

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：23803

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20H04109

研究課題名（和文）食餌由来ステロイドの腸内細菌異化代謝でステロイドホルモン様分子を産生する

研究課題名（英文）Intestinal bacterial catabolic metabolism of dietary steroids produces steroid hormone-like molecules

研究代表者

三好 規之（Miyoshi, Noriyuki）

静岡県立大学・食品栄養科学部・准教授

研究者番号：70438191

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,400,000円

研究成果の概要（和文）：自然薯（*Dioscorea japonica*）はヤマノイモ属の一種で、自然薯のような食用のヤマノイモ属品種をヤマイモとよぶ。我々は人々の健康に貢献してきた重要な食文化である「自然薯とろろ汁」の機能性に関する解析を実施し、有効成分ジオスゲニンが、大腸がん予防効果や抗糖尿病活性、脂質代謝改善作用を示すことを報告してきた。本研究では、消化管微生物代謝によって内因性ホルモン様物質へ変換される可能性を検討したが、その活性を確認することはできなかった。一方で、ジオスゲニンがステロイドホルモン合成に及ぼす影響を検討したところ、いくつかのステロイドホルモン合成に影響を及ぼす可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では検出できたステロイドホルモンがごくわずかと限られていたことからあり、diosgeninの機能性によるステロイドホルモン合成遺伝子発現への影響およびホルモンの分泌に与える影響の解明には不十分な結果である。そのため、Y1細胞に対するステロイドホルモン合成遺伝子の強制発現や、主要な副腎皮質酵素をすべて発現しているヒト由来の副腎細胞株NCI-H295Rへのdiosgenin曝露試験など、複数の副腎細胞を利用し、*in vitro*におけるdiosgeninの機能性を評価することが今後、diosgeninの詳細な機能性を解明するために実施すべきことであると示唆された。

研究成果の概要（英文）：The yam (*Dioscorea japonica*) is a member of the yam genus, and edible yam varieties such as yam are called yam. We have analyzed the functionality of yam soup, an important food culture that has contributed to people's health, and reported that the active ingredient diosgenin has preventive effects against colon cancer, anti-diabetic activity, and lipid metabolism improvement. In this study, we investigated the possibility that diosgenin is converted into an endogenous hormone-like substance by microbial metabolism in the gastrointestinal tract, but were unable to confirm its activity. On the other hand, we examined the effect of diosgenin on steroid hormone biosynthesis and suggested that it may affect the synthesis of several steroid hormones.

研究分野：栄養学および健康科学

キーワード：ステロイドホルモン 腸内細菌代謝 LC-MS

1. 研究開始当初の背景

自然薯 (*Dioscorea japonica*) はヤマノイモ属の一種で、自然薯のような食用のヤマノイモ属品種をヤムイモとよぶ。我々は、人々の健康に貢献してきた重要な食文化である「自然薯とろろ汁」の機能性に関する解析を実施し、有効成分ジオスゲニンが、大腸がん予防効果や抗糖尿病活性、脂質代謝改善作用を示すことを報告してきた。ジオスゲニンは、ステロイド側鎖にスピロ環を有するステロイドサポゲニンであり、植物体内では配糖体(サポニン)のジオシンとして存在している。自然薯のジオスゲニン含有量は非常に少なく、乾燥品 1 kg あたり 64 mg (0.0064% w/w) 程度である。しかし、最近我々は「自然薯むかご」の特に皮層部にジオスゲニンが高含有されていることを見出した(自然薯の約 50 倍)。カレーの香辛料に使用されるフェヌグリークは自然薯の 100 倍程度、メキシコ産ヤムイモ (*D. composita*)、東南アジア産ヤムイモ (*D. esuclenta*)、生薬のツクバネソウ (*Paris polyphylla*) などは自然薯の 1,000 倍程度のジオスゲニンを含有している。ジオスゲニンの機能性については、認知機能改善作用や、インスリン感受性改善作用、骨格筋重量増加作用(抗口コモ活性)なども報告されている。これらの実験で重要なことは、消化管を経由する経口投与実験のほうが消化管を経由しない腹腔内投与実験よりも投与量が少ない(有効濃度が低値)ということである。我々の報告においても、非常に低濃度(ジオスゲニン混餌 20~500 ppm)の経口投与で顕著ながん予防、抗糖尿病・抗高脂血症効果を見出している。つまり、ジオスゲニンが消化管を通過することで生理活性が強烈に増強されることを示唆している。興味あることに、糸状菌(真菌)の一種 *Fusarium oxysporum* がジオスゲニンを内因性ステロイドホルモンの一つであるデヒドロエピアンドロステロン(DHEA)に代謝変換されることが指摘されている。DHEA は、老化や糖尿病など病態の進行に伴い血中濃度が低下するが、実験動物への投与により病態改善作用を示すことが報告されているため、アンチエイジングの若返りホルモンなどと巷で謳われている。しかし、ジオスゲニンが微生物代謝で DHEA、あるいはそれに匹敵する強活性の代謝物に変換されるかどうか、直接的な根拠は示されておらず真偽は不明である。そこで本申請課題では、消化管微生物代謝によって DHEA など内因性ホルモン様物質へ変換される可能性と、ステロイドホルモン生合成に及ぼす影響を検討した。

