大豆食品・成分による加齢性機能障害および生活習慣病の予防作用：サルモデルでのゲノム医生物学的研究（第一報）

中村　伸*[1]・光永総子[1]・A-Ram Joeng[1]・山内英典[1]・林　隆志[2]・Joseph Gabriel[2]

[1]京都大学霊長類研究所　[2]イナリサーチ/INARP

Molecular Biomedical Evaluation in Monkeys of Efficacy of Soy Products, Soy Protein and Soy Isoflavone for Treatment of Hypercholesterolemia (Part I)

Shin NAKAMURA[1], Fusako MITSUNAGA[1], A-Ram JOENG[1], Hidenori YAMAUCHI[1], Takashi HAYASHI[2] and Joseph GABRIEL[2]

[1]Primate Research Institute, Kyoto University, Inuyama 484-8506
[2]Ina Research /Ina Research Philippines, Nagano 399-4501

ABSTRACT

Soy Products are known to protect against both hypercholesterolemia and hypercholesterolemia-mediated atherosclerosis, which are typical life-style-related diseases in the advanced countries. These diseases are also closely linked with age-related dysfunction in postmenopausal women. In the current study, we examined protective and/or therapeutic effect of soy protein (β-Conglycinin; β-CG) and the soy isoflavone (Soyaflavone HG; IF), which are expected to be the functional components in soy products, on hypercholesterolemia that was developed in ovariectomized (OVX) crab-eating monkeys with experimentally created postmenopausal condition. The molecular mechanism of protective and/or therapeutic action of the soy products against hypercholesterolemia was investigated by genomic biomedical analyses of plasma, liver, adipose tissue, and stool samples. Plasma levels of cholesterol and other related biochemical markers were monitored weekly. Plasma levels of adipocytokines, leptin and adiponectin, were also assayed by a sandwich ELISA established for monkey samples. Gene expression profiling was performed on thrombotic genes (TF, TFPI), Th1/Th2 cytokine genes (IL-4, INF-γ), cholesterol metabolic genes (LDL-R, VLDL-R, HMG-CoA, SR) and adipocytokine genes (leptin, adiponectin, TF) by means of a Real-Time RT-PCR/SYBRY method with ABI PRISM 7700. (Also, using bacterial DNA prepared from monkey stool, intestinal microflora (Bacteroides, Bifidobacteria, *E. coli*, and Clostridia) was analyzed by means of PCR. β-Conglycinin revealed significant protective and/or

*〒484-8506　犬山市官林41-2

therapeutic effect on hypercholesterolemia in OVX-monkeys, whereas Soyaflavone did not show any effect. Little change was observed in the plasma levels of adipocytokines. β-Conglycinin caused up-regulation of gene expression of TF, LDL-R, and HMG-CoA reductase in both peripheral MNL (monocytes) and the liver (hepatocytes), down-regulation of gene expression of TF and leptin, and up-regulation of adiponectin in adipose tissue (adipocytes). Interestingly β-Conglycinin had significant effect on intestinal microflora. It was effective in reducing the cell numbers of harmful bacteria, E. coli and Clostridia, and increasing those of beneficial bacteria, Bifidobacteria. From these results using a monkey model, it is suggested that β-Conglycinin, but not soyaflavone, is the functionally effective component that protects or cures postmenopausal hypercholesterolemia. These results also suggest that β-Conglycinin- or soy protein-enriched-food is a possible candidate for alternative-complementary medicine for these age-related disorders. *Soy Protein Research, Japan* **7**, 13-19, 2004.

Key words：β-conglycinin, OVX-hypercholesterolemia, monkey model, adipocytokines, intestinal microflora, alternative medicine

我が国では大豆食品が日常的に広く摂取され，長寿化との関連で大豆食品・成分の効用が注目されている．特に，大豆を常食しない欧米では，大豆食品による健康維持，疾病予防および老化に伴う機能障害防止などに関心が高まり，大豆成分が食品サプリメントの位置づけからalternative medicine（代替医療）の候補としても考えられている[1, 2]．しかしながら，大豆食品・成分の生体反応調節機能の分子機序に関しては未解明な部分が多く，その解明が望まれている．

