

## 大豆イソフラボンの血糖制御に関する作用解析

矢ヶ崎一三\*・長岡真聡・三浦 豊

東京農工大学大学院共生科学技術研究院生命農学部

### Blood Glucose Regulation by a Soybean Isoflavone, Genistein: Studies in Cultured Cells and Type 2 Diabetic Mice

Kazumi YAGASAKI, Masato NAGAOKA and Yutaka MIURA

Division of Agriscience and Bioscience, Institute of Symbiotic Science and Technology,  
Tokyo University of Agriculture and Technology, Fuchu 183-8509

#### ABSTRACT

Effect of a soybean isoflavone, genistein, on (1) glucose uptake by rat-derived L6 myotubes and (2) insulin secretion from rat-derived RIN-5F pancreatic  $\beta$ -cells was studied *in vitro*. Then, (3) that on blood glucose levels in type 2 diabetic KK-Ay/Ta mice was studied *in vivo*. Genistein dose-dependently and significantly stimulated glucose uptake by L6 myotubes and insulin secretion from RIN-5F cells in culture at 10-100  $\mu$ M, where genistein exerted no influence on the viability of RIN-5F cells. Feeding 0.1% genistein in 20% casein diet (20C) for 5 weeks to KK-Ay/Ta mice suppressed increases in blood glucose levels and the suppressive effect was significant at 1<sup>st</sup> and 5<sup>th</sup> week of feeding as compared with 20C-fed diabetic control mice. Genistein also suppressed urinary glucose excretion as compared with control mice during the feeding period. These effects of genistein were not due to reduction in food intake. From these results, genistein was strongly suggested to suppress the increases in blood glucose level in type 2 diabetic mice through stimulating glucose uptake and/or insulin secretion. *Soy Protein Research, Japan* **11**, 121-126, 2008.

Key words : soybean genistein, muscle cells, pancreatic  $\beta$ -cell, glucose uptake, insulin secretion, type 2 diabetes

わが国における糖尿病患者数は増加の一途をたどり、2006年には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(いわゆる予備軍)

1,050万人で、両者を合わせると1,870万人と推計されており、2002年調査の約1,620万に比べ250万人(15.4%)増加した<sup>1)</sup>。肥満、糖尿病、高脂血症(脂質異常症)、高血圧は同一個人に重複して合併することが多く、近年、この病態はメタボリックシンドローム

\*〒183-8509 府中市幸町3-5-8

と称されている。日本人の糖尿病は2型がほとんどであり、人種的にインスリン分泌能が弱く、筋肉などグルコース利用組織においてインスリンへの感受性が低下していること（インスリン抵抗性）が特徴である。大豆植物化学成分抽出物（Soyabean phytochemical extract, SPE）については小腸のSGLT1を阻害して腸管からのグルコース吸収を阻害する作用<sup>2)</sup>が報告されているが、グルコースが血液へ移行してからのSPEの作用は明らかではない。そこで本研究では、細胞培養系で構築した検定系を用い、インスリン分泌能とグルコース取り込み能に対するイソフラボン、特にゲニステインの促進作用の解析および個体レベルにおける血糖低下作用の有無についてそのシグナル伝達経路の解析も念頭において検討することを目的とする。

## 方 法

### 細胞の培養

グルコース取り込み能は、ラット骨格筋由来のL6筋芽細胞<sup>3)</sup>を用いて検討した。10%ウシ胎児血清（FBS）を含むDMEM培地（10%FBS/DMEM）で11日間培養し、L6筋管細胞へ分化させた。その後塩類溶液で2時間培養し細胞を洗浄後、グルコースおよび検体を含む塩類溶液に交換し4時間培養した。培養前後のグルコース濃度の差からL6筋管細胞のグルコース取り込み量を算出した<sup>4)</sup>。インスリン分泌能は、ラット由来の膵臓β細胞RIN-5F<sup>5)</sup>を用いて検討した。10% FBSを含むRPMI1640培地（10%FBS/RPMI1640）でRIN-5F細胞を3日間培養した。その後、血清濃度を下げた1%FBS/RPMI1640培地（対照培地）およびこれにゲニステインを添加した実験培地に交換し、さらに3時間培養後、培地中に分泌されたインスリン濃度をラット・インスリンELISAシステムで測定した。RIN-5F細胞に対するゲニステインの細胞毒性の有無は、培地中へ放出される乳酸脱水素酵素（LDH）活性を指標として評価した。

