

大豆成分による高脂血症および動脈硬化への予防・治療効果の作用機序：
サルモデルを用いた分子病態生理学的研究

中村 伸*¹・光永総子¹・岡田真紀¹・Aram Joeng¹・林 隆志^{2,3}・
Rosario M. Perez³・Romualdo L. Carrasco³・中川博司^{2,3}

¹京都大学霊長類研究所分子生理遺伝子情報 ²イナリサーチ ³INA Research Philippines

**Phytomedical Effect of Soy Protein and Soy Isoflavone
on Hypercholesterolemia and/or Atherosclerosis :
Its Molecular Pathophysiological Mechanism in Monkeys**

Shin NAKAMURA¹, Fusako MITSUNAGA¹, Maki OKADA¹,
Aram JOENG¹, Takashi HAYASHI^{2,3}, Rosario M. PEREZ³, Romualdo L. CARRASCO³,
and Hiroshi NAKAGAWA^{2,3}.

¹Primate Research Institute, Kyoto University, Inuyama 484-8506
²Ina Research Inc., Nagano 399-4501 ³INA Research Philippines, Philippines.

ABSTRACT

Soy protein (β -Conglycinine) and soy isoflavone (Soyaflavone HG) are known to regulate hypercholesterolemia and its mediated atherosclerosis. In the current study we examined the phytomedical effect of β -Conglycinine and Soyaflavone using an established monkey hypercholesterolemia/atherosclerosis model, in normal male, female and ovariectomized (OVX)-female monkeys. The molecular mechanism of the phyto-medical function of the soy products was investigated by analyses of blood lipid markers (total Chol, LDL-C, HDL-C, GOT, GPT, Glu, CPK, TG, Apo-AI, Apo-B, and Apo-E). To elucidate the genetic mechanism, gene expression profiling analyses of an inflammatory and thrombotic gene (TF) and lipid metabolic genes (LDL-R, VLDL-R, HMG-CoA, SR) were performed by RT-PCR. β -Conglycinine and Soyaflavone both suppressed upregulated TF gene expression in hypercholesterolemia, suggesting a new mechanism of these soy products in hypercholesterolemia/atherosclerosis. *Soy Protein Research, Japan* **6**, 57-62, 2003.

Key words : β -conglycinine, soyaflavone, hypercholesterolemia, monkey model, gene expression profiling

*〒484-8506 犬山市官林41-2

サル類は進化系統的にヒトに最も近縁で、そのゲノム・遺伝子構造、血管構造、止血-凝固反応系、脂質代謝系、食性ならびにライフスパンなどの医生物学的特性はヒトに酷似している。そのため、サル類は高脂血症や動脈硬化など長期間に複合要因が関わる生活習慣病の研究には最適な実験モデルと言える。加えて、サルの遺伝子や機能因子の分子生物学・生化学的検討には、ヒト用の検査・測定試薬が利用でき、サルモデルでの詳細な分子病態解析が可能となる。これまで、ヒトの疫学的調査やマウス・ラットでの動物実験から、高脂血症・動脈硬化など生活習慣病に対する大豆食や大豆成分の予防・治療効果が注目されている^{1,2)}。

本研究では、こうしたサルの医生物学的特質を活かして、脳・心臓循環器疾患の主なりスク要因である高脂血症・動脈硬化に対する大豆成分の作用機序について、サルモデルを駆使した分子病態生理学的検討を進めた。具体的には、サル（主にカニクイザル）での高脂血症（動脈硬化）モデルを作出し、大豆たん白質（ β -conglycinine）あるいは大豆イソフラボン（Soyaflavone HG）を経口投与し、血中コレステロールなど臨床生化学マーカーの動態および脂質代謝系遺伝子や炎症・血栓症要因遺伝子の発現プロファイルの検討を試みた。

方 法

高脂血症（動脈硬化）サルモデルの作出および大豆成分の投与

高脂血症（動脈硬化）サルモデルの作出 成熟カニクイザルのオス、メスおよび卵巣摘除メス（OVX-メス）に、Table 1で示す組成の高脂血症（動脈硬化）誘発AS飼料を与え、一定の血中コレステロールレベル

Table 1. Composition of the special diet AS to induce hypercholesterolemia in monkey model

