

大豆食品・成分による閉経性／加齢性機能障害の予防作用： サルモデルでのゲノム医生物学的研究（Ⅲ）

中村 伸^{*1}・光永総子¹・橋本寛之¹・出井早苗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

Studies on Effect of Soy Products to Menopause-Associated Disorders in Monkey Model (III): Immune Response, Intestinal Bacteria Flora and Brain-Nerve Function in OVX-Menopause Monkeys

Shin NAKAMURA¹, Fusako MITSUNAGA¹, Hiroyuki HASHIMOTO¹, Sanae DEI¹,
Takashi HAYASHI² and Joseph GABRIEL²

¹Primate Research Institute, Kyoto University Inuyama 484-8506

²INA Research /INA Research Philippines Nagano 399-4501

ABSTRACT

Soy is accepted to be a functional food to protect age-related deteriorations in postmenopausal women, even though enough evidences on its protective action are not accumulated yet. Most pre-clinical studies on efficiency of functional foods and/or their components were performed in conventional animals, such as rat or mouse, because studies using these rodent models are of low cost and/or easy to perform. However, biomedical characteristics of rodents are markedly different from those of humans to elucidate detailed mechanisms of the functional foods. Macaque monkeys, *Cynomolgus*, Rhesus or Japanese macaque, are closely-related primates to humans and their genomic differences are just in 2-3% to shear whole biomedical nature with humans. This is a merit for us to perform pre-clinical studies using monkey on efficiency and/or safety of functional foods, if examination cost could be down to a reasonable level. In a series of this study, we developed an ovariectomy (OVX) *Cynomolgus* macaque model to examine postmenopausal age-related deteriorations and effect of soy products on them. We have found that soy protein (β -Conglycinin; β -CG), but not soy isoflavone (Soyaflavone HG; IF), was functionally potential component to protect both hypercholesterolemia and osteoporosis in the postmenopausal monkeys (1-3). In this study, we examined efficacy of the soy components of β -CG and IF on immune system, especially on Th1/Th2 response,

*〒484-8506 犬山市官林41-2

intestinal bacteria flora, and cerebral-nerve function in postmenopausal primate model on the level of functional genes. We also examined antigenicity of both components to monitor production of specific IgE. *Soy Protein Research, Japan* **9**, 1-8, 2006.

Key words: β -conglycinin, isoflavone, functional genes, immune system, Brain, intestinal bacteria, postmenopause, monkey

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^{4,5)}。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・作用機序の分子基盤に関する知見・情報の蓄積が待たれている。

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、脂質代謝系、免疫系、脳・神経系、食性、日周リズム、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、サル類は機能性食品や漢方・伝統医療など作用・効果が緩徐で、長期間に渡って複合要因に関わる疾病改善・予防の有効性を評価検討する上で格好なヒトモデルと言える。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基盤解析が可能となる。

本研究では、こうしたサルのバイオメディカル特質に着目して、卵巣摘除 (OVX) による閉経カニクイサルモデルを作出し、閉経に伴うエネルギー代謝、骨代

謝、免疫応答あるいは脳・神経機能の加齢性機能低下とそれらに対する大豆成分の予防・改善作用を評価検討した。

Fig. 1に示す様に、これまで閉経に伴う①脂質代謝異常 (高脂血症) および②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解析を進め、大豆たん白質 (β -Conglycinin, β -CG) の新たな機能として骨粗鬆症改善作用を見出した¹⁻³⁾。一方、大豆イソフラボン (Soyaflavone HG, IF) では、高脂血症および骨粗鬆症のいずれに対しても改善作用は認められず、従来のラット・マウスでの試験結果とは異なった^{6,7)}。

今年度はこの閉経カニクイサルモデルを活用して、③免疫応答系、④腸内細菌フローラおよび⑤脳・神経系に対する大豆たん白質 (β -Conglycinin, β -CG) あるいは大豆イソフラボン (Soyaflavone HG, IF) の影響・効果を、主にゲノム・機能遺伝子レベルでの発現プロファイル解析を通じて評価検討した。また、⑥アレルギー抗原性についても安全性の観点から検討した。

