

機関番号：82613

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21700712

研究課題名 (和文) 男性骨粗鬆症に対する大豆イソフラボン代謝産物の作用と  
その作用機序の解明研究課題名 (英文) Effects of a soybean isoflavone metabolite on male osteoporosis and  
the elucidation of its mechanism

研究代表者

東泉 裕子 (TOUSEN YUKO)

独立行政法人国立健康・栄養研究所 食品保健機能プログラム 流動研究員

研究者番号：20360092

研究成果の概要 (和文)：4週間のエクオール投与 (EQ 0.50mg/日) は雄性骨粗鬆症モデルマウスにおいて、脛骨の骨量減少を抑制し、骨吸収マーカーを抑制する傾向を示した。加えて、エクオールは RAW264 細胞から破骨細胞への分化を容量依存的 (0.1～50  $\mu$ M) に抑制し、成熟破骨細胞のカパーゼ 3/7 活性を促進した。これらの結果より、エクオールは骨吸収を抑えることで、男性骨粗鬆症の骨代謝を改善する可能性が示された。

研究成果の概要 (英文)：The administration of equol (0.50 mg/day) for 4 weeks inhibited tibial bone loss, and markers of bone resorption tended to decrease in orchietomized mice. Furthermore, equol significantly inhibited the osteoclast formation induced by RANKL (receptor activator of NF-kappaB ligand) in a dose-dependent manner (0.1-50  $\mu$ M) in RAW 264 cells and promoted the activities of caspase 3/7 in RAW 264 cell-derived mature osteoclasts. These results suggest that equol improves the bone metabolism in male osteoporotic patients, and the inhibition of bone resorption may contribute to the improvement of bone metabolism.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学

キーワード：骨粗鬆症、大豆イソフラボン、エクオール、骨密度、破骨細胞、骨芽細胞、アポトーシス、エストロゲン

## 1. 研究開始当初の背景

我が国における骨粗鬆症患者数のうち、およそ 1/4～1/5 が男性であり、その予防は重要な課題である。一方、大豆イソフラボンは弱いエストロゲン様作用を持つことで、閉経後女性の骨量減少を抑えることが示されている。エクオールはダイゼインの代謝産物であり、他のイソフラボンより強いエストロゲ

ン様活性をもつことが報告されている。他方、初老の男性において骨吸収を調節する最も重要なホルモンはエストロゲンであることが示唆されている。しかしながら、男性骨粗鬆症に対するエクオールの作用は検討されていない。

## 2. 研究の目的

本研究は男性骨粗鬆症に対するエクオー

ルの作用とその作用機序を解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 雄性骨粗鬆症モデル動物の骨代謝に対するエクオール作用

#### ①実験計画

8週齢雄性 ddy マウスに偽手術(Sham 群)、あるいは精巣摘出手術(ORX 群)を行い、精巣摘出したマウスにエクオールまたは  $17\beta$ -エストラジオール(E2)を充填した浸透圧ポンプを皮下に埋め込んだ。エクオール 0.25mg/日 (EQ 0.25 群)、EQ 0.50mg/日 (EQ 0.5 群)、または E2 0.03  $\mu$ g/日 (E2 群)の濃度で4週間投与した(n=4-7)。飼料は AIN-93G を基本組成とし、大豆油をコーン油に置換したものをペアフエッドで与えた。4週間飼育後に心臓から血液を採取した後、子宮および脛骨を摘出した。

#### ②脛骨骨密度

摘出した脛骨は二重エネルギーX線測定法で測定した。

#### ③骨吸収マーカー

骨吸収マーカーとして、尿中デオキシピリジノリン (DPD) 濃度を酵素免疫測定 (ELISA) 法で測定した。

#### ④血清および尿中エクオール濃度

血清および尿中エクオール濃度は時間分解蛍光免疫測定法で測定した。

(2) 破骨細胞、骨芽細胞に対するエクオールの作用

#### ①細胞培養

RAW264 細胞は 10%ウシ胎児血清、1%抗生物質を含む  $\alpha$ MEM(フェノールレッド不含)培地で培養した。RAW264 細胞は破骨細胞に分化誘導するため、播種 24 時間後に RANKL (receptor activator of NF-kappaB ligand) (100ng/ml) を添加した。ST2 細胞は 10%ウシ胎児血清、1%抗生物質を含む DMEM(フェノールレッド不含)培地で培養した。ST2 細胞はコンフルエントとなる播種 3 日後にエクオールを添加した。RAW264 および ST2 細胞は温度 37°C、二酸化炭素濃度 5%で培養した。

#### ②細胞増殖

細胞増殖性を測定するため MTT 分析を行った。測定には CellTiter 96<sup>®</sup> Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay

