

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：32658

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K24321

研究課題名(和文) エクオール鏡像異性体の骨代謝制御メカニズムの解明と有効性評価

研究課題名(英文) Study of regulatory mechanisms of bone metabolism by equol enantiomers

研究代表者

田中 未央里 (TANAKA, Miori)

東京農業大学・応用生物科学部・助教

研究者番号：00845505

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ダイゼイン代謝産物であるエクオールの各鏡像異性体が骨代謝に及ぼす影響について、培養細胞ならびに動物モデルを用いて比較検討を行った。培養細胞において、エクオール鏡像異性体は破骨細胞分化を抑制し、特にS体で強い作用を示すことを見出した。そのメカニズムとしてNF- κ B, MAPK, NFATc1の活性化を抑制すること、S体のみ破骨細胞のアポトーシスを促進することを明らかにした。また閉経後骨粗鬆症モデルマウスにおいて、S体の投与により骨量減少が抑制され、血中及び組織中のエクオール濃度はR体と比較してS体で高値を示すことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

エクオールと骨疾患の関連については複数の疫学研究、動物実験がなされているものの、先行研究は全てS体に着目しており、S体とR体の比較検討を行った研究はない。本研究では、エクオール鏡像異性体の骨疾患に対する有効性及び安全性を比較することを目的とし、さらに詳細な作用機序を明らかにすることで、食品因子による骨疾患予防・改善メカニズムに新たな知見をもたらすものとする。要介護の主要因である骨疾患の予防を目指す新たな食生活スタイルを提案することは、QOL向上や医療費削減等にも繋がるため、社会的意義は非常に大きい。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to compare the properties of equol enantiomers on osteoclast formation and underlying molecular mechanisms in vitro. We also investigated the comparative effects of equol enantiomers on bone fragility in OVX mice. In the cell experiments, we demonstrated that equol enantiomers inhibited osteoclast differentiation, and (S)-equol had a stronger effect than (R)-equol. Additionally, (S)-equol induced apoptosis of mature osteoclasts and osteoblast differentiation. In the animal experiments, (S)-equol suppressed bone loss and femoral osteoclastic gene expression in OVX mice. We also found that the concentrations of (S)-equol were clearly increased in serum, tibia, liver, and kidney compared to those of (R)-equol.

研究分野：食品機能学

キーワード：エクオール 骨代謝 破骨細胞 骨芽細胞 炎症 アポトーシス 骨粗鬆症

1. 研究開始当初の背景

超高齢社会を迎えた日本をはじめとする世界各国では、骨粗鬆症、関節リウマチなどの骨疾患の予防が喫緊の課題となっている。骨の恒常性は骨芽細胞による骨形成、破骨細胞による骨吸収のバランスによって保たれており、この「骨リモデリング」が破綻して骨吸収が亢進することで、様々な骨疾患の発症に繋がる。

ポリフェノール的一种である大豆イソフラボン類は、女性ホルモンのエストロゲンと類似した構造を有し、エストロゲン受容体に結合して様々な生理作用を発揮する。主要イソフラボンのダイゼインは、腸内細菌によりエストロゲン活性がより強いエクオールに代謝され、疫学研究ではエクオール産生者による骨粗鬆症予防効果が報告されている (Wu J, *Menopause*, 2007)。また我々はこれまでに、骨粗鬆症モデル動物のエクオール産生能向上による骨量減少抑制効果を明らかにしている (Uehara M, *J Clin Biochem Nutr*, 2013)。

マウスやラットではほぼ全ての個体がエクオール産生菌を保有する一方、ヒトでは約30~50%のみがエクオール産生者であると報告されている。そのためエクオール非産生者は、腸内細菌を変化させてエクオール産生能を高める、エクオールをサプリメントで摂取するといった方法で骨疾患を予防・改善できる可能性がある。については我々の報告や他の先行研究において、イソフラボンと難消化性のオリゴ糖もしくはでんぷんの併用摂取によりエクオール産生能を高められることが動物レベルで示されているが、エクオール非産生者のヒトでの効果は認められていない。したがって、のエクオール摂取が最も簡便かつ広く効果が期待できる方法だと考えられる。

エクオールには、鏡像異性体のS体とR体が存在する。生体内で産生されるのはS体のみとされていること、ラセミ体の各鏡像異性体への分離、製品化が遅れていたことから、R体が骨代謝に及ぼす影響を検討した研究は存在せず、S体及びR体の骨疾患に対する有効性、安全性の比較検討については、細胞、動物、ヒトのいずれの段階でも行われていない。

2. 研究の目的

そこで本研究では、エクオール鏡像異性体が骨代謝に及ぼす影響と詳細な分子メカニズムを解明するとともに、生体内での効果を比較することを目的とした。細胞実験では、破骨細胞及び骨芽細胞に対するエクオール鏡像異性体の影響の差異を検討し、詳細な作用機序を明らかにする。さらに骨粗鬆症モデル動物を用いて、エクオール鏡像異性体の生体内での有効性、安全性について比較検討を行う。

