

メバロン酸代謝経路を介したイソフラボンの骨量低下抑制作用の 作用機序解明に関する研究

海老沢秀道・腰原康子*

東京都老人総合研究所骨代謝制御研究グループ

Studies on Bone-protective Function of Isoflavone via the Mevalonate Metabolic Pathway

Hidemichi EBISAWA and Yasuko KOSHIHARA

Bone Research Group, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology, Tokyo 173-0015

ABSTRACT

The purpose of the present study was to elucidate the mechanism on bone protective function of isoflavone in relation to mevalonate-geranylgeranylpyrophosphate (GG-PP) metabolic pathway and signal transduction. We examined the effects of dietary isoflavone on mevalonate and GG-PP production in ovariectomized (OVX) aged-rats in experiment-1 and the effects of daidzein and genistein treatment on Rho-A level in rat osteosarcoma cells (UMR-106) in experiment-2. In experiment-1, rats fed isoflavone supplemented diet (OVX-IF) showed 1) relatively lower biochemical markers of bone metabolism, 2) higher urinary mevalonate and relatively higher serum GG-PP than those of control (OVX-CA). In experiment-2, 3) daidzein or genistein treatment caused apparently lower Rho-A level in particulate and soluble fraction and lower ratios of particulate to soluble fraction (P/S ratio) than those of control. 4) Mevalonate caused higher P/S ratio than that of control, although diminished Rho-A level was observed. 5) Diminished Rho-A level by genistein treatment was rescued by co-treatment with mevalonate or GG-PP. These results suggest that daidzein and genistein inhibits the expression and activation of Rho-A by mevalonate-GG-PP metabolic pathways in osteoblast. But, in the present study, dietary isoflavone did not reduce the mevalonate and GG-PP production in rats since aged female rats had wide variation of responsibility to dietary isoflavone. *Soy Protein Research, Japan* **5**, 117-121, 2002.

Key words : isoflavone, daidzein, genistein, mevalonate, Rho-A

*〒173-0015 東京都板橋区栄町35-2

ダイゼインやゲニステイン等の大豆イソフラボン
は、生殖器に影響しない、副作用の少ない骨量低下抑
制因子として報告されている^{1,2)}。しかし、骨代謝対
するイソフラボンの作用機序については十分明らか
にされていない。最近、低分子GTPたん白質のRho-Aと
骨代謝の関係が注目されている。Rho-Aは細胞質中に
発現しているが、メバロン酸代謝の中間体のゲラニル
ゲラニルピロリン酸 (GG-PP) によってゲラニルゲラ
ニル化され、細胞膜付近に移動してシグナル伝達に関
与する。Rho-Aと破骨細胞に関する研究は、Rho-Aは
破骨細胞の遊走性および骨吸収活性を促進するが³⁾、
破骨細胞形成にはGG-PPによるゲラニルゲラニル化が
必要なことを示している⁴⁾。一方、骨芽細胞とGG-PPに
関する研究は数少ないが、HMG-CoA reductase阻害剤
のスタチン⁵⁾は骨芽細胞におけるオステオカルシンおよ
びBMP-2の発現を促進して骨形成を高めることおよび
BMP-2の発現はメバロン酸およびGG-PPで抑制される
ことが報告されている⁶⁾。これらの報告は、メバロン
酸-GG-PP代謝経路が阻害されてGG-PPによるRho-A
の活性化が抑制されると、破骨細胞による骨吸収が抑
制される一方骨芽細胞による骨形成が促進され、骨代
謝は骨形成に傾くことを示唆している。一方ゲニステ
インは、肝臓でのコレステロール合成を抑制すること
から⁷⁾、イソフラボンはメバロン酸-GG-PP代謝経路
を抑制していることが予想される。本研究は、イソフ
ラボンの骨量低下抑制作用の作用機序を解明する目的
で、メバロン酸-GG-PP代謝経路およびRho-A発現に
対するイソフラボンの影響を観察した。

方 法

実験1：高齢期ラットのメバロン酸-GG-PP代謝経 路に対する大豆イソフラボンの影響

骨粗鬆症あるいは骨の老化に関する研究は若齢動物
ではなく高齢期動物を用いるべきである。実験1とし
て、大豆イソフラボンがメバロン酸-ゲラニルゲラニ
ルピロリン酸 (GG-PP) 代謝経路を抑制して骨代謝を
修飾するか否かを高齢期ラットを用いて観察した。実
験動物は、東京都老人総合研究所老化動物研究施設内
で繁殖させた24カ月齢のウイスター系雌ラット (平均
体重250 g) を用いた。これらラットの卵巣を摘除し
(OVX)、骨粗鬆症モデルを作成した。卵巣摘除したラ
ットをOVX-CA群 (n=6) とOVX-IF群 (n=5) に分け
た。このほかにSham群 (n=3) も設けた。実験食条件
はTable 1に示した。飼料摂取量の相違は、カルシウム
摂取量の相違を招き骨代謝に大きな影響を及ぼす。そ

