

大豆イソフラボンの抗酸化作用と植物エストロゲン作用による 抗肥満効果の検討

青木直人*・荒川恵梨菜・伊藤美幸

三重大学大学院生物資源学研究科

Studies on Anti-Obesity Effects of Soy Isoflavones with Anti-Oxidant and Phytoestrogenic Activity

Naohito AOKI, Erina ARAKAWA and Miyuki ITO

Department of Life Science, Graduate School of Bioresources, Mie University Tsu 514-8507

ABSTRACT

C57BL/6J mice (male, 4wk old) were fed low fat diet (LF), high fat diet (HF), or HF supplemented with 1.0% soy isoflavone mixture (HF+Iso) for 10 wks. As expected, final body weight and adipose tissue weight were increased in HF group over LF one, but no significant difference was observed between HF and HF+Iso groups. Plasma triglyceride and TBARS were decreased in HF+Iso group as compared to HF one, whereas plasma cholesterol and glucose were indistinguishable. Gene expression and plasma level of adiponectin decreased by HF was upregulated by soy isoflavone, while no obvious effect of soy isoflavone upon resistin and leptin expression was observed. Further, expressions of macrophage markers CD68 and F4/80, and NADPH oxidase in adipose tissue induced by high fat diet were significantly reduced by soy isoflavone. Glycosylated soy isoflavones (genistin, glycitin, daizin) reduced ROS production in 3T3-L1 adipocyte and potentiated adiponectin secretion into cell culture medium. Unexpectedly, resistin secretion of 3T3-L1 adipocytes were also increased by glycosylated soy isoflavones. Thus, it is suggested that soy isoflavone modulates physiological functions of adipocyte/adipose tissue through its anti-oxidant activity. *Soy Protein Research, Japan* **9**, 96-101, 2006.

Key words : soy isoflavone, adipocyte, 3T3-L1, ROS, obesity

大豆イソフラボンは抗酸化作用と植物エストロゲン作用を併せ持つことが広く知られており、その作用に根ざした様々な応用が模索されてきている。過食に伴

う肥満は、脂肪組織におけるマクロファージの浸潤・活性化に起因する炎症と活性酸素種（ROS, reactive oxygen species）の増加を伴うこと¹⁻³⁾、また脂肪組織（細胞）ではエストロゲン受容体を介して脂肪取り込み作用が阻害されることから⁴⁾、食事として摂取する

*〒514-8507 津市栗真町屋町1577

大豆イソフラボンが抗酸化作用と植物エストロゲン作用を通じて抗肥満作用を示すことは十分期待される。そこで本研究課題では、脂肪組織へのマクロファージの浸潤・活性化、血液中のROSおよびアディポサイトカイン量を指標として、大豆イソフラボンの抗肥満作用を調べることを目的とする。

実験方法

実験動物および飼育

4週齢の近交系C57BL/6J雄性マウスを用いた。市販非精製飼料(CE-2, 日本クレア)で1週間予備飼育後、体重が揃うように低脂肪食群(5%コーンオイル:LF群)、高脂肪食群(5%コーンオイル, 30%ラード:HF群)および高脂肪食に大豆イソフラボン混合物を加えた群(0.5%ソヤフラボン:HF+Iso群)に分け、10週間飼育した。その間、体重、摂食量を2~3日ごとに計測した。飼育後、採血し、脂肪組織(皮下、副睾丸周囲、腎周囲、腹膜後)を摘出し、秤量後直ちに液体窒素中で凍結させ、-80℃で保存した。血液は固体毎に遠心分離し、得られた血清を各種パラメータの測定まで-80℃で保存した。

血液パラメータの測定

血液中の中性脂肪値、遊離脂肪酸値、総コレステロール値、血糖値はそれぞれトリグリセライドE-テスト^㉔、NEFA C-テスト^㉔、コレステロールE-テスト^㉔、グルコースCII-テスト^㉔(いずれも和光純薬工業)を用いて測定した。レプチン、アディポネクチン濃度はELISAキット(いずれも大塚製薬)あるいは特異抗体を用いたウエスタンブロット法により測定した。血液中の酸化状態はTBARS法により定量した。

