

大豆由来イソフラボンによる骨代謝調節機序

森田恭子*・濱松由子・木戸慎介・竹谷 豊・宮本賢一・武田英二

徳島大学医学部

Effect of Soybean Isoflavone on Bone Metabolism

Kyoko MORITA, Yuko HAMAMATSU, Shinsuke KIDO, Yutaka TAKETANI,
Ken-ichi MIYAMOTO and Eiji TAKEDA

School of Medicine, The University of Tokushima, Tokushima 770-8503

ABSTRACT

Genistein is an isoflavone abundantly presents in soybeans, and shows a structural similarity to estrogen, which suggests that it may act as a phytoestrogen. Recently, genistein has been shown to have a stimulatory effect on bone formation and an inhibitory effect on osteoclastic bone resorption. In addition, genistein has been reported to be as active as estrogen in maintaining bone mass in ovariectomized (OVX) animals. However, the mechanisms for the action of isoflavone as a phytoestrogen remain unknown. Here, we investigated the effect of genistein on the expression of type I collagen (COL I), alkaline phosphatase (AP), osteopontin (OP) and osteocalcin (OC) genes that have been associated with bone formation in mouse osteoblastic cells (MC3T3-E1 cells) and OVX mice. In MC3T3-E1 cells, genistein as well as estrogen increased the amount of OP mRNA. No significant difference was observed in the levels of COL I, AP and OC mRNAs. In OVX mice, the weight of uterus was significantly decreased compared with the sham-operated control. Estrogen completely restored the weight of uterus in the OVX mice, whereas genistein did not affect. The levels of the four transcripts in the bone were markedly decreased in the OVX mice. Estrogen increased the levels of COL I mRNA, but not AP, OP or OC mRNA. Similar findings were observed in the genistein treated OVX animals. These results indicate that genistein exhibits estrogenic action in bone of OVX animals without estrogenic action in the uterus. Thus, these results suggest that soybean containing genistein may be useful nutritional source in the prevention of osteoporosis. *Soy Protein Research, Japan* **2**, 76-82, 1999.

Key words : isoflavone, genistein, estrogen, osteoporosis, MC3T3-E1 cells

近年、食品中の成分が多様な生理的機能を示すこと

が明らかとなり、生活習慣病を予防する食品因子として、注目されている。特に大豆には、ゲニステインやダイゼインなどのイソフラボンをはじめとした多くの

*〒 770-8503 徳島市蔵本町 3-18-15

配糖体が含まれており¹⁾、動脈硬化や乳癌、前立腺癌などの予防効果を示すことが報告されている²⁾。これらの予防効果は、イソフラボンが、エストロゲンに類似した構造を持つフィトエストロゲンであることと関連がある (Fig. 1)。

一方、乳癌、前立腺癌、心臓病の他にエストロゲンが発症に関与する疾患として骨粗鬆症がある。エストロゲンは、カルシトニンを上昇させ骨吸収を抑制する作用、25 水酸化ビタミン D1 α 水酸化酵素活性の亢進を介して腸管からのカルシウムの吸収を高める作用が知られている³⁾。一方、エストロゲンは骨芽細胞にその受容体が発現し、*in vitro* で I 型コラーゲンや transforming growth factor (TGF- β) を調節し、骨基質を維持することが報告されている³⁾。また、副甲状腺ホルモンによる骨吸収を抑制することも知られている³⁾。従って、閉経後のエストロゲン低下は、著しい骨量の低下をもたらす、骨折の頻度も高まることから、閉経後の骨粗鬆症への対処は重要である。最近、大豆の摂取量と骨密度の相関が注目され、大豆中のイソフラボンによる骨粗鬆症の予防効果が期待されている。しかし、イソフラボンの骨代謝に対する作用機序は明らかではない。そこで本研究では、大豆より分離したイソフラボン (ゲニステイン) の骨芽細胞に対する作用について *in vitro* で検討し、エストロゲンの作用と比較した。さらに、卵巣摘出マウスにゲニステインを投与し、生体への影響についても検討を行った。

