

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（第二報）

中村 伸^{*1}・光永総子¹・山内英典¹・橋本寛之¹・林 隆志²・Joseph Gabriel²

¹京都大学霊長類研究所 ²イナリサーチ/INARP

Efficacy of Soy Product, Soy Protein or Soy Isoflavone, to Hypercholesterolemia and Osteoporosis: Its Molecular Biomedical Studies in Monkeys (Part II)

Shin NAKAMURA^{*1}, Fusako MITSUNAGA¹, Hidenori YAMAUCHI¹,
Hiroyuki HASHIMOTO¹, Takashi HAYASHI² and Joseph GABRIEL²

¹Primate Research Institute, Kyoto University, Inuyama 484-8506

²INA Research /INA Research Philippines, Nagano 399-4501

ABSTRACT

Soy products are known to protect age-related disfunctions such as hypercholesterolemia and osteoporosis in postmenopausal women. In current study we examined an efficiency of soy protein (β -Conglycinine; β -CG) or soy isoflavone (Soyaflavone HG; IF), which are expected to be functional component(s) in soy products, to these age-related disfunctions. In this current study we examined efficacy of the soy components of β -CG and IF to hypercholesterolemia or osteoporosis in primate model. Ovariectomy (OVX) Cynomolgus macaques were developed for model of postmenopausal age-related hypercholesterolemia and/or osteoporosis. β -Conglycinine revealed significantly protective and/or therapeutic effect to hypercholesterolemia in OVX-monkeys, while Soyaflavone did not showed any effect. In PBMC LDL-R, VLDL-R and UCP-2 genes that associate with lipid metabolism, were up-regulated by β -Conglycinine, but not Soyaflavone. In liver, β -Conglycinine affected to up-regulate ADH7, HSP70, PPAR- γ , and GDF15 genes and to down-regulate HSP60, CYP3A43, CYP3A4, SULT, AGTR1, SOD2, IL-7, and IL18 genes. β -Conglycinine showed significant effect to protect bone-mineral-density (BMD) loss in OVX-osteoporosis monkeys. However Soyaflavone had little effect to prevent BMD loss even though its preventing effect had been reported in previous studies using non-primate model. These results suggest that β -Conglycinine, but not Soyaflavone, is functionally potential component to protect both of hypercholesterolemia and osteoporosis. These also imply that β -Conglycinine or its enriched-food is a possible

*〒484-8506 犬山市官林41-2

candidate for alternative-complementary medicine to these age- and/or life style-related disorders. *Soy Protein Research, Japan* **8**, 1-7, 2005.

Key words: β -Conglycinine, Isoflavone, Hypercholesterolemia, Osteoporosis, Postmenopause, Monkey model

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、日周リズム、免疫系、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骨粗鬆症など長期間に複合要因が関わる加齢性機能障害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。

大豆食品・成分は、生活習慣病や加齢性機能障害に対する予防・改善・治療効果を示す健康食品・機能性食品として注目されている^{1,2)}。しかしながら、大豆食品・成分のそうした体調機能に関しては科学的根拠が充分でなく、特に、作用点・作用機序などに関する知見・情報の蓄積が待たれている。

本研究では、こうしたサルの医生物学的特質を活かして、心臓循環器疾患の主なりリスク要因となる脂質代謝異常（高脂血症）および閉経後骨代謝異常（骨粗鬆症）に対する大豆成分の効果と作用機序について、サルモデルを駆使した検討を進めた。具体的には、卵巣摘除に

よる実験的閉経状態のカニクイサルで高コレステロール血症モデル作出し、大豆たん白質（ β -Conglycinine）あるいは大豆イソフラボン（Soyaflavone HG）を長期経口投与し、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の発現プロファイル解析を試みた。同時に、上記実験的閉経カニクイサルの骨粗鬆症モデルを用い、 β -ConglycinineあるいはSoyaflavone HGによる骨粗鬆症に対する予防・治療作用についての比較検討も実施した。

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、マウス・ラットでは困難な延べ70週の長期間実験を実施した。