2. 研究の目的

ジオスゲニンが、内因性ステロイドホルモンと同一あるいは類似の分子へ変換される根拠を明確に提示できれば、生体調節や食事成分の代謝を理解するうえで重要な微生物種の新規機能にスポットライトを当てるパラダイムシフトの可能性を秘めている。ヒト共生細菌 2,430 種(原核生物)のメタゲノム解析より、44,000 の低分子化合物生合成遺伝子クラスターが見出されているが、そのうち少なくとも 3,118 の遺伝子クラスターは機能未知である(*Cell* 2014, **158**, 1402-1414)。それゆえ、本研究の方法論を、他のステロイド化合物、例えば強い生理活性を示すことが報告されている生薬や香辛料のサポニンなどに適用し研究を拡大することで、微生物叢の(機能未知)遺伝子が制御する代謝物・生成経路・作用部位の新規同定など、食品科学・創薬・医療の分野で大きな貢献が期待できる。

3. 研究の方法

ジオスゲニン異化代謝の可能性が示唆されている *F. oxysporum* Schlechtendal f sp. *lini*

(MAFF305120)を農研機構バンク(NARO)より入手した。

マウス副腎皮質腫瘍細胞株 Y1 はステロイド産生能を持っており、*in vitro* でのホルモン産生および分泌の研究に用いられている。理化学研究所バイオリソース研究センターより購入した。Y1 細胞は、10% FBS を添加した RPMI-1640 培地で増殖させ、37°C、5% CO₂ のインキュベーターにて培養した。Y1 細胞を 5.0×10^4 cells/ml で 6 well plate に播種し、前培養を行った。次に MeOH にて溶解させた diosgenin (5, 10 μM) を 3 h もしくは 6 h 曝露した (Dio5_3 h 群, Dio5_6 h 群, Dio10_3 h 群, Dio10_6 h 群)。その後、RNA 抽出を行い、遺伝子発現解析に供した。なお、cntr 群には vehicle として MeOH (0.1%) を使用し、対照群 (cntr_3 h 群, cntr_6 h 群) とした。また、Y1 細胞を 5.0×10^4 cells/ml で 6 well plate (遺伝子発現解析) および 100 mm dish (ステロイドホルモン分析) に播種、前培養を行い、cAMP (50 μM) および diosgenin (0, 5, 10 μM) を細胞へ 8 時間曝露した (cAMP50 群, cAMP50+Dio5 群, cAMP50+Dio10 群)。その後、各分析のための処理を行い、遺伝子発現解析および機器分析に供した。なお、すべての実験において vehicle として MeOH (0.1%) を使用し、対照群 (Cntr 群) とした。

遺伝子発現解析においては、Y1 細胞へ cAMP および diosgenin 曝露後、培地を除去し、PBS で 2 回洗浄後、RNAiso plus を用いて RNA を抽出した。Prime script RT Master Mix (Invitrogen) を用いて cDNA を調製し、RT-qPCR による遺伝子発現解析を行った。House keeping 遺伝子として glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を用いた。

UPLC-APCI-QQQ-MS を用いた Y1 細胞産生ステロイドホルモン分析においては、細胞に必要な処理を行った後、細胞上清を 50 ml 遠沈管に回収した。細胞が接着した dish には 100 % MeOH 2ml を加え、セルスクレーパーで細胞を剥がしたのち、細胞上清を回収した 50 ml 遠沈管に回収した。なお、この操作を 2 回繰り返した。さらに、ステロイドホルモンは脂溶性ホルモンであることから、酢酸エチルを加え抽出を行った。15 ml 遠沈管に回収した有機層を遠心エバポレーターで減圧乾固し、10 μM prednisone (PDNS) を含む 1.0 % FA in MeOH (100 μl) を加え、超音波破碎機で完全に溶解した。遠心分離し、上清をインサートに移し、UPLC-APCI-QQQ-MS に供した。

