

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：32658

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580198

研究課題名(和文)安全性を考慮した大豆イソフラボンおよびその代謝産物の有効性の検討

研究課題名(英文) Evaluation of isoflavone and its metabolite efficacies, while minimizing the impact on reproductive organs

研究代表者

上原 万里子 (UEHARA, Mariko)

東京農業大学・応用生物科学部・教授

研究者番号：20211071

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：イソフラボン代謝産物のequolには鏡像異性体が存在している。卵巣摘出(OVX)骨粗鬆症モデル動物に、各鏡像異性体を0.5mg/dayで皮下投与したところ、S-equolは、天然の選択的エストロゲン受容体作動薬(SERMs)のように子宮重量に影響を与えず、R体より強く骨量減少を抑制した。また、同マウスの大腿骨の遺伝子変動をマイクロアレイ解析に供したところ、骨吸収を担う破骨細胞分化関連遺伝子の発現を抑制する可能性が示唆された。更に、投与イソフラボン量低減化のため、難消化性糖質の併用摂取効果も検討し、有効な最低投与量はアグリコンのdaidzeinとして0.05%程度であることが確認された。

研究成果の概要(英文)： Equol, a metabolite of isoflavone, is a chiral molecule that exists as the enantiomers (R)(+)-equol and (S)(-)-equol. To compare the effect of R-equol and S-equol on bone loss, ovariectomized (OVX) mice were used and each equol (0.5mg/day) were administered to the OVX mice. As natural selective estrogen receptor modulators (SERMs), the equol enantiomers inhibited bone loss, while minimizing the impact on the uterus. S-equol had stronger effects than R-equol in vivo. We performed transcriptome analysis to comprehensively understand the effects of equol enantiomers in mouse femur. DNA microarray analysis demonstrated that S-equol might down-regulate the expression of osteoclast differentiation associated genes responsible for bone resorption. Furthermore, to reduce isoflavone amount for the administration to OVX mice, a combination of isoflavone and indigestible sugars should be considered. The effective lowest dose was confirmed whether it might be about 0.05% as the aglycone daidzein.

研究分野：食品機能学

キーワード：大豆イソフラボン equol 鏡像異性体 難消化性糖質 骨粗鬆症

1. 研究開始当初の背景

(1) 高齢者人口の増加に伴い、骨粗鬆症はますます重要な疾患となり、その予防対策が必須となっている。非栄養性成分であり、エストロゲン様作用を有する大豆イソフラボンの骨粗鬆症予防効果については多くの報告が存在するが、研究代表者らは一定の量では子宮などの生殖器官に副作用を与えずエストロゲン様作用を示す天然の Selective Estrogen Receptor Modulator (SERM: 選択的エストロゲン受容体作動薬) である可能性を有し、骨量減少を抑制する大豆イソフラボンと、その代謝産物で強い生理活性をもつ equol に着目し、それらの骨量減少抑制および脂質代謝改善作用を検討してきた^{1,2)}。

(2) 主要イソフラボン daidzein から equol の変換状態には種差があるが、特にヒトでは、各個人が有する腸内細菌叢および腸内環境が関連しており、equol 産生能の高さは、ホルモン依存性がん、骨粗鬆症、更年期障害、脂質異常症のリスク軽減に繋がると考えられている。更に equol には鏡像異性体が存在し、近年、主に S 体の効果が報告されて来たが、R 体についても、がん予防などの側面より期待されるようになった³⁾。

(3) 2006 年、内閣府・食品安全委員会の大豆イソフラボンに対する安全性評価の結果が公となって以来、イソフラボンの有効性よりも安全性が問題視されるようになった。しかし、前述のイソフラボンの SERM 様作用については未検討であり、各個人の equol 産生能も考慮に入れられていない。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、equol の構造の違いが、骨代謝に与える影響について、また、どちらの異性体が骨粗鬆症予防に効率良くはたらくのか、安全性も考慮した上で検討した。卵巣摘出 (OVX) 骨粗鬆症モデル動物に対する S、R、ラセミ体 equol の有効性を骨量減少抑制作用とし、安全性を子宮肥大の有無で評価した。まずは、有効性を発揮し、安全性を担保する、即ち前述の生殖器官に副作用を与えず、骨に対してはエストロゲン様作用を示す SERM 様作用を発揮する投与量を決定し、より優れた構造を有する代謝産物の可能性を明らかにすることを第一の目的とした。

