

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23700910

研究課題名(和文)大豆イソフラボンの卵巣摘出による認知機能低下抑制の分子機序の解明

研究課題名(英文) Mechanism of protective effect of Soy isoflavone against impaired spatial memory in ovariectomized (OVX) mice.

研究代表者

趙 娟 (Zhao, Juan)

名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：20381890

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：大豆イソフラボンの摂取が、更年期後認知機能低下を予防する機序を明らかにするために、卵巣摘出マウスに大豆イソフラボン類を4週間摂取させた。大豆イソフラボン類の摂取により、体重増加の抑制、認知機能の低下抑制、海馬インスリン様成長因子-1(IGF-1)の濃度増加、および海馬新生ニューロンの増加が観察された。大豆イソフラボン類はこれらの機序を介して卵巣摘出マウスの認知機能低下を予防していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Soy-isoflavone has been utilized as phytoestrogens to prevention cognitive symptoms found in menopausal women because its biological activities similar to those of estrogens. However, the precise mechanisms underlying its effects remain unknown. In this study, effects of soy-isoflavone on spatial memory were investigated in ovariectomized (OVX) mice. Administration of isoflavone for 4 weeks to OVX mice increased hippocampal levels of IGF-1 and prevented the decrease of spatial memory. Immunohistochemical expression of DCX and BrdU suggested an enhancement of neurogenesis in the dentate gyrus of the hippocampus after isoflavone administration. These observations suggest that isoflavone might promote spatial memory through increasing hippocampal IGF-1 level and neurogenesis in OVX-mice.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：食生活学

キーワード：大豆イソフラボン 卵巣摘出 認知機能

## 1. 研究開始当初の背景

高齢化社会への急激な移行に伴い、認知症患者の急増が大きな社会問題となっている。特に閉経後認知機能の低下の発症頻度は、同年代の男性の認知機能低下のそれよりも高いことが報告されている。閉経後の認知機能低下には女性ホルモン(エストロゲン)の分泌低下が関与しており、そのために、その治療には、エストロゲン補充療法が行われることがある。しかしながら、エストロゲン補充療法では、心疾患、脳卒中、及び乳癌のリスクが増加することが報告され、この病態の安全な治療方法の開発が期待されている。

大豆イソフラボンは、選択的エストロゲン受容体モジュレーターとしての有益な特性によって、心疾患のリスク低減、更年期障害の緩和、及び骨粗しょう症の予防に有効であることが証明されたが、その詳細な作用機構は明らかとなっていない。大豆イソフラボン類のうちゲニステインは、脳、心臓、骨に豊富に存在するエストロゲン受容体 に対しより高い親和性があり、直接そのレセプターに結合し、エストロゲン様作用を発揮するという仮説もあるが、イソフラボンはエストロゲン様作用と抗エストロゲン作用を有するなど、その作用の多様性の発現機序は、十分に解明されているとは言えない。

申請者は、消化管の知覚神経を刺激することにより、その刺激情報が、温痛覚伝達系をへて、海馬へ伝わり、そこで CGRP を増加させ、IGF-1 産生を促進することを報告した (Zhao J, et al. Neuropharmacology 2010; 58: 774-83; Narimatsu N, et al., J Pharmacol Exp Ther. 2009; 330: 2-12)。IGF-1 は、海馬の興奮性シナプス伝達を促進し、神経再生を促進することによって空間認知機能を改善する作用を有する。エストロゲンは知覚神経の CGRP 産生増加作用を有し、また、申請者が属する研究グループの研究成果から、卵巣摘出したマウスにおいて、CGRP

の発現が低下していることが示されている (Shimozawa N, et al. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2007; 292: G615-9)。これらの事実は、閉経後エストロゲン分泌の減少による認知機能の低下は、海馬 CGRP 産生の抑制に起因する海馬 IGF-1 産生低下に関与している可能性を示している。更に、我々は、知覚神経細胞である培養脊髄後根神経節 (DRG) ニューロンで、イソフラボンは CGRP の発現を増加させることを確認した (Zhao J, et al. J Nutr Biochem 2011; 22: 227-33)。これらの事実は、イソフラボンが、海馬の CGRP の産生を促進し、結果として、IGF-1 の産生を促進することで、更年期による認知機能の低下を抑制する可能性を示す。

以上のような背景から、イソフラボンの摂取による更年期後認知機能低下の抑制機序は、閉経後海馬 CGRP 濃度の低下を防止することにより、IGF-1 の産生を促進することによると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では、大豆イソフラボンが、卵巣摘出による認知機能低下を IGF-1 の産生を増加させることで改善するか否かを検討し、それらの結果を基に、大豆イソフラボンを含んだ認知機能低下などの更年期障害を改善する機能性食品の開発へと応用することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 卵巣摘出マウスの作成、および大豆イソフラボンの投与