(Promega(株))を使用した。RAW264 細胞は播種 24 時間後に RANKL と同時にエクオールを添加し、添加 24 時間後に MTT 分析を行った。ST 細胞は播種と同時にエクオールを添加し、

48 時間後に MTT 分析を行った。

#### ③TRAP 染色

RAW264 細胞から破骨細胞への分化を評価するため、分化誘導 3 日後に TRAP 染色を行った。染色された 3 つ以上の核を持つ多核細胞の数を測定した。

#### ④カスパーゼ 3/7 活性

RAW264 細胞を成熟破骨細胞に分化させた後、エクオールを添加し、12 時間後にカスパーゼ 3/7 活性を測定した。カスパーゼ 3/7 活性の測定は Caspase - Glo<sup>™</sup> 3/7 Assay kit (Promega(株))を用いた。

#### ⑤アルカリフォスファターゼ (ALP) 染色

ST2 細胞から骨芽細胞への分化を評価するため、エクオール添加 10 日後に ALP 染色を行った。ALP 染色は Alkaline Phosphatase Staining kit ((株)プライマリーセル)を用いた。

### (3) 統計解析

すべてのデータは平均値 $\pm$ 標準偏差で示した。統計解析の有意水準は 5%とした。群間の比較は一元配置の分散分析を行い、その後 Tukey-Kramer 法で多重比較検定を行った。マウス脛骨骨密度の検定は共分散分析を行い、共変量は体重を用いた。

### 4. 研究成果

(1) 雄性骨粗鬆症モデル動物の骨代謝に対するエクオールの作用

#### ①体重変化、精巣重量

4週間エクオールを投与した後、全ての群で体重に有意な差は認められなかった。精巣を摘出した群において、精巣重量が Sham 群と比べ低値を示した。一方、エクオール投与の影響は認められなかった。

#### ②血中および尿中エクオール濃度

EQ 0.25 群、EQ 0.50 群の血中エクオール濃度は  $1950 \pm 780$ 、 $2144 \pm 679$ nmol/L、尿中エクオール濃度は  $8.25 \pm 2.31$ 、 $13.2 \pm 2.94$  ( $\mu$ mol/L)/(クレアチニン mg/dL)であった。

#### ③脛骨骨密度

脛骨骨密度を図 1 に示した。EQ 0.50 群は ORX 群と比べ有意に高値を示し、EQ 0.25 群は高い傾向を示した。精巣を摘出したことにより骨量が減少したが、エクオール投与 (0.50 mg/日)により、骨量減少が抑制された。

#### ④骨吸収マーカー

骨吸収マーカーを表 1 に示した。尿中 DPD 濃度は ORX 群と比較し Sham 群、E2 群は有意

に低値を示した。また、EQ 0.50 群は ORX 群と比較し低い傾向を示した。

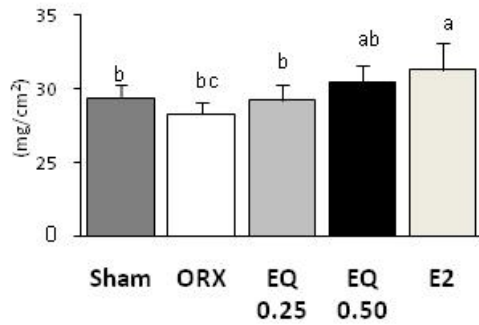


図 1. マウス脛骨骨密度

表 1. 骨吸収マーカー

群	尿中排泄デオキシピリジノリン (nmol/L)/creatinine(mg/dL)
Sham	1.76 ± 0.43 <sup>b</sup>
ORX	2.56 ± 0.33 <sup>a</sup>
EQ 0.25	2.41 ± 0.41 <sup>a</sup>
EQ 0.50	2.29 ± 0.22 <sup>ab</sup>
E2	1.80 ± 0.34 <sup>b</sup>

(2) 破骨細胞、骨芽細胞に対するエクオール  
の作用

#### ①MTT 分析

RAW264 細胞において、RANKL と同時にエクオールを添加した場合、細胞増殖は容量依存的 (エクオール: 0.1, 1, 10, 25, 50 μM) に抑制された。ST2 細胞はコントロールに対し、エクオール 50 μM 添加により細胞増殖が 45%抑制された。しかし、ST 細胞において、エクオール (0.1–25 μM) 添加による有意な細胞増殖抑制は認められなかった。

