

平成 28 年 10 月 24 日現在

機関番号：84420

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25350178

研究課題名(和文)大豆イソフラボン代謝産物の機能性及び安全性評価に関する研究

研究課題名(英文)Assessment of efficacy and safety of isoflavone metabolite

研究代表者

石見 佳子 (Ishimi, Yoshiko)

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・国立健康・栄養研究所食品保健機能研究部・部長

研究者番号：50154159

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：大豆イソフラボン代謝産物のエクオールは機能性と安全性の評価を行った。機能性の評価では、エクオールは脂肪細胞MC3T3-L1の分化を抑制するとともに、TNFにより抑制されたヒト血管内皮由来HUVEC細胞のeNOS遺伝子発現を回復させた。エクオールは、骨粗鬆症モデル動物の骨・脂質代謝及び血流を改善する可能性が示唆された。

安全性の評価では、エクオールはエストロゲン受容体陽性乳がん細胞MCF-7のDNA合成期細胞の割合を有意に増加させた。作用機構としては、細胞周期のG1期での進行を促進させることで陽性細胞増加に導く可能性は低く、MCM2-7のクロマチン結合などに正に機能する可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：Efficacy and safety of isoflavone metabolite, equol, was examined. Equol inhibited differentiation of adipocyte, MC3T3-L1 cells and modulated eNOS gene expression in human vascular endothelial cells, HUVEC. Equol intake improved fat and bone metabolism as well as blood flow in estrogen deficient rats.

Equol, significantly increased proportion of DNA-synthesizing cells in mammary carcinoma MCF-7 cells. This effect may not be due to stimulation of progression during G1 phase of cell cycle but it may be due to stimulation of chromatin-binding of MCM2-7 complex.

研究分野：栄養学

キーワード：大豆イソフラボン フィトケミカル 安全性評価 有効性評価

1. 研究開始当初の背景

高齢化が急速に進む中、21世紀の保健医療は生活習慣病に対する予防が最重要課題となっている。女性は閉経年齢を超えると、エストロゲンの低下により骨粗鬆症や脂質代謝異常症など生活習慣病のリスクが増加する。骨粗鬆症や脂質代謝異常の発症には食事や運動等の生活習慣が関わっていることから、その改善による生活習慣病の予防が期待される。

大豆イソフラボンはエストロゲン様作用を持つことが示唆されており、閉経後の骨および脂質代謝異常、更年期症状に対する有用性が示唆されている。大豆イソフラボンのうちのダイゼインは腸内細菌によりエクオールへと代謝される。エクオールは他のイソフラボンに比べて強いエストロゲン様活性を持つことから、特にその有用性が期待されているが、作用の詳細ならびに安全性については十分に検討されていない。

我々は骨粗鬆症モデルマウスにおいて、エクオールの投与が大腿骨の骨量減少を有意に抑制し、全身の脂肪量を減少させることを報告した (Fujioka et al. J. Nutr. 2004)。さらに、閉経後女性へのイソフラボンの介入試験において、エクオール産生者は非産生者と比較し、骨量減少が抑えられ、体幹部体脂肪の増加が抑制されることを報告している (Wu et al. Menopause, 2007)。

エストロゲンは脂質代謝を調節していることが報告されていることから、弱いエストロゲン作用を示すイソフラボンの脂質代謝に対する作用も期待されているが、エクオールの脂質代謝調節作用とそのメカニズムの詳細は検討されていない。また、エクオールには、ほてりや肩こり等の更年期症状の緩和作用が認められるという介入試験の結果がある (Menopause, 2009)。

一方、我々は信頼できる RCT 研究のメタ分析により、イソフラボンの摂取が成人男女の収縮期血圧を有意に低下させることを明らかにしているが (Taku et al. J Hypertes, 2010)、これらの現象は実験的に証明されていない。

さらに安全性の評価として、細胞増殖に対する作用を、分子レベルで明らかにする。イソフラボンを含めフィトケミカルの標的細胞の増殖への効果は様々で統一的には評価できない。ここでは、標的細胞の DNA 複製への影響に焦点をあて、DNA 複製そのものへの効果と DNA 複製に中心的な役割を担う MCM2-7 タンパク質の発現とクロマチン結合性に対する効果の両面から調べる。これまでにマウスの *in vivo* の実験から、エストロゲンが MCM タンパク質の発現を促進し、MCM タンパク質のクロマチン結合性を促進することが他のグループから示されている (Pan et al. Proc. Natl. Acad. Sci., 2006)。

