

骨代謝における大豆イソフラボンの反応性に関する研究

海老沢秀道^{1,2}・腰原康子^{*1}

¹東京都老人総合研究所骨代謝制御 ²昭和女子大学生活科学科

Study of Daidzein on Bone Metabolism: Individual Variability in Aging Rats

Hidemichi EBISAWA^{1,2} and Yasuko KOSHIHARA¹

¹Bone research group, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology, Tokyo 173-0015

²School of Human Life Sciences, Showa Women's University, Tokyo 154-8533

ABSTRACT

Soy isoflavones have received increasing attention because of their potential role in the prevention of osteoporosis. However, we previously observed no response in bone mineral density (BMD) in some aging rats fed isoflavones. Thus, in the present study, we investigated individual variability in bone metabolism of rats in response to dietary daidzein. Ovariectomized (OVX) 4-mo and 24-mo old rats were fed 13 g of a diet supplemented with no (OVX-CA), 0.44% (OVX-DL) or 0.88% (OVX-DH) daidzein for 12 wk. Rats fed OVX-DH had lower femoral BMD and higher bone metabolic markers than OVX-CA fed rats, although wide individual variation in BMD was observed in the 24-mo old rats. ER-alpha, ER-beta, HMG-CoA reductase, BMP-2 and FT-alpha mRNA expressions in the femurs of the 24-mo old rats were measured by the RT-PCR method. Lower mRNA expression of HMG-CoA reductase was observed in the OVX-DH group compared to the OVX-CA group. When comparing characteristics of the 24-mo old rats fed OVX-DH, we found that rats with the highest BMD (BMD-H) had lower mRNA expression for HMG-CoA reductase and ER-alpha than rats with the lowest BMD (BMD-L). This suggests that dietary daidzein may inhibit HMG-CoA reductase mRNA expression. HMG-CoA reductase and ER-alpha expressions may partially explain the individual variability in response to dietary daidzein on bone metabolism. *Soy Protein Research, Japan* **6**, 116-121, 2003.

Key words : daidzein, bone metabolism, gene expression, ovariectomized rat

*〒173-0015 東京都板橋区栄町35-2

ダイゼインやゲニステインなどの大豆イソフラボン
は、エストロゲン受容体 (ER) に結合してエストロ
ゲン様の生理作用を持つ一方、生殖器に殆ど影響しな
いため、副作用の少ない食事性の骨量低下抑制因子と
して注目されている^{1,2)}。イソフラボンによる骨代謝調
節機序として、エストロゲン受容体を介した調節経路
の他にGeranylgeranyl-pyrophosphate (GG-PP) や
Farnesyl-pyrophosphate (F-PP) による低分子GTPた
ん白質の活性化³⁾を介した調節経路が大きな注目を集
めている。我々はこれまでに、大豆イソフラボン抽出
物が卵巣摘除ラットの骨量低下を抑制すること⁴⁾およ
びゲニステインとダイゼインは骨芽細胞様細胞におけ
る低分子GTPたん白質のRho-A発現を抑制することを
確認している⁵⁾。その一方で、加齢の進んだ24ヶ月齢
ラットでは、大豆イソフラボン摂取によって骨量低下
が抑制された個体と骨量低下が抑制されなかった個体
が認められた。すなわち、加齢ラットでは、大豆イソ
フラボンに対する骨代謝の応答に大きな個体差が示さ
れた。大豆イソフラボンと骨代謝に関する研究のほと
んどは、若齢期動物を用いている。そのため、これま
では高齢期における個体差については全く見過ごされ
てきた。一方ヒトにおいても、骨粗鬆症治療薬のビスフ
ォスフォネートによる骨量低下抑制効果にも同様の個
体差の有ることが認められており、骨粗鬆症治療上の
大きな問題となっている。これらの所見は、大豆イソ
フラボンを用いて骨粗鬆症の予防あるいは治療を図る
ためには、高齢期における骨代謝の個体差の有無およ
びその成因を大豆イソフラボンに対する反応性低下と
の関係から解明すべきことを示している。

本研究は、大豆イソフラボンに対する骨代謝の反応
性の個体差の有無を確認し、さらにその成因を解明す
ることを目的とした。

方 法

実験動物および実験食

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4ヶ月齢 (平均体重172±12 g) お
よび24ヶ月齢 (平均体重271±25 g) のウィスター系
雌ラットを用いた。これらラットに、麻酔下で、卵巣
摘除術 (OVX) を施し、骨粗鬆症モデルラットを作成
した。OVXに対する対照としてSham群を設けた。
OVXラットには大豆イソフラボンの主分画を占めるダ
イゼインを0% (コントロール, OVX-CA群), 0.44%
(OVX-DL群) あるいは0.88% (OVX-DH群) 添加した
20%カゼインたん白質食をSPF環境下で12週間投与し