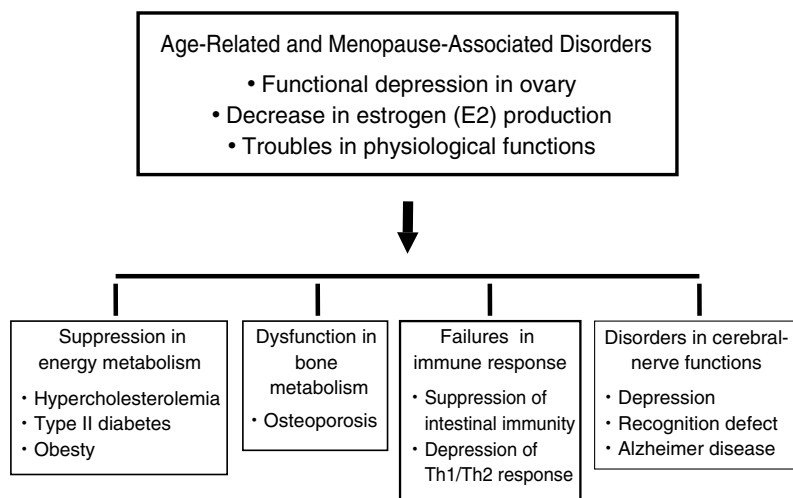


Fig. 1. Post-menopausal age-related disorders.

材料・方法

サル閉経モデルへの大豆成分の投与

本研究では、成獣メスのカニクイザルを卵巣摘出 (OVX) して作出したOVX-閉経サルモデルを用いた。これらのOVX-閉経サルモデルに、被検物資として大豆たん白質 (β -Conglycinin, β -CG) あるいは大豆イソフラボン (Soyafavone 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、Fig. 2に示す様に長期連続経口投与し、以下の試験を実施した。

遺伝子発現・ゲノム解析

コントロール (Ctr) 群, β -CG投与群およびIF投与群について、それぞれの主要リンパ組織および脳各部位を採取後、種々組織試料から既報²⁾に従ってDNAフリーの高純度RNAを調製した。得られたRNAを用いOligo-dT primerでのRT反応後、Fig. 3に示す機能遺伝子の特異的PCRプライマーを用いたReal Time RT-PCRを実施し、機能遺伝子群の発現変動を定量解析した。さらに、糞便試料についてはQIAGENのstool kitを活用して、糞便中の腸内細菌DNAを抽出し、Fig. 3に示す腸内細菌に対する特異的PCRプライマーを用いたReal Time PCRで腸内細菌叢の動態を定量比較した。

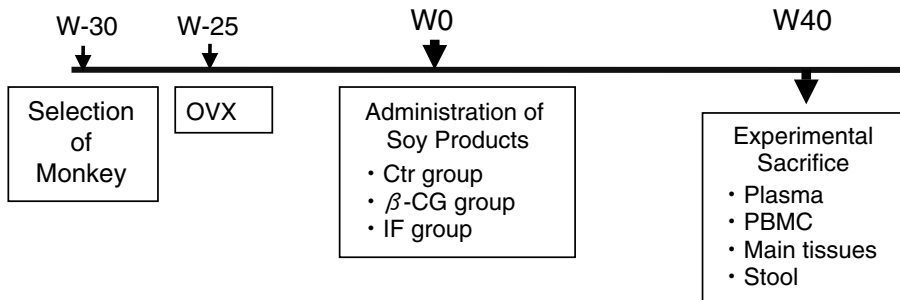


Fig. 2. Study schedule using OVX-menopause cynomolgus macaques.

