

大豆イソフラボンによる炎症，アディポサイトカインを標的とする メタボリックシンドロームの予防に関する基盤研究

津田孝範*

中部大学応用生物学部

Prevention of Metabolic Syndrome by Soy Isoflavone

Takanori TSUDA

College of Bioscience and biotechnology, Chubu University, Kasugai 487-8501

ABSTRACT

Adipocyte dysfunction is strongly associated with the development of obesity and insulin resistance. It is accepted that the regulation of adipocytokine expression is one of the most important targets for the prevention of obesity and amelioration of insulin sensitivity. In this study, we demonstrated that soy isoflavone has the potency of a unique pharmacological function in 3T3-L1 adipocytes. The pre-treatment of isoflavone significantly blocked downregulation of adiponectin expression by $\text{TNF-}\alpha$ in 3T3-L1 adipocytes. Interestingly, isoflavone did not activate $\text{PPAR}\gamma$ transcriptional activity. Genistein significantly inhibited $\text{TNF-}\alpha$ induced MAPK signaling (SAPK/JNK) which is involved with adiponectin expression. These data indicate that isoflavone blocks downregulation of adiponectin expression through inhibition of SAPK/JNK pathway. *Soy Protein Research, Japan* **10**, 88-92, 2007.

Key words : isoflavone, adipocyte, adiponectin, diabetes

平成16年国民健康・栄養調査によれば、30歳～60歳代の男性、60歳代の女性の約3割は肥満と報告されている。肥満は、これを基盤として糖尿病、高脂血症、高血圧に関連し、最終的には動脈硬化症を引き起こす。このことは、メタボリックシンドローム（内臓脂肪症候群）として呼称されている。2005年4月には、わが国における診断基準が提唱されるにいたっている。前述の調査では、40歳～74歳のメタボリックシンドローム

の有病者数と予備群者数は、併せて約1,960万人と報告されている。従ってその対策は急務である。

近年の成果から脂肪細胞は、単なる脂肪の貯蔵場所ではなく、種々のアディポサイトカイン（脂肪細胞より分泌される生理活性物質を指す）を分泌する最大の内分泌細胞であることが明らかになっている。最近の研究より肥満と炎症の関係が注目されている。肥満＝脂肪組織の慢性炎症状態がアディポサイトカインの異常をきたし、メタボリックシンドロームに関与する^{1,2)}。従って炎症とこれに伴うアディポサイトカインの発

*〒487-8501 春日井市松本町1200

現・分泌異常を改善することが重要である。

アディポサイトカインの中でアディポネクチンは、脂肪細胞特異的に発現しており、肥満や糖尿病で低下し、エネルギー消費促進やインスリン抵抗性の改善作用に関わる重要なアディポサイトカインの一つである。このような背景から本研究では、培養脂肪細胞における炎症モデルを構築し、これを利用して大豆イソフラボンのアディポネクチン発現低下の抑制効果を検討した。

方 法

マウス由来脂肪細胞株3T3-L1を定法に従い、培養・分化誘導を行って成熟脂肪細胞を得た。分化誘導後7日目の成熟脂肪細胞へ各種大豆イソフラボン (Genistein, Daidzein, Glycitein, Equol, Genistin, Daidzin, Glycitin) を最終濃度として25 μ Mあるいは50 μ Mになるように投与し、1時間後TNF- α を投与 (最終濃度10 ng/mL) した。15時間後にキアゾール (キアゲン) を用いて総RNAを回収し、Takara RNA PCR kit (タカラバイオ) を用いてcDNAを作成した。遺伝子発現量の測定はアプライドバイオシステム社製のTaqman Gene Expression Assayを用いたリアルタイムPCR法により行った。培養上清中のアディポネクチン分泌量は市販ELISAキット (大塚製薬) を用いた。

MAPキナーゼたん白質の検出はMAPキナーゼおよびそのリン酸化たん白質に対する特異的抗体を用いたウェスタンブロット法により行った。

結果と考察

TNF- α によるアディポネクチンの発現低下に対する大豆イソフラボンの抑制作用

大豆イソフラボンおよび代謝物のひとつであるエクオールをあらかじめ投与した成熟脂肪細胞にTNF- α を投与した時のアディポネクチンの遺伝子発現量について検討した結果をFig. 1に示した。TNF- α 処理によりアディポネクチンの発現量は低下した。しかしながらGenistein, Daidzein, Glycitein, Equolの前処理はいずれの場合もその低下を有意に抑制した。

同様にイソフラボン配糖体 (Genistin, Daidzin, Glycitin) で前処理した時のアディポネクチンの遺伝子発現量について検討した結果をFig. 2に示した。配糖体においてもその前処理はTNF- α 投与によるアディポネクチンの遺伝子発現量の低下を有意に抑制するが、その効果はアグリコンよりも弱くなる傾向が認められた。イソフラボンの投与によるアディポネクチンの遺伝子発現と細胞外分泌