2. 研究の目的

女性は閉経期を迎えると、エストロゲンの分泌低下により骨粗鬆症や脂質代謝異常症など生活習慣病のリスクが増加する。大豆イソフラボンはエストロゲン様作用を持つことが示唆されており、閉経後の骨・脂質代謝異常、更年期症状及び高血圧に対して有効に作用する可能性が示唆されている。なかでも、ダイゼインから腸内細菌によって産生されるエクオールは、他のイソフラボンに比べて強いエストロゲン様活性を持つことが示唆されている。しかし、その作用の詳細ならびに安全性は不明である。そこで、本研究では、エストロゲン欠乏に起因する骨及び脂質代謝異常、さらには血管系に対するエクオールの新規作用とそのメカニズム、さらに安全性評価として細胞増殖に対する作用とそのメカニズムを分子、細胞および動物レベルで明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

25 年度：有効性評価としてダイゼインの代謝産物であるエクオールは脂肪細胞の増殖と分化に対する作用を、脂肪細胞株細胞である MC3T3-L1 細胞を用いて検討した。安全性評価として、エクオールのヒト乳がん細胞 MCF-7 の DNA 複製に対する影響とその DNA 切断活性を調べた。

26 年度：ヒト血管内皮由来 HUVEC 細胞を用いて、血管拡張に関連する eNOS 及び血管の炎症に与える遺伝子発現に対するイソフラボン及びエクオールの影響を評価した。安全性評価として、エクオールのヒト乳がん細胞の MCM2-7 タンパク質の発現とそのクロマチン結合性に対する影響を調べた。

27 年度：卵巣摘出骨粗鬆症モデル動物にエクオールを摂取させ、骨・脂質代謝、血流等に及ぼす影響を評価した。安全性評価として、ダイゼインの MCF-7 細胞 DNA 複製に対する影響と MCM2-7 タンパク質のクロマチン結合性に対する影響を調べた。

4. 研究成果

25 年度：有効性の評価では、エクオールは、脂肪様株細胞 MC3T3-L1 細胞の増殖に対し、0.1 ~ 50 μ M では影響を及ぼさなかったが、100 μ M では有意に抑制した。また、エクオールは、脂肪細胞の分化の指標である PPAR、C/EBP、FAS の遺伝子発現及び脂肪の蓄積に対し、100 μ M では有意に抑制した（図 1）。

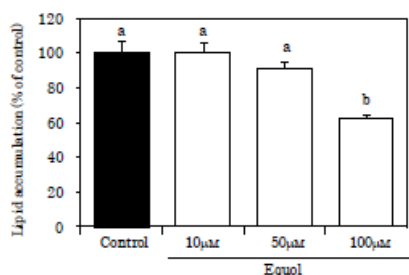


図 1. エクオールの脂肪細胞の脂肪蓄積に対する影響

安全性の評価では、エストロゲン受容体タンパク質の存在を確認したヒト乳がん由来の MCF-7 細胞を用いて、エクオールの DNA 複製に対する影響を、DNA 合成前駆体となるブROMODEOKISHIURIJIN (BrU) の DNA への取り込みを蛍光顕微鏡観察することにより調べたところ、1 μ M エクオールは、無添加細胞に比べ DNA 合成を促進する傾向があったが、統計学的な有意差は認められなかった。この結果の確実性を検討するために、今後、実験例数を増やして、エクオールの乳がん細胞の DNA 複製への影響を明らかにすることとした。一方で、エクオールは 100 μ M まで、2 本鎖 DNA 切断の指標となる、H2AX のリン酸化を有意に増加させなかった（図 2）。

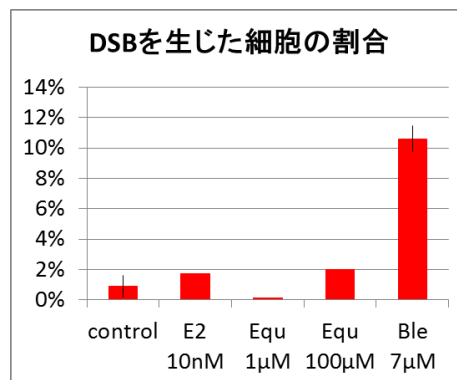


図 2 エクオールの DNA 2 重鎖切断 (DSB) への影響：MCF-7 培養液に各試薬の存在下に 2 日間培養し、 γ -H2AX 抗体を使った免疫染色により DNA の 2 重鎖切断を調べた。E2：エストロゲン、Equ：エクオール、Ble：プレオマシン