Immune System	Intestinal Bacteria	Brain-Nerve System
• Lymphoid Tissues Mesenteric lymph node, Spleen, Thymus • Intestinal Tissues Small intestine (Jejunum, Ileum) Large intestine (Colon) • Th1/Th2 Cytokines and Their Receptors (Th1) IL12, IL18, IFN-g IFN-gR1, IFNg-R2 (Th2) IL-4, IL13, IL4R, CCR4	Stool Bacteria DNA • Beneficial bacteria Bif (Bifidobacterium) Cbu (Clostridium buty.) Fpr (Enterococcus) Lacto (Lactobacillus) • Harmful bacteria Ccl (C. clostridiiforme) Dsv (Desulfovibrio) Veillo (Veillonella) • Opportunistic bacteria Eco (Enterobacteria) Ral (Ruminococcus)	• Neurotrophins and Their Receptors (NT) BDNF, NGF, NT-3, NT-4/5 (NT-R) TrkA, TrkB TrkC, P75 • Apoptosis-Associated Factors Bax, BclxL, p53, • Alzheimer-Associated Factor Saladian-1 • Steroid Hormone Receptors ERa, ERb, PR • Hypoxia Response /Angiogenesis TF, VEGF

Fig. 3. List of functional genes or genome examined in this study.

結果と考察

主要免疫組織でのTh1/Thサイトカインおよびサイトカイン-レセプター遺伝子発現への影響

Table 1に、主要免疫組織の腸リンパ節、脾臓および胸腺におけるTh1サイトカイン/サイトカイン-レセプター（R）（IL-12, IL-18, IFN- γ , IFN- γ -R1, IFN- γ -R2）およびTh2サイトカイン/サイトカイン-R（IL-4, IL-4-R, CCR4）の遺伝子発現に対するIFあるいは β -CGの影響をまとめた。興味深いのは、IFはTh1およびTh2双方のサイトカイン/サイトカイン-Rの遺伝子発現をdown-regulationする事から、主要免疫組織での免疫応答ポテンシャルを低下する可能性が伺われる。一方、 β -CGには上記のTh1/Th2関連遺伝子の発現抑制作用は見られなかった。

腸管免疫系でのTh1/Thサイトカインおよびサイトカインレセプター遺伝子発現への影響

小腸・大腸の腸管には感染性微生物や異物に対する生体防御として独自の腸管免疫系が存在することが知られ、機能性食品あるいは漢方などの作用点として腸管免疫系への影響が注目されている。そこで、閉経サルモデルの小腸（空腸、回腸）および大腸（結腸）の免疫応答に対するIFあるいは β -CGの影響を、Th1/Th2サイトカイン/サイトカイン-R遺伝子の発現変動を指標に検討した。

Table 2に小腸（空腸、回腸）および大腸（結腸）でのTh1/Th2サイトカイン/サイトカイン-R遺伝子の発現特性を示したが、小腸・大腸のTh1/Th2系は上記の主要免疫組織とは異なり、Th1ではIL-12/IL-18, Th2ではIL-4/CCR4の遺伝子発現は検出限界以下であった。IFおよび β -CGとも揃って、空腸でのIL-4R, 回腸および結腸でのIFN- γ R1の遺伝子発現陽性作用が認められ、腸管の部位毎にIFあるいは β -CGのTh1/Th2系への作用・影響が異なる事が示唆された。

腸内細菌叢への影響

腸内（主に大腸・結腸部）には約300種類の腸内細菌が生息していて、糞便乾燥重量の1/3を占める。こうした腸内細菌のうち、いわゆる有用菌は不消化性植物繊維を分解し有機酸など有用代謝物の産生を介して、便通、腸管上皮細胞の増殖および腸管免疫など腸管機能の維持・充進に関わっている。一方、有害菌はニトロソアミンや硫化水素など有害物質を産生することで腸管機能を低下させ、腸管機能障害や大腸がんなどのリスク要因として考えられている。

本研究では腸内細菌のリボソームRNAをコードす

Table 1. Effect of IF or β -CG on gene expression of cytokine/cytokine receptors in mesenteric lymph node, spleen and thymus

		Ctr.	IF	β -CG
Mesenteric Lymph Node	IL4	100	23	177
	IL4R	100	62	99
	CCR4	100	279	325
	IL12	100	25	45
	IL18	100	326	744
	IFN- γ	100	76	136
	IFN- γ R1	100	83	156
	IFN- γ R2	100	89	161
Spleen	IL4	100	75	148
	IL4R	100	39	130
	CCR4	100	41	125
	IL12	100	36	83
	IL18	100	58	134
	IFN- γ	100	74	186
	IFN- γ R1	100	71	114
	IFN- γ R2	100	107	125
Thymus	IL4	100	36	98
	IL4R	100	47	92
	CCR4	100	47	72
	IL12	100	19	59
	IL18	100	73	180
	IFN- γ	100	51	110
	IFN- γ R1	100	61	127
	IFN- γ R2	100	89	200