こで本研究では、飼料投与量を1日13 gに制限した。
ラットはSPF環境下で、12週間飼育した。実験食期終
了時に72時間尿を採取し、骨吸収マーカーのデオキシ
ピリジノリン量および生体のメバロン酸合成量を反映
する尿中メバロン酸を測定した。実験食期終了後、ラ
ットを麻酔下に採血屠殺し、骨形成マーカーの血清オ
ステオカルシン、総コレステロール、GG-PP合成を推
定するために血清ゲラニルゲラニオール (GG-OH)
を測定した。血清GG-OHは、血清をアルカリフォス
ファターゼ処理してGG-PPをGG-OHに変換した後、
Knossら⁸⁾の方法によりHPLCを用いて分析した。

実験2：ラット骨芽細胞様細胞におけるRho-A発現に 対するイソフラボンの影響

イソフラボンが骨の細胞に直接作用してRho-A発現
を抑制するか否かを観察した。骨芽細胞の機能を備えて
いるrat osteosarcoma骨芽細胞様細胞 (UMR-106) をウ
シ胎児血清を含んだ α -MEMでconfluentになるまで培
養し、無血清培養液で24時間incubateした後、Table 2
の1から9の培養液のいずれかを用いて24時間培養し
た。その後Ohnakaら⁹⁾の方法に準じて細胞を処理した。

Table 1. Experimental diet

Group	Experimental diet	
OVX-CA	20% Casein-protein diet (20 CA)	13 g/day
OVX-IF	20 CA+2.5% isoflavone extract*	13 g/day
Sham	20 CA	13 g/day
Isoflavone extract*		
Isoflavone content (g/100 g)		
Daidzin	2.192 Daidzein	0.106
Genistin	0.481 Genistein	0.015
Malonyldaidzin	0.046 Glycitin	1.183
Malonylgenistin	0.009 Glycitein	0.271
Acetyldaidzin	1.978 Acetylglycitein	0.568
Acetylgenistin	0.032 Malonylglycitin	0.050

*Soyaflavone E (gifted from Fujiol Co., Osaka).

Table 2. Culture medium conditions

Agent added to α -MEM	Concentration
1. DMSO ¹ (Control)	
2. Cerivastatin	1 μ M
3. Genistein	30 μ M
4. Daidzein	30 μ M
5. Mevalonate	1 mM
6. GG-PP	5 μ M
7. Farnesyl-pyrophosphate	5 μ M
8. Genistein (30 μ M)+GG-PP ² (5 μ M)	
9. Genistein (30 μ M)+Mevalonate (1 mM)	

¹DMSO: Dimethylsulfoxide.

²GG-PP: Geranylgeranyl-pyrophosphate.

即ち、細胞はharvest後、低張lysate bufferに懸濁し、凍結－融解を3回繰り返して細胞膜を破壊した。このcell lysateの超遠心（100,000×g, 60 min, 4℃）上清をsoluble画分とした。残渣はさらにtritonX 100とSDSで処理し、可溶化した画分を遠心分離（14,000 rpm×20 min, 4℃）により集め、particulate画分とした。solubleおよびparticulate画分中のRho-AをSDS-PAGEにより測定した。

結果と考察

実験1

体重変化と血液性状 ラットの体重と血清アルブミンおよびカルシウム濃度をTable 3に示した。ラットの体重は、卵巣摘除直後に減少したが、その後は増加し、実験食期間終了時にはOVX-CA群とOVX-IF群の間に有意差はなかった。一方血清アルブミンおよびカルシウム濃度は、全てのラットで正常範囲内の値を示していた。

臓器重量 子宮、肝臓および腎臓重量をTable 4に示した。子宮重量は、Sham群に比べてOVX-CA群で有意な低値を示し、卵巣摘除によって子宮重量は減少した。しかしOVX-IF群とOVX-CA群の間に有意差は観察されなかった。一方、肝臓および腎臓重量は、OVX-CA群とOVX-IF群の間に有意差は認められず、大豆イソフラボンは高齢期ラットの臓器重量に影響しなかった。