サル類は生物進化上ヒトに最も近縁で，そのゲノム・遺伝子構造，脳神経系，循環器・止血凝固反応系，内分泌・ホルモン系，免疫・生体防御，解毒・代謝系および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，サル類は長期間に複合要因が関わる加齢性機能障害や生活習慣病の研究には最適な実験モデルと言える．したがって，サルモデルでの研究成果は，大豆食品・成分のヒトでの効用について，ゲノム・遺伝子を主体にした医生物学的研究を展開する上でラット・マウスなど汎用実験動物では得難い，ヒトに直接外挿出来る貴重な知見・情報を提供することが期待される．

本研究では，生活習慣病および加齢・閉経障害の典型である高脂血症・動脈硬化に対する大豆成分の予防・治療作用について，卵巣摘除した閉経サルの高コレステロール血症モデルを用いたゲノムレベルでのバイオメディカル研究を展開した．具体的には，血中コレステロールなど臨床血液生化学マーカーの分析，血中leptinおよびadiponectinの動態，血液凝固系/コレステロール代謝系/免疫応答系/アディポサイトカイン関連の遺伝子発現プロファイル解析，および腸内細菌叢のDNA解析などを通じて，大豆成分の生体機能調節作用の分子機序の解明を進めた．

方　　法

サルモデルでの実験スケジュールのアウトラインをFig. 1に示したが，機能性食品としての大豆成分の作用を明らかにするために，長期間での実験を設定した．得られたサル試料について下記の実験条件・方法で解析した．

閉経カニクイサルでの高コレステロール血症（動脈硬化）モデルの作出および大豆成分の投与

サル（カニクイサル）での高コレステロール血症（動脈硬化）誘発には，既に開発した特別AS飼料を用いた[3]．また，昨年度の結果から，正常オスサル，正常メスサルおよび卵巣摘除（OVX）した閉経メスサルの内，OVX-サルがコレステロール応答が高く，容易に高コレステロール血症を誘発されることが示された[3]．したがって，本実験ではOVX-サルにコレステロール血症誘発用AS飼料を与え，血中コレステロール（Chol）レベルを300～500 mg/100mLに制御したOVX-サルを，閉経（加齢性機能障害）性の高コレステロール血症（動脈硬化）モデルとして作出した．

大豆成分として大豆たん白質（β-conglycinin; β-CG），大豆イソフラボン（Soyaflavone HG; IF）を，ヒトでの摂取量に近い2.0 g/匹/日（β-CG），100 mg/

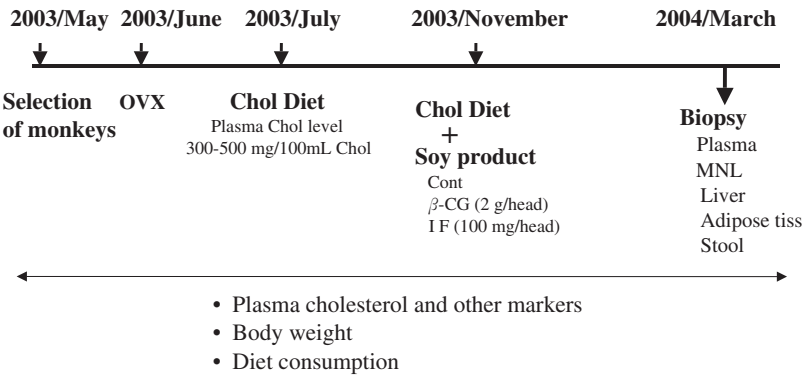

Fig. 1. Examination schedule using OVX-crab-eating monkeys.

匹/日（IF）を毎日経口投与した．投与に当たっては，直前にPBSでホモジネートを調製し（15 mL ケンダク液；β-CG，10 mL 溶液；IF），それぞれドレナージで経口投与した．この時，高コレステロール血症サルを３群（１群３～４頭）に分け，コントロール（生食投与）群，β-CG群およびIF群とした．

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

毎週体重測定と採血を実施した．血液試料については，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-Al, Apo-B, Apo-E）を既報[4]に従って測定した．さらに，LDL/HDL 比を高コレステロール血症の指標として，その3.0以上を高コレステロール血症とした．