加齢性脂質代謝異常（高コレステロール血症）および加齢性骨代謝異常（骨粗鬆症）サルモデルの作出

サル（カニクイサル）での高コレステロール血症誘発には、既に開発した特別AS飼料³⁾を用いた。また、

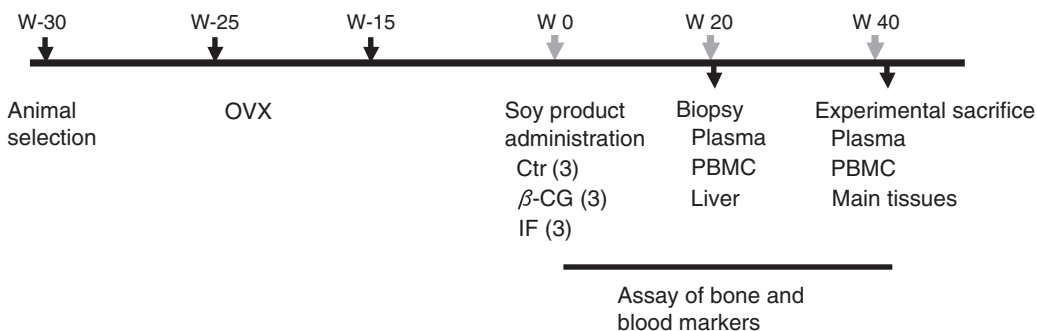


Fig. 1. Study schedule using OVX-Cynomolgus monkeys.

昨年度報告に示した条件に基づき、卵巣摘除（OVX）カニクイサルにAS飼料を与え、血中コレステロール（Chol）レベルを300～500 mg/100mLに調節した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モデルとして作出した⁴⁾。同時に、実験的閉経に伴う顕著な骨密度低下に着目して閉経（加齢性機能障害）性の骨粗鬆症モデルを作出した。

大豆成分の投与

大豆成分として大豆たん白質（ β -Conglycinine; 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/head/day（ β -CG）、100 mg/head/day（IF）をそれぞれ連続経口投与した。投与実験は、生食投与のコントロール（Ctr）群、 β -Conglycinine（ β -CG）投与群およびSoyaflavone HG（IF）投与群の3群で実施した。

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-AI, Apo-B, Apo-E）を既報⁴⁾に従って測定した。また、LDL/HDL比を高コレステロール血症の指標として、LDL/HDL比の5.0以上を高コレステロール血症とした。

遺伝子発現解析

単核白血球、肝臓、脂肪組織、腸リンパ組織、骨組織などから既報⁴⁾に従ってDNAフリーRNAを調製した。得られたRNA試料を用いOligo-dT primerでのRT

反応後、Fig. 2に示す遺伝子（群）について設計したPCRプライマーを用い、PCR Premix (Takara) を利用したABI PRISM 7700装置でのReal Time RT-PCRを実施し、遺伝子発現の変動を定量解析した。さらに、肝臓RNA試料についてはCtr群および β -CG群での機能遺伝子の発現変化について、DNAチップを用いた発現プロファイルの比較検討も実施した。

骨密度測定

Ctr、 β -CGおよびIF投与群のサルについてケタミン/キシラジン麻酔下、第3～第5腰椎の骨密度を既報⁵⁾の条件で経時変化を測定した。具体的には、Fig. 3に示す様にDPX a X-ray bone densitometer/Lunar scan software version 1.3h (Lunar Corporation, U.S.A.)を用いたdual energy X-ray absorptiometry (DEXA) で実施し、それぞれのサルの解析直前の第3～第5腰椎の骨密度を100%として、それ以降の骨密度の変動をモニターした。

結果と考察

血中コレステロールレベルの動態

Table 1に比較結果を示した。血中コレステロールレベルが高コレステロール状態を維持した時点で、それぞれのグループに生理食塩水（control）、大豆たん白質（ β -Conglycinine; 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4～10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、14週以降IF投与群のLDL/HDL比はコントロール群と同

<u>Cholesterol metabolism system</u> <u>Energy production system</u> • Plasma : LDL-/HDL-Chol, TG, Glu IGF-1 • PBMC : • Liver : • Adipose tissue (Genes) TF, TFPI, HMG, LDL-R, VLDL-R, SR, UCP-1, UCP-2, IN, AN, IGF-1, IGFBP3, GHR IL-6, ER-α, ER-β, PR Other drug response genes (1,600)	<u>Bone metabolism system</u> • Plasma : NTx • Bone density • Bone : (Genes) IGF-1, BGR, ER-α	<u>Immune system</u> • PBMC : • Lymphoid tissue : (Ileum • Intestinal lymph node • Spleen) (Genes) IL-4, IL12, IL13, IL18, IFN-γ, IL4R, CCR4, IFN-γR1, IFN-γ-R2,
---	--	--

Fig. 2. Genes and related biomarkers analyzed in this study.



Fig. 3. Bone mineral density (BMD) analysis in monkey using a DEXA machine.