3. 研究の方法

(1) エクオール鏡像異性体の骨代謝制御メカニズムの検討 (培養細胞レベルでの検討)

エクオール鏡像異性体が破骨細胞分化に及ぼす影響の検討

8週齢 ddY 雄マウスから採取した骨髄細胞 (BMC)、マウスマクロファージ細胞 RAW 264.7 を活性型ビタミン D₃ または RANKL 刺激により破骨細胞に分化させ、同時に(S)-エクオール、(R)-エクオールを添加した。破骨細胞数を酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ (TRAP) 染色にて測定した。また破骨細胞分化関連因子 (TRAP, Ctsk, NFATc1, OSCAR, DC-STAMP, OC-STAMP) の mRNA 及びタンパク質発現量、骨吸収シグナル伝達経路 (MAPK, NFκB, NFATc1) の活性化を検討した。さらにエストロゲン受容体 (ER) の阻害剤がエクオールの作用に及ぼす影響を検討した。

エクオール鏡像異性体が破骨細胞のアポトーシスに及ぼす影響の検討

分化済みの成熟破骨細胞に(S)-エクオール、(R)-エクオールを処理し、12時間後の破骨細胞数を測定した。またアポトーシス関連因子 (Bax, Bcl-2, caspase-3) の mRNA 及びタンパク質発現量、caspase-3/7 活性を測定した。

エクオール鏡像異性体が骨芽細胞分化に及ぼす影響の検討

マウス骨芽前駆細胞 MC3T3-E1 を分化誘導培地で骨芽細胞に分化させ、同時に(S)-エクオール、(R)-エクオールを添加した。分化、石灰化への影響をアルカリ性ホスファターゼ (ALP) 活性測定及びアリザリンレッド染色にて検討した。

(2) エクオール鏡像異性体が閉経後骨粗鬆症モデルマウスに及ぼす影響の検討

エクオール鏡像異性体が骨代謝に及ぼす影響と安全性の検討

8週齢 ddY 雌マウスに偽手術 (Sham) または卵巣摘出術 (OVX) を施し、閉経後骨粗鬆症モデルである OVX マウスを作製した。エクオール鏡像異性体の生体内での効果を比較検討するため、OVX マウスに(S)-エクオール、(R)-エクオール、ラセミ体エクオールを皮下投与し、4週間飼育した。大腿骨における骨密度、骨吸収関連因子 (TRAP, Ctsk, NFATc1, RANKL) の mRNA 発現量を測定した。また、安全性の指標として子宮重量と甲状腺ホルモン濃度を測定した。

エクオール鏡像異性体の組織分布の検討

各鏡像異性体の組織分布を検討するため、血清、脛骨、肝臓、腎臓、脾臓、脳を採取し、脱抱合処理を行った後、キラルカラムを用いた HPLC 法にて(S)-エクオール、(R)-エクオールの濃度

を測定した。

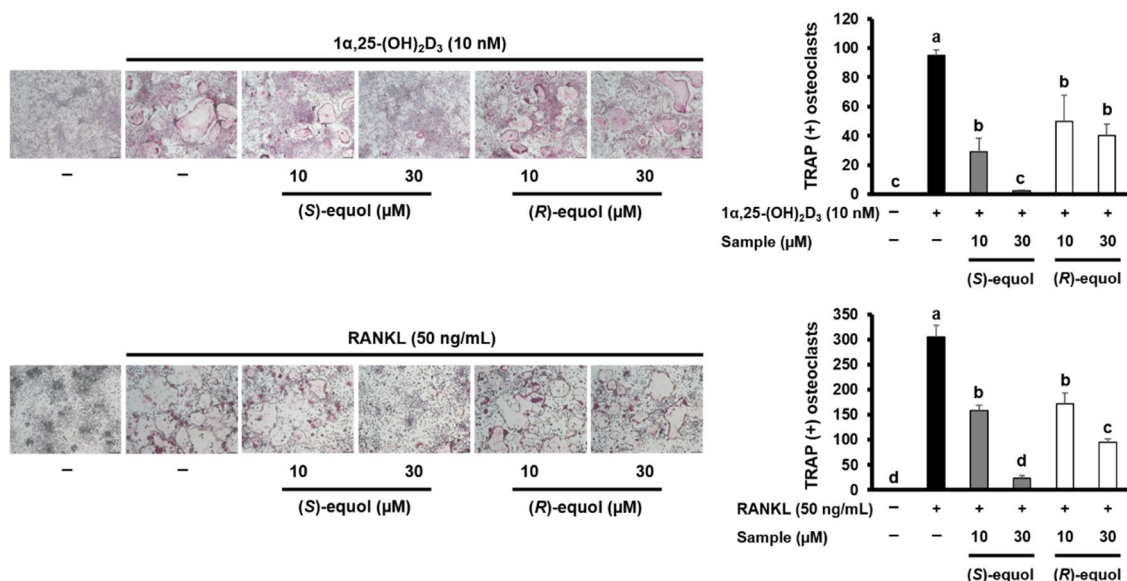
4. 研究成果

(1) エクオール鏡像異性体の骨代謝制御メカニズムの検討 (培養細胞レベルでの検討)