方 法

実験 1 培養骨芽細胞に対するゲニステインの投与実験 マウス頭蓋冠由来骨芽細胞様細胞株の培養

マウス頭蓋冠由来骨芽細胞様細胞株 (MC3T3-E1 細胞) は、10% の牛胎児血清 (FBS; Equestech-Bio) を含む培養液 (MEM- α ; α -modified minimum essential medium,

GIBCO-BDL) 中、5% CO₂ 条件下において 37℃ で培養した。培養液の交換は 3 日ごとに行った。

ゲニステイン、17 β -エストラジオールの骨基質たん白質 mRNA 発現に及ぼす影響

MC3T3-E1 細胞 (細胞 20 万個 /10 cm dish) をコントロール群、ゲニステイン群、エストラジオール群の 3 群に分け、継代から、3, 6, 9, 12, 18 日目に、ゲニステイン群には終濃度 10⁻⁶ M になるように調整した大豆由来のゲニステイン (フジッコ)、エストラジオール群には、終濃度 10⁻⁹ M になるように調整した 17 β -エストラジオール (SIGMA) をそれぞれ 100 μ L 添加した。コントロール群には、100% エタノールを 100 μ L 添加した。なお、ゲニステイン、17 β -エストラジオールによる誘導の際には、活性炭で処理した FBS を用いた。それぞれ 24 時間培養後、MC3T3-E1 細胞から ISOGEN (WAKO) を用いて RNA を抽出し RT-PCR 解析を行った。

RT-PCR 解析

MC3T3-E1 細胞から抽出した total RNA 5 μ g を逆転写酵素と反応させ、cDNA を合成した。骨芽細胞の分化マーカー⁴⁾ として、I 型コラーゲン、アルカリフォスファターゼ、オステオポンチン、オステオカルシンを用い、PCR 法で増幅するため Table 1 に示す合成オリゴヌクレオチドプライマーを作成した。テンプレート (合成 cDNA) は、それぞれ 1 μ M の正方向及び逆方向のプライマーと耐熱性 DNA ポリメラーゼ Ampli Taq Gold (Perkin Elmer) または Taq polymerase (サウデー) を用い、2.5 mM dNTP mixture, 100 mM Tris-HCl (pH 8.3), 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 0.01% (w/v) gelatin を含む反応液中にて、以下の条件で各 PCR 反応を行った: I 型コラーゲン/プレヒート 95℃ 12 分 1 サイクル、変性 95℃ 1 分・アニーリング 62℃ 1 分 30 秒・伸長反応 72℃ 1 分 30 ~ 40 サイクル、伸長反応 72℃ 1 分 1 サイクル; アルカリフォスファターゼ,

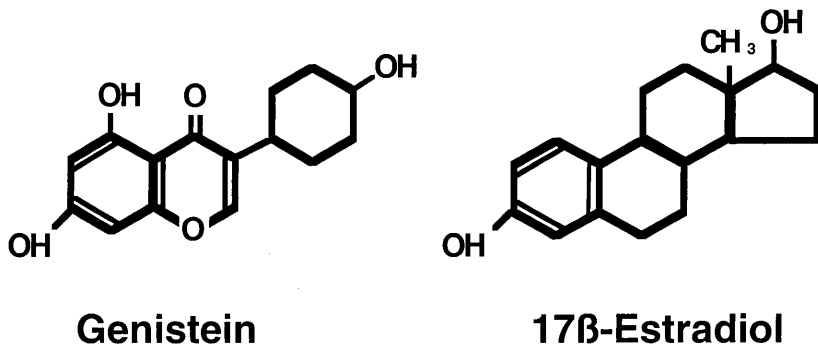


Fig. 1. Skeletons of genistein with estrogenic properties (phytoestrogen).

オステオポンチン, オステオカルシン/プレヒート 95℃ 1分 30秒 1サイクル, 変性 95℃ 1分・アニーリング 55℃ 2分 30秒・伸長反応 72℃ 2分 30サイクル, 伸長反応 72℃ 5分 1サイクル,

また各 PCR 産物は, 1.5% アガロースゲルにて泳動し, エチジウムブロマイド反応量を FM Bio アナライザー (TAKARA) で定量した. なお, 各 PCR 反応の定量に際しては, β -actin で補正した値を用いた.