(2) また、同時に摂取する食品因子と組み合わせることで、イソフラボン摂取量を低減させる可能性についても検討することを第二の目的とした。プレバイオティクスであるフラクトオリゴ糖 (FOS) は小腸では難吸収性であり、大腸で発酵することから、大腸からのミネラル吸収を促進し、イソフラボン配糖体の糖鎖切断および equol の産生能も高めることで^{2,4)}、同時摂取するイソフラボン量の低減化に寄与する食品因子としての可能性が期

待される。また、その他の難消化性糖質の併用摂取効果についても検討を行った。

3. 研究の方法

(1) 平成 24 年度: 8 週齢の ddY 雌マウスに Sham (偽手術) または OVX 術を施し、OVX 群を 4 群 (S-equol (Eq), R-Eq, ラセミ体-Eq (Racemi), 17 β -estradiol (E₂) 投与) に分け、4 週間の飼育観察を行った。3 種の equol および E₂ は、溶媒 (DMSO/PEG) に溶解し、浸透圧ポンプにて各々皮下より 0.5mg/day/kg 体重を投与した (E₂ は positive control として 0.03 μ g/day/kg 体重投与)、飼育期間中は基礎飼料として AIN93-G を自由摂取させた。4 週間後、マウスを解剖し、血液、肝臓、大腿骨および脛骨を採取した。試験実施項目として、大腿骨は、骨密度、骨強度、骨構造解析に供し、脛骨は real-time PCR による骨代謝関連遺伝子発現解析に供した。骨密度は DXA 法、骨強度は三点折り曲げ法、骨代謝 (骨形成および骨吸収) マーカー (osteocalcin (OC), deoxypyridinoline (DPD), I 型コラーゲン C 末端テロペプチド (CTX)) は ELISA 法にて測定した。血清、尿中 S および R-equol 濃度は共同研究先であるヘルシンキ大学の Adlercreutz 教授の研究グループの協力を仰ぎ、キラルカラムを用いてクーロアレイ HPLC にて測定した。更に equol 鏡像異性体の破骨細胞に対する作用を検討するためにマウス骨髄細胞に破骨細胞分化誘導剤 (活性型ビタミン) と equol 鏡像異性体を各々添加して破骨細胞の分化状態を観察した。

(2) 平成 25 年度: 前年度と同様なマウスに同様な処理を行い、ラセミ体と E₂ 投与群を除いた 4 群にて 4 週間の飼育観察を行い、血液、尿を採取し、各組織 (脳、肝臓、腎臓、大腿骨、脛骨) を摘出した。脳、肝臓、腎臓、脛骨は、HPLC による equol 鏡像異性体濃度測定に、大腿骨は RNA を抽出し、DNA マイクロアレイ解析に供した。

(3) 平成 26 年度: 難消化性糖質との併用摂取でイソフラボン投与量の低減化を図るため、イソフラボン配糖体 (ISO) と FOS との併用摂取試験を行った。8 週齢の ddY 雌マウスに Sham または OVX 術を施し、OVX 群を 6 群 (OVX 単独、OVX+0.16%ISO (ISO), OVX+5%FOS (FOS), OVX+ISO+FOS (IF), OVX+0.08%ISO (50%ISO), OVX+50%ISO+FOS (50%IF)) に分け、計 7 群で 4 週間の飼育観察を行った。次に投与イソフラボンを配糖体からアグリコン (daidzein) に換えて同様な試験を行った。更に、難消化性糖質の種類を FOS からセロオリゴ糖 (COS) に変更して、FOS と同様に COS とイソフラボン配糖体との併用摂取試験も行った。