遺伝子発現の定量

遺伝子発現の定量はLine GeneおよびSYBR Green Realtime PCR Master Mix(いずれも東洋紡)を用いた定量的リアルタイムPCR法により行った。脂肪組織および培養脂肪細胞からのRNA抽出はTrizol(インビトロジェン)、cDNAの合成はSuper Script III(インビトロジェン)を用いてそれぞれ行った。

3T3-L1細胞の培養とROS産生測定

3T3-L1細胞はDMEM培地に10%ウシ胎児血清(FCS)を添加して培養し、分化誘導カクテル(Dexamethasone, IBMX, インスリン)により脂肪細胞へと分化させた⁵⁾。分化誘導後10日前後の十分に分化した脂肪細胞を用いて実験を行った。分化誘導した3T3-L1脂肪細胞(12-well plate)に、各種大豆イソフラボン成分を終濃度100 μMになるように加え1時間培養した。ポジティ

ブコントロールとしてN-acetyl cysteine (NAC)を終濃度10 mMになるように加えた。培地を除去して0.2%NBT/PBSを0.5 mL加え、再度各種大豆イソフラボン成分あるいはNACを同様の濃度で加えて90分間培養を続けた。培地を除去し、酢酸溶液を0.5 mL加えて10分間振とうし、マイクロプレートリーダーで吸光度(550 nm)を測定した³⁾。

結果と考察

食餌誘発性肥満モデルマウスとして汎用されているC57BL/6Jマウスに対し10週間による高脂肪食摂取をさせたところ、これまでの報告通りHF群ではLF群に比べ飼育後の体重は有意に増加した。しかしながらHF+Iso群の終体重はHF群と有意差は認められず、イソフラボン添加による顕著な体重軽減効果は認められなかった(Fig. 1)。また脂肪組織重量は同じくHF群で有意に増加したが、HF+Iso群との間に有意差はなく、体重同様大豆イソフラボンの軽減効果は認められなかった(Fig. 2)。

血液中のトリグリセライド濃度はHF群、LF群で有意な差は認められなかったが、イソフラボン添加により有意な減少効果が認められた(Fig. 3)。コレステロール、グルコース、遊離脂肪酸に対する大豆イソフラボンの軽減効果は認められなかった。一方、血液中のTBARS濃度はHF群で有意に上昇したが、大豆イソフラボンの添加により有意な軽減効果が認められたことから(Fig. 3)、全身性の酸化状態に対しては、大豆イ

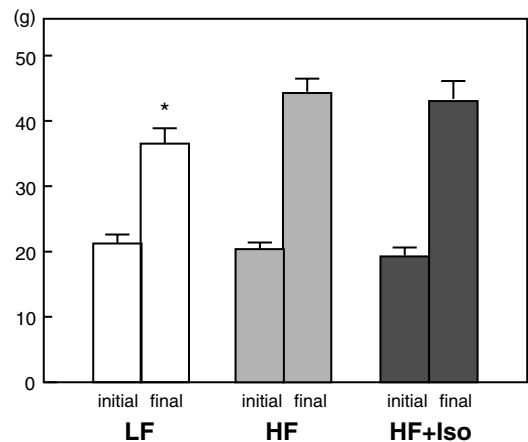


Fig. 1. Effect of soy isoflavone on the high-fat diet induced body weight gain of C57BL/6 mice. Results are expressed as means + SEM (n=5). *P<0.05 vs high-fat group (HF).

ソフラボンは一定の効果を示すと考えられる。

血液中のアディポネクチン濃度はHF群で有意に低下したが、大豆イソフラボンの添加により増加し、LF群を上回った (Fig. 4)。一方、HF群でのレプチン濃度の上昇に対する軽減効果は認められなかった。これを支持するように副精巣周囲脂肪組織におけるアデ

イボネクチン、レプチンの遺伝子発現もほぼ同様な挙動を示した (Fig. 4)。またマウスにおいては悪玉アディポサイトカインとして知られるレジスチンはHF群でむしろ低下し、大豆イソフラボンの添加効果は認められなかった。これらの結果は、大豆イソフラボンが脂肪細胞に対して一定の機能改変効果を持つことを示唆している。