実験 2 卵巣摘出 (OVX) マウスにおけるゲニステインの投与実験

11 週齢の C57BL/6J 雌マウスに偽手術 (Sham) あるいは卵巣摘出手術 (OVX) を施し 4 週間後, OVX 群を Vehicle, ゲニステインおよびエストラジオール投与群の 3 群に分類した. Vehicle 群には, 100% エタノールを, ゲニステイン群には 0.1 mg/day のゲニステイン, エストラジオール群には 0.1 μ g/day の 17 β エストラジ

オールを 2 週間皮下投与した. 2 週間後, 各マウスより子宮を摘出し, 重量を測定した. また, 大腿骨より total RNA を抽出し, 実験 1 と同様に RT-PCR 解析を行った.

結 果

MC3T3-E1 細胞における骨基質たん白質 mRNA の発現に及ぼすゲニステインおよび 17 β -エストラジオールの影響

MC3T3-E1 細胞の分化に対するゲニステイン及び 17 β -エストラジオールの影響を検討するため, 骨芽細胞の基質たん白質で分化マーカーである I 型コラーゲン, アルカリフォスファターゼ, オステオポンチン, オステオカルシンについて, RT-PCR 解析を行った (Fig. 2). 各 mRNA レベルは, 内部標準スタンダード

Table 1. PCR primer sequences

Target mRNA	Forward primer	Reverse primer	PCR product size (bp)
COL I type I collagen	TCTCCACTCTTCTAGTTCCT	TTGGGTCATTTCCACATGC	268
AP alkaline phosphatase	GCCCTCTCCAAGACATATA	CCATGATCACGTCGATATCC	372
OP osteopontin	ACACTTTCCTCAATCGTCC	TCTGACAAAGCCTTCATGTCC	240
OC osteocalcin	TGCCCTTTCGTTGTGTGTCC	AAATAGTGATACCGTAGATGCG	199
β -actin	CATCTGGGCCGCTCTAGGCACCA	CGGTTGGCCTTAGGGTTTCAGGGG	249

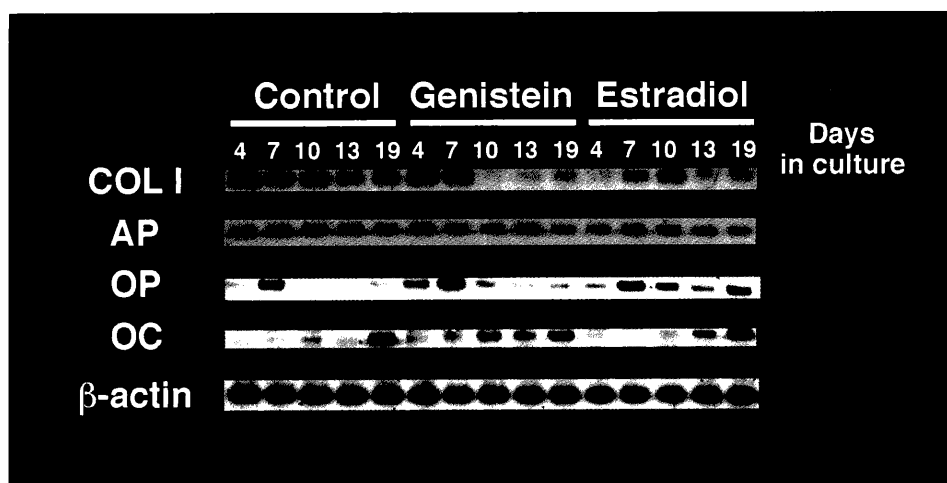


Fig. 2. The effects of genistein and 17 β -estradiol on osteoblastic markers gene expression during osteoblast differentiation. MC3T3-E1 cells were treated for 24h with vehicle (100% ethanol), genistein or 17 β -estradiol on days 3, 6, 9, 12 and 18. Total cellular RNA was isolated, and RT-PCR analysis was performed as described in methods. COL I, type I collagen : AP, alkaline phosphatase : OP, osteopontin : OC, osteocalcin.