Crude protein	21.1%
Crude fat	16.7%
Calories	418 kcal
Powder ingredient (AS base)	45.1%
Salt-free butter	15.0%
Sucrose	25.0%
Milk casein	10.0%
Cholesterol	0.3%
Minerals	3.5%
Vitamins	1.0%
(A, D ₃ , E, K, B complex)	
Vitamin C	0.1%

(400~700 mg/mL)を長期(22週)間維持するために、高脂血症(動脈硬化)誘発AS飼料の給餌量を適宜調節し必要カロリーを通常PS飼料で補った。

大豆成分の投与 大豆イソフラボン(Soyaflavone HG)および大豆たん白質(β -conglycinine)については、それぞれ生食でのホモジネートを投与直前に調製し、高脂血症(動脈硬化)サルモデルに経口で100 mg/head/dayのSoyaflavone HGあるいは7.5 g/head/dayの β -conglycinineを8週間連続投与した。

血中コレステロールなど臨床血液生化学マーカーの測定

一定間隔で採血し、血球数・像(WBC, RBC, HGB, HCT, MCV, MCH, Plt, Ret, WBC differential count (St, Seg, Eo, Ba, Ly, Mo), 血液凝固能(PT, APTT), 総コレステロール, HDL-C, LDL-Cおよび脂質代謝関連マーカー(GOT, GPT, Glu, CPK, TG, Apo-AI, Apo-B, Apo-E)を既報³⁾に従って測定した。さらに、LDL/HDL ratioを高脂血症指標として、その3.0以上を高脂血症(hypercholesterolemia)と判定した。

遺伝子発現解析

上記検査・測定用の血漿画分を分取後、血球分画をPBSに再懸濁し、サル用のFicol/Conray液(比重, 1.077)に重層し、遠心分離後、単核白血球(PBMC; monocytes/lymphocytes)を分取し、得られたPBMC分画を遺伝子発現解析に用いた。

PBMCをIsogen液でホモジナイズ後、total RNAを抽出した。このIsogen法では混在するDNAが完全に除去出来ないため、更にQIAGEN-Kitを用いたRNAの再精製とDNA処理を実施し、DNA-フリーtotal RNAを調製した。

遺伝子発現量についてはRT-PCR法で半定量した。RT反応は100 ngのDNA-フリーtotal RNAを用いたOligo-dT primerで実施し、cDNAを作成した。このcDNAをtemplateとして、サル遺伝子(GAPDH, TF, LDL-R, HMG, SR, VLDL-R)のDNA fragmentを増幅する各種PCR primerの設計とPCR反応の至適条件を確立した(Fig. 1)。PCR産物は5%PAGE-電気泳動で分離し、DNA検出蛍光色素・SYBR Green Iを用いて検出し、ネガフィルム(ポラロイド106)を用いた透過型デンストメトリーでPCR産物を半定量して相対遺伝子発現量を測定した。

結果と考察

高脂血症（動脈硬化）サルモデル

高脂血症(動脈硬化)誘発AS飼料の給餌量を適宜調節しながら、400~700 mg/100 mLの血中コレステロ

ールレベルを保ち、LDL/HDL比3.0以上の高脂血症モデルを作出した (Table 2). この時、高脂血症 (動脈硬化) 誘発AS飼料を通常のPS飼料に変更した際の血中コレステロール (LDL/HDL比) 動態について、正常オス、メスおよびOVX-メスで比べると、OVX-メスのLDL/HDL比の低下は著しく遅延していた (Fig. 2). 閉経後の女性で、エストロゲン欠乏による高脂血症・動脈硬化のリスクが増大することは良く知られているが、その要因が一旦上昇したコレステロールの減

少・消費の遅延であることが今回のサル高脂血症モデル実験から窺える。

高脂血症 (動脈硬化) サルモデルにおける大豆成分によるコレステロール低下効果・作用の検討

オス高脂血症サルには7.5 g/head/dayの大豆たん白質 (β -conglycinine) を、一方、OVX-メス高脂血症サルには100 mg/head/dayの大豆イソフラボン (Soyaflavone HG) を、それぞれ8週間連続経口投与し、上記の臨床血液生化学マーカーの動態を定期的に調べた。両者