4. 研究成果

(1) Equol 鏡像異性体の骨代謝調節作用の差

異(平成 24 年度)

大腿骨・骨密度(BMD)および骨強度はOVXにより明らかな低下が認められ、equol 鏡像異性体の中では、*S*-equol で骨量減少抑制効果が強く(図 1)、骨吸収マーカー(CTX)においても低下抑制がみられた。また、副作用のマーカーである子宮肥大は認められなかった(図 1)。骨吸収関連遺伝子として *TNF- α* 、*IL-6*、*RANKL/OPG* 比の mRNA 発現は OVX により高値または高値傾向を示したが、各 equol 投与により抑制傾向がみられた。しかし、構造による差異は認められなかった。*S*-equol の方が *R*-equol よりも効果が強かった点については、血・尿中の *S*-equol 濃度が明らかに高いことに起因するものと思われるが(図 1)、この生体内利用率の差については、今後の検討が必要とされる。Equol は破骨細胞分化を抑制したが、構造による差異はみられなかった。

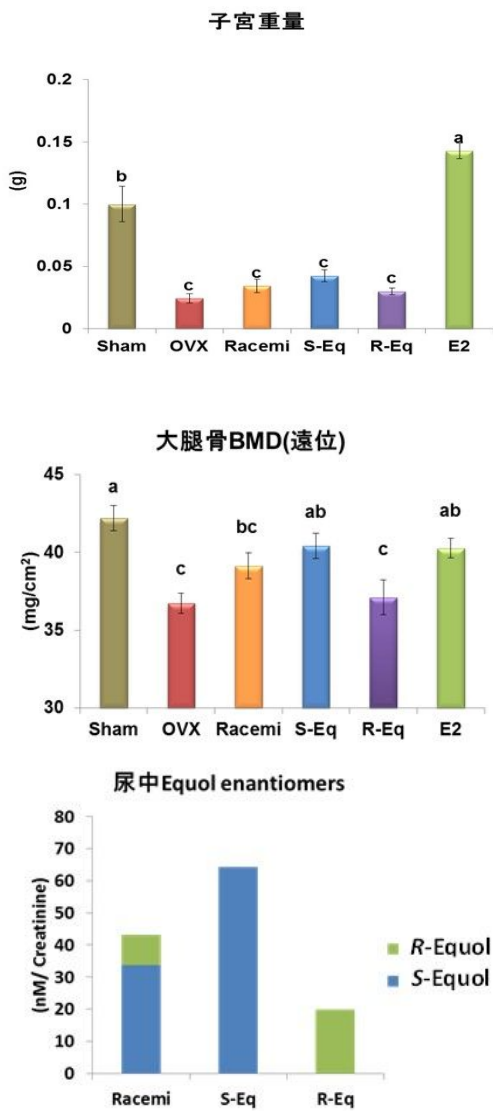


図 1. 子宮重量、大腿骨 BMD および尿中 equol 鏡像異性体濃度

平均値 ± 標準誤差。

異なるアルファベット間で有意差あり ($p < 0.05$)。

(2) DNA マイクロアレイを用いた equol 鏡像異性体投与による大腿骨・骨代謝遺伝子変動の網羅的解析と組織分布(平成 25 年度)