として β -actin を用いて補正し、コントロール群の4日目の発現レベルを 100%とした時の相対的变化で示した (Fig. 3). コントロール群では、骨芽細胞分化の初期に発現する I 型コラーゲンは、4 日目以降経時的に低下した。また、石灰化の初期に発現量が上昇するアルカリフォスファターゼは、I 型コラーゲンより遅れて7日目に発現のピークが見られ、7 日目以降低下した。骨芽細胞の分化段階の中期以降に発現が高まるオステオポンチンは、アルカリフォスファターゼと同様7日目にピークが現れた。さらに、骨芽細胞の石灰化の最終的な指標となるオステオカルシンの発現は、19 日目に著しい上昇が認められた。一方、ゲニステイン群はコントロール群と比較して、オステオポンチンの発現が上昇し、I 型コラーゲン、アルカリフォスファターゼおよびオステオカルシンについては影響が認め

られなかった。またエストラジオール群もゲニステイン群と同様にオステオポンチンのみ発現を誘導した。

OVX マウス子宮重量に及ぼすゲニステインおよび 17β -エストラジオールの影響

子宮重量は、OVX によって低下し、2 週間のゲニステイン皮下投与によっても、全く回復しなかった。一方、 17β -エストラジオールの2 週間の投与により、子宮重量は Sham レベルに回復した (Fig. 4)。

OVX マウス大腿骨基質たん白質 mRNA 発現に及ぼすゲニステインおよび 17β -エストラジオールの影響

各マウス大腿骨における I 型コラーゲン、アルカリフォスファターゼ、オステオポンチン、オステオカルシン mRNA レベルについて RT-PCR 解析を行った (Fig. 5). I 型コラーゲンは、Fig. 5 B に示すように、OVX によって低下し、ゲニステインおよび 17β -エストラジ