ROS産生はNADPHオキシダーゼによると考えられるが、HF群でのNADPHオキシダーゼサブユニットの一つp47phoxの発現がHF群に比べ有意に上昇した (Fig. 5)。HF+Iso群ではその上昇が有意に抑えられ大豆イソフラボンの軽減効果が認められた。一方、逆の作用をする抗酸化酵素グルタチオンペルオキシダーゼ (GPx) の遺伝子発現は各群間で有意な変動は認められなかった (Fig. 5)。高脂肪食摂取により脂肪組織へのマクロファージの浸潤が亢進することが報告されている^{1,2)}。今回の実験条件下でもHF群の副精巣脂肪組織において、末梢マクロファージの存在を示すCD68やF4/80の発現上昇が認められた (Fig. 5)。いずれの発現も大豆イソフラボン添加により減少することから、大豆イソフラボンはマクロファージの脂肪組織への浸潤抑制効果を持つことが強く示唆される。

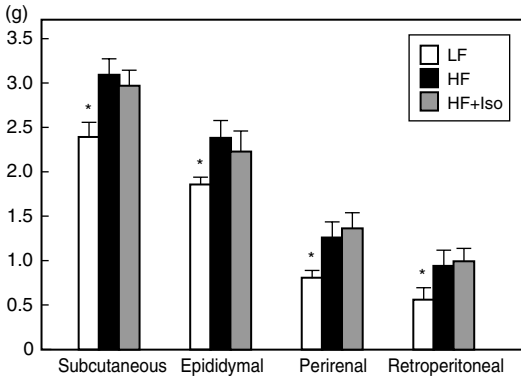


Fig. 2. Effect of soy isoflavone on the high-fat diet induced adipose tissue weight gain of C57BL/6 mice. Results are expressed as means + SEM (n=5). * $P < 0.01$ vs high-fat group (HF).

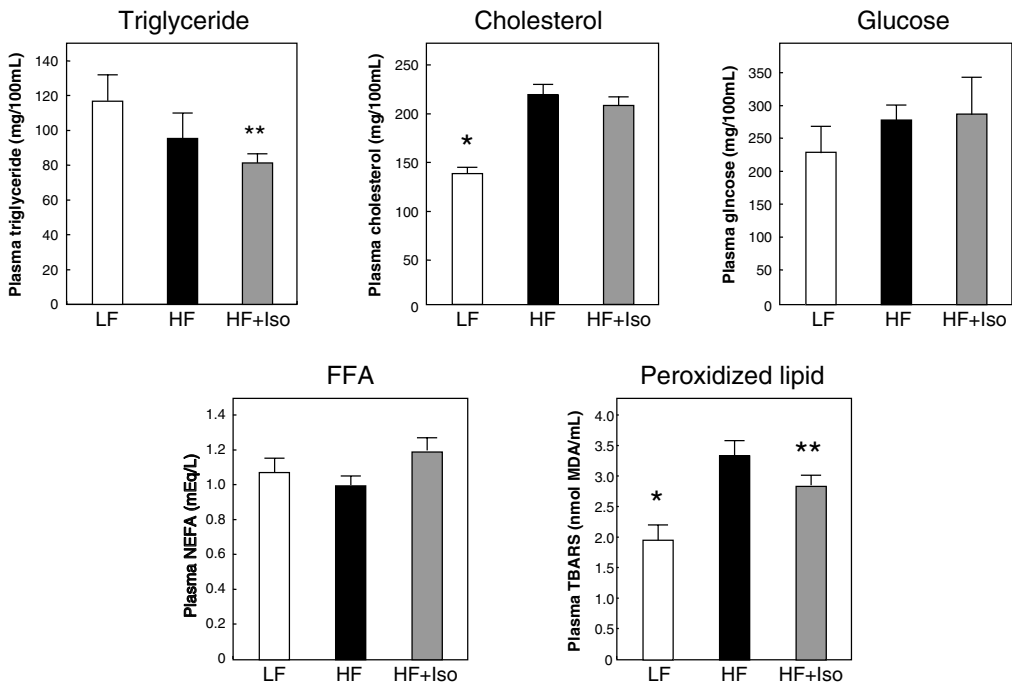


Fig. 3. Effect of soy isoflavone on plasma parameters of C57BL/6 mice. Each parameter was determined as described under materials and methods. Results are expressed as means + SEM (n=5). * $P < 0.01$, ** $P < 0.05$ vs high-fat group (HF).