骨代謝マーカー 卵巣摘除によって、ラットの骨代謝回転は亢進し、骨代謝マーカーおよび骨吸収マーカーは高値を示す。大豆イソフラボンが骨代謝にどのような影響を及ぼすかを観察するために、骨形成マーカー

の血清オステオカルシンおよび骨吸収マーカーの尿中デオキシピリジノリン排泄量を測定し、その結果をTable 5に示した。OVX-CA群に比べてOVX-IF群は、血清オステオカルシン濃度は僅かな低値傾向および尿中デオキシピリジノリン排泄量は明らかな低値を示し、本研究でも大豆イソフラボンは卵巣摘除による骨代謝回転の亢進を抑制した。

メバロン酸代謝に対する大豆イソフラボンの影響 大豆イソフラボンがメバロン酸－GG-PP経路を阻害するか否かを明らかにするために、血清コレステロール、尿中メバロン酸および血清GG-OHを測定した。測定結果はTable 6に示した。

OVX-CA群に比べて、OVX-IF群の尿中メバロン酸量は有意な高値、血清総コレステロール濃度はむしろ低値傾向、そしてGG-OHは27%高値傾向を示した。イソフラボンはコレステロール合成を抑制する事が報告されているが²⁾、本研究からは、大豆イソフラボンがメバロン酸－GG-PP代謝経路を抑制する結果は得られなかった。この理由として、OVX-IF群のラットは個体差が大きく、2匹のラットで尿中メバロン酸および血清中GG-OHが高く、残り3匹の尿中メバロン酸および血清GG-OHはOVX-CA群と変わらないかむしろ低値を示していたことが挙げられた。即ち、ラットの個体によってイソフラボン抽出物に対する反応性が大きく異なっていた。骨粗鬆症治療薬に対する反応性の個体差は高齢者でも観察されており、高齢期ラットでも同様のことが観察されたものと思われる。イソフラボンに対する反応性の個体差については、解明すべき重要課題として残された。

Table 3. Body weight and blood analyses

Group	n	Body weight ¹ g	Serum albumin g/100 mL	Serum calcium mg/100 mL
OVX-CA	6	265±24	4.7±0.8	10.9±1.3
OVX-IF	5	242±18	4.9±0.5	10.7±0.9
Sham	3	258±33	5.0±0.4	11.6±1.6

¹Body weight at the end of experimental period.

Table 4. Organ weights

Group	n	Uterus g/kg BW	Liver g/kg BW	Kidney g/kg BW
OVX-CA	6	1.65±0.60	35.1±8.0	6.60±0.41
OVX-IF	5	2.14±0.38	37.0±5.3	7.79±0.82
Sham	3	3.59±0.89*	31.8±0.9	6.81±0.46

*Significantly different from OVX-CA at *P*<0.05.

Table 5. Effect of isoflavone extract on bone metabolic markers

Group	n	Osteocalcin ng/mL	DPN ¹ g/kg BW
OVX-CA	6	99.2±31.9	12.0±3.2
OVX-IF	5	80.2±30.4	6.6±2.4*
Sham	3	88.9±14.9	5.9±1.2

¹DPN: deoxypyridinoline.

*Significantly different from OVX-CA at *P*<0.05.

Table 6. Urinary mevalonate and serum geranylgeraniol

Group	n	Urine Mevalonate μg/day	Serum T-chol mg/100 mL	GG-OH ng/mL
OVX-CA	6	3.72±0.47	162±31	76.2±15.5
OVX-IF	5	4.75±0.95*	150±41	96.5±52.5
Sham	3	3.69±1.21	148±42	87.5±72.0

¹Significantly different from OVX-CA at *P*<0.05.

実験 2

骨芽細胞におけるRho-Aレベルに対するイソフラボンの影響 大豆イソフラボンが骨芽細胞に直接作用してRho-Aレベルを抑制するか否かを明らかにするためにrat osteosarcoma (UMR-106) をイソフラボンを含んだ培養液で培養し、Rho-Aのレベルを測定した (Fig. 1A). 細胞質に発現しているRho-Aはゲラニルゲラニル化されて活性化され、細胞膜に移動し、シグナル伝達に関与する. 従ってparticulate/solubleの比率 (P/S比) はRho-Aの活性化の程度を示す. Fig. 1Aに電気泳動像を, Fig. 1Bに夫々のバンドのdensityを示した. その結果, コントロールに比べて, スタチンの一つであるcerivastatinはparticulate画分およびsoluble画分共にRho-Aレベルは明らかに低く, 本研究でもスタチンによるRho-Aの抑制が観察された. また, particulate画分よりもsoluble画分でRho-Aレベルが抑制されたため, cerivastatinのP/Sはコントロールよりやや高い値を示した. 一方ゲ