アディポネクチンの遺伝子発現調節については、リガンド応答性の核内受容体型転写因子であるPeroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ の支配下遺伝子であることが明らかにされており、糖尿病治療薬であるチアゾリジン誘導体はPPAR γ のアゴニストとして作用し、アディポネクチンの産生、分泌が上昇することが報告されている³⁾。またこのアディポネクチンの発現制御は、Liver receptor homolog-1 (LRH-1) がこの転写を増強することも報告されてい

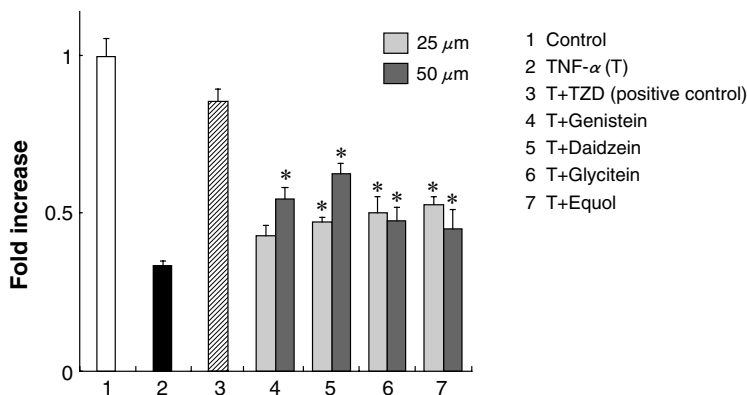


Fig. 1. Inhibitory effect of various isoflavone (aglycon) on TNF- α mediated downregulation of adiponectin expression in 3T3-L1 adipocytes. The gene expression level was expressed relative to the control (=1.0) after normalization using the β -actin gene expression level. Values are means $\pm$ SEM, n=3-6. *Significantly different at $p < 0.05$ compared to TNF- α (T) group.

る⁴⁾。これまでの研究報告から大豆イソフラボンは PPAR γ の転写活性を促進することが報告されている^{5,6)}。そこで、大豆イソフラボンによるアディポネクチンの発現低下抑制作用が PPAR γ の転写活性の促進によるものかどうかを検討するため、大豆イソフラボンのみを成熟脂肪細胞へ投与したときのアディポネクチンの遺伝子発現、細胞外への分泌に対する影響を検討した。その結果、イソフラボンの投与 (Genistein, Daidzein, Glycitein) は、いずれの場合もアディポネクチンの遺伝子発現量の有意な上昇が認められなかった (Fig.

3A)。同様にイソフラボンの投与によるアディポネクチンの培養上清への分泌についても検討したが、分泌量に有意な影響は与えなかった (Fig. 3B)。

TNF- α の投与による MAP キナーゼ 経路の活性化に対する大豆イソフラボンの影響

Fig. 3の結果から、イソフラボンのアディポネクチンの発現低下抑制作用メカニズムについては、PPAR γ の転写活性が上昇することによりアディポネクチンの発現低下が抑制されることは別のメカニズムが関与しているのではないかと考えられた。成熟脂肪細胞

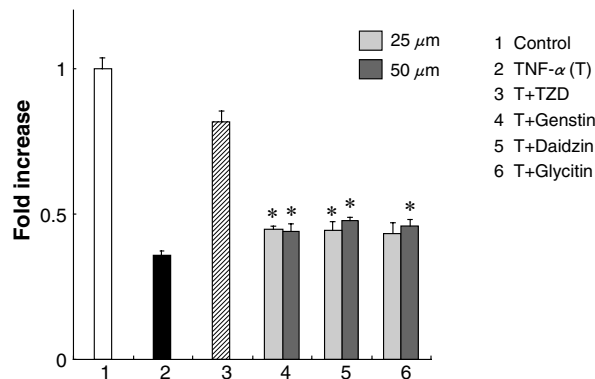


Fig. 2. Inhibitory effect of various isoflavone (glycoside) on TNF- α mediated downregulation of adiponectin expression in 3T3-L1 adipocytes. The gene expression level was expressed relative to the control (=1.0) after normalization using the β -actin gene expression level. Values are means $\pm$ SEM, n=3-6. *Significantly different at $p < 0.05$ compared to TNF- α (T) group.