26 年度：有効性の評価では、イソフラボンのヒト血管内皮由来 HUVEC 細胞を用いて血管拡張に関連する因子の遺伝子発現に対する作用を調べたところ、イソフラボン及びエクオールは、TNF により抑制された HUVEC 細胞の eNOS 遺伝子発現を回復させ、また TNF により更新した IL-6 遺伝子発現を抑制した。

これにより、イソフラボンには血管を拡張させる作用がある可能性が示唆された。安全性の評価では、エストロゲン受容体をもつヒト乳がん由来 MCF-7 細胞に対し、添加するエクオール濃度を 0.01 μM から 100 μM まで変えて培養し、DNA 複製細胞の割合を調べたところ、0.01 μM から 10 μM のエクオール存在下に 2 倍以内の DNA 複製細胞の増加が見られた。1 μM エクオール存在下での実験を繰り返した結果、DNA 複製促進が有意であることが示された (図 3)。エクオールによる DNA 複製促進の機構を明らかにするために、DNA 複製に DNA ヘリカーゼとして機能する MCM2-7 タンパク質の量的な変化を調べたが、増加するという結果は得られなかった。一方で、細胞分画や細胞染色の手法を使った実験より、MCM3 などクロマチン結合型の割合が増加する傾向が見られた。

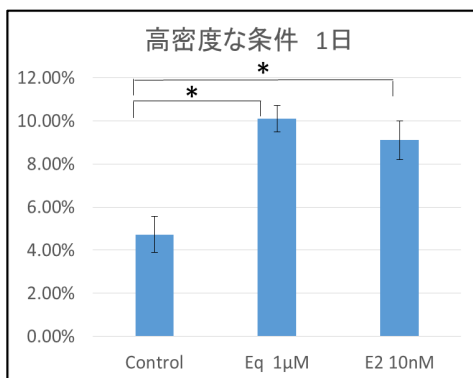


図 3 MCF-7 細胞 DNA 複製に対するエクオールの影響：MCF-7 培養液にエクオール(Eq)またはエストロゲン (E2)を加え 1 日間培養した後、BrU を添加し、抗 BrU 抗体を用いて免疫細胞染色することで、DNA 合成期の細胞を検出した。全体の細胞中の DNA 合成期細胞の割合を縦軸に示す。

27 年度：有効性評価では、卵巣摘出骨粗鬆症モデルラットを用いて、エクオールの脂質代謝、骨代謝及び血流に対する影響を評価したところ、5 週間の 0.064%エクオールの混

餌投与は、エストロゲン欠乏による全身体脂肪量 (図 4) と血中総コレステロールの増加及び骨量減少を改善した (図 5)。また、エクオール摂取は、エストロゲン欠乏による血流の低下を改善する傾向が認められたが、大動脈血管内皮の eNOS、カベオリン 1 及びカルモデュリン 1 遺伝子発現子発現には影響しなかった (図 6)。