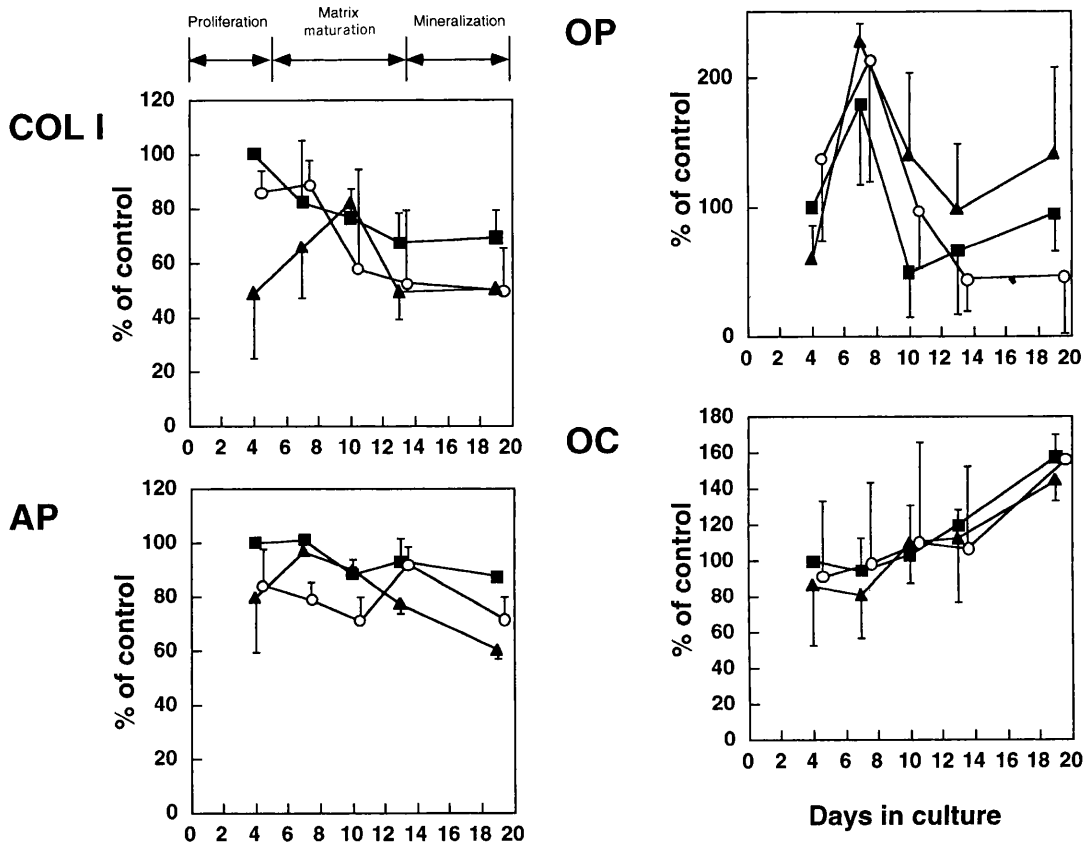


Fig. 3. The effects of genistein and 17β -estradiol on osteoblastic markers gene expression during osteoblast differentiation. Fig. 2 was the results normalized to β -actin mRNA and presented as a percentage relative to the results of the control on day 4. The results are presented as the mean $\pm$ SD (n=3). Control (■), Genistein (○), Estradiol (▲)

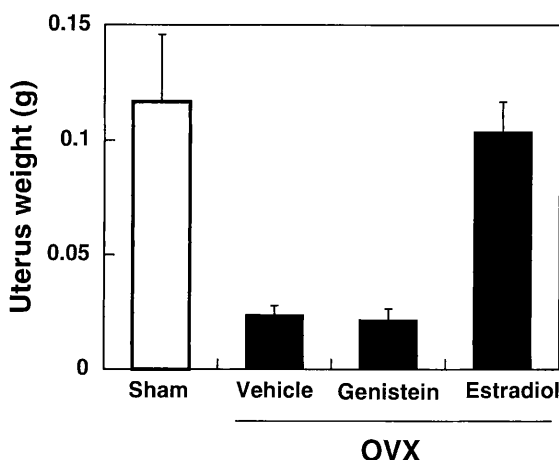


Fig. 4. The effects of genistein and 17 β -estradiol on uterus weight in OVX mice. Female mice were either sham-operated or OVX. Some OVX mice were treated for 2 weeks with genistein (0.1 mg/day) or 17 β -estradiol (0.1 μ g/day) subcutaneously. The results are presented as the mean $\pm$ SD (n=5).

オールの投与によって、著しく発現量が増加した。一方、アルカリフォスファターゼ、オステオポンチン、オステオカルシン mRNA レベルは、OVX によって低下し、ゲニステインおよび 17 β -エストラジオールの投与によっても上昇しなかった (Fig. 5 A)。

考 察

骨粗鬆症の発症要因であるエストロゲン欠乏により、女性は閉経後数年間で骨吸収が亢進し、急速に骨量が低下する。これに対し、エストロゲンの補充療法により骨量減少が抑制されることから、エストロゲンは閉経後の骨粗鬆症の治療薬として中心的な位置を占めている⁵⁾。しかし、エストロゲンは骨に対する作用と同時に女性生殖器に対する作用も有し、補充療法には子宮出血、乳癌、子宮内膜癌などのリスク増大という問題点が懸念されている。従って副作用の少ない骨粗鬆症の治療法についての検討が重要である。最近、エストロゲンの有効性を生かしながら生殖器への作用を排除できる理想的なエストロゲン様薬剤として、選択的エストロゲン受容体モジュレーター (selective estrogen modulator: SERM) が注目されている⁶⁾。SERM は、エストロゲンの骨への作用を保持したままで生殖器への作用を失ったもの、あるいは生殖器では抗エストロゲ

