

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. Both pre-treatment of isoflavone significantly blocked downregulation of adiponectin expression by TNF- α in 3T3-L1 adipocytes. Interestingly, isoflavone did not activate PPAR γ transcriptional activity. Genistein significantly inhibited TNF- α induced JNK activation which is involved with adiponectin expression. The administration of soy isoflavone significantly reduced blood glucose concentration in type 2 diabetic mice. *Soy Protein Research, Japan* **11**, 105-109, 2008.

Key words : isoflavone, adipocyte, adiponectin, diabetes

我が国の糖尿病患者の増加は深刻な社会問題となっている。平成18年国民健康・栄養調査によれば、糖尿病が強く疑われる人は820万人、糖尿病の可能性を否定できない人は1,050万人で合計1,870万人に達したことが報告されている。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。前述の調査では、40歳～74歳では、男性2人のうち1人、

女性の5人のうち1人はメタボリックシンドロームが強く疑われる者または予備群と考えられると報告されている。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。すなわち肥満における脂肪組織の炎症性変化がアディポサイトカインの発現異常をきたし、メタボリックシンドロームに関与する^{1,2)}。従って脂肪組織の炎症とこれに伴うアディポサイトカインの発現・分泌異常を改善

*〒487-8501 春日井市松本町1200

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、細胞レベルでのメカニズム解明と動物個体レベルでの検証を目的とした。

方 法

マウス由来繊維芽細胞株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50 μ Mになるように投与後TNF- α で刺激した。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。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エスタンブロット法により行った。動物個体での検証は、実験動物としてKK-A^yマウスを用いた。本動物実験は中部大学動物実験委員会の承認を得て、動物実験の適正な実施に向けたガイドラインに準拠して行った。マウスは1週間の予備飼育の後、コントロール食あるいはイソフラボン添加食を摂取させ、この間の体重増加、摂餌量、随時血糖値を測定した。

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Equolをあらかじめ投与した成熟脂肪細胞をTNF- α で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. 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。しかしながらイソフラボンの処理はいずれもその低下を有意に抑制したがGenistein, Daidzeinに特に効果が認められた。一方イソフラボン配糖体(Genistin, Daidzin,

Glycitin)で前処理した場合はその効果はアグリコンよりも低下した。

イソフラボンのアディポネクチン遺伝子発現低下抑制作用のメカニズム解明

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PPAR γ に対するアゴニスト作用活性を測定した。しかしながらGenistein, Daidzein, Equolはいずれも活性が認められなかった。また大豆イソフラボンのみを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、細胞外への分泌には影響を与えなかった。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

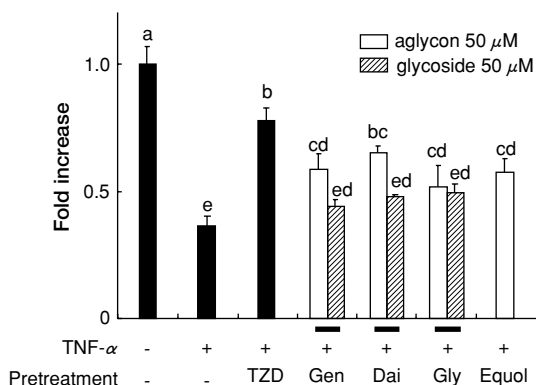


Fig. 1. Inhibitory effect of various isoflavone on TNF- α mediated downregulation of adiponectin expression in 3T3-L1 adipocytes. The gene expression level was expressed relative to the control (=1.0) after normalization using the β -actin gene expression level. Values are means \pm SEM, n=3. TZD, troglitazone.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

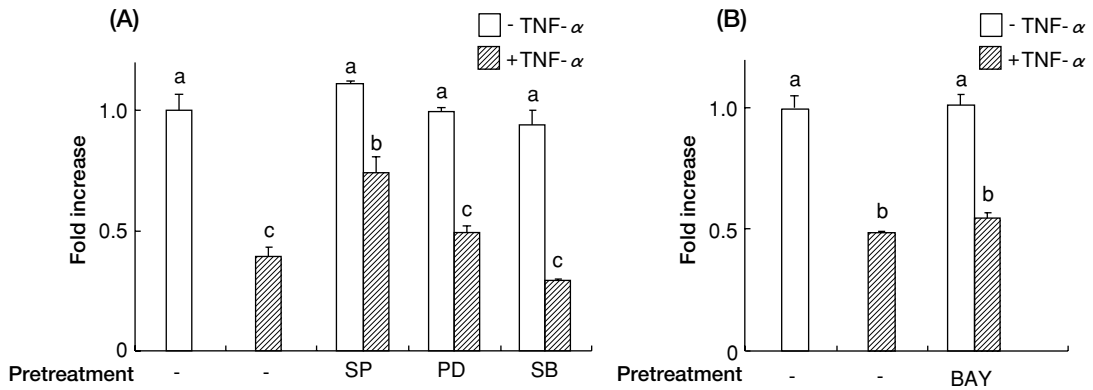


Fig. 2. Inhibitory effect of various MAPK (A) or NF- κ B i (B) nhibitors on the TNF- α mediated downregulation of adiponectin in 3T3-L1 adipocytes. The gene expression level was expressed relative to the control (=1.0) after normalization using the β -actin gene expression level. SP: SP600125 (JNK inhibitor), PD: PD98059 (MEK inhibitor), SB: SB203580 (p-38 MAPK inhibitor), BAY: BAY11-7082 (NF- κ B inhibitor) Values are means \pm SEM, n = 3-6. Values without a common letter are significantly different at $p < 0.05$.

