

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K14423

研究課題名(和文) イソフラボン代謝物エコール抱合体は小腸を介して胃排出を遅延し食欲を低下させるか？

研究課題名(英文) Isoflavone metabolite S-equol conjugates decrease food intake accompanied with delayed gastric emptying in female rats

研究代表者

藤谷 美菜 (Fujitani, Mina)

愛媛大学・農学研究科・講師

研究者番号：70737402

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：大豆イソフラボン腸内細菌代謝物エコールは雌特異的にラットの食欲を抑制する。エコールは体循環よりもはるかに多く腸肝循環に存在していること、エコールが腸肝循環しながら数日かけて蓄積されることが食欲抑制作用の発現に必要なことが示された。また、ラットの胆汁中ではエコール4'位グルクロン酸抱合体は雌特異的に存在することがわかった。さらに、卵巣摘出ラットではエコール前駆体・ダイゼイン摂取により胃排出が遅延した。スリーブ状胃切除ラットではエコール摂取による食欲抑制が見られなかった。ラットで雌特異的に存在するエコール4'位グルクロン酸抱合体が胃排出を遅延させることで食欲を抑制する可能性が考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大豆イソフラボンの生理作用について、そのほとんどは体内での作用、特にエストロゲン様作用によって説明されているが、我々の一連の検討の中で、大豆イソフラボン代謝物が腸肝循環しながら小腸と相互作用し、胃排出を遅延させることで食欲を抑制する可能性が示された。大豆イソフラボンのエストロゲン性は場合によっては内分泌攪乱をもたらす可能性が盛んに議論され、安全性の議論は決着していない。本研究でエストロゲンとの作用機構の違いが示唆されたことから、安全性の議論に貢献できるものと考えられる。さらに、本研究の成果は、まだまだ知見の少ない非栄養素と食欲との関わりの解明にも貢献できるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We found that equol, a metabolite of intestinal bacterial conversion from soy isoflavone daidzein, has female-specific anorectic effects. Dietary daidzein increased serum and bile concentrations of equol to far higher levels than those of daidzein. Equol concentration was more than several hundred fold-higher in bile than in serum. Bile concentration of equol 4'-O-glucuronide of female rats were significantly higher than that of male rats, suggesting that equol 4'-O-glucuronide may be involved in the female-specific anorectic effect. Dietary daidzein delays gastric emptying and that it has an anorectic effect with residual gastric contents, but not without gastric contents. Dietary equol significantly decreased daily food intake in the OVX rats without sleeve gastrectomy, but not in those with sleeve gastrectomy, suggesting that the accumulation of food in the stomach is required for the anorectic effect of equol to occur.

研究分野：食品科学

キーワード：大豆イソフラボン 食欲 抱合体 胃排出

1. 研究開始当初の背景

高度肥満の治療法として確立されているのは外科的に胃を小さくする方法のみである。この方法の長期的な効果のメカニズムは未だ解明されておらず、非外科的でより安全な方法の開発が望まれている。我々は、大豆イソフラボン・ダイゼインが雌特異的に食欲を抑制することで体脂肪蓄積を抑制すること、その腸内細菌代謝産物エコールが作用物質であることを見出した。ダイゼインおよびエコールはエストロゲン受容体に弱い親和性を示すことが知られている。しかし、ダイゼインまたはエコールの摂取が雌特異的に食欲を抑制するのに対し、エストラジオールの食欲低下作用は雌よりも内因性エストロゲン分泌の少ない雄でより顕著にみられた。エコールによる食欲低下作用は単純にエストロゲン受容体を介して引き起こされるわけではなく、未知の機構で引き起こされている可能性が示されたため、我々は作用機構解明を目指して研究を続けてきた。