血中leptinおよびadiponectinのELISA測定

市販の抗ヒトleptinならびに抗ヒトadiponectinの中からサル抗原を認識する抗体（それぞれ非標識およびビオチン標識）を選定し，それらを利用したサルleptinおよびadiponectinのサンドイッチELISA測定系を開発し，leptinおよびadiponectinの血中動態を解析した．

遺伝子発現プロファイル解析

末梢血由来の単核白血球（単球およびリンパ球）はQIAGEN RNA Kitを用いて高純度のDNAフリーRNAを単離した．肝臓および白色脂肪組織（腹部皮下脂肪）はバイオプシサンプルをRNA LaterでRNAase不活性化処理後，Isogen法とQIAGEN Kitの組み合わせでDNAフリーのRNAを調製した．得られたRNAをオリゴプライマーでRT反応してcDNAを調製後，ABI PRISM 7700装置を利用した real time PCR/SYBRY 法で遺伝子発現の変動を定量解析した．なお，検査対象にした11遺伝子（TF, TFPI, LDL-R, HMG-CoA, VLDL-R, SR, IL-4, INF-γ, leptin, adiponectin, GAPDH）のプライマー配列およびPCR条件等をFig. 2に示した．

腸内細菌叢の解析

腸内細菌叢（intestinal microflora）は各腸内細菌について，それぞれの細菌特異的なDNA配列を指標にして検討した[5]．具体的には，QIAGEN Stool Kitを用いて糞便中の細菌からDNAを抽出し，得られたDNAを用いてreal time PCRを実施し，増幅されたPCR産物を比較定量して腸内細菌数を推定した．検査した腸内細菌（Bacteroides, Bifidobacteria, *E. coli*, Clostridia）のPCRプライマーをFig. 2に示した．

結果と考察

大豆たん白質，イソフラボンの血中コレステロール低下作用の比較

Fig. 3に比較結果を示した．血中コレステロールレベルがLDL/HDL比で10前後（正常は3.0以内）の高コレステロール状態を維持した時点の13週目で，それぞれのグループに生理食塩水（control），大豆たん白質（β-conglycinin; β-CG）あるいは大豆イソフラボン（Soyaflavone HG; IF）を食間に経口投与した．投与初期の15～20週ではIFによる軽い血中コレステロール低下作用が見られるが，その作用は一過性で，21週以降IF投与群のLDL/HDL比はコントロール群と同レベルになった．一方，β-CG投与群の血中コレステロールレベルは特徴的で，β-CG投与後５週間ほどのlag phaseを経て遅延的な作用応答を示し，20週以降LDL/HDL比が正常レベルの3.0に低下し，その後も 正常LDL/HDL比が維持された．この時，Fig. 4に示す様に，β-CG投与群の体重減少は認められず，他の２群同様に僅かに増加傾向を示し，β-CG投与による摂食