ニステインおよびダイゼインは, particulateおよびsoluble共にRho-Aのレベルはコントロールのおよそ半量に抑制されていた. また, Rho-Aの活性化の程度を示すparticulate/solubleの比率 (P/S比) もゲニステインとダイゼインで明らかな低値を示し, イソフラボンはRho-Aのレベルおよび活性化を抑制した. この結果は, ゲニステインあるいはダイゼインがRho-AのmRNA発現を調節している可能性を示している. イソフラボンがRho-AのmRNA発現を調節するか否かについては今後明らかにすべき重要課題である. 一方, メバロン酸およびGG-PPは, Rho-Aレベルを促進すると予想されたが, particulateおよびsolubleいずれもコントロールよりRho-Aレベルはやや低かった. しかし, P/S比は, GG-PPおよびメバロン酸共にコントロールより高く, 特にメバロン酸はRho-A活性化を著しく促進した. また, ゲニステインによるRho-Aレベルの抑制はGG-PPあるいはメバロン酸の共存によって消失した. ダイゼ

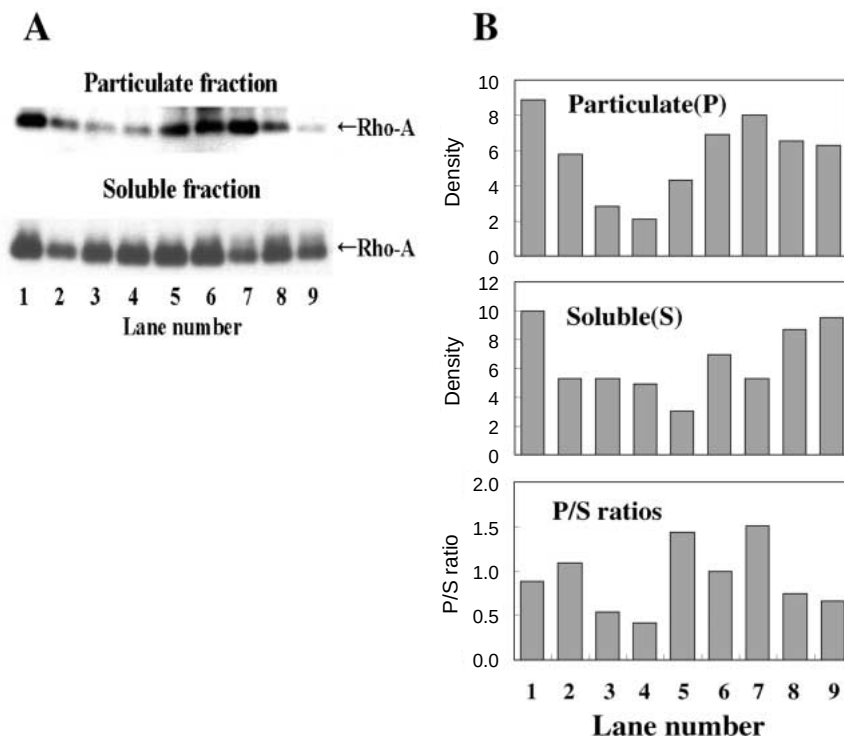


Fig. 1. Effects of isoflavones, mevalonate and geranylgeranylpyrophosphate (GG-PP) on Rho-A level in UMR-106 rat osteosarcoma cells. (A) SDS-PAGE of Rho-A, (B) Arbitrary density of each band. UMR-106 cells were incubated for 24 hrs with vehicle (DMSO, lane 1), 1 μ M cerivastatin (lane 2), 30 μ M genistein (lane 3), 30 μ M daidzein (lane 4), 1 mM mevalonate (lane 5), 5 μ M GG-PP (lane 6), 5 μ M F-PP (lane 7), 30 μ M genistein+ 5 μ M GG-PP (lane 8) or 30 μ M genistein+1 mM mevalonate (lane 9) in the presence of 10 μ M lysophosphatidic acid. Cells were lysed with hypotonic-lysis buffer and the lysates were separated to soluble and particulate fractions. An equal amount of protein was loaded in each lane and subjected to SDS-PAGE. Immunoblot analyses were performed using specific anti-RhoA antibody. Densities of Rho-A in each band were calculated by computer imaging.

