論文標題 Prevention Effect of Antiplatelets on Aneurysm Rupture in a Mouse Intracranial Aneurysm Model	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cerebrovascular diseases	6. 最初と最後の頁 180-186
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1159/000487812	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 神尾佳宣	4. 巻 49
2. 論文標題 Roles of nicotine in the development of intracranial aneurysm rupture	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Stroke	6. 最初と最後の頁 2445-2452
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1161/STROKEAHA.118.021706	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 神尾佳宣
2. 発表標題 脳動脈瘤形成における植物性エストロゲンの役割
3. 学会等名 第44回日本脳卒中学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 神尾佳宣
2. 発表標題 Role of nicotine in the development of intracranial aneurysm rupture
3. 学会等名 International Stroke Conference 2017（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 神尾佳宜
2. 発表標題 Role of nicotine in the development of intracranial aneurysm rupture
3. 学会等名 International Stroke Conference 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山崎友裕
2. 発表標題 アスピリンの Maus 脳動脈瘤破裂予防効果
3. 学会等名 第43回日本脳卒中学術集会
4. 発表年 2018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
研究分担者	山崎 友裕 (YAMASAKI Tomohiro) (40781050)	浜松医科大学・医学部附属病院・助教 (13802)	
研究分担者	神尾 佳宜 (KAMIO Yoshinobu) (10829716)	浜松医科大学・医学部・診療助教 (13802)	
研究協力者	橋本 友紀 (HASHIMOTO Tomoki)		