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10週間ほどのlag phaseを経て遅延的な作用応答を示し、12週以降LDL/HDL比が正常レベル近くに低下し、その後40週でも正常LDL/HDL比が維持された。

この結果は小型動物を用いた先行研究^{6,7)}のそれとは異なり、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。

末梢単核白血球での脂肪代謝関連因子の遺伝子発現への影響

この時、Ctr、 β -CGおよびIF投与群のサル末梢単核白血球における脂肪代謝関連遺伝子のlow density lipoprotein receptor (LDL-R), very low density lipoprotein receptor (VLDL-R) およびuncoupling protein 2 (UCP-2) の遺伝子発現を、投与前 (pre)、投与10週後 (W10)、20週後 (W20) および40週後 (W40) で比較すると、Table 2に示すように β -CG投与群の単核白血球でLDL-RおよびVLDL-R遺伝子のup-regulationが見られ、血中コレステロールの低下と一致した。さらに、単球ミトコンドリアでの脂肪代謝・ATP産生系のUCP-2遺伝子についても β -CG投与群でup-regulationが認められた。一方、CtrおよびIF投与群の単核白血球ではLDL-R、VLDL-RおよびUCP-2遺伝子の発現減少が見られた。その他の遺伝子 (TF, HMG, SR, TFPI, IL4, IFN- γ) では3群間での特徴的な発現性の差異は認められなかった。

肝臓における種々機能遺伝子の発現プロファイルの検討

β -CG投与群におけるコレステロール血症改善作用の分子機序を明らかにする目的で、Ctrおよび β -CG投与群における肝臓機能遺伝子の発現プロファイルの比較解析を行った。Fig. 4に示すように β -CG投与群では、ADH7, HSP70, PPAR- γ , GDF15等の遺伝子のup-regulationが認められた。一方、 β -CG投与によるdown-regulationはHSP60, CYP3A43, CYP3A4,

Table 1. Effect of β -CG or IF to the blood cholesterol level in OVX-hypercholesterolemia monkeys

Week	LDL/HDL Ratio		
	Control group	β -CG group	IF group
-4	11.5	9.6	10.3
-2	9.4	9.5	8.7
0	8.4	7.9	8.2
2	9.2	10.4	6.0
4	7.5	8.8	6.3
6	9.1	5.6	6.5
8	11.3	4.8	7.7
10	11.6	4.2	8.7
12	14.5	4.1	12.7
14	13.1	3.8	9.1
16	12.2	3.4	9.1
20	11.4	3.7	9.1
24	9.9	4.6	10.4
26	12.6	3.8	6.4
28	8.1	3.3	7.4
30	12.5	3.4	8.2
32	12.7	3.3	6.6
34	9.5	2.9	6.7
36	9.5	3.7	7.2
38	8.6	4.3	7.8
40	8.7	4.1	8.1

Table 2. Effect of β -CG or IF to gene expression of LDL-R, VLDL-R and UCP-2 in PBMC of OVX-hypercholesterolemia monkeys

LDL-R				
	Pre	W 10	W 20	W 40
Control group	100	76	130	50
β -CG group	100	119	257	238
IF group	100	86	135	71
VLDL-R				
	Pre	W 10	W 20	W 40
Control group	100	95	130	64
β -CG group	100	182	253	232
IF group	100	117	167	42
UCP-2				
	Pre	W 10	W 20	W 40
Control group	100	80.4	67.2	79.2
β -CG group	100	150	199	187
IF group	100	161	79	84

SULT, AGTR1, SOD2, IL-7およびIL18の各遺伝子で見られた。これをそれぞれの遺伝子の機能面で検討すると、脂肪代謝系 (PPAR- γ) は機能亢進し、一方、エストロゲン代謝系 (SULT)、スーパーオキシド代謝系 (SOD2) およびTh2・液性免疫系サイトカイン (IL18) は機能低下している事が窺える。

なお、肝臓では単核白血球とは異なり β -CG投与群

でのLDL-R, VLDL-RおよびUCP-2遺伝子のup-regulationは見られず, 従来のコンセンサスと異なる結果を示した。

脂肪組織における機能遺伝子の発現動態の検討

皮下脂肪組織 (WAT) で検討した17遺伝子 (TF, HMG, LDL-R, VLDL-R, SR, TFPI, LN, AN, UCP-1, UCP-2, IGF1, IGFBP3, GH-R, IL6, ER- α , ER- β , PR) についての詳細なデータ評価は途中段階であるが, Fig. 5に示すように β -CG投与群での他の2群 (CtrおよびIF群) と異なる点として, AN/LNの発現比ならびにUCP-2発現の増加傾向が観察された。WATでのAN/LNの遺伝子発現比については, ANおよびLN関与代謝系における両者間のバランス指標と考えることも可能で, その視点から β -CG投与群にお