2. 研究の目的

ダイゼインの雌特異的食欲抑制作用の作用物質についてのこれまでの研究から、エコールは体内ではほとんどが抱合体の形で腸肝循環中に存在することが明らかになっている。雌ラットにエコールを混餌投与した場合(150 mg/kg 飼料) 投与開始後数日間には有意な食欲低下がみられなかったことから、この期間に起こる何らかの変化が本効果の発現に重要であることが示唆された。エコールの体内分布の変化を摂取開始から5日目まで調べたところ、エコールは体循環中に比べてはるかに多く腸肝循環中に存在しており、エコールの胆汁中濃度は数日の摂取によって次第に上昇していくことが明らかとなった。さらに、ダイゼインを投与された雌ラットの胆汁をダイゼインが投与されていない雌ラットの十二指腸より注入することで、注入11時間後以降で飼料摂取量が有意に低下した。以上のことから十二指腸における胆汁中エコール抱合体が食欲抑制作用に重要であることが示唆された。しかし、ラット胆汁に含まれるエコール抱合体タイプは不明であったため、本研究では液体クロマトグラフィー - 四重極・飛行時間型質量分析計(LC-Q-TOF-MS/MS)を用い、雌雄のラット胆汁中に存在する主要なエコール抱合体タイプを推測した。抱合反応は主に肝臓と小腸で行われるが、ポリフェノールの抱合反応には雌雄差があることが報告されている。我々の先の研究でも、ダイゼイン摂取ラットで、胆汁中総エコール濃度は雄と比較して雌で約2倍高いことが明らかとなっている。我々は、ラット胆汁中に雌特異的なエコール抱合体が存在し、それが雌特異的食欲低下作用に関与しているかもしれないと考え、主要な胆汁中エコール抱合体濃度を雌雄のラットで比較した。また、エコールの抱合反応への内因性エストロゲンの影響を調べるために、卵巣摘出手術(OVX)によって胆汁中エコール抱合体濃度が変化するかを検討した。

作用機構について、食欲調節の重要な中枢である視床下部の食欲調節因子や、レプチンおよび消化管ホルモンへのダイゼイン摂取の影響を検討してきたが、解明には至っていない。検討を続ける中で、ラットの胃重量を測定したところ、ダイゼイン摂取による有意な増加がみられた。満腹感や胃の膨張によっても引き起こされる。そこで本研究では、ダイゼイン摂取による胃排出への影響、胃排出遅延と食欲低下との関連を明らかにすることを目的とし、エストロゲン欠乏によって過食となる卵巣摘出ラットを用いて以下の実験を行った。まず、摂食時間を制限することで短時間に多くの飼料を摂取できるように訓練したラットで、ダイゼイン摂取によって胃排出が遅延するのかが検討した。そして、多くの視床下部食欲抑制因子は胃排出の調節にも関与していることから、ダイゼイン摂取によって胃排出が遅延する機構を明らかにするため、ダイゼイン摂取による視床下部の食欲調節因子の遺伝子発現への影響を検討した。さらに、ダイゼイン摂取による胃排出遅延と食欲低下の関連性を明らかにするため、スリーブ状胃切除術(約50%切除)を施した卵巣摘出ラットを用いて検討した。

3. 研究の方法

雄、雌、卵巣摘出ラットの胆汁中エコール抱合体の比較

実験 : 6週齢のSD系雌雄ラットを馴化後、コントロール飼料(AIN-76配合に準拠)またはそれにダイゼインを添加したダイゼイン飼料(300 mg/kg 飼料)を自由摂取させ、2週間飼育を行った。その後、胆汁を採取した。胆汁は前処理を行った後、Q-TOF-MS/MSを用いて分析を行いエコール抱合体の同定を行った。その後、特定した抱合体を元に標品を酵素合成し(TOPU バイオ研究所)、LC-TOF-MSを用いて胆汁に含まれるエコール抱合体の定量を行った。

実験 : 6週齢のSD系雌ラットに卵巣摘出(OVX)を施したOVX群と偽手術を行ったsham群に分け、回復後、それぞれの群にコントロール飼料とダイゼイン飼料(150 mg/kg 飼料)を自由摂取させ、4週間飼育を行った(n=8)。その後、胆汁を採取した。胆汁は前処理を行い、LC-TOF-MSを用いてエコール抱合体の定量を行った。

ダイゼインの食欲抑制作用への胃排出遅延の関与についての検討

実験 : 6週齢SD系雌ラットにOVXを施し、3時間制限食(暗期中の3時間のみ摂食可能とした)に十分慣れさせた。コントロール飼料またはダイゼイン飼料(300 mg/kg 飼料)を与え飼育