#### ②TRAP 染色

破骨細胞分化に対するエクオールの影響を図 2 に示した。エクオールは RAW264 細胞から破骨細胞への分化を容量依存的 (0.1–50 μM) に抑制した。

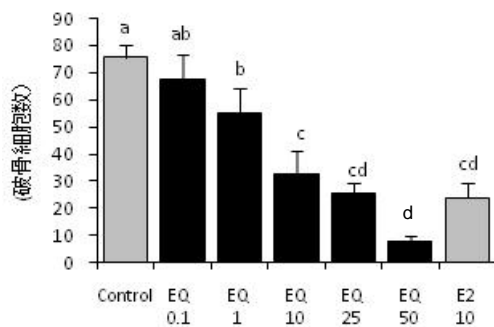


図 2. 破骨細胞分化に対するエクオールの作用

#### ③カスパーゼ 3/7 活性

アポトーシスによる細胞死の指標として、カスパーゼ 3/7 活性を測定した (図 3)。成熟破骨細胞において、エクオール 50 μM を添加した場合、コントロールと比較しカスパーゼ 3/7 活性が有意に高値を示した。

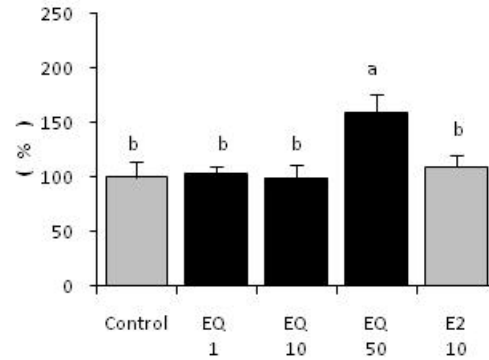


図 3. カスパーゼ 3/7 活性に対するエクオールの影響 (コントロールに対する活性割合 (%) で示した)

#### ④ALP 染色

ST2 細胞にエクオール (0.01, 0.1, 1, 10, μM) を添加し、骨芽細胞の分化に対する影響を検討した。しかし、エクオールは、ST2 細胞から骨芽細胞への分化に対して、顕著な影響を及ぼさなかった。

#### (3) 考察

本研究は男性骨粗鬆症に対するエクオールの作用とその作用機序を解明することを目的とした。

初めに男性閉経後骨粗鬆症モデルとして、雄性骨粗鬆症モデルマウスを用い、エクオールの骨代謝への影響を評価した。本実験において、雄性骨粗鬆症モデルマウスに対するエクオール (0.5mg/日) の投与は、脛骨の骨量減少を抑制し、骨吸収マーカーを抑制する傾向を示した。

疫学研究では、大豆イソフラボンの摂取量が骨密度と正の相関を示すことが報告されている。また、主に欧米で行われた閉経後女性を対象とした介入研究においては、大豆イソフラボンが脛骨や大腿骨の骨量の減少を抑えることが示唆されている (Clin Nutr. 2008; 27:57)。加えて、閉経後骨粗鬆症モデル動物において、大豆イソフラボンやその代謝産物であるエクオールが骨量減少を抑えることは数多く報告されている (Forum Nutr. 2009; 61:104)。しかしながら、雄性骨粗鬆症モデル動物において、エクオールの骨量減少抑制作用を示した報告は本研究が初めてである。Wu らは精巣摘出雄マウスにおいて、

大豆イソフラボンであるゲニステインと運動の併用が骨量減少を抑制したことを報告しており (J Appl Physiol. 2003; 94:335)、本実験の結果は、Wu らの結果とも一致する。一方、Fujioka らは閉経後骨粗鬆症モデルマウスへのエクオール (0.5mg/日) の投与は、全身骨の骨量減少を有意に抑制したことを報告した (J Nutr. 2004; 134:2623)。本実験において、骨代謝に対するエクオールの作用は、Fujioka らの結果と比較し、穏やかであった。これはエクオールに対する感受性の性差による違いであることが推測される。

そこで、エクオールの男性骨粗鬆症骨代謝に対する作用機序を明らかにするため、破骨細胞、骨芽細胞に対するエクオールの作用を検討した。本実験において、エクオールは RAW264 細胞から破骨細胞への分化を容量依存的 (0.1–50 μM) に抑制した。Ohtomo らはマウス骨髄細胞と初代骨芽細胞の共存培養において、 $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$  により誘導した破骨細胞形成をエクオール (0.1 μM) が抑制したことを報告している (Eur. J Nutr. 2008; 47:273)。これは本実験の結果と一致している。加えて、本実験において、エクオールは成熟破骨細胞のカスパーゼ 3/7 活性を促進した。ダイゼイン、エストラジオールが骨髄細胞において、カスパーゼ 3、8 の開裂を促進することにより、アポトーシスが促進され、その結果として破骨細胞の分化が抑制されたことが報告されている (JBMR. 2002; 17:630)。すなわち、本実験においても少なくとも一部に関して、エクオールはエストロゲン様作用により、破骨細胞のアポトーシスを促進することで、破骨細胞に対して抑制的に作用したことが示唆される。