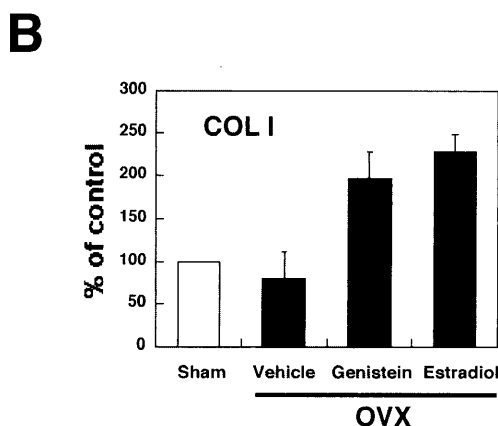
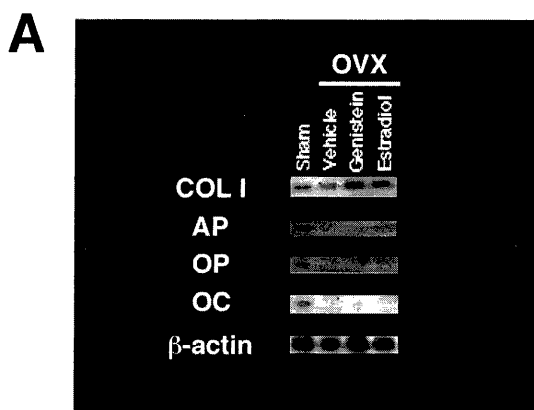


Fig. 5. The effects of genistein or 17 β -estradiol on osteoblastic markers gene expression in OVX mice bone. Total RNA was isolated from genistein or 17 β -estradiol treated mice femur. A: RT-PCR analysis was performed as described in methods. B: The results of COL I in panel A were normalized to β -actin mRNA and presented as a percentage relative to results of the sham-operated control. The results are presented as the mean $\pm$ SD (n=5).

ン作用を示すというエストロゲン誘導体である。例えば、ラロキシフェンは骨にのみアゴニストとして働き、子宮や乳腺に対してはアンタゴニストとして作用する⁷⁾。今回、ゲニステインが 17 β -エストラジオールと異なって OVX マウスの子宮重量には影響を与えず、一方大腿骨基質たん白質の発現には、エストロゲンと同様の作用を示すことが明らかとなった。また、Ishimi らは、ゲニステインが OVX マウスにおいて、子宮に全く作用することなく骨髓 B リンパ球造血の亢進及び骨密度低下を正常化させることを報告した⁸⁾。す

なわちゲニステインは、骨及び骨髄に対してのみ選択的なエストロゲン様作用をもつSERMであると考えられる。これらの報告は大変興味深く、ゲニステインの骨への作用機序を理解するのに役立つと考えられる。

また、今回骨芽細胞を用いて、ゲニステインの直接的な作用についても検討した。その結果、ゲニステインは骨基質たん白質のうちオステオポンチンの発現を刺激し、その作用は17 β -エストラジオールに類似していた。しかし、OVXマウスを用いた*in vivo*の実験系では、ゲニステインはオステオポンチンの発現には影響を与えなかったが、骨芽細胞に対しては影響が見られなかったI型コラーゲンの発現が上昇した。これら*in vitro*と*in vivo*実験結果の相違は、ゲニステインが直接骨基質たん白質遺伝子発現を調節するのではなく、エストロゲン受容体あるいは種々のサイトカインの調

節を介して作用する可能性を示唆している。実際、生体内におけるエストロゲンの生理作用は、エストロゲン受容体を介して引き起こされている。エストロゲン受容体には、現在 $\alpha^{9)}$ と $\beta^{10)}$ の2種類のタイプが同定されており、リガンドであるエストロゲンの存在下でエストロゲン応答配列に結合し、標的遺伝子の転写を調節すると考えられている。現在、ゲニステインのエストロゲン受容体に対する作用について検討を行っている。今回の結果は、ゲニステインが骨形成に関与している可能性を示しているが、今後はエストロゲン受容体も含めた骨形成促進機序、あるいは骨吸収の抑制作用についても検討することが重要である。また、副作用の少ない治療法の開発は臨床的に非常に重要な課題であり、今後さらにゲニステインの骨代謝機序を明確にしていけることが必要である。