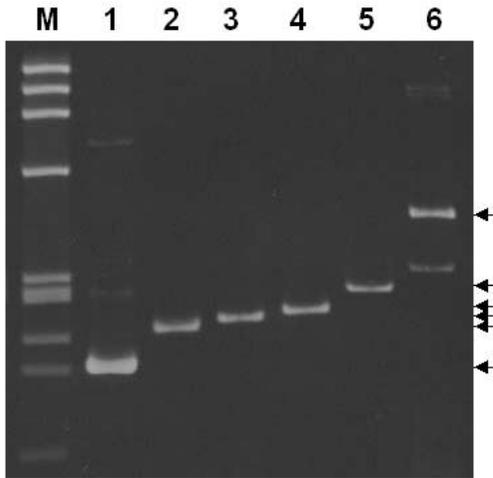


Fig.1. Gene expression analyses by RT-PCR.

Conditions

- RT:
DNA-free total RNA, 100ng
Oligo dT primer
- PCR:
Primers, constructed for monkey gene
[94C/30sec-58C/30sec-72C/30sec] x 40 cycles
SYBR Green I staining
- Genes:
1, GAPDH (194bp)
(house keeping)
2, Tissue Factor (TF; 238bp)
(thrombosis and inflammatory response)
3, 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase (HMG; 246bp)
4, LDL-R (258bp)
5, VLDL-R (294bp)
6, Scavenger receptor (SR; 435bp)

Table 2. Feeding conditions and profiles of blood cholesterol level in monkey

Animal Number	AS Given (g)	Time Point	Body weight (kg)	CHOL mg/100 mL	CHOL age value %	TG mg/100 mL	HDL-C mg/100 mL	LDL-C mg/100 mL	Non-HDL-C mg/100 mL	C/H ratio	LDL/HDL ratio
1104 (IM0002)	0	Pretest	7.05	167		79	70	78	97	2.4	1.1
	70	Pretest	6.85	224	100	85	77	110	147	2.9	1.4
	210	Week 1	7.20	378	169	102	87	262	291	4.3	3.0
	210	Week 2	7.40	595	266	41	39	495	456	15.3	12.7
	52.5	Week 3	7.45	786	351	84	26	668	760	30.2	25.7
	52.5	Week 4	7.30	832	371	40	18	795	814	46.2	44.2
	52.5	Week 5	7.20	914	408	51	19	754	895	48.1	39.7
	0	Week 6	7.15	806	360	34	19	666	787	42.4	35.1
	0	Week 7	7.10	522	233	26	23	417	499	22.7	18.1
	0	Week 8	7.05	429	192	28	31	338	398	13.8	10.9
	52.5	Week 9	6.95	538	240	53	38	421	500	14.2	11.1
	0	Week 10	7.10	473	211	34	26	397	447	18.2	15.3
	0	Week 12	6.85	361	161	39	29	278	332	12.4	9.6
	52.5	Week 14	7.10	543	242	59	33	402	510	16.5	12.2
	52.5	Week 15	7.05	548	245	55	26	419	522	21.1	16.1
	52.5	Week 16	7.15	607	271	45	28	475	579	21.7	17.0
	21	Week 17	7.05	586	262	51	30	464	143	5.8	15.5
	21	Week 18	7.20	548	245	26	23	439	525	23.8	19.1
	21	Week 19	7.20	459	205	25	31	405	428	14.8	13.1
	52.5	Week 20	7.25	448	200	36	27	377	421	16.6	14.0
	52.5	Week 21	7.25	631	292	70	31	515	600	20.4	16.6
	52.5	Week 22	7.00	631	282	44	23	512	608	27.4	22.3
1105 (IM0229)	0	Pretest	7.35	120		17	44	60	76	2.7	1.4
	70	Pretest	7.15	131	100	14	56	62	75	1.7	1.1
	210	Week 1	7.15	395	302	51	51	254	344	7.7	5.0
	210	Week 2	7.10	334	255	15	45	226	289	7.4	5.0
	52.5	Week 3	7.25	505	385	25	48	368	457	10.5	7.7
	210	Week 4	7.15	523	399	13	38	444	485	13.8	11.7
	210	Week 5	7.15	628	479	15	36	489	592	17.4	13.6
	210	Week 6	7.10	750	573	14	30	567	720	25.0	18.9
	0	Week 7	7.15	422	322	8	23	321	399	18.3	14.0
	0	Week 8	7.15	244	186	10	28	184	216	8.7	6.6
	105	Week 9	7.25	199	152	12	41	138	158	4.9	3.4
	210	Week 10	7.35	275	210	14	37	205	238	7.4	5.5
	105	Week 12	7.15	245	187	18	35	180	210	7.0	5.1
	157.5	Week 14	7.15	480	366	28	36	342	444	13.3	9.5
	157.5	Week 15	6.90	538	411	24	36	369	502	14.9	10.3
	157.5	Week 16	6.85	633	483	21	38	439	595	16.7	11.6
	105	Week 17	6.80	675	515	26	34	475	641	19.9	14.0
	52.5	Week 18	6.85	687	524	27	30	492	657	22.9	16.4
	52.5	Week 19	6.95	621	474	24	35	448	586	17.7	12.8
	52.5	Week 20	6.85	544	415	16	27	381	517	20.1	14.1
	52.5	Week 21	6.75	651	497	33	29	470	622	22.4	16.2
	52.5	Week 22	6.70	706	539	27	28	477	678	25.2	17.0