### 2型糖尿病モデル動物における検討

2型糖尿病モデル動物として、KK-Ay/Taマウスを、正常マウスとしてC57BL/6Jマウスを用いた。いずれも3週齢で購入し固型飼料（CE-2）およびAIN-93処方<sup>6)</sup>の20%カゼイン食（20C, Table 1）で1週間予備飼育し、午前10時に尾静脈から採血し血糖値を測定した。KK-Ay/Taマウスを血糖値と体重が等しくなるように2群にわけ、1群には20Cを、他の1群には0.1%ゲニステイン含有20Cを5週間にわたり自由摂取させ、週に一度採血して血糖値を測定した。C57BL/6Jマウス

にも同様に20Cを摂取させ、同様に血糖値を測定した。なお、尿へ排泄されるグルコースを尿糖試験紙（ウリエース、テルモ）にて採血日に測定した。飼育期間終了後に屠殺し、採血して血清を調製し、血清中のトリグリセリド（TG）、総コレステロール（Ch）、過酸化脂質（TBARS）、インスリン、アディポネクチンの濃度を市販キットにて測定した。

### 統計処理

結果は平均値±標準誤差で示した。有意差の検定は対照群に対してDunnett multiple comparisons testで行い、 $p < 0.05$ のとき有意差があるとした。

## 結果と考察

まず、筋管細胞のグルコース取り込み能に対するゲニステインの用量-作用反応を検討した（Fig. 1）。ゲニステインはグルコースの取り込みを用量依存的に促進し、10および100 $\mu$ Mで有意な促進効果が認められた。同様にゲニステインは膵臓β細胞からのインスリン分泌能も10および100 $\mu$ Mで有意に促進した（Fig. 2A）。ゲニステインが膵臓β細胞に対し細胞殺作用を示した結果、培地へのインスリン分泌量が増加した可能性が考えられたため、ゲニステインの細胞毒性についてLDH活性を指標として検討した。Triton X-100で細胞膜は破壊されて、細胞質内のLDHはすべて培地へ放出するものと考えられるので、このときのLDH活性を100としてゲニステインの影響を調べた（Fig. 2B）。その結果、ゲニステイン群（10, 100 $\mu$ M）は対照群（ゲニステイン0 $\mu$ M）に比べてLDH活性に影響を与えず、ゲニステインのインスリン分泌促進効果はその細胞毒性に基づくのではないことが明らかとなった。なお、対照群にも認められるLDH活性は1%FBSにもともと存在するLDHによるものと考えられる。

以上の*in vitro*の結果から、ゲニステインは*in vivo*において血糖値を制御しうることが示唆された。そこで、2型糖尿病モデル動物としてKK-Ay/Taマウスを選び、食餌に0.1%添加した場合のゲニステインの効果を検討した。正常群に比べ、糖尿対照群では初期体重および初期血糖値、5週間に渡る食餌摂取量と体重増加量が有意に増加していた。しかし、ゲニステインはこれらの項目とくに食餌摂取量に有意な影響を与えなかった（Table 2）。5週間に渡る飼育期間中、正常群の血糖値はほぼ一定値を示したのに対し、糖尿対照群では3週目まで直線的に上昇を続け、以後5週目までこの高値を維持した。ゲニステイン投与群では血糖値が対照群より常に低く、1および5週目では有意な上昇

抑制効果を示した (Fig. 3). ゲニステインのこの血糖上昇抑制効果は、上述のごとく食餌摂取量の低下によるものではなく、ゲニステイン固有の特性 (グルコース取込み促進および/またはインスリン分泌促進作用) に基づくものと考えられた。

尿中へのグルコース排泄に対するゲニステインの作用をFig. 4に示した。正常群では全期間に渡って尿糖はまったく検出されなかった。一方、糖尿対照群では3週目で全マウスが尿糖陽性になったのに対し、ゲニステイン投与群では尿糖陰性 (-) または境界 (±) が

ほとんどであった。また、5週齢目においても糖尿対照群では全マウスが++ないし+++であったのに対し、ゲニステイン投与群では+ないし++であり、糖尿病を軽症化していることが明らかとなった (Fig. 4)。