既報に従い、麻酔下に 8 週齢雌性マウスに偽手術 (Sham 群) あるいは卵巣摘出手術 (OVX 群) を施す (Shimozawa N, et al. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2007; 292: G615-9)。卵巣摘出手術または偽手術の 2 日前に AIN-93 組成に従ったイソフラボン抜き

飼料に切り替えた。卵巣摘出手術を行ったマウス手術後に AIN-93 組成に従ったイソフラボン抜き飼料を与える群 (OVX)、二種類のイソフラボン含飼料を与える群に分け (OVX+IF1; OVX+IF2)、4 週間投与する (Shimozawa N, et al. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2007; 292: G615-9)。全ての動物は体重測定および食下量測定を週 1 回おきに行った。

(2) 大豆イソフラボン投与による認知機能への影響の評価

大豆イソフラボン投与して 4 週間後、ビデオカメラ式行動解析システムを用いて、モーリス水迷路試験による空間認知機能の評価を行い、卵巣摘出による認知機能の低下、または大豆イソフラボン投与による認知機能低下が抑制するか否かを確認した。

(3) 大豆イソフラボン投与による海馬 IGF-1、CGRP への影響の評価

モーリス水迷路試験後、偽手術群、卵巣摘出群、および大豆イソフラボン投与群において、麻酔下に採血した後、海馬を摘出し、血中 IGF-1 濃度、組織中 IGF-1、CGRP、および IGF-1 mRNA 発現を測定した。

(4) 大豆イソフラボン投与による海馬神経細胞再生への影響の評価

海馬神経細胞の再生を評価するため、各群ともに手術した後 4 週間後、新生細胞のマーカである 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) を 50 mg/kg/day、5 日間腹腔内投与する。BrdU を投与したマウスを 35 日目に麻酔下に心臓からリン酸緩衝 4%パラホルムアルデヒド溶液を還流して、脳を採取し免疫染色を行い、BrdU 陽性細胞を計測した。また、血管内皮細胞のマーカである CD31、神経細胞のマーカである calbindin-D28k、アストロ細胞のマーカである glial fibrillary

acidic protein (GFAP) の抗体を用いて、それぞれ二重染色を行い、新生細胞の計測と同一を行なった。

4. 研究成果

(1) 大豆イソフラボン摂取によるマウス体重、および摂取量への影響

卵巣摘出により、マウスの摂食量が有意に増加した (図 1 A)。大豆イソフラボン飼料群は、イソフラボン抜き飼料群より摂食量の低下が認められた (図 1 A)。

各群の 4 週間後の体重増加値を図 1 B に示した。投与 4 週間後における体重の増加は対照群  $2.65 \pm 0.65\text{g}$  に対し、OVX 群で  $4.47 \pm 0.86\text{g}$  ( $p < 0.01$ ) であった。大豆イソフラボン摂取群における体重増加は、OVX 群と比べて有意な低下が認められた (IF1:  $2.69 \pm 0.70\text{g}$ ; IF2:  $2.50 \pm 0.92\text{g}$ )。

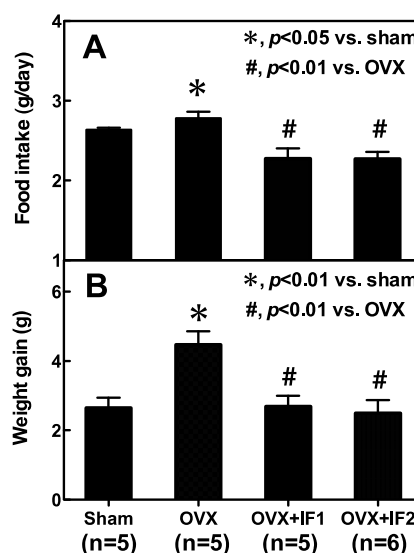


図 1. 大豆イソフラボン摂取によるマウス体重、および摂取量への影響

(2) 大豆イソフラボン摂取によるマウス認知機能への影響

モーリス水迷路試験により評価で、Sham 群はプラットフォームまでの到達時間は日々短縮された (図 2 A)。OVX 群では、プラットフォームへの到達時間は試験期間中短縮さ

れなかったが、OVX マウスに大豆イソフラボンを投与すると試験開始 4 日目からプラットフォームへの到達時間は有意に短縮された (図 2A) ( $p < 0.05$ )。