における臨床マーカーの中で、コレステロール関連の総コレステロール、HDL-CおよびLDL-Cの減少が認められ、Fig. 3にそれをLDL/HDL比の動態として示した。 β -conglycinineを投与した高脂血症オスサルでは、8週間の投与でLDL/HDL比は投与前に比べ48%減少したが、正常レベル（LDL/HDL比；3.0）までの回復効果は見られなかった。一方、Soyaflavone HGを投与されたOVX-メス高脂血症サルではLDL/HDL比の急速回復が認められ、投与3週間でほぼ正常値に、8週間では完全に正常レベルに戻った。

この時、両者における他の脂質代謝関連マーカーのTG、Apo-AI、Apo-BおよびApo-Eに関しては、上記のコレステロール関連指標に比べ大きな変動は見られなかった。

高脂血症（動脈硬化）サルモデルで、大豆たん白質・ β -conglycinineおよび大豆イソフラボン・Soyaflavone HGの高脂血症（総コレステロールおよびLDL/HDL比）に対する回復効果が認められた。特にOVXされた高脂血症サルではSoyaflavone HGの効果が顕著で、大豆イソフラボンがヒトの閉経に伴う高コレステロール血症（動脈硬化）の予防・治療対策として有用であることを示している。

高脂血症（動脈硬化）サルモデルでの大豆成分による関連遺伝子の発現プロファイルの検討

高脂血症（動脈硬化）関連遺伝子としてFig. 1に示す、tissue factor (TF, 炎症反応, 血栓症動脈硬化の主要因子)⁴⁾, ならびに脂質代謝系の3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase (HMG)⁵⁾, low density lipoprotein receptor (LDL-R)⁶⁾, very low density lipoprotein receptor (VLDL-R)⁷⁾, および scavenger receptor (SR)⁷⁾の遺伝子を検討対象とした。末梢血単核白血球 (PBMC: 単球/リンパ球) におけるこれら5種の遺伝子発現プロファイルを、高脂血症前の正常状態 (Pre), 高脂血症状態 (Chol) および高脂血症状態で大豆成分投与 (Chol + SP (soy protein)) においてRT-PCR法で比較した。Fig. 4AおよびFig. 4Bに示す様に、大豆たん白質・ β -conglycinine投与 (Fig. 4A) と大豆イソフラボン・Soyaflavone HG投与 (Fig. 4B) では異なる遺伝子発現プロファイルを示した。

オス高脂血症サルへの β -conglycinine投与ではTF遺伝子発現亢進への抑制作用が見られた。一方、OVX-メス高脂血症サルへのSoyaflavone HG投与では、TFに加えLDL-R, VLDL-RおよびSR等コレステロール代謝系遺伝子の発現亢進に対する抑制作用も示された。また、これらの遺伝子発現プロファイルから、正常

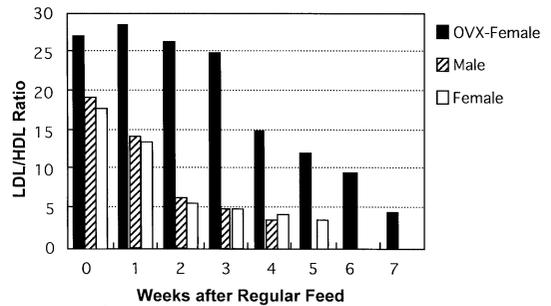


Fig. 2. Comparison of hypercholesterolemia response among OVX-female, normal female and normal male monkeys.