血清中のTG, Ch, TBARS濃度および肝臓中のTGとCh含量は正常群に比べ糖尿対照群ですべて有意に上昇した。これらの上昇に対し、ゲニステインは抑制する方向に作用した (Table 2)。血清アディポネクチンの濃度は正常群に比べ糖尿対照群で有意に低下し、ゲニステインはその低下を抑制する方向に作用した。

Table 1. Composition of experimental diets

Ingredient (%)	20C	20C+G
Casein <sup>a</sup>	20.00	20.00
$\beta$ -Corn starch <sup>b</sup>	49.75	49.65
$\alpha$ -Corn starch <sup>b</sup>	13.20	13.20
Corn oil <sup>c</sup>	7.00	7.00
Cellulose powder <sup>a</sup>	5.00	5.00
Mineral mixture <sup>b</sup> (AIN93G-MX)	3.50	3.50
Vitamin mixture <sup>b</sup> (AIN-93-VX)	1.00	1.00
L-Cystine <sup>d</sup>	0.30	0.30
Choline bitartrate <sup>d</sup>	0.25	0.25
Genistein <sup>e</sup>	—	0.1

<sup>a</sup>Oriental Yeast Co., Ltd., Tokyo. <sup>b</sup>Nihon Nosan Kogyo Co., Ltd., Yokohama. <sup>c</sup>Hayashi Chemicals Co., Ltd., Tokyo. <sup>d</sup>Wako Pure Chemical Industries., Ltd., Osaka. <sup>e</sup>Tyger Sci. Inc., USA.

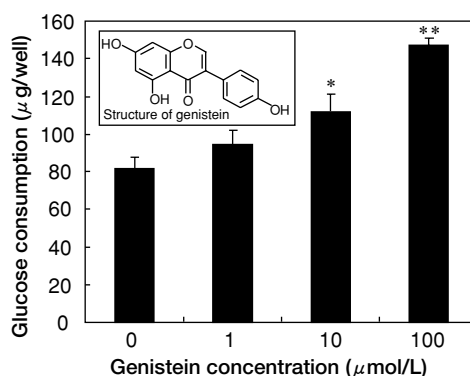


Fig. 1. Effect of genistein on glucose consumption in cultured L6 myotubes. Each value represents the mean  $\pm$  SEM for 6 wells. Asterisks mean statistical significance at \* $p < 0.05$  or \*\* $p < 0.01$  by Dunnet multiple comparisons test.

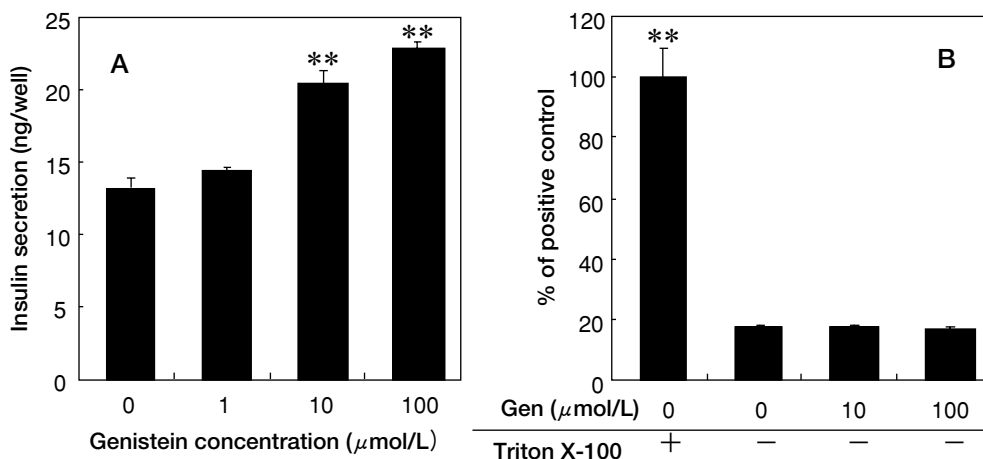


Fig. 2. Effect of genistein on insulin secretion and cytotoxicity in cultured RIN-5F cells. Each value represents the mean  $\pm$  SEM for 6 wells. Asterisks mean statistical significance at \*\* $p < 0.01$  by Dunnet multiple comparisons test.