OVX を施した equol 鏡像異性体投与マウス的大腿骨から RNA を抽出し、DNA マイクロアレイに供し、先ず、得られたデータを正規化、階層クラスタリング解析を行ったところ、4 群間で異なるクラスタリングとなったが、クラスター間の距離については、OVX+S-equol 投与群で対照の Sham 群と近く、OVX+R-equol 投与群で OVX 群と近い結果となった(図 2)。また、fold change が 1.3 以上、 $p < 0.05$ で変動した遺伝子は、Sham - OVX 間では 1,403、OVX - OVX-S 間では 726、OVX - OVX-R 間では 4,410、OVX-S - OVX-R 間では 4,388 であった。更に Sham 群に対して OVX で up し、OVX に対し OVX-S で down した遺伝子は 139、逆に down し、up した遺伝子は 93 であった。この 139 遺伝子のうち、細胞接着、細胞分裂、神経分化等細胞機能に関わる遺伝子群が多かった。中でも、Wnt シグナル関連の遺伝子に変動がみられ、OVX では G タンパク質を介して細胞内 Ca^{2+} の上昇(Ca 感受受容体(*Casr*)の発現変動あり)からカルシニューリンの上昇を誘導し、破骨細胞分化の調節因子である NFATc1 による破骨細胞分化誘導が推測され、*S*-equol 投与により破骨細胞分化が抑制される可能性が示唆された。更に、*S*-equol と *R*-equol の体内の分布状態を比較したところ、肝臓、腎臓、骨では *S*-equol が、脳では *R*-equol 濃度が優位となる傾向を示した。特に、骨(脛骨)における *S* 体の高値は、*S*-equol の生体内利用率の高さと骨への移行性が *R*-equol よりも優れていることを示す結果であり、*in vivo* での骨量減少抑制作用の強さを裏付けるものと思われる。また、H24 年度に行った *in vitro* での破骨細胞分化に対する鏡像異性体の影響について、再度サンプル数を増やし検討するため、骨髄細胞培養液中への各 equol を 0.1 ~ 10 μ M 添加したところ、*S*-equol よりも *R*-equol で、破骨細胞分化を強く抑制し、*in vivo* 試験とは異なる結果となった。

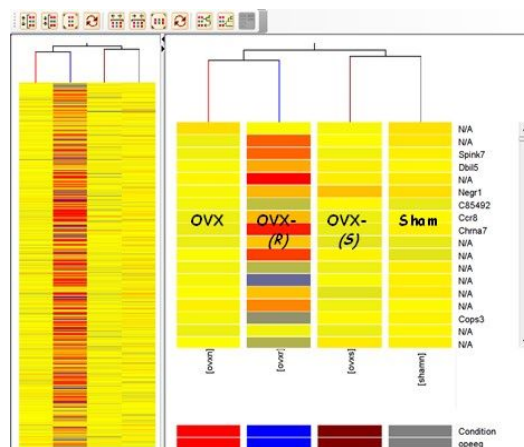


図 2 階層的クラスタリング解析

(3)難消化性糖質(プレバイオティクス)による equol 産性能の増強とイソフラボン投与量の低減化(平成 26 年度)

FOS との併用摂取 : OVX マウスを用い、イソフラボン配糖体の投与量を、骨量減少抑制作用が発現する半量とし、5 %FOS を併用摂取させたところ、ISO または FOS 単独、ISO・FOS 併用 (IF 群) 何れの投与量においても BMD の減少抑制作用が認められたが、IF 群で最も強い抑制傾向を示した(図 3)。しかし、ISO 配糖体半量投与で FOS を併用摂取させても、相加効果はみられなかった。次に同様な OVX マウスにアグリコンの daidzein(Dz)と FOS の併用摂取を行ったところ、0.1%Dz 単独、Dz+FOS との併用(DF)、その半量の単独・併用摂取群いずれでも OVX による骨量減少は有意に抑制され、併用摂取群で equol 濃度の上昇も認められたが、更にその半量の 0.025%では FOS との併用摂取を行っても equol 産生は上がり、骨量減少も抑制されなかった。以上より、5%FOS との併用摂取で equol 産生増強が期待できる投与量は、Dz(アグリコン)で 0.05%、イソフラボン配糖体では、0.16%であることが確認された。この配糖体の中の Dz の割合としては約 0.04%であり、前述の 0.05%と近似した値であった。また、骨量減少に対する効果については、Dz 量としては 0.05%、イソフラボン配糖体では、0.16%の半量である 0.08%でも抑制効果が現れた。イソフラボン配糖体には、Dz 配糖体 + 他のイソフラボンである genistein および glycitein の配糖体も含有されていることから、これらの効果も影響したものである。

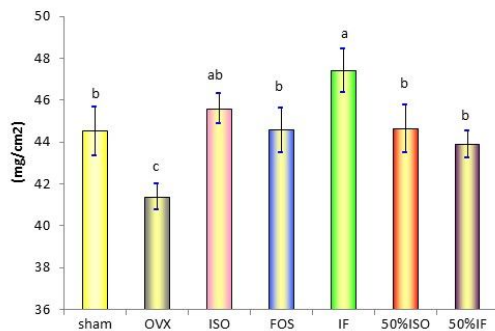


図 3 大腿骨 BMD

平均値 ± 標準誤差.