た。摂食量の相違による骨代謝への影響を避けるため
に、実験食は13 g/日の制限食条件で与えた。Sham群
にはOVX-CA群と同じ飼料を与えた。本研究における
ダイゼイン投与量は、OVX-DL群およびOVX-DH群で
それぞれ1日当たり5.5 mgおよび11 mgであった。
OVX-DH群の食餌ダイゼイン量は、大豆イソフラボン
抽出物を投与した前回研究⁴⁾におけるダイゼイン、ダ
イジンおよびマロニルダイジンの合計摂取量と等しく
なるように設定した。実験食条件はTable 1に示した。

Table 1. Experimental diet

Group	Experimental diet
OVX-CA	20% Casein-protein diet (20CA), 13 g/day
OVX-DL	20CA + 0.44% Daidzein, 13 g/day
OVX-DH	20CA + 0.88% Daidzein, 13 g/day
Sham	20CA, 13 g/day

測定項目

実験食期終了後、72時間尿を採取し、デオキシビリ
ジノリン量を測定した。その後ラットを麻酔下に採血
屠殺し、直ちに大腿骨を摘出し、液体窒素で固定
後、-70℃で保存した。その後、子宮重量、大腿骨骨
密度、血清オステオカルシン、血清カルシウム濃度等
を測定した。

大腿骨におけるmRNA発現の測定

24ヶ月齢の加齢ラットの左大腿骨遠位端から、
AGPC法を用いてT-RNAを抽出した。そしてRT-PCR
を実施し、エストロゲン受容体 (ER- α , ER- β),
HMG-CoA reductase, Bone morphogenetic protein-2
(BMP-2), Farnesyl transferase- α (FT- α) のmRNA
発現を測定した。PCRには以下のプライマーセットを
使用した。ER- α はAATTCTGACAATCGACGCCAG
(forward) およびGTGCTTCAACATTCTCCCTCCTC
(reverse), ER- β はGTCCTGCTGTGATGAACTAC
(forward) およびCCCTCTTTGCGTTTGGACTA
(reverse), HMG-CoA reductaseはGGGACGGT
GACACTTACCATCTGTATGATG (forward) および
ATCATCTTGGAGAGATAAACTGCCA (reverse),
BMP-2はCACATCTGCAGAGCTCCAGAT (forward)
およびGACGCTTTTCACGTTTGTGGA (reverse),
Farnesyltransferase- α はTCTGTGTGGAACCAA
AGACAC (forward) およびACTCTGGAGGGAC
CGTCCAAT (reverse) をそれぞれプライマーとして
用いた。

結果および考察

体重と臓器重量

加齢ラットでは、OVX-CA群およびSham群でそれぞれ3匹および1匹のラットが実験食期間中に死亡した。若齢ラットでは飼育期間中の死亡はなかった。4ヶ月齢の若齢ラットの平均摂食量はOVX-CA群、OVX-DL群、OVX-DH群およびSham群でそれぞれ 11.5 ± 0.7 g, 11.5 ± 0.9 g/day, 10.2 ± 0.4 g/dayおよび 11.7 ± 0.8 g/dayだった。24ヶ月齢の加齢ラットは与えた飼料を全て摂取した。

ラットの実験食期終了時の体重と臓器重量に対するダイゼイン投与の影響をTable 2に示した。実験食期間終了時の体重は、若齢および加齢ラット共に、OVX-CA群とOVX-DH群の間に有意差はなかった。子宮重量は、若齢および加齢ラット共に、Sham群に比べてOVX-CA群で明らかな低値を示し、卵巣摘除により子宮は萎縮した。しかし、OVX-CA群とOVX-DH群の間に有意差は見られなかった。このようにダイゼインは、成熟および加齢ラットの子宮重量を増加しな

った。若齢ラットの肝臓、腎臓および心臓重量は、OVX-CA群とOVX-DH群の間に有意差は見られず、ダイゼインは臓器重量に影響しなかった。一方加齢ラットでは、これら臓器重量はOVX-CA群に比べてOVX-DH群でやや低値を示した。

血液分析

血液分析の結果をTable 3に示した。若齢ラットおよび加齢ラット共に、OVX-CA群に比べてOVX-DH群の総コレステロール濃度は低値傾向を示した。アルブミンおよびカルシウム濃度は両群の間に明らかな相違は観察されなかった。この他に、GOTおよびGPT活性も測定したが、全てのラットで正常値を示していた。