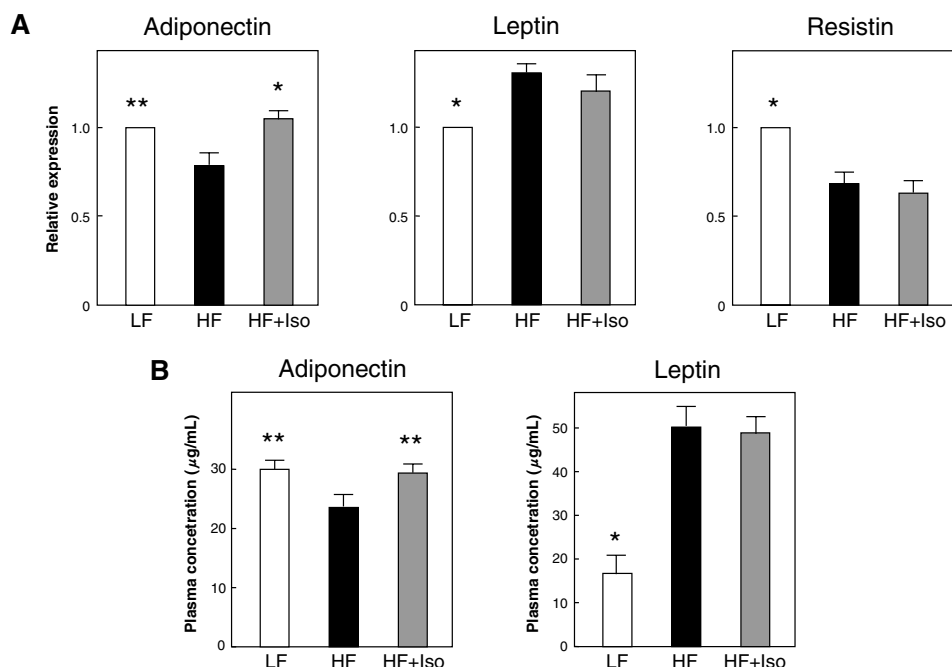


Fig. 4. Effect of soy isoflavone on gene expression in epididymal adipose tissue (A) and plasma concentration (B) of adipocytokines. Gene expression and plasma level of each adipocytokine were determined by real-time PCR and ELISA, respectively, as described under materials and methods. Results are expressed as means + SEM (n=5). * $P < 0.01$, ** $P < 0.05$ vs high-fat group (HF).

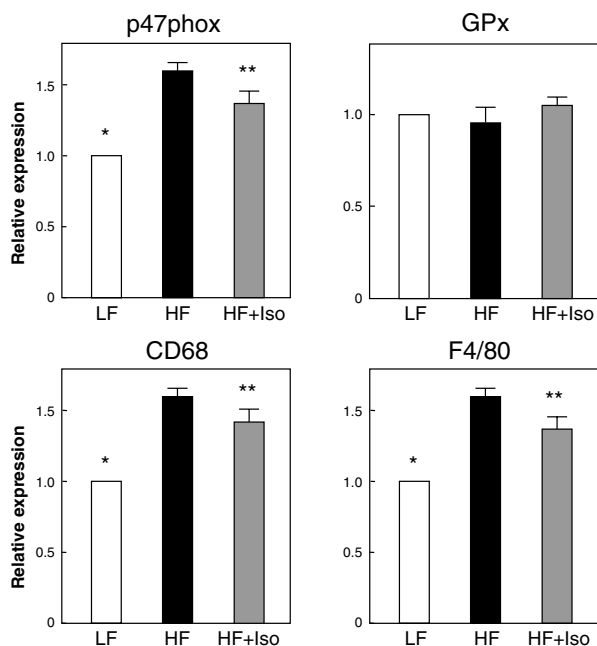


Fig. 5. Effect of soy isoflavone on gene expression of oxidation and anti-oxidation enzymes and macrophage markers in epididymal adipose tissue of C57BL/6 mice. Gene expression of p47phox and GPx was determined by real-time PCR as described under materials and methods. Results are expressed as means + SEM (n=5). * $P < 0.01$, ** $P < 0.05$ vs high-fat group (HF).