プローブテストにおいて、OVX 群では、大豆イソフラボン投与によるターゲット領域内の滞在時間が延長された (図 2B)。

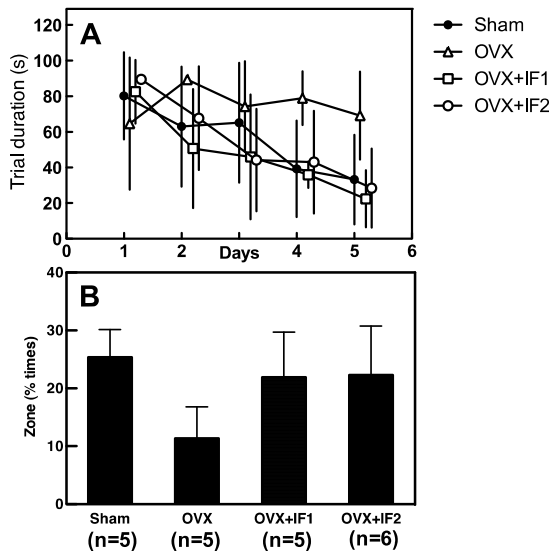


図 2. 大豆イソフラボン摂取による空間認知機能への影響

### (3) 大豆イソフラボン摂取による IGF-1 濃度変化への影響

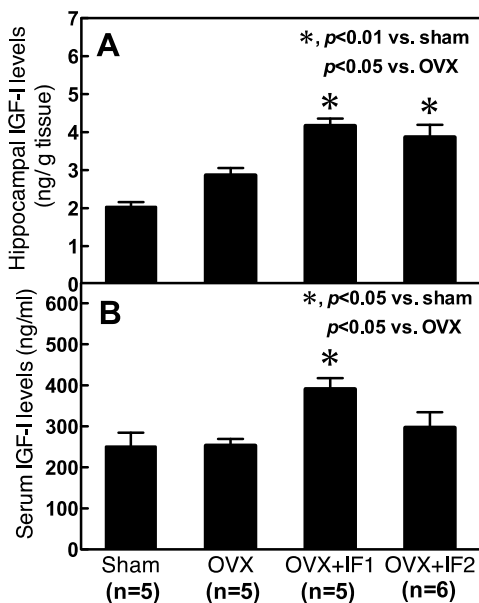


図 3. 大豆イソフラボン摂取による血漿、および海馬 IGF-I 濃度への影響

海馬 IGF-1 タンパク質濃度に関して、OVX による変化が認められなかったが、大豆イソフラボンの摂取群は、Sham 群と OVX 群に対して有意な増加が認められた (図 3A)。

血漿中 IGF-1 タンパク質濃度は、IF1 摂取群に高値が認められた (図 3B)。

IGF-1 mRNA の発現レベルを測定したところ、各群の間に海馬 IGF-1 mRNA 発現量の差は認められなかった。

### (4) 大豆イソフラボン摂取による海馬神経細胞新生への影響

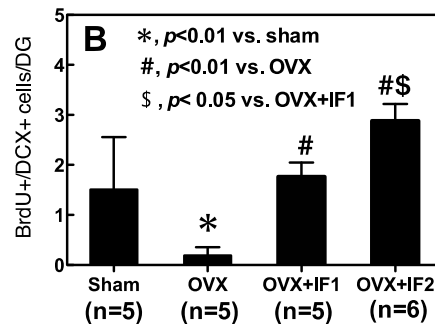
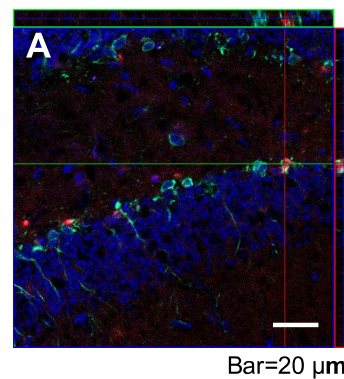


図 4. 大豆イソフラボン摂取による海馬神経新生への影響

新生ニューロンのマーカーである DCX と細胞分裂のマーカーである BrdU の二重染色結果により、DCX 陽性細胞の一部に BrdU との共陽性を認め (図 4A) その共陽細胞数が、卵巣摘出により有意に低下し、その低下が大豆イソフラボンの摂取により有意に抑えられた (図 4B)。

### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

趙 娟、原田 直明、岡嶋 研二、  
Dihydrotestosterone inhibits hair  
growth in mice by inhibiting  
insulin-like growth factor-I  
production in dermal papillae ,Growth  
Horm IGF Res、査読有、Vol.21、No.5、  
2011、pp. 260-267、  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1096637411000785>

〔学会発表〕(計2件)

趙 娟、アスタキサンチンはインスリン  
様成長因子-I を増加させ育毛を促進す  
る、第29回日本美容皮膚科学会総会・  
学術大会、2011年9月10日、下関

趙 娟、アスタキサンチンは、インスリ  
ン様成長因子-I を増加させ、育毛を促  
進する、アスタリールシンポジウム  
2012、2012年2月19日、京都

6. 研究組織

(1)研究代表者

趙 娟 (ZHAO JUAN)  
名古屋市立大学・医学研究科・助教  
研究者番号：20381890