他方、ST2 細胞から骨芽細胞への分化に対するエクオールの顕著な作用は認められなかった。

これらの結果より、エクオールは破骨細胞に作用し骨吸収を抑えることで、男性骨粗鬆症の骨代謝を改善する可能性が示された。今後、さらにエクオールの骨代謝への作用とその作用機序を解明することにより、男性骨粗鬆症の予防に繋がることが考えられる。

#### 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 3 件)

- ① Tousen Y, Abe F, Ishida T, Uehara M, Ishimi Y. Resistant starch promotes equol production and inhibits tibial bone loss in ovariectomized mice treated with daidzein. *Metabolism: 査読有*, 2011. (In press)
- ② Tousen Y, Ezaki J, Fujii Y, Ueno T,

Nishimuta M, Ishimi Y. Natural S-equol decreases bone resorption in postmenopausal, non-equol-producing Japanese women: a pilot randomized, placebo-controlled trial. *Menopause: 査読有*, 19, 2011. (In press)

- ③ 谷中かおる, 東泉裕子, 松本輝樹, 竹林純, 卓興鋼, 山田和彦, 石見佳子. 「健康食品」中の大豆たんぱく質および大豆イソフラボンの定量と表示に関する調査研究. *栄養学雑誌: 査読有*, 68(3), 2010; 234-241.

[学会発表] (計 8 件)

- ① 東泉裕子, 安部文子, 石田達也, 上原万里子, 石見佳子. ダイゼインとレジスタントスターチの併用摂取は骨粗鬆症モデルマウスのエクオール産生を促進し脛骨の骨量減少を抑制する. 第 15 回日本食物繊維学会学術集会. (2010. 11. 22. 北海道)
- ② Tousen Y, Ezaki J, Fujii Y, Ueno T, Ueno S, Ishimi Y. Effects of an equol supplement on bone mineral density in postmenopausal Japanese women. The 9th Inter National Symposium on the Role of Soy in Health Promotion and Chronic Disease Prevention and Treatment. (2010. 10. 19. Washington D. C, USA)
- ③ Tousen Y, Ezaki J, Fujii Y, Ueno T, Nishimuta M, Ishimi Y. Equol Decreased bone resorption in postmenopausal Japanese women of equol non-producer: a pilot randomized placebo-controlled trial. American Society of Bone and Mineral Research (ASBMR) 2010 Annual meeting. (2010. 10. 16. Toronto, Canada)
- ④ 東泉裕子, 石見佳子. 大豆イソフラボン代謝産物が雄性骨粗鬆症モデルマウスの骨量減少に及ぼす影響. 第 57 回日本栄養改善学会学術総会. (2010. 9. 12. 埼玉)
- ⑤ 東泉裕子, 藤井康弘, 上野友美, 石見佳子. ヒトを対象としたエビデンスの構築～大豆イソフラボン代謝産物の骨代謝調節作用～. 第 64 回日本栄養・食糧学会大会 シンポジウム. (2010. 5. 22: 徳島)
- ⑥ Yuko Tousen, Junko Ezaki, Fumiko Abe, Mariko Uehara, Yoshiko Ishimi: Effect of Japanese diet, catechin, high carbohydrate and dietary, on bioavailability of soybean isoflavone in ovariectomized mice. 19 th International Congress of Nutrition.

(2009. 10. 4. Bangkok, Thailand)

- ⑦ 東泉裕子, 江崎潤子, 安部文子, 上原万里子, 石見佳子. 食物繊維が骨粗鬆症モデルマウスのエクオール産生能および骨量減少に及ぼす影響. 第56回栄養改善学会学術集会 (2009. 9. 2. 札幌)
- ⑧ 東泉裕子, 山崎千春, 伊藤友里恵, 佐藤あゆみ, 石見佳子, 石綿肇. 母親ラットを介して胎仔期・乳仔期に投与されたダイゼインが成長期における仔ラットの骨代謝に及ぼす影響. 第63回日本栄養・食糧学会大会 (2009. 5. 20. 長崎)

〔図書〕 (計1件)

- ① 石見佳子, 東泉裕子. 市村出版, スポーツ現場に生かす運動生理・生化学. スポーツ選手の体調管理とビタミン・ミネラル. 2011; 143-155.

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

東泉 裕子 (TOUSEN YUKO)

独立行政法人国立健康・栄養研究所・食品保健機能プログラム・流動研究員

研究者番号: 20360092