Table 2. Effect of IF or β -CG on gene expression of cytokine/cytokine receptors in jejunum, ileum and colon

		Ctr.	IF	β -CG
Jejunum	IL4R	100.0	24.8	19.7
	IFN- γ	100.0	110.6	33.6
	IFN- γ R1	100.0	71.6	115.2
	IFN- γ R2	100.0	80.0	133.1
Ileum	IL4R	100.0	168.6	153.3
	IFN- γ	100.0	131.1	349.2
	IFN- γ R1	100.0	30.1	35.0
	IFN- γ R2	100.0	81.3	94.7
Colon	IL4R	100.0	168.6	153.3
	IFN- γ	100.0	131.1	349.2
	IFN- γ R1	100.0	30.1	35.0
	IFN- γ R2	100.0	81.3	94.7

るバクテリアゲノムに着目して、ターゲットの腸内細菌をDNAレベルで識別・定量出来るReal Time PCR法を駆使して、IFおよび β -CGの腸内細菌フローラへの影響を解析した。

Table 3に示す結果の様に、有用菌のCbu (Closidrium butyrate), Fpr (Enterococcus) および

Lacto (Lactobacillus) がIFおよび β -CG投与の双方で2～5倍増大し、日和見菌のEco (Enterobacteria) ではIFおよび β -CG投与の両群で菌数が1/50～1/100に著減した。一方、有害菌のCcl (C. clostridiiforme), Dsv (Desulfovibrio) およびVeillo (Veillonella) については、IFあるいは β -CG投与のいずれも菌数の増減に影響を及ぼさなかった。有用菌と有害菌のバランスを考えると、今回の試験ではIFおよび β -CGいずれも有用菌の増大を促進し、腸内環境の改善作用が認められた。

脳・神経系の機能因子の遺伝子発現への影響

Fig. 4にカニクイザルの脳とその主要部位（前頭葉、嗅球、視床下部、海馬、小脳、延髄）を示したが、今回は海馬、視床下部、前頭葉および小脳における神経成長因子・ニューロトロフィン（BDNF, NGF, NT-3, NT-4/5）とそのレセプター（TrkA, TrkB, TrkC, P75）、アポトーシス／アルツハイマー病関連因子（Bax, BclxL, p53, Saladian-1）、ステロイドホルモンレセプター・核内レセプター（ER α , ER β , PR）ならびにHypoxia／血管新生関連因子（TF, VEGF）について、IFおよび β -CGの影響をこれら機能遺伝子の発現変動の解析を通じて評価した。

①海馬：海馬は中枢神経系の働きに目的性を与え、情報・記憶のストックや出し入れを統御しており、閉経後にこうした海馬の役割が低下すると認知症などのリスクが高まると考えられている。

Table 4に海馬における神経機能遺伝子の発現性に対する β -CGあるいはIFの影響を示したが、IF投与群あるいは β -CG投与群においてNT-4/5（ニューロトロフィン）、Bax, BclxL（アポトーシス）等の発現性に変化が見られた。

Table 3. Effect of IF or β -CG on intestinal bacteria flora

		Ctr.	IF	β -CG
Beneficial Bacteria	Cbu	100	340	467
	Fpr	100	182	295
	Lacto	100	243	222
Opportunistic Bacteria	Eco	100	2	1
	Ral	100	60	558
Harmful Bacteria	Ccl	100	97	227
	Dsv	100	135	138
	Veillo	100	66	138

Table 4. Effect of IF or β -CG on gene expression of functional factors in hippocampus

	Ctr.	IF	β -CG
NGF	100	59	136
NT4/5	100	32	16
NT-3	100	114	48
BDNF	100	124	48
P75	100	84	143
TrkB	100	227	224
TrkC	100	55	257
Bax	100	95	208
BclxL	100	457	303
P53	100	101	127
Seladia-1	100	156	87
ER α	100	105	75
ER β	100	212	107
PR	100	171	95
TF	100	58	97
VEGF	100	151	186