4 . 研究成果

ジオスゲニン異化代謝の可能性が示唆されている *F. oxysporum* Schlechtendal f sp. *lini* (MAFF305120) を農研機構バンク (NARO) より入手し、LC-MS にてジオスゲニンの異化代謝を検討したが、その活性を確認することができなかった。

そのため、Diosgenin 経口摂取による血糖値および分泌ステロイドホルモンへの影響を検討した。Diosgenin は抗糖尿病予防効果を有していると既に報告されていることから、予備検討として streptozotocin (STZ) 誘導性糖尿病を発症したマウス (対照群には STZ の代わりに 0.9 % 生理食塩水を尾静脈投与した) に対して、diosgenin を経口投与し、糖尿病による血糖値上昇およびステロイドホルモン分泌への影響を検討した。なお、STZ または生理食塩水投与 1 週間後より、通常食 (AIN-93M) および diosgenin 100、500 ppm 混餌食を与え、それぞれ、cntr_D₀ 群、cntr_D₅₀₀ 群、STZ_D₀ 群、STZ_D₁₀₀ 群、STZ_D₅₀₀ 群とした。血糖値は ACCU-CHECK Aviva を使用して空腹時血糖 (絶食時間 17~22 h) を、STZ または生理食塩水投与後 1 週目および 5 週目に測定したところ、1 週間後の測定により、STZ 群マウスは糖尿病を発症したと判断した (空腹時血糖値 300 mg/dl 以上)。その後、diosgenin (100、500 ppm) 混餌食を与えたところ、STZ_D₀ 群と比較して、STZ_D₅₀₀ 群では、空腹時血糖値が有

意に低下した。このことから、diosgenin の持続的摂取は生体内における糖質代謝に影響を与え、血糖値上昇を抑制することが示唆された。また、マウス解剖時に下大静脈より採血した血液に含まれるステロイドホルモンを UPLC-APCI-QQQ-MS 分析に供したところ、STZ 群は cntr 群と比較して corticosterone (CSR) 、 11-deoxycortisol (DeCSL) 、 cortisol (CSL) の血中レベルが糖尿病発症により上昇した。一方、STZ_D100 群および STZ_D500 群では diosgenin 摂取により control 群と同程度まで減少した。このことから、糖尿病発症により上昇した糖質コルチコイドの血中レベルが、diosgenin の持続的摂取により糖尿病改善を経て、低下したことが示唆された。したがって、動物実験において、diosgenin は血糖値上昇抑制による糖尿病症状改善を誘導し、血中におけるステロイドホルモン、特に糖代謝に関わる糖質コルチコイドの分泌に影響を及ぼし、その分泌を抑制させることが示唆された。しかし、現段階では、diosgenin が及ぼす糖質コルチコイド分泌抑制の詳細なメカニズムは解明されていない。このことから、糖質コルチコイドをはじめとするステロイド産生能を有するマウス副腎皮質腫瘍細胞由来の Y1 細胞を用いて、*in vitro* における diosgenin 曝露試験を行った。また、ステロイドホルモン生成に関与する cAMP と diosgenin の共曝露試験を行うことで、diosgenin のステロイドホルモン生成に対する影響および cAMP 存在下における diosgenin のステロイドホルモン生成に対する影響を検討した。なお、曝露試験後はステロイドホルモン産生に関わる酵素の遺伝子発現解析および LC-MS によるステロイドホルモン分泌量分析を行った。

Diosgenin によるステロイドホルモン産生遺伝子発現への影響

本研究では diosgenin によるステロイドホルモン産生遺伝子発現への影響を評価するために、ステロイド合成律速因子である cholesterol 輸送タンパク質 StAR、ステロイド産生因子-1 (SF-1) cholesterol 側鎖切断酵素 (CYP11A1) 3 β -hydroxysteroid 脱水素酵素 (HSD3) 17 α -水酸化酵素 (CYP17A1) 21-水酸化酵素 (CYP21A1) および 11 β -水酸化酵素 (CYP11B1, CYP11B2) の mRNA 発現量を比較した。その結果、Y1 細胞に対する diosgenin を単独曝露では、曝露時間に関わらず、StAR、SF-1、CYP11A1 の遺伝子発現に有意な差は生まれなかった。また、そのほかの遺伝子は発現量が極めて少なく、本研究においては検出限界以下であった。