要 約

大豆には、ゲニステインなどエストロゲン様の構造を持つイソフラボンが含まれており、フィトエストロゲンの特性を有すると考えられているが、骨代謝に対する作用機序は明らかではない。そこで本研究では、大豆由来のイソフラボンであるゲニステインの骨芽細胞に対する作用について検討した。マウス頭蓋冠由来骨芽細胞様細胞株MC3T3E1細胞に、 10^{-6} Mのゲニステインおよび 10^{-9} Mの17 β -エストラジオールを経日的に添加して24時間培養後、RNAを抽出した。骨芽細胞の分化マーカーであるI型コラーゲン、アルカリフォスファターゼ、オステオポンチン、オステオカルシンについてRT-PCR解析を行った結果、ゲニステインは、I型コラーゲン、アルカリフォスファターゼ、オステオカルシンの発現にはほとんど影響を与えなかった。一方、ゲニステインは、17 β -エストラジオールと同様にオステオポンチンの発現を増加させた。次に、卵巣摘出マウスに、ゲニステインおよび17 β -エストラジオールを2週間皮下投与した。ゲニステインはOVXによって低下した子宮重量を全く回復しなかったが、17 β -エストラジオールは、Sham群レベルまで回復させた。さらに、各マウス大腿骨よりRNAを抽出し、RT-PCR解析を行った結果、ゲニステインは17 β -エストラジオールと同様にI型コラーゲンmRNAレベルを増加させた。以上の結果より、ゲニステインは、子宮には作用しないが、骨に対してエストロゲン様作用を示すことが明らかとなった。

文 献

- 1) Franke AA, Custer LJ, Cerna CM and Narala KK (1994) : Quantitation of phytoestrogens in legumes by HPLC. *J Agric Food Chem*, **42**, 1905-1913.
- 2) Brandi ML (1997) : Natural and synthetic isoflavones in the prevention and treatment of chronic diseases. *Calcif Tissue Int*, **61**, S5-S8.
- 3) Harris SA, Tau KR, Turner RT and Spelsberg TC (1996) : Estrogens and progestins. In : *Principles of Bone Biology*. Bilezikian JP, Raisz LG and Rodan GA, eds., Academic Press, San Diego, pp. 507-520.
- 4) Stein GS, Lian JB, Stein JL, van Wijnen AJ, Frenkel B and Montecino M (1996) : Mechanisms regulating osteoblast proliferation and differentiation. In : *Principles of Bone Biology*. Bilezikian JP, Raisz LG and Rodan GA, eds., Academic Press, San Diego, pp. 69-86.
- 5) Hannon R, Blumsohn A, Naylor K and Eastell R (1998) : Response of biochemical markers of bone

- turnover to hormone replacement therapy : impact of biological variability. *J Bone Miner Res*, **13**, 1124-1133.
- 6) Turner RT, Wakley GK, Hannon KS and Bell NH (1988) : Tamoxifen inhibits osteoclast-mediated resorption of trabecular bone in ovarian hormone-deficient rats. *Endocrinology*, **122**, 1146-1150.
 - 7) Black LJ, Sato M, Rowley ER, Magee DE, Bekele A, Williams DC, Cullinan GJ, Bendele R, Kauffman RF, Bensch WR, Frolik CA, Termine JD and Bryant HU (1994) : Raloxifene (LY139481 HCl) prevents bone loss and reduces serum cholesterol without causing uterine hypertrophy in ovariectomized rats. *J Clin Invest*, **93**, 63-69.
 - 8) Ishimi Y, Miyaura C, Ohmura M, Onoe Y, Sato T, Uchiyama Y, Ito M, Wang X, Suda T and Ikegami S (1999) : Selective effects of genistein, a soybean isoflavone, on B-lymphopoiesis and bone loss caused by estrogen deficiency. *Endocrinology*, **140**, 1893-1900.
 - 9) Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S and Gustafsson JA (1996) : Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci USA*, **93**, 5925-5930.
 - 10) Mosselman S, Polman J and Dijkema R (1996) : ER beta : identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett*, **392**, 49-53.