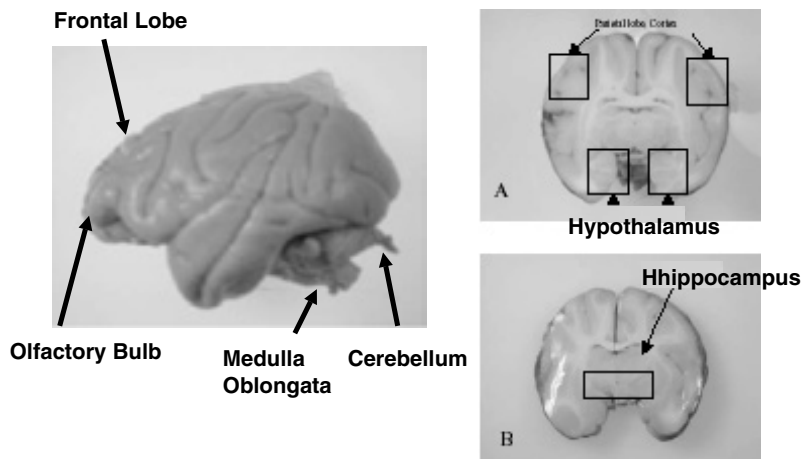


Fig. 4. Brain and its main region of cynomolgus macaque.

②**視床下部**：視床下部は自律神経機能や内分泌機能の制御を通じて生命活動（血液循環系，代謝系，生殖，日内リズムなど）の維持と調節に関わり，加齢に伴いこうした機能低下や障害が生じる。

Table 5に示すように， β -CGあるいはIFによる視床下部の神経機能遺伝子の発現性に対し， β -CGとIFのいずれも，神経成長因子レセプターのp75およびアルツハイマー病関連遺伝子のSaladia-1に対する強い発現抑制作用を示した。また，両者ともアポトーシス関連遺伝子のBax, BclxL, p53の発現抑制作用も示した。また，IF投与群では，Hypoxia／血管新生に関与する

Table 5. Effect of IF or β -CG on gene expression of functional factors in hypothalamus

	Ctr.	IF	β -CG
NGF	100	30	695
NT-3	100	66	162
NT4/5	100	59	61
BDNF	100	93	84
TrkB	100	103	118
TrkC	100	90	106
P75	100	32	29
Bax	100	43	68
BclxL	100	50	61
P53	100	47	53
Seladia-1	100	21	45
ER α	100	127	122
ER β	100	91	116
PR	100	122	158
TF	100	43	60
VEGF	100	64	100

Table 6. Effect of IF or β -CG on gene expression of functional factors in frontal lobe

	Ctr.	IF	β -CG
NGF	100	95	42
NT-3	100	84	130
NT4/5	100	33	73
BDNF	100	109	79
TrkB	100	129	106
TrkC	100	151	104
Bax	100	57	38
BclxL	100	148	100
P53	100	176	62
Seladia-1	100	301	139
ER α	100	105	112
ER β	100	131	131
PR	100	202	66
TF	100	166	107
VEGF	100	153	108

TFおよびVEGF遺伝子に対する軽い発現抑制効果も見られた。

③**大脳皮質・前頭葉**：前頭葉は認知した外界からの情報・刺激に対して，記憶されている経験・情報を基に海馬に連動して行動・応答の最適化を担う中枢神経系で，ほ乳類の中で霊長類が特に発達している。閉経性あるいは加齢性の認知・行動障害はこうした前頭葉の機能低下が要因と考えられている。

Table 6に示すように，IF投与群でのNT-4/5遺伝子の発現抑制およびアルツハイマー病関連遺伝子のSaladia-1の発現亢進が見られた。

④**小脳**：小脳は運動活動の統御や筋の弛緩・緊張などの調節および反射複合運動の適性化などの役割を担うことが知られているが，他の未知な役割も潜んでいるらしい。

Table 7の結果に示す様に，小脳ではIF投与群のみに神経成長因子・ニューロトロフィンのNT-3およびNT-4/5の遺伝子発現に対する顕著な発現抑制が見られた。