インおよびゲニステインは骨形成を促進することから⁹⁾、イソフラボンはメバロン酸-GG-PP代謝経路を抑制してRho-Aレベルおよび活性化を抑制して、おそらくBMP-2の発現を促進して、骨芽細胞における骨形成を促進するものと考えられる。本研究では破骨細胞にお

けるRho-Aレベルを測定していないが、Rho-Aが破骨細胞形成および骨吸収活性に必要なこと³⁾およびゲニステインとダイゼインは破骨細胞形成を抑制することから^{10, 11)}、破骨細胞においてもゲニステインとダイゼインはRho-A発現を抑制するものと考えられる。

要 約

イソフラボンの骨量低下抑制作用の作用機序を解明する目的で、メバロン酸-GG-PP代謝経路に及ぼす大豆イソフラボン摂取の影響および骨芽細胞のRho-A発現に対するダイゼインおよびゲニステインの影響を観察した。その結果、大豆イソフラボン摂取ラットでは、1) 子宮重量に影響することなく、卵巣摘除による骨代謝マーカーの亢進は抑制された。2) 尿中メバロン酸および血清GG-PPはむしろ高値傾向を示し、イソフラボンによるメバロン酸代謝経路の抑制は観察されなかった。そこで骨芽細胞様細胞にゲニステインとダイゼインを直接作用させたところ、3) Rho-A発現および活性化は抑制された。4) また、ゲニステインによるRho-Aの抑制はメバロン酸およびGG-PPにより解除された。以上の結果から、食餌イソフラボンがメバロン酸-GG-PP代謝経路を抑制することを*in vivo* 実験で証明することはできなかった。しかし、大豆イソフラボンの主要画分であるダイゼインおよびゲニステインは骨芽細胞に直接作用してRho-Aの発現および活性化を抑制し、骨芽細胞における骨形成を促進することが示唆された。

文 献

- 1) Yamaguchi M and Gao YH (1998): Inhibitory effect of genistein on bone resorption in tissue culture. *Biochem Pharmacol*, **55**, 71-76.
- 2) Ishida H, Uesugi T, Hirai K, Toda T, Nukaya H, Yokotsuka K and Tsuji K (1998): Preventive effects of the plant isoflavones, daidzein and genistein, on bone loss in ovariectomized rat fed calcium-deficient diet. *Biol Pharm Bull*, **21**, 62-66.
- 3) Chellaiah MA, Soga N, Swanson S, McAllister S, Alvarez U, Wang D, Dowdy SF and Hruska KA (2000): Rho-A is critical for osteoclast podosome organization, motility, and bone resorption. *J Biol Chem*, **275**, 11993-12002.
- 4) Coxton FP, Helfrich MH, Hof R, Sebti S, Ralston SH, Hamilton A and Rogers M (2000): Protein geranylgeranylation is required for osteoclast formation, function and survival: inhibition by bisphosphonates and GGTI-298. *J Bone Miner Res*, **15**, 1467-1476.
- 5) 澤田直樹, 伊藤 裕, 中尾一和 (2001): 臓器保護薬としてのHMG-CoA還元酵素阻害薬 (スタチン) の新展開. *日本臨床*, **59**, 2470-2475.
- 6) Ohnaka K, Shimoda S, Nawata H, Shimokawa H, Kaibuchi K, Iwamoto Y and Takayanagi R (2001): Pitavastatin enhanced BMP-2 and osteocalcin expression by inhibition of RhoA-associated kinase in human osteoblast. *Biochem Biophys Res Comm*, **287**, 337-342.
- 7) Borradaile NM, De Dreu LE, Wilcox LJ, Edwards JY and Huff MW (2002): Soya phytoestrogens, genistein and daidzein, decrease apolipoprotein B secretion from HepG2 cells through multiple mechanisms. *Biochem J*, **366**, 531-539.
- 8) Knoss W and Reuter B (1996): Biosynthesis of [¹⁴C] geranylgeranyldiphosphate by a prenyl transferase system from a mutant strain of *Gibberella fujikuroi*. *Anal Biochem*, **239**, 208-212.
- 9) Gao YH and Yamaguchi M (1999): Anabolic effect of daidzein on cortical bone in tissue culture: comparison with genistein effect. *Mol Cell Biochem*, **194**, 93-97.
- 10) 海老沢秀道, 腰原康子 (2001): ヒト破骨細胞形成に対するダイズイソフラボンの抑制効果. *大豆たん白質研究*, **4**, 129-134.
- 11) Viereck V, Grundker C, Blaschke S, Siggelkow H, Emons G and Hofbauer LC. (2002): Phytoestrogen genistein stimulates the production of osteoprotegerin by human trabecular osteoblasts. *J Cell Biochem*, **84**, 725-735.