Genes (Primer Name)	Primer Sequence		PCR Products(bp)	Annealing Tem.(℃)
Cytokine				
Interferone-gammma	Sense	TgCAgAgCCAAATTgTCTCCTTTTAC	291	64
	Anti-sense	gggATgCTCTTCgACCTCgAAA		
Interleukine-4	Sense	CgAAACTCTgAACAgCCTCACAgAg	358	64
	Anti-sense	TCAgCTCgAACACTTTgAATATTTCTCTCTCAT		
Cholesterol Metabolism				
LDL-Receptor	Sense	CAATgTCTCACCAAgCTCTg	258	58
	Anti-sense	TCTgTCTCgAggggTAgCTg		
HMG-CoA Reductase	Sense	TACCATgTCAggggTACgTC	246	58
	Anti-sense	CAAgCCTAgAgACATAATCATC		
Scavenger Receptor	Sense	gCTCCgAATCTgTgAAATTTgATgC	435	58
	Anti-sense	AggTACTTAgCTgCAgAAgAATgTC		
VLDL-Receptor	Sense	TTCCAgTgCACAAATggTCgCTgTA	294	58
	Anti-sense	ATCACATCTCCAggACACTgggATA		
Thrombosis				
Tissue Factor	Sense	ACTACTgTTTCAgTgTTCAAgCAgTgATTC	238	58
	Anti-sense	ATTCAgTggggAgTTCTCCTTCCAgCTCTg		
Tissue Factor Pathway Inhibitor	Sense	ggAAgAAgATCCTggAATATgTCgAgg	230	64
	Anti-sense	CTTggTTgATTgCggAgTCAgggAg		
Adipocytokine				
Adiponectin	Sense	CgTgATggCAgAgATggCACC	450	64
	Anti-sense	ATgCAggAgCACAgAgCCggAg		
Leptin	Sense	ACCCTCATCAAgACAATTgTCACCA	369	64
	Anti-sense	CTgCAgAgACCCCTgCAgCC		
Tissue Factor	Sense	ACTACTgTTTCAgTgTTCAAgCAgTgATTC	238	58
	Anti-sense	ATTCAgTggggAgTTCTCCTTCCAgCTCTg		
House Keeping				
GAPDH	Sense	CCATggAgAAggCTgggg	194	58/64
	Anti-sense	CAAAgTTgTCATggATgACC		
Intestinal Micriflora				
Bifidobacteria	Sense	gTTCCCgACggTCgTAgAg	153	
	Anti-sense	gTgAgTTCCCggCATAATCC		
Bacteroides	Sense	ggCAgCATTTCAgTTTgCTTg	423	60
	Anti-sense	ggTACATACAAAATTCCACACgT		
Clostridia	Sense	CCgCATggCAgTgTgTgAAA	255	60
	Anti-sense	CTgCTgATAgAgCTTTACATA		
E. coli	Sense	gACCTCggTTTAgTTCACAgA	585	
	Anti-sense	CACACgCTgACgCTgACCA		

Fig. 2. PCR primers and reaction conditions used in this study.

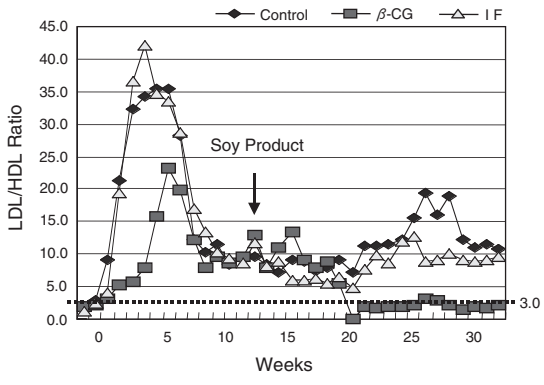

Fig. 3. Effect of soy product, soy protein (β-conglycinin; β-CG) or soy isoflavone (soyaflavone HG; IF) to plasma cholesterole level in OVX-hypercholesterolemia monkey. Soy product, β-CG or IF, was administrated at 13 weeks.

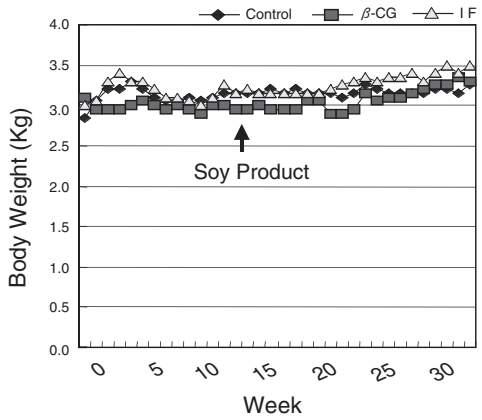

Fig. 4. Little effect on body weight by administration of soy product, β-CG or IF.

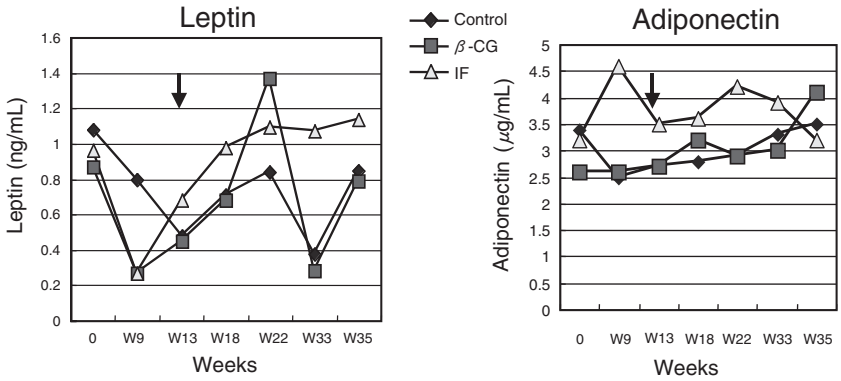

Fig. 5. Effect of soy product, β-CG or IF, to plasm leptin and adiponectin in OVX-hypercholesterolemia monkey. Arrow indicates soy product administration.