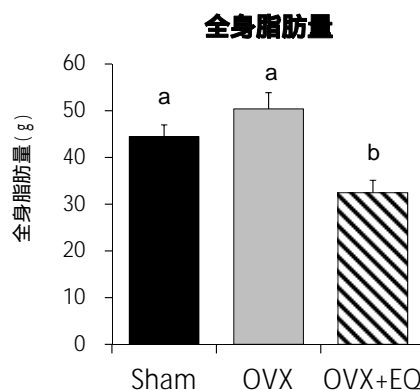


図 4. エクオール摂取が骨粗鬆症モデルラット (OVX) の全身脂肪量に及ぼす影響
ANOVA: 異なる文字で有意差あり、 $P < 0.05$

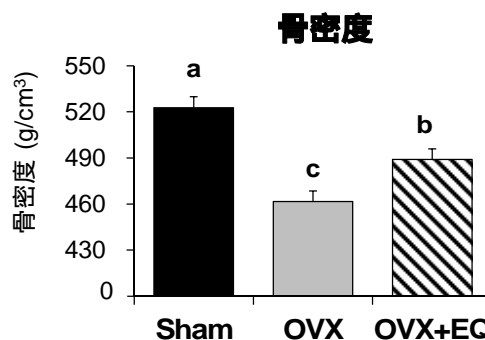


図 5 . エクオール摂取が骨粗鬆症モデルラット (OVX) の腰椎骨密度に及ぼす影響
ANOVA: 異なる文字で有意差あり、 $P < 0.05$

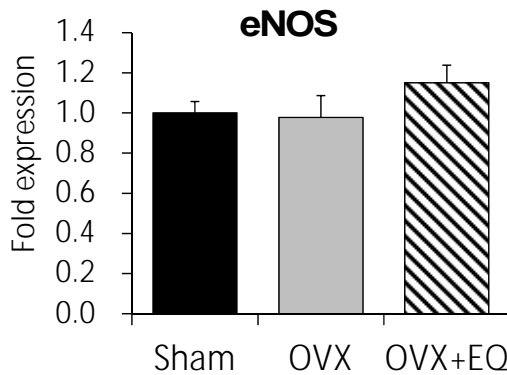


図6 .エクオール摂取が骨粗鬆症モデルラットの動脈内皮の eNOS 遺伝子発現に及ぼす影響

安全性評価では、ダイゼインの効果を調べた。0.01 ~ 100 μM のダイゼインの存在下に1日間培養した MCF-7 細胞の DNA 合成期細胞を、BrU の取り込みにより検出した (図7)。1 μM ダイゼイン添加細胞では、非添加細胞の約2倍の DNA 合成陽性細胞が観察された。この増加は統計的に有意であった。ダイゼインによる DNA 合成細胞の増加が、サイクリン D1 の核局在化による G1 期進行の促進によってもたらされた可能性を検討するために、MCF-7 細胞に対する、サイクリン D1 核局在化を抑制する GSK-3 キナーゼ阻害剤の LiCl_2 添加の影響を調べた。25 mM LiCl_2 によりサイクリン D1 の核局在化が促進されたが、DNA 合成細胞の増加は認められず、逆に低下した。この条件に 1 μM ダイゼインを共存させると、DNA 合成の抑制が部分的に解除された。よって、ダイゼインによる DNA 合成の促進をサイクリン D1 の核局在化で説明することは難しい。また、 LiCl_2 は DNA 合成に対し負に作用する未知の作用をもち、その効果をダイゼインは緩和すると考えられる。さらに G1 期移行でのダイゼインの効果を検討するために、G0 から G1 期への移行に関わる転写因子 MYC の変動について調べたが、現在までのところ、MYC タンパク質の量的な変化は認められていない。以上の結果から、ダイゼインによる DNA

合成細胞陽性率の増加は、G1 期の進行の促進では説明できないと考えられる。ダイゼインは、MCM2-7 ヘリカーゼのクロマチン結合の促進を含む別の機構で DNA 合成を促進すると考えられる。

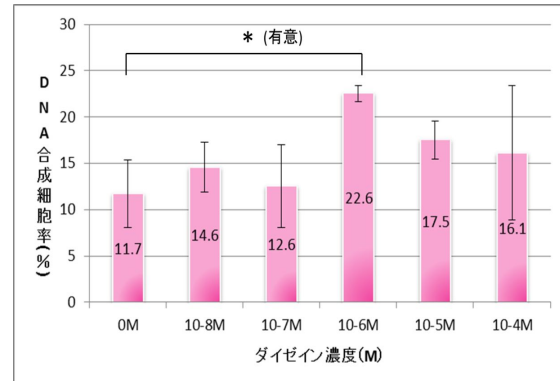


図7 ダイゼインの MCF-7 細胞 DNA 複製に対する影響: MCF-7 細胞培養液にダイゼインを 10^{-8} から 10^{-4}M までの濃度で加え、1日間培養した。BrU 取り込み細胞を免疫染色法で検出した。全体の細胞中の取り込み細胞の割合を縦軸に示す。