した。ダイゼインによる有意な食欲抑制作用を確認した後、ラットを1時間の摂食後2時間絶食させ、その間の胃排出量(=飼料摂取量-胃内容物量)を測定した(n=8)。

実験 : 実験と同様の条件で飼育を行い、ダイゼインの有意な食欲抑制作用を確認した。その後21時間絶食させ、3gのコントロール飼料を与え、摂取開始0、15、30、60、120、180分後の血糖値を測定した(n=8)。

実験 : 6週齢のSD系雌ラットにOVXを施し、摂食パターンを揃えるため2食制(1日2食各1時間、食間2時間)に十分慣れさせた。コントロール飼料またはダイゼイン飼料(300mg/kg飼料)で飼育した。ダイゼインによる有意な食欲抑制作用を確認した後、2食目食中に解剖し、視床下部食欲調節因子の遺伝子発現を測定した(n=8)。

実験 : 6週齢のSD系雌ラットにOVXのみ、またはOVXとスリーブ状胃切除術(約50%切除)を施した。スリーブ状胃切除ラットにはマイシリジブル(0.05ml/rat/day、明治製菓株式会社)を筋肉注射し、胃酸分泌抑制剤プラゾシン(10mg/ml)を皮下投与した。24時間絶食絶食させた後、5%のグルコース溶液を24時間のみ自由摂取させた。その後、コントロール飼料を与えて8日間回復させた後、コントロール飼料またはそれにエコールを添加したエコール飼料(150mg/kg飼料)を与え7日間飼育した。

これらの動物実験は、愛媛大学動物実験委員会での審査を経て愛媛大学学長に承認されたのちに実施された。

4. 研究成果

飼料摂取量は雌において卵巣の有無にかかわらずコントロール群に比べダイゼイン群で有意に減少した。一方、雄では有意な差は見られなかった。雌雄ラット胆汁中に含まれるエコール抱合体と総エコールの定量を行ったところ、エコール4'位グルクロン酸抱合体が雌ラット胆汁中に特異的に多量に存在しており、総エコールも雌では雄に比べ多く存在していることが明らかとなった。また、OVX群とsham群でエコール抱合体の濃度に差は見られなかった(屋敷ら、第13回日本ポリフェノール学会、2019)。ダイゼインを摂取したラットで雌特異的に見られる食欲抑制作用には胆汁中に雌特異的に含まれるエコール4'位グルクロン酸抱合体が関与している可能性が考えられた。