けるAN関与代謝系 (エネルギー消費系) のポテンシャルが増大していることが予測される。なお, ANおよびLNについては, それらの遺伝子発現レベルと血中のたん白質レベルが必ずしも一致しないことが示唆されており, 上記の遺伝子レベルでのAN/LN比が血中のたん白質レベルのAN/LN比に反映するかは今後の検討課題である。

また, 褐色脂肪に関しても同様な解析を実施したが, これまでのところ3群間での特徴的な差異は認められなかった。

免疫系における機能遺伝子の発現動態への影響

回腸 (パイエル板), 腸管リンパ節および脾臓の主要リンパ組織についてFig. 2に示す免疫応答関連9遺伝子の発現性への影響について3群間で比較したが, これまでの予備的検討では有意な差異は認められず, さらに比較解析を進めている。

骨密度 (骨代謝) への影響の検討

Fig. 6に示すようにDEXAでの骨密度 (BMD) 測定の結果から β -CG投与群のみに顕著なBMD低下抑制効果が認められた。興味深いのは従来の研究⁷⁾でBMD低下抑制効果が示唆されているIF投与群ではCtr群と同様, BMD低下抑制作用は見られず, これまで知られていなかった大豆たん白質・ β -CGによる骨密度低下防止作用が見出された。

さらに, 骨破壊・吸収マーカーのI型コラーゲン架橋N-テロペプチド (NTx) の血中動態の比較検討からも, β -CGによる骨密度低下 (骨粗鬆症) 抑制効果が明らかにされた。すなわち, β -CG投与群では投与前後 (W0, W40) での血中NTxは同レベル (変化な

Up-Regulated Genes	Down-Regulated Genes
ADH7	HSP60
HSP70	CYP3A43
PPAR- γ	CYP3A4
(lipid metabolism)	SULT
GDF15	(E2 metabolism)
	AGTR1
	SOD2
	(superoxide metabolism)
	IL7
	IL18
	(Th2 response)

Fig. 4. Effect of β -CG on expression profile of liver functional genes in OVX-hypercholesterolemia monkey.

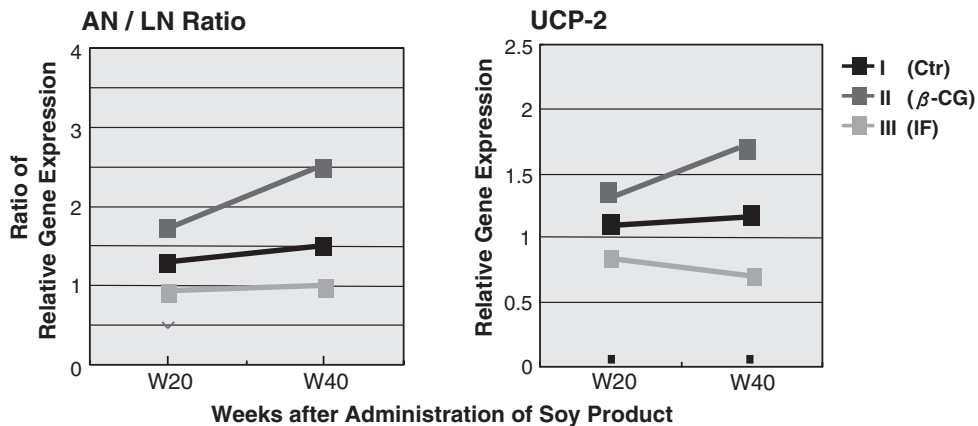


Fig. 5. Effect of β -CG or IF on gene expression of AN, LN and UCP-2 in adipose tissue of OVX-hypercholesterolemia monkey.

し)であった。一方、IF投与群およびCtr群では投与前(W0)の血中NTxレベルに比べ投与後(W40)のそれは顕著に増大した。この結果から、IF群およびCtr群では骨破壊が進んでいるが、 β -CG群においてはその骨破壊が止まり骨密度低下(骨粗鬆症)を防いでいることが示された。

骨代謝系遺伝子の発現動態の検討

骨代謝・骨形成に関わる機能遺伝子¹⁰⁾の内、IGF-1、BG-RおよびER- α についてCtr、IF投与および β -CG投与の3群で比較検討すると、 β -CG投与群においてBG-RおよびER- α 遺伝子のup-regulation傾向が見られ、 β -CGによる骨形成反応の活性化・促進作用が示唆された。