骨代謝マーカーおよび大腿骨骨密度

卵巣摘除によって、ラットの骨代謝回転は亢進し、骨代謝マーカーは高値を示す。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、骨代謝に対するダイゼインの影響を観察した (Table 4)。若齢および高齢期ラット共に、OVX-CA群に比べてOVX-DH群の血清オステオカルシン濃度および尿中デオキシピリジノリン排泄量はむしろ高い値を示し、本研究条件では、ダ

Table 2. Mean body and organ weights

4 mo	n	Body wt	Uterus	Liver	Kidney	Heart
		g	g/kg BW	g/kg BW	g/kg BW	g/kg BW
OVX-CA	6	220 ± 27	1.31 ± 1.16	30.8 ± 5.0	5.80 ± 0.72	2.86 ± 0.34
OVX-DL	4	215 ± 21	1.86 ± 0.95	33.4 ± 4.2	6.51 ± 1.06	3.01 ± 0.51
OVX-DH	4	191 ± 7	0.67 ± 0.12	29.0 ± 1.1	6.23 ± 0.40	2.79 ± 0.21
Sham	3	198 ± 4	2.63 ± 0.60	34.9 ± 0.2	6.57 ± 0.14	3.03 ± 0.12
24 mo	n	Body wt	Uterus	Liver	Kidney	Heart
		g	g/kg BW	g/kg BW	g/kg BW	g/kg BW
OVX-CA	3	266 ± 36	2.40 ± 1.30	42.8 ± 8.0	7.94 ± 1.25	4.17 ± 1.02
OVX-DH	7	256 ± 21	2.23 ± 0.90	$32.8 \pm 4.3^*$	7.09 ± 0.54	$3.24 \pm 0.35^*$
Sham	2	256 ± 45	7.12 ± 2.55	35.1 ± 3.4	7.21 ± 0.72	3.55 ± 0.35

*: Significantly different from OVX-CA at $P < 0.05$. Mean $\pm$ SD.

Table 3. Blood analyses

4 mo	n	ALB	Ca	T-chol
		g/100 mL	mg/100 mL	mg/100 mL
OVX-CA	6	3.3 ± 0.5	10.3 ± 0.4	117.7 ± 17.5
OVX-DL	4	3.6 ± 0.3	10.7 ± 0.4	$90.4 \pm 10.0^*$
OVX-DH	4	3.2 ± 0.4	11.0 ± 0.7	99.9 ± 11.4
Sham	3	3.1 ± 0.6	10.7 ± 0.2	100.6 ± 8.0
24 mo	n	ALB	Ca	T-chol
		g/100 mL	mg/100 mL	mg/100 mL
OVX-CA	3	3.4 ± 0.2	10.1 ± 0.2	193.6 ± 69.5
OVX-DH	7	3.2 ± 0.2	9.9 ± 0.9	150.0 ± 49.9
Sham	2	3.2 ± 0.2	9.9 ± 0.6	136.9 ± 47.2

*: Significantly different from OVX-CA at $P < 0.05$. Mean $\pm$ SD.

Table 4. Bone metabolic markers

4 mo	n	OC	DPN	BMD	BMC
		ng/mL	nmole/day	mg/mm ²	mg
OVX-CA	6	181±27	61.5±15.3	0.161±0.013	251±17
OVX-DL	4	155±27	63.9±9.3	0.169±0.017	270±24
OVX-DH	4	200±76	90.7±24.1*	0.155±0.009	245±18
Sham	3	148±44	40.3±20.4	0.175±0.005	288±19*
24 mo	n	OC	DPN	BMD	BMC
		ng/mL	nmole/day	mg/mm ²	mg
OVX-CA	3	105±44	42.7±22.3	0.183±0.007	340±16
OVX-DH	7	146±26	43.9±26.8	0.177±0.029	323±63
Sham	2	99±17	26.5±3.5	0.178±0.009	324±3*

OC: Osteocalcin. DPN: Urinary deoxypyridinoline. BMD: Bone mineral density. BMC: Bone mineral content.

*: Significantly different from OVX-CA at $P<0.05$. Mean $\pm$ SD.