コントロール群に比してダイゼイン群の胃排出量が有意に減少した(Adhikariら、Biosci Biotechnol Biochem、2020)。また、胃排出測定日の1時間飼料摂取量にダイゼイン摂取による有意な影響はなかった。さらに、食餌負荷後の血糖上昇曲線下面積でもコントロール群に比してダイゼイン摂取群で有意な低下が見られた。以上のことからダイゼインの摂取は胃排出を遅延させることが示された。2食制で飼育した場合には、ダイゼイン摂取によって2食目後半の40分間でのみ飼料摂取量が有意に減少した。2食目食中の視床下部において、食欲抑制および胃排出遅延作用を持つurocortin mRNAが有意に増加した。その他の視床下部食欲調節因子の遺伝子発現には有意な変化はみられなかった。ダイゼイン摂取による胃排出遅延と食欲低下の関連性を明らかにするため、スリーブ状胃切除術(約50%切除)を施した卵巣摘出ラットを用いて検討したところ、エコール摂取により血中エコール濃度は上昇したにもかかわらず、飼料摂取量の有意な減少は見られず、胃内容物貯留能を失った状態ではエコールは食欲低下を引き起こさないことが示された(Adhikariら、Biosci Biotechnol Biochem、2020)。これらの結果は、ダイゼイン摂取による食欲低下作用は胃排出の遅延に起因するという仮説を支持するものである。また、本作用に視床下部urocortinが関与することが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sudhashree Adhikari, Keshab Bhattarai, Yasuhiro Abe, Mayu Kira, Mina Fujitani, Tomihiro Miyada and Taro Kishida	4. 巻 84
2. 論文標題 Dietary daidzein decreases food intake accompanied with delayed gastric emptying in ovariectomized rats	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1232-1238
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/09168451.2020.1723404.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mina Fujitani, Takafumi Mizushige, Keshab Bhattarai, Sudhashree Adhikari, Junji Ishikawa and Taro Kishida	4. 巻 40
2. 論文標題 Dietary daidzein induces accumulation of S-equol in enterohepatic circulation to far higher levels than that of daidzein in female rats with and without ovariectomy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biomedical research.	6. 最初と最後の頁 97-105
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2220/biomedres.40.97.	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 藤谷美菜, 水重貴文, 岸田太郎	4. 巻 9
2. 論文標題 大豆イソフラボンの雌特異的食欲抑制作用	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本ポリフェノール学会雑誌	6. 最初と最後の頁 29-34
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 屋敷 哲良, 小林 拓広, 吉良 真結, 藤谷 美菜, 岸田 太郎
2. 発表標題 卵巣摘出ラットにおいてダイゼイン摂取は非空腹時の食欲を低下させ、視床下部 urocortin 遺伝子発現を増加させる
3. 学会等名 第73回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 アディカリ スダスリ、 パッタライ ケシャブ、 藤谷 美菜 、 岸田 太郎
2. 発表標題 ダイゼイン摂取は高脂肪/高スクロース食で飼育した卵巢摘出ラットの空腹時血糖値を低下させ、 肝臓PGC1 および小腸粘膜プレグルカゴンの遺伝子発現を増加させる
3. 学会等名 第13回日本ポリフェノール学会 第16回日本カテキン学会 合同学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 屋敷 哲良、 吉良 真結、 鈴木 遥、 藤谷 美菜、 岸田 太郎
2. 発表標題 ダイゼイン腸内細菌代謝産物エコールによる雌特異的食欲抑制作用の機構解明 -エコール4'位グルクロン酸抱合体は雌特異的にラット胆汁中に存在する-
3. 学会等名 第13回日本ポリフェノール学会 第16回日本カテキン学会 合同学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉良 真結、 屋敷 哲良、 鈴木 遥、 藤谷 美菜、 岸田 太郎
2. 発表標題 大豆イソフラボン・ダイゼイン摂取は卵巢摘出ラットの食欲と胃排出を抑制し、 視床下部urocortin遺伝子発現を増加させる
3. 学会等名 第13回日本ポリフェノール学会 第16回日本カテキン学会 合同学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小林拓広、 阿部恭大、 吉良真結、 藤谷美菜、 岸田太郎
2. 発表標題 ダイゼイン摂取による雌ラット特異的食欲抑制作用の機構解明-食欲抑制作用を示すエコール抱合体の探索-
3. 学会等名 第72回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉良真結, 阿部恭大, 小林拓広, 藤谷美菜, 岸田 太郎
2. 発表標題 雌ラットにおいてダイゼイン摂取は胃内容排出 の遅延を介して食欲を抑制するのか?
3. 学会等名 第72回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 屋敷哲良, 小林拓広, 吉良真結, 藤谷美菜, 岸田太郎
2. 発表標題 ダイゼイン腸内細菌代謝物エコールの雌特異的食欲抑制作用の機構解明-エコール4'位グルクロン酸抱合体は雌特異的にラット胆汁中に存在する-
3. 学会等名 第51回日本栄養・食糧学会 中国・四国支部大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石田彩華, 屋敷哲良, 鈴木遥, 藤谷美菜, 岸田太郎
2. 発表標題 大豆イソフラボン・ダイゼインの摂取は視床下部Urocortin遺伝子発現を増加させ、胃内容排出が遅延し食欲を低下させる
3. 学会等名 第53回日本栄養・食糧学会中国・四国支部
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Sudhashree Adhikari, Keshab Bhattarai, Mina Fujitani, Masao Sato, Taro Kishida
2. 発表標題 Dietary Daidzein Lowered The Serum Cholesterol Level Via Changing The Gene Expression Associated With Cholesterol Metabolism on Female SD Rats.
3. 学会等名 Asian Congress of Nutrition 2019. (国際学会)
4. 発表年 2019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
---------	---------