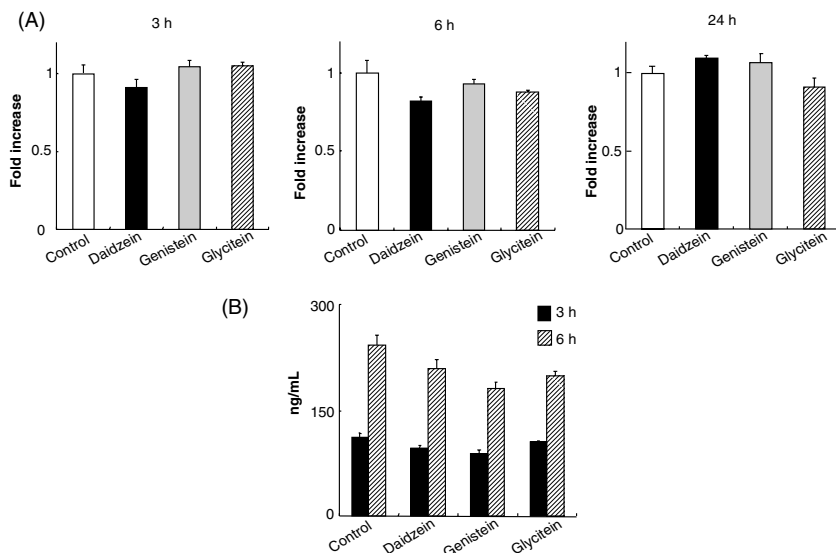


Fig. 3. Effect of various isoflavone (aglycon) on adiponectin gene expression (A) and secretion (B) into the media in 3T3-L1 adipocytes.

においてTNF- α 投与によるMAPキナーゼ経路の活性化によるシグナル伝達経路を考えた場合, stress-activated protein kinase/Jun-N-terminal kinase (SAPK/JNK) を活性化する経路, p38 MAP kinase (p38MAPK) を活性化する経路, ERK1/2 (P44/42 MAP kinase) を活性化する経路が考えられる. 最近の報告から, SAPK/JNKの特異的阻害剤によりTNF- α によるアディポネクチンの発現低下はほぼ完全に抑制されることが報告されている⁷⁾. SAPK/JNK経路については, この経路の活性化がインスリン抵抗性に関連し, この経路の阻害活性を有するペプチドやアスピリンに耐糖能異常やインスリンシグナルを改善する効果が認められている^{8,9)}. 従ってイソフラボンのアディポネクチンの発現低下抑制作用の機構の一部としてSAPK/JNK経路の阻害の関与が想定される. そこでアディポネクチンの発現低下抑制作用が認められたイソフラボンの1つであるゲニステインについてMAPキナ

ーゼの活性化に対する影響を検討した. その結果ゲニステインの前処理はTNF- α の投与によるSAPK/JNK経路の活性化 (JNKのリン酸化) を有意に抑制した (Fig. 4). 一方, ERK1/2, p38 MAPK経路については, いずれもその活性化を抑制しなかった (Fig. 5). 以上の結果から, ゲニステインのアディポネクチンの発現低下抑制作用のメカニズムの一つとしてゲニステインは, TNF- α によるSAPK/JNK経路の活性化の阻害を介してアディポネクチンの発現低下の抑制に関与していることが明らかになった.

以上の結果, 大豆イソフラボンのアディポネクチン発現低下抑制作用を明らかにするとともに, その作用メカニズムの一旦を明らかにした. 今後, 未検討のダイゼインについても同様な機構を介しているのかどうか, また動物個体レベルでの大豆イソフラボンの効果などの詳細な解析を要する.

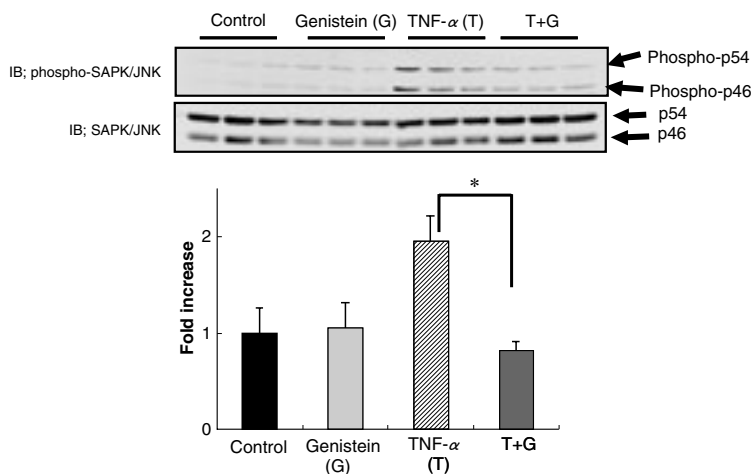


Fig. 4. Effect of pre-treatment of genistein on TNF- α mediated SAPK/JNK activation in 3T3-L1 adipocytes.