イゼインは卵巣摘除による骨代謝回転の亢進を抑制しなかった。

次に、ラット大腿骨骨密度をDEXA法で測定した。その結果、若齢ラットおよび加齢ラット共に、OVX-CA群に比べてOVX-DH群の骨密度はむしろ低く、本研究条件では、ダイゼインは卵巣摘除による骨密度の低下を抑制しなかった。しかし、加齢ラットでは、OVX-DH群の骨密度は0.150 mg/mm²から0.182 mg/mm²の広い範囲に分布し、加齢ラットの骨代謝はダイゼインに対する反応性に大きな個体差を示した。

以上のように、本研究では、大豆イソフラボン抽出物を投与した前回研究⁴⁾と異なり、11 mg/dayのダイゼイン投与卵巣摘除ラットの骨代謝を改善しなかった。骨代謝に対するダイゼインと大豆イソフラボン抽出物の違いが何に起因するかは不明である。ダイゼイン摂取レベルと骨代謝の応答に関してさらに研究する必要があるものと考えられた。

大腿骨遠位端におけるmRNA発現

大腿骨骨密度の結果から、加齢ラットの骨代謝はダイゼインに対して大きな個体差を示すことが明らかにされた。この成因を明らかにする目的で、加齢ラットの大腿骨におけるHMG-CoA reductase, BMP-2, ER- α , ER- β およびFT- α のmRNA発現を測定し、これらの遺伝子発現とダイゼイン摂取の関係を観察した。Fig. 1-Aにノザンブロットの泳動像を、Fig. 1-Bに夫々の遺伝子の発現レベルを群毎に示した。その結果、有意とはならなかったが、OVX-CA群に比べてOVX-DH群ではHMG-CoA reductaseの発現が明らかに低かった。一方エストロゲン受容体、低分子GTPたん白質のRasを活性化するFT- α および骨形成サイトカインのBMP-2⁶⁾の発現はダイゼイン摂取による明らかな影響を受けなかった。

イソフラボンの骨代謝調節メカニズムとして我々

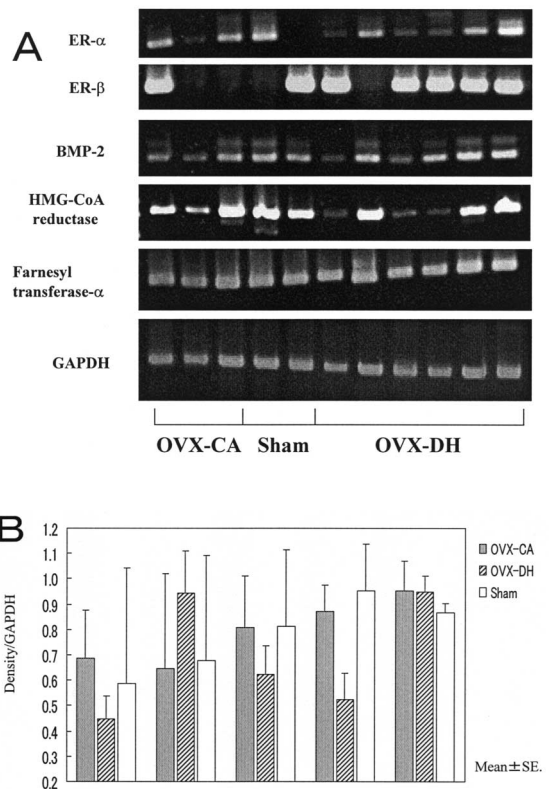


Fig. 1. Effects of dietary daidzein on expression of ER- α , ER- β , HMG-CoA reductase, Bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) and Farnesyl transferase- α (FT- α) mRNA in 24-mo rat femur. (A) Northern blot analysis. (B) Calculated density from dot-blot data for Northern blot analysis. Total RNA isolated from 24-mo rat femur was reverse transcribed and the cDNA obtained was subjected to PCR employing primers specific for ER- α , ER- β , HMG-CoA reductase, BMP-2 and FT- α as described in method.

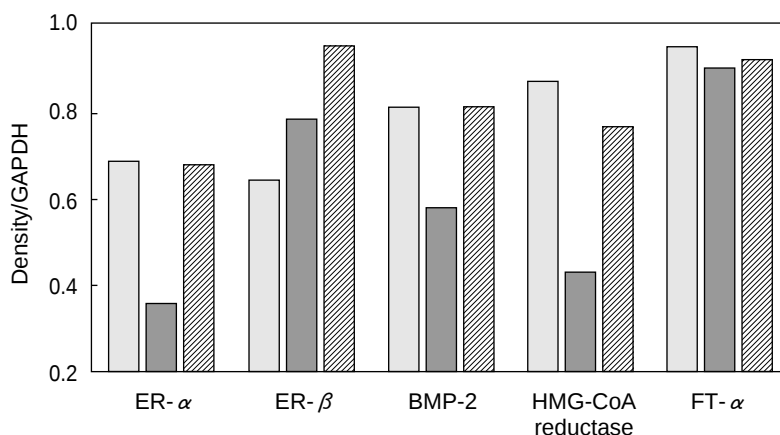


Fig. 2. Effects of individual variability on gene expression in response to dietary daidzein. Two rats that had highest and lowest BMD were selected from OVX-DH in 24-month old rat, then the average values in density were calculated from the Northern blot analysis. □, OVX-CA; ■, BMD-High; ▨, BMD-LOW.