これらの結果より、大豆イソフラボン及びその代謝産物であるエクオールは、エストロゲン欠乏時における脂質代謝、骨代謝及び血流低下を改善する可能性が示唆された。また、ダイゼインとエクオールは、1 μM の濃度で、ヒト由来乳がん細胞の DNA 複製期細胞の割合を2倍程度増加させることが分かった。その機構としては、イソフラボンが遺伝子発現を誘導することで MCM2-7 タンパク質を増加させることや、エストロゲン受容体を介して、MCM2-7 などに直接的に作用する可能性が考えられる。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件) 主なもの7件

1. Nishide Y, Tousen Y, Inada M, Miyaura C, Ishimi Y, Bi-phasic effect of equol on adipocyte differentiation of MC3T3-L1 cells, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* ;77,201 -204,2013

2. Nishide Y, Tadaishi M, Kobori M, Tousen Y, Kato M, Inada M, Miyaura C, Ishimi Y, Possible role of S-equol on bone loss via amelioration of inflammatory indices in ovariectomized mice, J Clin Biochem Nutr ;53,41-48,2013

3. Tousen Y, Ishiwata H, Takeda K, Ishimi Y, Assessment of safety and efficacy of perinatal or peripubertal exposure to daidzein on bone development in rats, Toxicology Reports; 2, 429-436 ,2015

4. Ueno T, Abiru Y, Uchiyama S, Ishimi Y, Distribution of 24-h urinary equol excretion as an indicator of the physiological range in healthy Japanese equol excretors, J Funct Foods; 7, 129-135 , 2014

5. 石見佳子, 食品中の大豆イソフラボン組成と生体利用性, 食品と開発;49, 70 - 72 , 2014

6. Tousen Y, Ishiwata H, Ishimi Y, Ikegami S- Equol, a metabolite of daidzein, is more efficient than daidzein for bone formation in growing female rats, Phytother Research;29(9),1349-1354,2015

7. Ishimi Y,Osteoporosis and Lifestyle, J.Nutr.Sci.Vitaminol;61,S139-S141,2015

〔学会発表〕(計 10 件) 主なもの 6 件

1. 西出依子, 只石幹, 小堀真珠子, 東泉裕子, 加藤美智子, 稲田全規, 宮浦千里, 石見佳子, 大豆イソフラボン代謝産物エクオールが閉経後骨粗鬆症モデルマウスの骨髄細胞中の遺伝子発現に及ぼす影響, 第 67 回日本栄養・食糧学会, 2013. 名古屋市

2. 田中知紀, 永島峻甫, 東泉裕子, 石見幸男, 石見佳子, 大豆イソフラボン代謝産物エクオールの DNA 複製への影響, 第 87 回日本生化学会, 2014. 京都市

3. Tousen Y, Kato M, Nishide Y, Ueno T, Uchiyama S, Ishimi Y, Soy isoflavones metabolite, S-equol, relieves endothelial dysfunction and bone loss in varietomised rats, 12th Asian Congress of Nutrition 2015, 2015. 横浜市

4. 田中智紀, 永島峻甫, 東泉裕子, 石見佳子, 石見幸男, 大豆イソフラボン代謝産物エクオールの DNA 複製への影響, 平成 27 年度日本生化学会関東支部例会, 2015. 新潟市

5. 石見佳子, 健康食品素材の有効性評価及び健康影響評価に関する研究, 第 62 回日本栄養改善学会学術総会, (学会賞受賞講演) 2015. 福岡市

6. 東泉裕子, 松本雄宇, 小池理絵, 平田成美, 上野友美, 内山成人, 石見佳子, 大豆イソフラボン代謝産物が骨粗鬆症モデルラットの血流および骨密度に及ぼす影響, 第 70 回日本栄養・食糧学会: 2016. 西宮市

〔図書〕(計 2 件) 主なもの 1 件

1. 石見佳子, 建帛社, 大豆イソフラボンの有用性と安全性, 2015, 26 総ページ

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石見佳子 (Yoshiko ISHIMI)

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所 国立健康・栄養研究所・食品保健機能研究部・部長

研究者番号: 50154159

(2) 研究分担者

石見幸男 (Yukio ISHIMI)

茨城大学・理学部・教授

研究者番号: 80159772

(3) 連携研究者

東泉裕子 (Yuko TOUSEN)

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所 国立健康・栄養研究所・食品保健機能研究部・研究員

研究者番号: 20360092