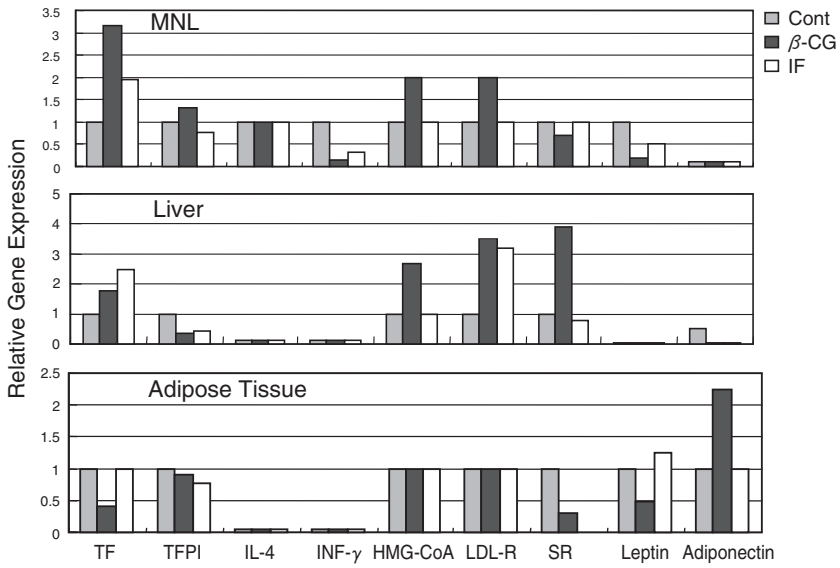

Fig. 6. Effect of soy product, β-CG or IF, to gene expression profile in peripheral blood mononuclear leukocytes (MNL), liver and adipose tissue in OVX-hypercholesterolemia monkey.

低下・体重減少に伴うLDL/HDL比の低下ではないことが確認された.

この結果から，IFには高コレステロール血症の改善・低下作用はなく，一方，β-CGが顕著なコレステロール低下作用を担う事が明らかにされた．また，大豆成分の生体機能調節作用を検討する際に，実施する試験期間が重要で，小型動物で見られる短期間での実験では，今回の様な遅延的な作用発現を見落とす危険性もある．そうした，試験条件が先行研究でのIFおよびβ-CGの作用評価の違い[6, 7]の要因になっていることが窺える.

大豆たん白質，イソフラボンの血中adipocytokine動態への影響

Fig. 5にコントロール，IF投与およびβ-CG投与群における，leptinおよびadiponectinの血中動態を示したが，いずれのadipocytokineにおいても群間での差違は見られず，今回の実験では，IFあるいはβ-CGによる血中adipocytokine動態への影響は認められなかった．しかし，後述するように，脂肪組織でのこれらadipocytokine遺伝子の発現はβ-CG投与群で顕著に変化していた（Fig. 6）．脂肪組織でのadipocytokine遺伝子発現のイベントが，血中でのadipocytokineたん白質動態とパラレルでないことは，adiponectinのケースで知られている[8]．ことに，adiponectinたん白質は血中

でマクロ分子複合体を形成するので，その血中クリアランスなど消長には複数の因子が関わるため血中動態が複雑になっていることが予測される．

遺伝子発現プロファイルによる大豆たん白質，イソフラボンの作用機序の解析

末梢血単核白血球（MNL），肝臓および皮下脂肪組織での，免疫サイトカイン（Th1 cytokine；INF-γ，leptin，Th2 cytokine; IL-4），コレステロール・脂質代謝系因子（LDL-R, HMG-CoA, SR, VLDL-R），血液凝固・血栓因子（TF, TFPI）およびadipocytokine（adiponectin, leptin, TF）の主要9遺伝子について，real time PCRでの定量的遺伝子発現プロファイル解析を実施し，その結果をFig. 6に示した．