よりアディポネクチンの発現低下が抑制されること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においては、Jun-N-terminal kinase (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、NF- κ Bを活性化する経路が考えられる。これまでに、JNKの活性化阻害により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⁾。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)}。

そこでまずTNF- α 刺激に対して、上記のシグナル伝達経路の阻害剤処理によるアディポネクチンの遺伝子発現低下への影響を検討した。その結果、MAPキナーゼに対する各種特異的阻害剤の前処理では、JNKの阻害剤処理のみにTNF- α によるアディポネクチンの遺伝子発現低下抑制作用が認められ、他のMAPキナーゼの阻害やNF- κ Bの阻害は影響を与えなかった (Fig. 2A, 2B)。

こ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のメカニズムの一部としてJNK経路の阻害の関与が想定されたので、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JNK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JNK経路の活性化 (JNK

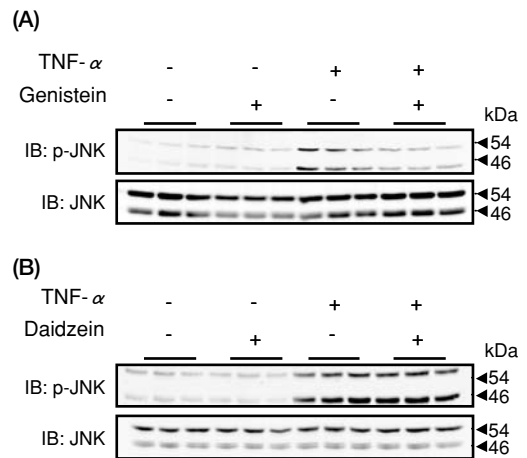


Fig. 3. The immunoblot analysis of the JNK protein in 3T3-L1 adipocytes pretreated with isoflavone (genistein, A; daidzein, B) before treatment with TNF- α .

のリン酸化)を抑制した (Fig. 3A)。一方、類似の構造ながらダイゼインにはJNKの活性化を抑制しなかった (Fig. 3B)。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、TNF- α による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。一方ダイゼインは別のメカニズムを介してアディポネクチンの発現低下の抑制作用を示すものと考えられるので、この点については今後の課題である。

大豆イソフラボンの2型糖尿病に対する抑制効果の検討

すでに大豆たん白質については、その摂取によるアディポネクチンの上昇が報告されている¹⁰。一方イソフラボンの動物個体での作用についてはイソフラボン単独での糖尿病への作用は未解明である。そこで大豆イソフラボンの2型糖尿病マウスにおける血糖値への影響を検討したところ、大豆イソフラボン粉末の摂取は体重、摂餌量に影響を与えずに2型糖尿病マウスの

血糖値の上昇を4週間にわたり有意に抑制した (Fig. 4A, 4B, 4C)。

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と細胞レベルでの作用メカニズムと動物個体レベルでの糖尿病抑制効果を明らかにした。今後、細胞レベルでの詳細な検討、また動物個体レベルでの大豆たん白質との効果比較、相乗的な相互作用などの解析を要する。

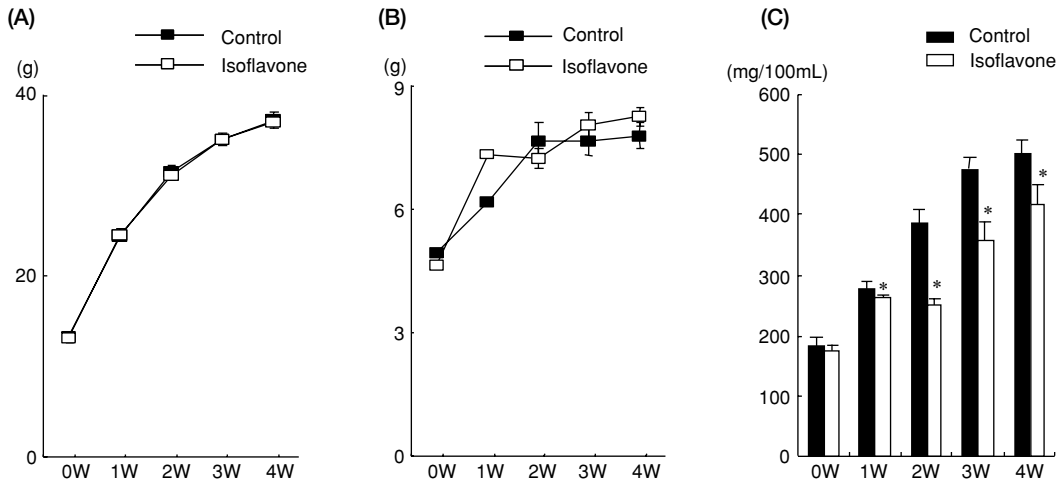


Fig. 4. Body weight (A), food intake (B) and serum glucose concentration (C) of KK-A^y mice fed control or isoflavone supplemented diet. Values are means \pm SEM, n=7-8. * Significantly different at $p < 0.05$ compared to the control group.

要 約

わが国の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。そのメカニズムとしては核内受容体PPAR γ を介さずJNK経路の阻害によりアディポネクチンの発現低下を抑制作用を発現していることが明らかになった。また2型糖尿病マウスでの検討の結果、大豆イソフラボンの摂取は血糖値の上昇を有意に抑制しており、大豆イソフラボンの活用による糖尿病予防、治療のための科学基盤の一端を明らかにすることができた。

文 献

- 1) Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante and 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 and 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.
- 10) 松澤祐次 (2003): 生活習慣病における脂肪細胞の意義と大豆たん白質の効果 体脂肪分布と脂肪細胞機能, 特にアディポサイトカイン分泌に及ぼす大豆たん白質の影響 (第二報). 大豆たん白質研究, **6**, 1-10.