また、ラットでの実験動物学的研究⁸⁾およびヒトでの疫学的研究⁹⁾では、大豆たん白質を含む飼料あるいは食事を摂取することで骨粗鬆症の予防・改善効果がしめされた。しかし、これらの報告では用いた大豆たん白質が未分画で、複数の大豆たん白質成分が混在するため、どの大豆たん白質が有効成分が特定出来ない。加えて、大豆イソフラボンも除去されていないため、ゲニステインやダイゼイン等イソフラボン誘導

体との相乗効果も否定することが出来ない。本研究では、 β -CGおよびIFの相互夾雑のない成分を用い、 β -CG投与による明確な骨密度低下防止作用を見出した。従って、大豆食品の骨粗鬆症に対する機能性成分として β -CGの役割が強く示唆される。

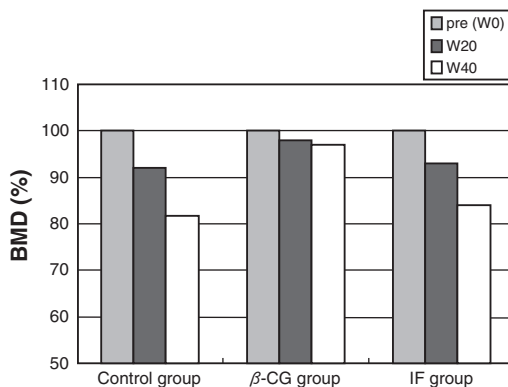


Fig. 6. Effect of β -CG or IF on lumbar BMD loss in OVX-osteoporosis monkey.

要 約

加齢性機能障害(高コレステロール血症、骨粗鬆症)サルモデルを用い、大豆主成分の大豆たん白質(β -Conglycinine; β -CG)および大豆イソフラボン(Soyafavone HG; IF)によるこれら加齢性機能障害に対する予防・改善作用について比較解析した。サルモデルを利用した本研究の結果では、 β -CGによる顕著な高コレステロール血症および骨粗鬆症抑制作用が見出され、その体調機能に関わる遺伝子も推定された。ことに、 β -CGによる明確な骨密度低下抑制(骨粗鬆症改善)作用に関しては本研究が初めての報告で、 β -CGおよびそのペプチド成分を利用した骨粗鬆症のドラッグデザインにも繋がる。本研究のサルモデルでの結果(ことに、大豆イソフラボンの骨代謝に対する効果・作用)は従来のマウス・ラット等を用いた報告と異なるが、これらの小動物はライフスパン、食性、日周リズム、エネルギー代謝系など医生物学的特性がヒトを含む霊長類と異なることに起因していることが考えられる。こうした観点で、マウス・ラットでの機能性食品の体調機能解析や安全性試験の結果をヒトに外挿することの問題点と、ヒトに近縁な霊長類モデルを活用した機能性食品の評価試験系の重要性が指摘される。

文 献

- Huntley AL and Ernst E (2004): Soy for the treatment of perimenopausal symptoms-a systematic review. *Maturitas*, **20**, 1-9.
- 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.
- 中村 伸, 光永総子, 山内英典, 岡田真紀, Aram Yoeng, 林 隆志, Rosalio M Perez, Romualdo L Carrasco, 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.
- 中村 伸, 光永総子, 山内英典, Aram Yoeng, 林 隆志, Joseph Gabriel (2004): 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 (I), 大豆たん白質研究, **7**, 13-19.

- 5) Hiyaoka A, Yoshida T, Cho F and Yoshikawa Y (1994): Age-related changes in bone mineral density, mean width and area of the lumbar vertebrae in male African green monkeys (*Cercopithecus aethiops*). *Exp. Anim*, **43**, 235-241.
- 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**, 368-72.
- 8) Blum SC, Heaton SN, Bowman BM, Hegsted M and Miller SC (2003): Dietary soy protein maintains some indices of bone mineral density and bone formation in aged ovariectomized rats. *J Nutr*, **133**, 1244-1249.
- 9) Ho SC, Woo J, Lam S, Chen Y, Sham A and Lau J (2003): Soy protein consumption and bone mass in early postmenopausal Chinese women. *Osteoporos Int*, **14**, 835-842.
- 10) T Ueland, PR Odgren, A Yndestad, K Godang, T Schreiner, SC Marks and J Bollerslev (2003): Growth hormone substitution increases gene expression of members of the IGF family in cortical bone from women with adult onset growth hormone deficiency-relationship with bone turn-over. *Bone*, **33**, 638-645.