一方、インスリン濃度は正常群に比べ糖尿対照群で有意に上昇し、ゲニステインはさらに上昇させる方向に作用した。しかし、これらのパラメータに対するゲニステインの作用は有意ではなかった。

なお、脂肪細胞においてダイゼインがPPAR $\gamma$ リガンドになりうるということが報告<sup>6)</sup>されているので、ゲニステインがPPAR $\gamma$ リガンドになりうるかどうかについて

キットを用いて測定したところ、今回はPPAR $\gamma$ に結合するという結果は得られず、再度確認する必要があると考えられる。

今後、<sup>14</sup>C]2-deoxyglucoseを培地に添加し、ゲニステインのグルコース取り込み促進能の確認とともに、各種阻害剤を用いたゲニステインのシグナル伝達経路の解明が課題である。

Table 2. Effect of genistein on methabolic parameters in KK-Ay/Ta mice

Measurement	Nor	Con	Gen
Initial body weight (g/mouse)	15.8±0.4*	18.1± 0.5	18.2±0.6
Food intake (g/35 days)	130.8±3.7*	229.7± 6.3	222.4±7.0
Body weight gain (g/35 days)	7.9±0.4*	18.6± 0.9	19.2±0.6
Initial blood glucose (mg/100mL)	192.4±5.6*	218.5±10.1	215.6±6.8
Serum lipid levels			
Cholesterol (mmol/L)	1.82±0.09*	2.88± 0.19	2.63±0.16
Triglyceride (mmol/L)	0.83±0.05*	1.37± 0.08	1.28±0.10
TBARS ( $\mu$ mol/L)	4.35±0.58*	6.95± 0.27	6.57±0.77
Serum adiponectin ( $\mu$ g/mL)	13.18±0.44*	7.67± 0.42	8.61±0.35
Serum insulin (ng/mL)	0.98±0.02*	13.25± 2.35	19.66±2.38
Liver lipid levels			
Cholesterol (mg/g liver)	1.84±0.10*	3.16± 0.05	2.97±0.13
Triglyceride (mg/g liver)	16.08±1.26*	29.26± 2.12	27.89±1.66

Each value represents the mean  $\pm$  SEM for 6 mice. Asterisks mean statistical significance at \* $p$ <0.05 by Dunnet multiple comparisons test.

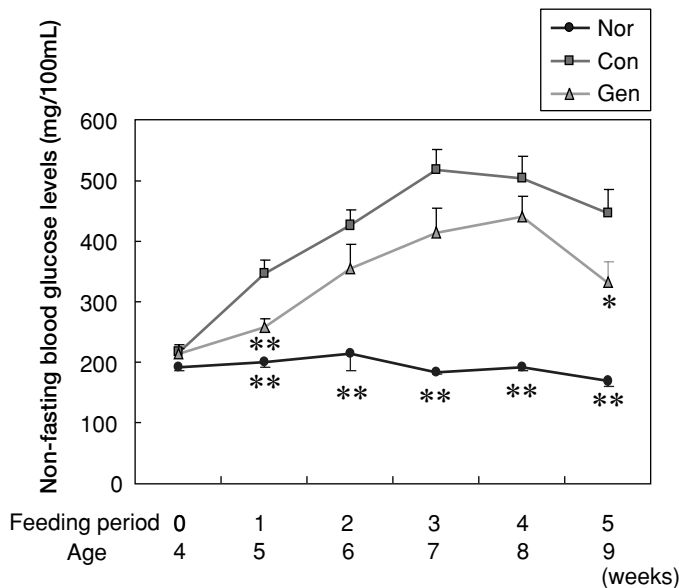


Fig. 3. Effect of genistein on non-fasting blood glucose levels in KK-Ay/Ta mice. Mice were kept on diets during blood collection from tail vein. Each value represents the mean  $\pm$  SEM for 6 mice. Asterisks mean statistical significance at \* $p$ <0.05 or \*\* $p$ <0.01 by Dunnet multiple comparisons test.