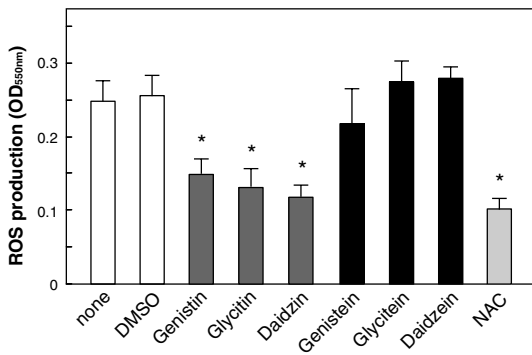


Fig. 6. Effect of soy isoflavone on ROS production in 3T3-L1 adipocytes. ROS production was determined by NBT reduction assay as described under materials and methods. Results are expressed as means + SEM of three independent determinations. * $P < 0.01$ vs none.

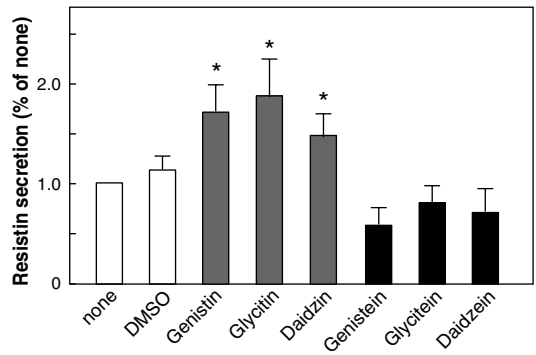


Fig. 8. Effect of soy isoflavone on resistin secretion by 3T3-L1 adipocytes. Resistin secretion was determined by Western blotting as described under materials and methods. Results are expressed as means + SEM of three independent determinations. * $P < 0.05$ vs none.

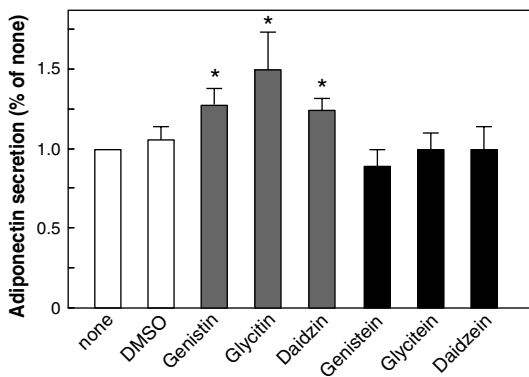


Fig. 7. Effect of soy isoflavone on adiponectin secretion by 3T3-L1 adipocytes. Adiponectin secretion was determined by Western blotting as described under Materials and methods. Results are expressed as means + SEM of three independent determinations. * $P < 0.05$ vs none.

前記のマウスを用いた *in vivo* 実験により、大豆イソフラボンは脂肪細胞に作用することが強く示唆された。さらに明確に調べるために、脂肪細胞のモデルとして汎用されている3T3-L1脂肪細胞に対する大豆イソフラボンの添加効果を調べた。

脂肪細胞は細胞内に蓄積した中性脂肪量に比例してROSの産生が高まることが報告されている³⁾。大豆イ

ソフラボンが直接脂肪細胞に作用するとすればROS産生にも効果を示すことが考えられる。十分に分化した脂肪細胞はROSを産生することが確認されたが、配糖体 (genistin, glycitin, daidzin) は有意にROSの産生を低下させた (Fig. 6)。一方、アグリコン (genistein, glycitein, daidzein) にはそのような効果は認められなかった。ROS産生の軽減は脂肪細胞の機能改善につながることを期待されるので、培地中に放出されるアディポネクチン量を調べたところ、ROSの軽減作用と呼応するようにgenistin, glycitin, daidzinには有意な分泌亢進が認められた (Fig. 7)。予想に反し、代表的な悪玉アディポサイトカインの一つとされるレジスチンの分泌もgenistin, glycitin, daidzinの添加により亢進された (Fig. 8)。