異なるアルファベット間で有意差あり ($p < 0.05$).

COS との併用摂取 : イソフラボン配糖体と COS との併用摂取により、尿中 equol 濃度は増加し、equol 産生の促進が確認された。Dz として、同様な投与量の場合、FOS 併用摂取との比較では、絶対量は FOS 併用摂取の方が高値を示したが、増加量では、COS 併用摂取の方が高値傾向を示した。また、その際、海綿骨量の多い大腿骨遠位部 BMD と脛骨近位部 BMD は OVX により減少したが、ISO

単独投与により骨量減少抑制傾向、COS 併用摂取(IC)では有意にその減少を抑制した。

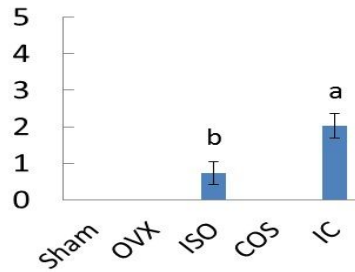


図 4 尿中 equol 濃度 (nM/Cre)

平均値 ± 標準誤差.

異なるアルファベット間で有意差あり ($p < 0.05$).

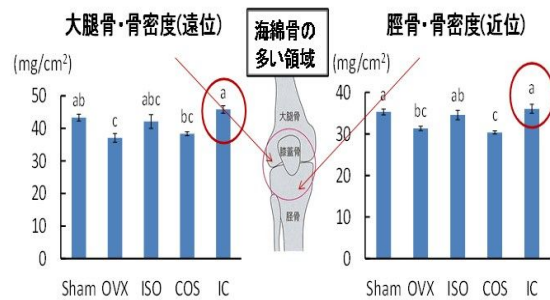


図 5 大腿骨および脛骨・骨密度

平均値 ± 標準誤差.

異なるアルファベット間で有意差あり ($p < 0.05$).

(4)まとめと今後の展望

主要大豆イソフラボン daidzein の代謝産物である equol について、*in vivo* では S-equolの方が R-equolよりも生体内利用率と組織移行性がよく、子宮重量を上げることなく、骨量減少抑制作用を示す SERM 様作用を有することが確認された。しかし、*in vitro*での破骨細胞に対する直接的な影響では、*in vivo*とは様相が異なり、今後はこの差異の詳細について明らかにする必要がある。また、FOS との併用摂取によるイソフラボン投与量の低減化は、ISO 単独で骨量減少抑制作用を発揮する投与量の半量までは可能であった。equol の産生についても、前駆体の daidzein の量を半量まで落としても促進可能であるが、それよりも低容量では equol への変換促進が難しいと思われる。更に本研究では、他の難消化性糖質(COS)との組み合わせによる equol 産生増加と骨量減少抑制作用も確認された。

本研究において、これらの結果をヒト試験にも活かすことを考えていたが、今回はかなわず、今後の課題としたい。

<引用文献>

- 1) Fujioka M, Uehara M *et al.* Equol, a metabolite of daidzein, inhibits bone loss in ovariectomized mice. *J Nutr*, 134: 2623-2627, 2004.
- 2) Ohta A, Uehara M *et al.* A combination of

dietary fructooligosaccharides and isoflavone conjugates increases femoral bone mineral density and equol production in ovariectomized mice. *J Nutr*, 132: 2048-2054, 2002.