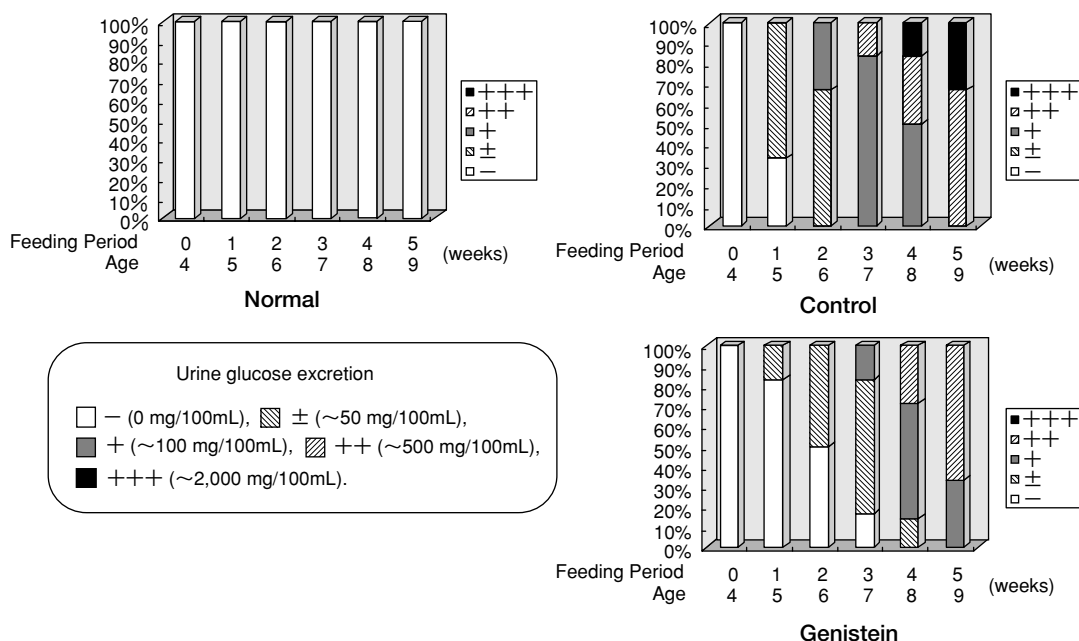


Fig. 4. Effect of genistein on urine glucose excretion in KK-Ay/Ta Jcl mice. Urine glucose excretion in mice was determined using urine test paper. Urine glucose concentration; - (0 mg/100mL), ± (~50 mg/100mL), + (~100 mg/100mL), ++ (~500 mg/100mL), +++ (~2,000 mg/100mL).

## 要 約

本研究では、大豆イソフラボンのうちゲニステインに着目し、まずラット由来L6筋管細胞のグルコース取込み能およびラット由来膵臓β細胞RIN-5Fからのインスリン分泌能におよぼす作用を細胞培養系で検討した。その結果、ゲニステインは両者を10および100 $\mu$ Mで刺激することがみいだされた。次に、2型糖尿病モデルKK-Ay/Taマウスに0.1%ゲニステインを含む標準20%カゼイン食を摂取させて血糖値や尿糖に対する作用を検討したところ、血糖値上昇抑制作用および尿糖排泄抑制作用が見出された。大豆ゲニステインは、身体で最大の組織である筋肉へのグルコース取込みの促進や、インスリン分泌促進作用を介して抗糖尿病作用を示すことが示唆された。

## 文 献

- 1) 厚生労働省 平成18年国民健康・栄養調査結果の概要について。 <http://www.mhlw.go.jp/houdou/2008/04/h0430-2.html>
- 2) Vedavanam K, Sriyayanta S, O'Reilly J, Raman A and Wiseman H (1999): Antioxidant action and potential antidiabetic properties of isoflavonoid-containing soybean phytochemical extract (SPE). *Phytother Res*, **13**, 601-608.
- 3) Yagasaki K, Morisaki N, Kitahara Y, Miura A and Funabiki R (2003): Involvement of protein kinase C activation in L-leucine-induced stimulation of protein synthesis in L6 myotubes. *Cytotechnology*, **43**, 97-103.
- 4) Doi M, Yamaoka I, Fukunaga T and Nakayama M (2003): Isoleucine, a potent plasma glucose-lowering amino acid, stimulates glucose uptake in C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> myotubes. *Biochem Biophys Res Commun*, **312**, 1111-1117.
- 5) Nomura E, Kashiwada A, Hosoda A, Nakamura K, Morishita H, Tsuno T and Taniguchi H (2003): Synthesis of amide compounds of ferulic acid, and their stimulatory effects on insulin secretion *in vitro*. *Bioorg Med Chem*, **11**, 3807-3813.
- 6) Kwon DY, Jang JS, Lee JE, Kim YS, Shin DH and

Park S (2006): The isoflavonoid aglycone-rich fractions of Chungkookjang, fermented unsalted soybeans, enhance insulin signaling and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activity *in vitro*. *Biofactors*, **26**, 245-258.