β-CG投与群：β-CG投与群において，MNLではLDL取り込みの律速因子・LDL-R遺伝子およびコレステロール代謝酵素・HMG-CoA遺伝子が顕著にup-regulateされ，SR遺伝子のdown-regulation が認められた．また，細胞性免疫・Th1応答や炎症反応に関わるIFN-γ遺伝子およびleptin遺伝子[9]もdown-regulationが見られた．肝臓ではLDL-R，HMG-CoA reductaseおよびSR遺伝子の顕著な発現亢進が認められた．脂肪組織では，炎症・血栓関与因子のTF遺伝子，SR遺伝子およびleptin遺伝子の発現抑制が見られ，一方，adiponectin遺伝子の発現誘導が見られた．

IF投与群：IF投与群のMNL，肝臓および脂肪組織における対象遺伝子の発現プロファイルはコントロール群のそれらと大きな違いは見られず，Fig. 3に見たIFにコレステロール低下作用がないことが遺伝子レベルでも確認された．

大豆たん白質，イソフラボンの腸内細菌叢（intestinal microflora）への影響

機能性食品の作用は比較的長期間を掛けて，主要生体反応系のバランス調節に関与する事が窺える．腸内細菌は糞便乾燥重量の約30%を占め，腸内での食品成分・医薬品・有用物質の代謝・吸収に大きく関与している点で，主要生体反応系の一つとして考えられている[10]．Fig. 7に示す様に，腸内細菌を便宜的に“善玉菌”と“悪玉菌”に区分し，それぞれの代表菌種についてβ-CGおよびIF長期摂取の影響を，菌種特異的なDNA指標を利用してゲノム・DNAレベルで解析した．

結果をFig. 8に示したが，β-CG投与群で“悪玉菌”のClostridia（CC）および*E. coli*（ECO）の減少が認められた．こうした腸内細菌叢の変化がコレステロール代謝にどのように関わるか，今後明らかにされるべき課題であろう．なお，他の機能性食品（ヨーグルト）の例では，腸内細菌叢の変化は認められていない[11]．

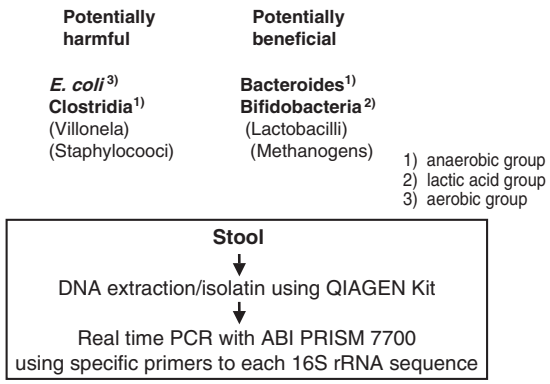

Fig. 7. Intestinal microflora and its DNA anlysis by PCR.

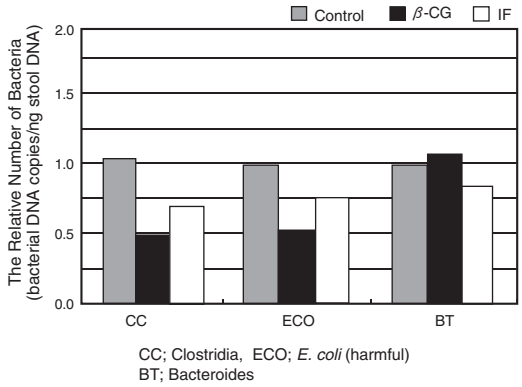

Fig. 8. Effect of soy product, β-CG or IF, to intestinal microflora in OVX-hypercholesterolemia monkey.

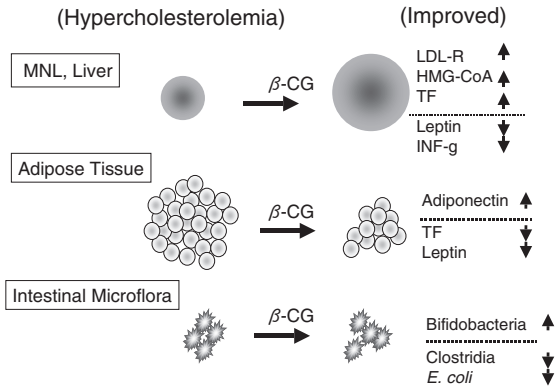

Fig. 9. Functional genes and intestinal bacteria associating with therapeutic effect of soy protein (β-CG) to hypercholesterolemia. ↑, up-regulation; ↓, down-regulation.