cAMP は、アデニル酸シクラーゼより、ATP から合成されるセカンドメッセンジャーであり、細胞内においてプロテインキナーゼ A (cAMP 依存性プロテインキナーゼ A; PKA) を活性化し、細胞内応答を引き起こすとされている。本研究で使用した副腎皮質腫瘍細胞においては、プロテインキナーゼ A の活性化に伴う、細胞内におけるステロイドホルモン産生に関わる遺伝子の発現を制御するという応答を引き起こすと考えられる。そこでステロイドホルモン合成に関わる遺伝子発現への cAMP および diosgenin の影響を評価するために、StAR、SF-1、CYP11A1、HSD3、CYP17A1、CYP21A1、CYP11B1、CYP11B2 の mRNA 発現量を比較した。その結果、StAR、SF-1 および CYP11A1 の遺伝子発現量は、cAMP (50 μ M) 曝露により cntr 群と比較して上昇した。したがって、曝露した cAMP が細胞膜に取り込まれたことにより、cAMP 依存性 PKA の活性化を介した StAR および SF-1 の遺伝子発現が上昇したことが示唆された。さらに、SF-1 の遺伝子発現の上昇により、ミトコンドリア内における cholesterol から pregnenolone への変換を触媒する酵素 CYP11A1 の遺伝子発現が上昇することが示唆された。また、cAMP (50 μ M) および diosgenin (5、10 μ M) の共曝露によって、StAR および SF-1 の遺伝子発現量は、cAMP 単曝露群と比較して変化しなかった。一方で、CYP11A1 の遺伝子発現量は、diosgenin (5 μ M) 曝露により cntr 群と同程度まで減少す

る傾向にあり、さらに diosgenin (10 μ M) 曝露により、CYP11A1 の遺伝子発現量は cntr 群と同程度まで有意に減少した。したがって、diosgenin を曝露することにより、cAMP/PKA 経路を介した CYP11A1 の遺伝子発現上昇は抑制され、細胞内膜からミトコンドリア内に取り込まれた cholesterol の側鎖切断反応が抑制されたことが示唆された。そのほか、pregnenolone を progesterone に変換する HSD3 β 、corticosterone から aldosterone に変換する CYP11B2 の遺伝子発現量が diosgenin (10 μ M) 曝露により有意に上昇した。このことから、diosgenin 曝露により、diosgenin のステロール骨格に特異的な反応を示し、HSD3 β および CYP11B2 の遺伝子発現が上昇したことが示唆された。