以上のように、大豆イソフラボンを混合物として実験動物に与えた場合、明確な体重、脂肪組織重量軽減作用は示さなかった。大豆イソフラボンのうちgenisteinが、卵巣摘出を施した雌マウスの体重軽減を引き起こすと報告されているが⁶⁾、今回のように雄マウスに対して顕著な効果は示さなかった。しかしながら、大豆イソフラボンは善玉アディポサイトカインとして知られるアディポネクチンの血中濃度を上昇させたこと、血液中のTBARS量を軽減させたこと、配糖体が培養下の脂肪細胞におけるROS産生を軽減させたことから、大豆イソフラボンはその抗酸化活性を通して脂肪細胞の機能改善効果を示したと考えられる。

要 約

食餌誘発性肥満モデルとして汎用されるC57BL/6Jマウスに高脂肪食（50%ラード含有食）を自由摂取させ、何も加えない群（HF群）と大豆イソフラボン（ソヤフラボンHG、総イソフラボン含量55.6%）を加えた群（HF+Iso群）を設定し、10週間にわたり飼育した。この間の体重増加、飼育後の体重にはHF群とHF+Iso群とで有意な差は認められなかったが、皮下および副精巣周囲脂肪組織重量はイソフラボン添加群で若干減少した。飼育後の血漿中性脂肪値、TBARS値（過酸化脂質値）はHF+Iso群で減少したが、コレステロール値、血糖（グルコース）値は両群で差は認められなかった。またマクロファージマーカー（CD68, F4/80）やNADPH oxidase酵素の発現は、HF群に比してHF+Iso群で減少した。アディポネクチンの発現はHF群で減少したが、イソフラボンの添加により改善した。一方、レジスチン、レプチンの発現、分泌に対するイソフラボンの効果は認められなかった。また培養脂肪細胞（3T3-L1細胞）では分化程度、すなわち脂肪蓄積程度に応じて細胞内で産生される活性酸素種（ROS）が増加するが、主に大豆イソフラボン配糖体（genistin, glycitin, daizin）にROS産生抑制効果が認められた。またアディポネクチンの分泌も配糖体により増加することが明らかとなった。一方レジスチンの分泌は予想に反して配糖体により増加し、アグリコン（genistein, glycitein, daizein）により減少した。以上の結果より、大豆イソフラボン成分は、顕著な抗肥満効果は示さないものの、脂肪細胞・組織の機能改変作用を有することが示唆された。

文 献

- 1) Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL and Ferrante AW Jr (2003): Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest*, **112**, 1796-1808.
- 2) Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, Sole J, Nichols A, Ross JS, Tartaglia LA and Chen H (2003): Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest*, **112**, 1821-1830.
- 3) Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, Nakayama O, Makishima M, Matsuda M and Shimomura I (2004): Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest*, **114**, 1752-1761.
- 4) Hamosh M and Hamosh P (1975): The effect of estrogen on the lipoprotein lipase activity of rat adipose tissue. *J Clin Invest*, **55**, 1132-1135.
- 5) Takahashi N, Kawada T, Yamamoto T, Goto T, Taimatsu A, Aoki N, Kawasaki H, Taira K, Yokoyama KK, Kamei Y and Fushiki T (2002): Overexpression and ribozyme-mediated targeting of transcriptional coactivators CREB-binding protein and p300 revealed their indispensable roles in adipocyte differentiation through the regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Biol Chem*, **277**, 16906-16912.
- 6) Naaz A, Yellayi S, Zakroczymski MA, Bunick D, Doerge DR, Lubahn DB, Helferich WG and Cooke PS (2003): The soy isoflavone genistein decreases adipose deposition in mice. *Endocrinology*, **144**, 3315-3320.