- 3) Brown NM *et al.* The chemopreventive action of equol enantiomers in a chemically induced animal model of breast cancer. *Carcinogenesis*, 31: 886-893, 2010.
- 4) Uehara M, Ohta A *et al.* Dietary fructooligosaccharides modify intestinal bioavailability of a single dose genistein and daidzein and affect their urinary excretion and kinetics in blood of rats. (2001) *J Nutr*, 131: 787-795, 2001.

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10件)

Yonemoto-Yano H, Maebuchi M, Fukui K, Tsuzaki S, Takamatsu K, Uehara M, Malonyl isoflavone glucoside are chiefly hydrolyzed and absorbed in the colon, *J Agric Food Chem*, 査読有, 62: 2264-2270, 2014.
doi: 10.1021/jf404378r. Epub 2014 May 3.

Uehara M. Isoflavone metabolism and bone-sparing effects of daidzein-metabolites. *J Clin Biochem Nutr*, 査読有, 52:193-201, 2013.
doi: 10.3164/jcfn.13-2. Epub 2013 May 1.

Tousen Y, Uehara M, Abe F, Kimira Y, Ishimi Y. Effects of short-term fructooligosaccharide intake on equol production in Japanese postmenopausal women consuming soy isoflavone supplements: a pilot study. *Nutr J*, 査読有, 12:127(1-8), 2013.
doi: 10.1186/1475-2891-12-127, 2013.

Kimira Y, Tajima K, Ohta A, Ishimi Y, Katsumata S, Suzuki K, Adlercreutz H, Uehara M. Synergistic effect of isoflavone glycosides and fructooligosaccharides on postgastrectomy osteopenia in rats. *J Clin Biochem Nutr*, 査読有, 51:156-60, 2012.
doi: 10.3164/jcfn.D-12-00010. Epub 2012 May 11.

Kimira Y, Katsumata S, Suzuki K, Ishimi Y, Ueno T, Uchiyama S, Adlercreutz H, Uehara M.

Comparative activities of the S-enantiomer and racemic forms of equol on bone fragility in ovariectomized mice. *Biosci Biotechnol Biochem*, 査読有, 76:1018-1021, 2012.

<http://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1271/bbb.110973>

[学会発表](計13件)

Uehara M, Inoue H, Takahashi N, Bone-sparing effects of phytochemicals *in vitro* and in rodent models of osteoporosis. 12th Asian Congress of Nutrition (ACN2015), 2015.5.14-5.18, Pacifico Yokohama, Kanagawa.

藤井駿吾、井上博文、高橋信之、上野友美、内山成人、上原万里子: Equol 鏡像異性体の有効性と安全性: *in vivo* と *in vitro* の評価系の差異, 日本農芸化学会 2015 年度大会, 2015 年 3 月 26 日~29 日、岡山大学(岡山)

藤井駿吾、井上博文、勝間田真一、鈴木和春、吉川裕治、町田 誠、上原万里子: 骨代謝モデルマウスの骨量減少およびイソフラボン代謝に及ぼす大豆イソフラボン・セロオリゴ糖併用摂取の影響. 第 68 回日本栄養・食糧学会大会, 2014 年 5 月 30 日~6 月 1 日、酪農学園大学(札幌)

上原万里子: 骨・脂質代謝を制御する植物化学成分. 日本農芸化学会 2014 年度大会(シンポジウム: 4 SY07-3) 2014 年 3 月 27 日~3 月 30 日、(東京)

Uehara M: Possible roles of phytochemicals on bone in rodent models of osteoporosis. 6th International Functional Food Symposium, 2012. 10.24-26, Hong Kong Polytechnic University, Hong Kong.

[図書](計1件)

上原万里子(芦田均、立花宏文、原博責任編集): 食品因子による栄養機能性業(「第14章 骨・脂質・糖代謝を制御するポリフェノール」p209-226 担当) 2015、全 296 頁.

6. 研究組織

(1)研究代表者

上原 万里子 (UEHARA, Mariko)
東京農業大学・応用生物科学部・教授
研究者番号: 20211071

(2)研究協力者

Herman Adlercreutz
Folkhälsan Research Center, University of Helsinki, Finland