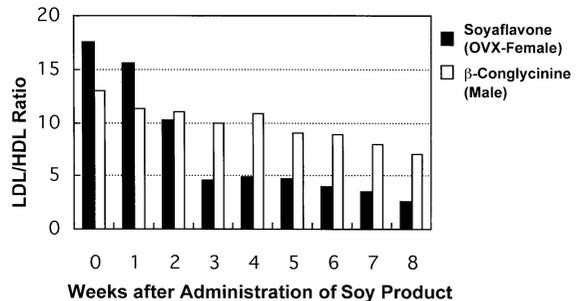


Fig. 3. Effect of oral administration of soy product on blood cholesterol level in OVX-female and normal male monkeys fed the high cholesterol diet. OVX-female monkeys were orally given with 100 mg/head/day of Soyaflavone suspension and normal male were orally given 7.5 g/head/day of β -conglycinine suspension for 8 weeks.

(オス)サルとOVX-メスサルでは、高脂血症状態でコレステロール代謝系遺伝子の発現特性が異なる可能性も示唆された。

興味深いのは、高脂血症に伴って見られるTF遺伝子の発現亢進が、 β -conglycinine投与あるいはSoyaflavone HG投与によって、共通して軽減・抑制された点である。TFは動脈硬化の際、活性化単球、泡沫化マクロファージあるいは動脈硬化部位平滑筋細胞で発現・生成亢進し、血液凝固VII因子との複合体形成を介して、血液凝固活性化・血栓形成を惹起し、硬化巣破綻に伴う血管内凝固・血栓症の主要リスク因子として知られている^{8,9)}。 β -conglycinineあるいはSoyaflavone HGが高脂血症（動脈硬化）におけるTF発現の異常亢進を抑えることを示す知見は、関連疾患・病態の予防・治療対策としてTFをターゲットにした新たなドラッグデザインの可能性を示唆している。

今回は予備実験的な位置づけでPBMCでの遺伝子発

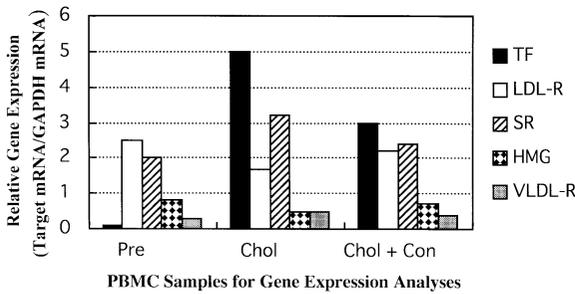


Fig. 4A. Effect of a soy protein, β -conglycinin (Con), on gene expression in PBMC of male hypercholesterolemia monkey. Total RNA was isolated from PBMC separated from 5 mL monkey whole blood. RT-PCR reaction and detection of PCR product were performed under the conditions as mentioned in Fig. 1. Relative gene expression of each gene was expressed by densitometry.

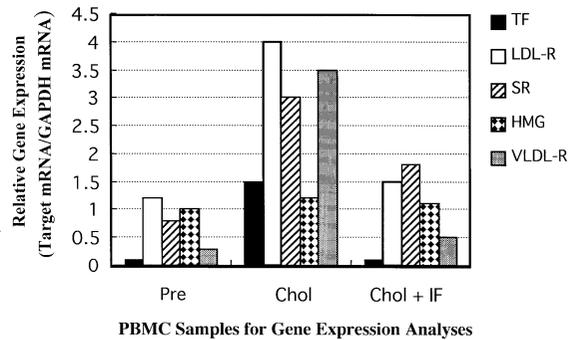


Fig. 4B. Effect of a soy isoflavone, Soyaflavone (IF), on gene expression in PBMC of OVX-female hypercholesterolemia monkey. Total RNA was isolated from PBMC separated from 5 mL monkey whole blood. RT-PCR reaction and detection of PCR product were performed under the conditions as mentioned in Fig. 1. Relative gene expression of each gene was expressed by densitometry.