アレルギー抗原性の検討

機能性食品について医薬品と大きく異なる点は副作用・毒性など安全性に関する評価クレームの重要性であろう。ことに，大豆たん白質のアレルギー抗原性が問題になっている。なお，アレルギーは抗原特異的なIgEと肥満細胞が主要因になる即時型炎症反応（Ⅰ型アレルギー），抗原特異的IgGと浸潤好中球が関わるアルサス炎症反応（Ⅲ型アレルギー），およびT-リンパ球と浸潤マクロファージによって引き起こされる遅延型炎症反応（Ⅳ型アレルギー）が知られている⁸⁾。食

Table 7. Effect of IF or β -CG on gene expression of functional factors in cerebellum

	Ctr.	IF	β -CG
NGF	100	78.8	116.4
BDNF	100	86.6	107.1
NT-3	100	29.4	138.8
NT4/5	100	0	76.6
P75	100	51.4	69.1
TrkB	100	100	84.6
TrkC	100	64.6	108.5
Bax	100	73.1	138
BclxL	100	101.5	95.7
P53	100	90.7	86.5
Seladia-1	100	92.9	108.3
ER α	100	104.5	102.1
ER β	100	93.7	173.8
PR	100	73.1	106.9
TF	100	69.2	114.2
VEGF	100	86.7	96.8

物アレルギーの殆どは食物中の抗原物質に対する特異的IgE抗体が産生されI型アレルギーを引き起こす。そのため、アレルギー抗原性は特異的IgE抗体の産生をモニターすることでアセスメント出来る。我々は従来から、サルモデルでのアレルギー研究を展開しているのでその経験を活かし、 β -CGあるいはIFを長期投

与したサルの血中特異的IgEレベルを測定した。

結果をFig. 5に示したが、 β -CG投与群あるいはIF投与群のいずれも投与40週（10ヵ月）後において、 β -CGあるいはIFに対する特異的IgEレベルの抗体価上昇は全く認められず、 β -CGおよびIF共に本試験の投与量ではアレルギー抗原性はないことが示された。

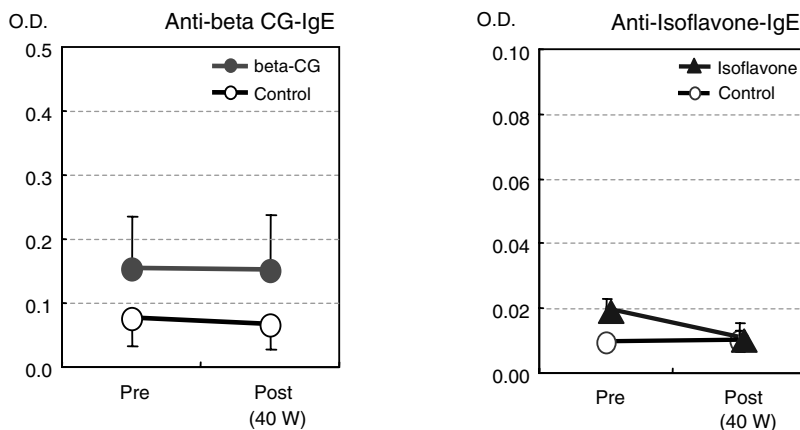


Fig. 5. Effect of β -CG or IF on production of antigen-specific IgE.