BMC 及び RAW 264.7 における破骨細胞数は、活性型ビタミン D₃ または RANKL 刺激で増加したが、(S)-エクオールまたは(R)-エクオール (10, 30 μM) 添加により減少した (図 1)。30 μM では、R 体と比較して S 体で強い抑制作用を示した。また破骨細胞分化関連因子 (TRAP, Ctsk, NFATc1, OSCAR, DC-STAMP, OC-STAMP) の mRNA 及びタンパク質発現もエクオール鏡像異性体添加で抑制された。詳細な作用機序検討のため、破骨細胞分化に關与する骨吸収シグナル伝達経路の活性化に対する影響を western blot 法にて検討した結果、JNK 1/2 及び NFκB のリン酸化、NFκB 及び NFATc1 の核移行がエクオール鏡像異性体により抑制されたことから、MAPK/NFκB/NFATc1 経路の抑制が關与している可能性が示された。また ER 阻害剤で処理した場合においても、エクオール鏡像異性体の破骨細胞分化抑制作用が一部阻害された。

R 体と比較して S 体で強い破骨細胞分化抑制作用が示された一方で、骨吸収シグナル伝達経路に対する影響は、S 体及び R 体間で差がみられなかった。エストロゲンは破骨細胞のアポトーシスを促進すること、破骨細胞では ERα よりも ERβ が強く発現し、(S)-エクオールは ERβ への親和性が高いことから、(S)-エクオールは ER を介して破骨細胞のアポトーシスをより促進している可能性があると考え、検討を行った。その結果、成熟破骨細胞において S 体のみ生存率を低下させ、アポトーシス関連因子である caspase-3/7 の活性を増強することを明らかにした。

さらにエクオール鏡像異性体が骨芽細胞分化に及ぼす影響をアリザリンレッド染色にて検討した結果、(S)-エクオールは骨芽細胞の分化、石灰化を亢進する一方で、(R)-エクオールによる効果はみられないことを明らかにした。骨形成マーカーである ALP 活性に対する影響は S 体及び R 体共に認められなかった。これらの結果から、(S)-エクオールは骨吸収抑制のみならず骨形成促進においても、(R)-エクオールよりも強い作用を有する可能性を示した。



【図 1】エクオール鏡像異性体が破骨細胞分化に及ぼす影響

(2) エクオール鏡像異性体が閉経後骨粗鬆症モデルマウスに及ぼす影響の検討

(S)-エクオール、(R)-エクオール、ラセミ体エクオールを 4 週間皮下投与した OVX マウスにおいて、S 体は OVX による大腿骨の骨密度低下を抑制したが、R 体及びラセミ体の骨量減少抑制効果は認められなかった。大腿骨における骨吸収関連因子 (TRAP, Ctsk, NFATc1, RANKL) の遺伝子発現についても、S 体投与群のみで改善がみられたことから、(S)-エクオールは細胞レベルに加えて動物レベルでも、(R)-エクオールと比較して高い骨吸収抑制作用を有することを明らかにした。また、子宮重量及び甲状腺ホルモン濃度を測定し、各鏡像異性体の安全性について重大な影響がみられないことを示した。

血中及び組織中のエクオール濃度を測定した結果、血清、脛骨、肝臓、腎臓において、R 体投与群と比較して S 体投与群で高値を示した。ラセミ体投与群の血清、脛骨、肝臓、腎臓、脾臓でも、S 体の濃度が R 体よりも高くなることを明らかにした。本研究では皮下投与を行っていることから、各鏡像異性体の組織蓄積量の差は、吸収の差ではなく腸肝循環中の再吸収時の脱抱合割合の差によるものである可能性が考えられた。こうした体内動態の違いについても、(S)-エクオールの高い骨量減少抑制効果に寄与している可能性を見出した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田中未央里、井上博文、高橋信之、石見佳子、上原万里子
2. 発表標題 エクオール鏡像異性体による破骨細胞分化抑制メカニズムの検討
3. 学会等名 第74回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田中未央里、井上博文、高橋信之、石見佳子、上原万里子
2. 発表標題 エクオール鏡像異性体の骨代謝制御作用に関する検討
3. 学会等名 2020年度日本フードファクター学会・日本農芸化学会西日本支部合同大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田中未央里、井上博文、高橋信之、石見佳子、上原万里子
2. 発表標題 破骨細胞分化に対するエクオール鏡像異性体の影響と作用機序の解明
3. 学会等名 第18回日本機能性食品医用学会総会
4. 発表年 2020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
---------	---------