1 細胞におけるステロイドホルモン産生・代謝に対し cAMP (50 μ M) および diosgenin (0, 5, 10 μ M) が与える影響を検討するために、Y1 細胞に cAMP および diosgenin を曝露した。抽出したステロイドホルモンを UPLC-MS/MS 定量分析に供した。検出された pregnenolone の定量値は、141.5 \pm 9.1 nM (cntr 群)、143.3 \pm 30.6 nM (cAMP50 群)、157.0 \pm 34.8 nM (cAMP50+Dio5 群)、251.6 \pm 74.9 nM (cAMP50+Dio10 群) であり、progesterone の定量値は 217.9 \pm 6.1 nM (cntr 群)、236.0 \pm 36.4 nM (cAMP50 群)、310.9 \pm 31.6 nM (cAMP50+Dio5 群)、352.5 \pm 67.3 nM (cAMP50+Dio10 群) であった。今後引き続きその他のステロイドホルモン分析について in vivo での評価についても実施していく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Onoda Keita, Kato Mai, Tsunematsu Yuta, Eto Fumihiro, Sato Michio, Yoshioka Yasukiyo, Yoshida Takuya, Tamura Kentaro, Yao Ikuko, Dohra Hideo, Watanabe Kenji, Miyoshi Noriyuki	4. 巻 71
2. 論文標題 Biosynthetic Gene Expression and Tissue Distribution of Diosgenin in <i>Dioscorea japonica</i>	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Agricultural and Food Chemistry	6. 最初と最後の頁 4292 ~ 4297
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jafc.2c08478	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 Hayakawa Sumio, Ohishi Tomokazu, Oishi Yumiko, Isemura Mamoru, Miyoshi Noriyuki	4. 巻 11
2. 論文標題 Contribution of Non-Coding RNAs to Anticancer Effects of Dietary Polyphenols: Chlorogenic Acid, Curcumin, Epigallocatechin-3-Gallate, Genistein, Quercetin and Resveratrol	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Antioxidants	6. 最初と最後の頁 2352 ~ 2352
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/antiox11122352	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 Ohishi Tomokazu, Hayakawa Sumio, Miyoshi Noriyuki	4. 巻 1
2. 論文標題 Involvement of microRNA modifications in anticancer effects of major polyphenols from green tea, coffee, wine, and curry	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Critical Reviews in Food Science and Nutrition	6. 最初と最後の頁 1 ~ 32
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/10408398.2022.2038540	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 Shioji Yudai, Kobayashi Takuma, Yoshida Takuya, Otagiri Tomoka, Onoda Keita, Yoshioka Yasukiyo, Sasada Tatsuya, Miyoshi Noriyuki	4. 巻 69
2. 論文標題 Nitrogen Balance and Bioavailability of Amino Acids in Spirulina Diet-Fed Wistar Rats	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Agricultural and Food Chemistry	6. 最初と最後の頁 13780 ~ 13786
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jafc.1c04840	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 Kobayashi Takuma, Toyoda Takeshi, Tajima Yuya, Kishimoto Shinji, Tsunematsu Yuta, Sato Michio, Matsushita Kohei, Yamada Takanori, Shimamura Yuko, Masuda Shuichi, Ochiai Masako, Ogawa Kumiko, Watanabe Kenji, Takamura-Enya Takeji, Totsuka Yukari, Wakabayashi Keiji, Miyoshi Noriyuki	4. 巻 34
2. 論文標題 o-Anisidine Dimer, 2-Methoxy-N4-(2-methoxyphenyl) Benzene-1,4-diamine, in Rat Urine Associated with Urinary bladder Carcinogenesis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Chemical Research in Toxicology	6. 最初と最後の頁 912 ~ 919
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.chemrestox.0c00536	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 Tajima Yuya, Toyoda Takeshi, Hirayama Yuichiro, Matsushita Kohei, Yamada Takanori, Ogawa Kumiko, Watanabe Kenji, Takamura-Enya Takeji, Totsuka Yukari, Wakabayashi Keiji, Miyoshi Noriyuki	4. 巻 33
2. 論文標題 Novel o-Toluidine Metabolite in Rat Urine Associated with Urinary Bladder Carcinogenesis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chemical Research in Toxicology	6. 最初と最後の頁 1907 ~ 1914
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.chemrestox.0c00098	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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 小野田圭汰、吉岡泰淳、中村俊之、中村宜督、三好規之
2. 発表標題 デキサメタゾン誘導性筋萎縮に対するジオスゲニンの抑制効果
3. 学会等名 第76回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Noriyuki Miyoshi
2. 発表標題 Effects of steroidal sapogenin diosgenin on the fasted and postprandial hypertriacylglycerolemia in high fat diet-fed KK-Ay mice
3. 学会等名 3rd Bandon-Shizuoka Food and Pharma Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小野田圭汰、竹村智花、吉岡泰淳、三好規之
2. 発表標題 ジオスゲニン摂取がストレプトゾトシン誘発糖尿病マウスの血中ステロイドホルモンに及ぼす影響
3. 学会等名 第75回日本栄養・食糧学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小野田圭汰、吉岡泰淳、中村俊之、中村宜督、三好規之
2. 発表標題 ジオスゲニンによるデキサメタゾンが誘導する筋萎縮に対する抑制効果
3. 学会等名 第26回日本フードファクター学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小野田圭汰、吉川悠子、吉岡泰淳、三好規之
2. 発表標題 ストレプトゾトシン誘発糖尿病マウスに対するジオスゲニンの血中ステロイドホルモンに及ぼす影響
3. 学会等名 日本農芸化学会2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小林琢磨、田島悠也、豊田武士、岸本真治、松下幸平、山田貴宣、小川久美子、渡辺賢二、高村岳樹、戸塚ゆ加里、若林敬二、三好規之
2. 発表標題 o-Anisidine曝露ラット尿中代謝物の探索
3. 学会等名 日本環境変異原学会 第49回大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<https://dfns.u-shizuoka-ken.ac.jp/labs/biochem/>

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	吉川 悠子 (Yuko Yoshikawa) (00580523)	日本獣医生命科学大学・獣医学部・准教授 (32669)	

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
---------	---------