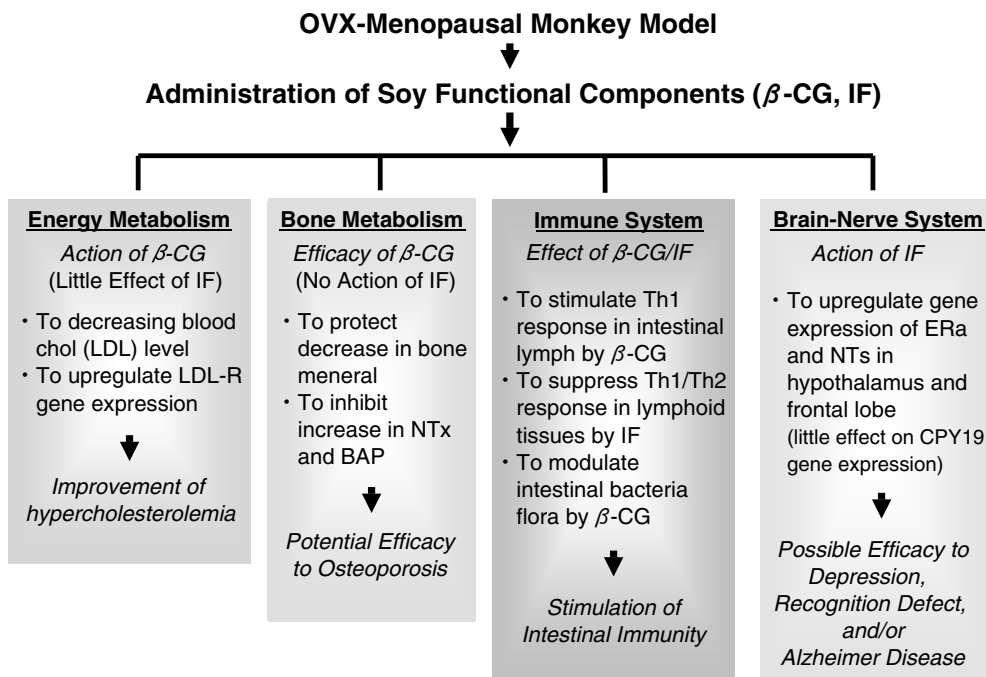


Fig. 6. Efficacy and molecular mechanism of β -CG and/or IF to menopause-associated disorders in monkey model.

要 約

霊長類の種々バイオメディカル特性がヒトのそれらと共通することから、サルモデルを活用した機能性食品の効果・作用あるいは安全性の分子基盤に関する前臨床研究が求められていた。Fig. 6に示す様に本特定研究では、閉経性機能障害サルモデルを作出し、コレステロール・脂質代謝、骨代謝、免疫応答能、腸内細菌フローラおよび脳神経機能に対する、大豆主成分の大豆たん白質 (β -Conglycinin, β -CG) および大豆イソフラボン (Soyaflavone HG, IF) の障害予防・改善作用について遺伝子・ゲノムレベルで解析した。閉経サルモデルを利用した本研究を通じて β -CG による骨密度低下抑制 (骨粗鬆症改善) 作用が初めて明らかにされ、 β -CG およびそのペプチド成分を利用した骨粗鬆症用の新たな機能性食品・サプリメントの誕生に繋がる。さらに免疫応答に関しては、IF が脾臓および胸腺での Th1/Th2 応答関連遺伝子群の発現抑制を示すことから、IF が細胞性・液性免疫応答を制御する可能性が窺える。また、腸内細菌では IF 投与群に日和見菌群の菌数著減が見られ、IF が腸内細菌フローラや腸内環境に強く影響することが示唆された。さらに脳神経機能への影響では興味深い知見が得られた。閉経後に機能低下が予測されている海馬、視床下部、大脳皮質 (前頭葉) において、神経成長因子/レセプター系あるいはアポトーシス系の機能遺伝子の発現調節作用・効果が、IF および β -CG に認められた。また、運動機能に関わる小脳において、IF が神経成長因子の NT-3 および NT-4/5 遺伝子の発現を強く抑制することから、IF が閉経後の小脳機能をモデュレートする可能性が考えられる。

文 献

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) 中村 伸, 光永総子, A-Ram Joeng, 山内英典, 林隆志, Joseph Gebriel (2005): 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効果: サルモデルでのゲノム医生物学的研究 (II)。大豆たん白質研究, **8**, 1-7.
- 4) Huntley AL and Ernst E (2004): Soy for the treatment of perimenopausal symptoms-a systematic review. *Maturitas*, **20**, 1-9.
- 5) 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.
- 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) 中村 伸 (2003): サルのアレルギーモデル。アレルギー日, **16**, 281-287.