は、HMG-CoAから誘導されるGG-PPによって活性化される低分子GTPたん白質のRho-A⁷⁾によるシグナル伝達の抑制を想定している。ダイゼインおよびゲニステインはHMG-CoA reductaseの発現を抑制する⁸⁾ことが最近報告されており、また我々もこれまでに、ダイゼインはラット骨芽細胞様細胞におけるRho-Aたん白質のレベルおよび活性化を抑制する結果を得ている⁵⁾。本研究でもFT-αのmRNA発現はダイゼインによる影響を受けなかったことから、ダイゼインはRasよりもむしろRho-Aを抑制することによって骨代謝を調節しているものと推定した。

次に、OVX-DH群ラットの肉骨密度が最も高かった2匹 (BMD-H) と骨密度が最も低かった2匹 (BMD-L) のmRNA発現を比較し、ダイゼインに対する反応性の個体差との関係を観察した (Fig. 2)。その結果、

ダイゼイン摂取によって骨密度が高く維持されたBMD-Hは、BMD-Lに比べてHMG-CoA reductaseおよびER-αの発現が明らかに低下していた。一方、ER-β、FT-α、BMP-2のmRNA発現は両者の間に明らかな相違を示さなかった。

この結果は、ダイゼインに対する反応性の個体差はER-αおよびHMG-CoA reductaseの発現と関係していることを示唆している。statinを含めたHMG-CoA reductase阻害剤に対する脂質代謝調節系に遺伝子多系の存在することが知られている⁹⁾。骨代謝においてもHMG-CoA reductaseの発現と関連した遺伝子の多系が存在するのかもしれない。一方、ダイゼインに反応し、骨密度が高く維持された個体でER-α発現が抑制されていた理由は不明である。解明すべき今後の大きな課題である。

要 約

イソフラボンに対する骨代謝の反応性の個体差の有無およびその成因を明らかにする目的で、卵巣摘除ラットの大腿骨骨密度、ER-α、ER-β、BMP-2、HMG-CoA reductaseおよびFT-αのmRNA発現に対するダイゼイン摂取の影響を観察した。その結果、1) ダイゼインは、卵巣摘除ラットの子宮重量を増加しなかった。また大腿骨骨密度および骨代謝マーカーを改善しなかった。2) しかし加齢ラットの大腿骨骨密度はダイゼインに対する大きな個体差を示した。3) 加齢ラットの大腿骨におけるHMG-CoA reductaseのmRNA発現は、ダイゼインによって抑制される傾向を示した。4) ダイゼインを摂取した加齢ラットの肉骨密度が高かったラットは、大腿骨におけるHMG-CoA reductaseおよびER-αのmRNA発現が抑制される傾向にあった。以上の結果から、加齢ラットではダイゼインに対する骨代謝の反応性の個体差が確認された。そして、この個体差の成因としてER-αとHMG-CoA reductaseの遺伝子発現が関係していることが推定された。

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) Coxton FP, Helfrich MH, Hof R, Sehti 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.
- 4) 海老沢秀道, 腰原康子 (2000): 加齢ラットの骨代謝に対する大豆イソフラボン混合物投与の影響. 大豆たん白質研究, **3**, 87-94.
- 5) 海老沢秀道, 腰原康子 (2002): 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. 大豆たん白質研究, **5**, 117-121.
- 6) Jia TL, Wang HZ, Xie LP, Wang XY and Zhang RQ (2003): Daidzein enhances osteoblast growth that may be mediated by increased bone morphogenetic protein (BMP) production. *Biochem Pharmacol*, **1**, 709-715.
- 7) 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.
- 8) 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*, **361**, 531-539.
- 9) Maitland-van der Zee AH, Klungel OH, Stricker BH, Monique Verschuren WM, Kastelein JJ, Leufkens HG and de Boer A (2002): Genetic polymorphisms: importance for response to HMG-CoA reductase inhibitors. *Atherosclerosis*, **163**, 213-222.