現解析を主体にした。今後はこの知見・結果を基に、OVX-メス高脂血症サルモデルを主体にして肝臓など主要組織での網羅的遺伝子発現プロファイル解析を進め、大豆たん白質およびイソフラボンの機能・効果について遺伝子レベルで更に精査し、これら大豆成分の分子・遺伝子作用機序を明らかにする。

謝辞 サル用の高脂血症（動脈硬化）誘発AS飼料の調製に協力頂いた桑原吉史（オリエンタル酵母）、大豆たん白質（ β -conglycinine）および大豆イソフラボン（Soyaflavone HG）の供給や関連情報などに尽力頂いた福井 健介・岡嶋哲彦（不二製油）の諸兄に深謝します。

要 約

サル高脂血症（動脈硬化）モデルを活用して大豆たん白質（ β -conglycinine）および大豆イソフラボン（Soyaflavone HG）の作用・効果を検討した。さらに血中脂質代謝系マーカー（総コレステロール, LDL-C, HDL-C, GOT, GPT, Glu, CPK, TG, Apo-AI, Apo-B, Apo-E）の動態、ならびにPBMCでの炎症・血栓形成遺伝子（TF）および脂質代謝遺伝子（HMG-CoA, LDL-R, VLDL-R, SR）の発現プロファイルから、高脂血症（動脈硬化）時のTF遺伝子発現亢進の抑制など、大豆たん白質および大豆イソフラボンの新たな作用点が示唆された。

文 献

- James W, Anderson MD, Bryan M J and Margaret E C-N (1995): Meta-analysis of the effects of soy protein intake on serum lipid. *N Engl J Med*, **333**, 276-282.
- Fukui K, Tachibana N, Wanezaki S, Tsuzaki S, Takamatsu K, Yamamoto T, Hashimoto Y and Shimoda T (2002): Isoflavone-free soy protein prepared by column chromatography reduces plasma cholesterol in rats. *J Agric Food Chem*, **50**, 5717-5721.
- Abumiya T, Nakamura S, Takenaka A, Takenaka O, Yoshikuni Y, Miyamoto S, Kimura T, Enjouji K and Kato H (1994): Response of plasma tissue factor pathway inhibitor to diet-induced hypercholesterolemia in crab-eating monkeys, *Arterioscler Thromb*, **14**, 483-488.
- Morrissey JM, Agis H, Albrecht S, Dignat-George F, Edgington TS, Luther T, Muller M, Mutin M,

- Nakamura S, Valent P and Vercellotti GM (1997): CD142 (tissue factor) workshop panel report, leukocyte typing IV, white cell differentiation antigens (eds., T. Kishimoto, et al.) pp.742-746.
- 5) Plat J and Mensink RP (2002): Effect of plant stanol esters on LDL receptor protein expression and on LDL receptor and HMG-CoA reductase mRNA expression in mononuclear blood cells of Healthy Men and Women. *FASEB J*, **16**, 258-260.
 - 6) Michael C H, Sheila J G, Brett C R, Wenliang S and Kenneth FS (1997): Effect of reduced maternal lipoprotein-cholesterol availability on placental progesterone biosynthesis in the Baboon. *Endocrinology*, **138**, 1385-1391.
 - 7) Nakazato K, Ishibushi T, Nagata K, Seino Y, Sakamoto T, Matsuoka R, Teramoto T, Sekimata M, Homma Y and Maruyama Y (2001): Expression of very low density lipoprotein receptor mRNA in circulating human monocytes: Its up-regulation by hypoxia. *Atherosclerosis*, **155**, 439-444.
 - 8) 中村 伸 (2000): 膜結合性組織因子, 検査と技術, **28**, 91-93.
 - 9) Yamamoto N, Ogawa H, Oshima S, Soejima H, Fujii H, Misumi K, Takazoe K, Mizuno Y, Noda K, Saito T, Tsuji I, Kumeda K, Nakamura S and Yasue H (2000): The effect of heparin on tissue factor and tissue factor pathway inhibitor in patients with acute myocardial infarction. *Int J Cardiol*, **75**, 267-274.