*Significantly different at $p < 0.05$.

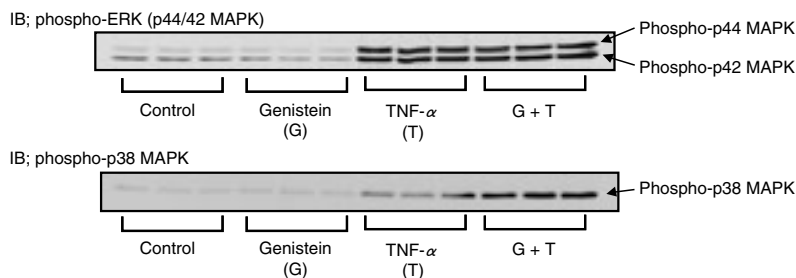


Fig. 5. Effect of pre-treatment of genistein on TNF- α mediated ERK1/2 (p44/42 MAPK) and p38 MAPK activation in 3T3-L1 adipocytes.

要 約

わが国の肥満を起因とするメタボリックシンドロームの急増に対してその予防は急務であり、食品因子からのアプローチによる予防が期待されている。すでに本財団に関連した研究から大豆たん白質のメタボリックシンドロームに対する作用について報告されている。本研究では大豆イソフラボンを対象として培養脂肪細胞における炎症モデルを利用して大豆イソフラボンによるアディポネクチンの発現低下に対する抑制効果を検討した。その結果、ダイゼイン、ゲニステイン、グリシテイン、ダイゼインの代謝物として知られるエクオールはいずれもアディポネクチンの発現低下を有意に抑制した。一方配糖体になるとその効果は低下する傾向が認められた。また、イソフラボンをそれぞれ単独で成熟脂肪細胞へ投与してもアディポネクチンの遺伝子発現や細胞外分泌には影響を与えなかった。最近の報告からTNF- α によるアディポネクチンの発現低下はMAPK経路のひとつであるSAPK/JNK経路の阻害により回復することが報告されている。作用メカニズムの可能性としてイソフラボンもTNF- α によるSAPK/JNK経路の活性化を阻害することによりアディポネクチンの発現低下を抑制するのではないかと考えられた。そこでイソフラボンがTNF- α 刺激によるSAPK/JNKの活性化を阻害するかどうかを細胞レベルで検討したところ、ゲニステインの前処理はTNF- α により誘導されるSAPK/JNKのリン酸化を抑制しており、作用のメカニズムのひとつとしてゲニステインはSAPK/JNK経路の活性化を阻害することによりアディポネクチンの発現低下作用を発現していることが示唆された。

文 献

- 1) Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante Jr AW (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) Maeda N, Takahashi M, Funahashi T, Kihara S, Nishizawa H, Kishida K, Nagaretani H, Matsuda M, Komuro R, Ouchi N, Kuriyama H, Hotta K, Nakamura T, Shimomura I and Matsuzawa Y (2002): PPAR γ ligands increase expression and plasma concentrations of adiponectin, an adipose-derived protein. *Diabetes*, **50**, 2094-2099.
- 4) Iwaki M, Matsuda M, Maeda N, Funahashi T, Matsuzawa Y, Makishima M and Shimomura I (2003): Induction of adiponectin, a fat-derived antidiabetic and antiatherogenic factor, by nuclear receptors. *Diabetes*, **52**, 1655-1663.
- 5) Dang ZC, Audinot V, Papapoulos SE, Boutin JA and Lowik CW (2003): Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) as a molecular target for the soy phytoestrogen genistein. *J Bio Chem*, **278**, 962-967.
- 6) Mezei O, Banz WJ, Steger RW, Peluso MR, Winters TA and Shay N (2003): Soy isoflavones exert antidiabetic and hypolipidemic effects through the PPAR pathways in obese Zucker rats and murine RAW 264.7 cells. *J Nutr*, **133**, 1238-1243.
- 7) Kim KY, Kim JK, Jeon JH, Yoon SR, Choi I, Yang Y (2005): c-Jun N-terminal kinase is involved in the suppression of adiponectin expression by TNF- α in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, **327**, 460-467.
- 8) Kaneto H, Nakatani Y, Miyatsuka T, Kawamori D, Matsuoka TA, Matsuhisa M, Kajimoto Y, Ichijo H, Yamasaki Y and Hori M (2004): Possible novel therapy for diabetes with cell-permeable JNK-inhibitory peptide. *Nat Med*, **10**, 1128-1132.
- 9) Gao Z, Zuberi A, Quon MJ, Dong Z and Ye J (2003): Aspirin inhibits serine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 in tumor necrosis factor-treated cells through targeting multiple serine kinases. *J Biol Chem*, **278**, 24944-24950.