要　　約

女性に見られる加齢性機能障害の一つとして閉経後の高コレステロール血症・動脈硬化が知られ，そうした機能障害・病態の予防・治療に大豆など機能性食品の利用が注目されている．今回，閉経モデルとして卵巣摘除（OVX）したカニクイザルを用い，高コレステロール血症誘発用に開発したAS飼料を与えて，閉経性高コレステロール血症サルモデルを作出した．この高コレステロール血症サルモデルに大豆成分の大豆たん白質（β-conglycinine; β-CG），大豆イソフラボン（Soyaflavone HG; IF）を長期連続経口投与し，両者の高コレステロール血症に対する抑制・治療効果を，血中コレステロールや関連の臨床生化学マーカーおよび遺伝子発現プロファイルの解析を通じて検討した．主な大豆成分の内，IFは血中コレステロールの低下作用を示さなかった．また，IF投与群の遺伝子発現プロファイルはコントロール群のそれとの差違が見られず，高コレステロール血症に対するIFの予防・抑制効果は認められなかった．一方，β-CGは顕著な血中コレステロール低下作用を示し，閉経後の高コレステロール血症の抑制・治療に有効であることが明らかにされた．β-CGの作用点をFig. 9にまとめたが，末梢単核白血球，肝臓および脂肪組織での関連遺伝子の発現調節（発現亢進あるいは抑制）ならびに腸内細菌叢の変化など多因子を介しての血中コレステロール低下作用であることが窺える．

文　　献

1) Huntley AL and Ernst E (2004): Soy for the treatment of perimenopausal symptoms-a systematic review. *Maturitas*, **20**, 1-9.
2) Chagan L, Ioselovich A, Asherova L and Cheng JW (2002): Use of alternative pharmacotherapy in management of cardiovascular diseases. *Am J Manag Care*, **8**, 270-285.
3) 中村　伸，光永総子，山内英典，岡田真紀，A-ram Joeng，林　隆志，Perez RM，Carrasco RL，中川博司（2003）：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，大豆たん白質研究，**6**，57-62.
4) Abumiya T, Nakamura S, Takenaka A, Takenaka O, Yoshikuni Y, Miyamoto S, Kimura T, Enjyouji 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.
5) Wang RF, Kim S-J, Rberttson LH and Cerniglia CE (2002): Development of a membrane -array method for the detection of human intestinal bacteria in fecal samples. *Mol Cell Probes*, **16**, 341-350.
6) Lucas EA, Lightfoot SA, Hammond LJ, Devareddy L, Khalil DA, Daggy BP, Soung do Y and Arjmandi BH (2003): Soy isoflavones prevent ovariectomy-induced atherosclerotic lesions in Golden Syrian hamster model of postmenopausal hyperlipidemia. *Menopause*, **10**, 314-321.
7) Uesugi T, Toda T, Tsuji K and Ishida H (2001): Comparative study on reduction of bone loss and lipid metabolism abnormality in ovariectomized rats by soy isoflavones, daidzin, genistin, and glycitin. *Biol Pharm Bull*, **24**, 368-372.
8) Lihn AS, Ostergard T, Nyholm B, Pedersen SB, Richelsen B and Schmitz O (2003): Adiponectin expression in adipose tissue is reduced in first-degree relatives of type 2 diabetic patients. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **284**, E443-448.
9) Lord GM, Matarese G, Howard JK, Baker RJ, Bloom SR and Lechler RI (1998): Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression, *Nature*, **394**, 897-901.
10) Turner NJ, Thomson BM and Shaw IC (2003): Bioactive isoflavones in functional foods: the importance of gut microflora on bioavailability. *Nutr Rev*, **61**, 204-213.
11) Saito Y, Hamanaka Y, Saito K, Takizawa S and Benno Y (2002): Stability of species composition of fecal bifidobacteria in human subjects during fermented milk administration. *Curr Microbiol*, **44**, 368-373.