

大豆たん白質摂取のメタボリック症候群を合併した 動脈硬化の退縮への影響と内臓肥満縮小効果の検討

山下智也*・中島健爾

神戸大学大学院医学研究科

Investigation of the Effects of Soy Protein on the Regression of Atherosclerosis and the Reduction of Abdominal Fat in Metabolic Syndrome

Tomoya YAMASHITA* and Kenji NAKAJIMA

Division of Cardiovascular Medicine, Department of Internal Medicine,
Graduate School of Medicine, Kobe University, Kobe 650-0017

ABSTRACT

Soy protein administration has been shown to reduce the incidence of cardiovascular diseases, although the precise mechanism is unknown. We investigated the effect of soy protein on the regression of atherosclerosis. LDL-receptor-deficient mice were fed a high cholesterol diet for 8 weeks to build up aortic sinus atherosclerotic lesions and then were fed a normal diet with soy protein or control casein for 4 weeks. Atherosclerotic lesions were histologically assessed, and immunological assays were performed. Soy protein treatment significantly regressed atherosclerosis (-19.5%, $p < 0.05$), though only changing the chow never induced the regression. Flow cytometric analysis revealed that soy protein increased neither immature DCs ($CD11c^+CD80^+CD86^+$) nor $CD25^+CD4^+$ regulatory T cells. Soy protein might decrease the number of $CD4^+$ T cells only in mesenteric lymph nodes, but not significantly. Soy protein treatment regressed atherosclerosis in animal models through unknown mechanisms. The present findings might partly explain the beneficial effects of soy protein in atherosclerotic cardiovascular disease patients in clinics. *Soy Protein Research, Japan* **14**, 81-85, 2011.

Key words : soy protein, atherosclerosis, regression, T lymphocyte, dendritic cell

大豆摂取が動脈硬化を基盤とした心血管病のリスク軽減に効果があることが、臨床研究にて明らかにされている¹⁾が、一度形成された動脈硬化の退縮への影響

の検討はなされていない。この研究の目的は、大豆たん白質の摂取が動脈硬化巣（プラーク）の安定化や退縮にどのような影響を及ぼすかを調査し、主に抗炎症作用と免疫機能への影響に焦点をしばってその機序を解明することである。

*〒650-0017 神戸市中央区楠町7-5-1

動脈硬化は慢性の炎症性疾患であるとされており、様々な免疫細胞・サイトカイン・ケモカインなどの病態への関与が報告されている。しかし、臨床の現場においては、直接炎症や免疫反応に介入する動脈硬化性疾患の治療法は未だ臨床応用されていない。

我々は動脈硬化性疾患の予防や治療のために炎症免疫反応を制御するという戦略が、期待される次世代の動脈硬化予防法になると考えて研究を進めている。最近、腸管からの免疫制御にて主に制御性T細胞 (regulatory T cell; Treg) と樹状細胞 (dendritic cell; DC) の機能修飾を介した新規動脈硬化予防法を開発し、論文に報告した²⁾。その論文のeditorialにて、我々の研究グループが“腸管免疫修飾による動脈硬化予防の可能性を初めて提唱した”という評価を受けている。

腸管からの免疫修飾という概念は、昔から免疫寛容の機序の解明において研究されてきた分野であるが、まだ十分には解明されていない。腸管には数多くの細菌が分布しており、最近その種類により免疫反応に差異が出現する可能性³⁾や、疾患の易罹患性にも影響を与える事が報告されている。さらに、腸は毎日の食事や薬剤などに含まれる様々な物質や成分に直接さらされる環境にあり、逆にその経口摂取物質を制御することで、腸管の細菌叢や免疫反応を調節できる可能性も考えられる。

大豆にはサポニンやイソフラボンなどの抗酸化成分も含まれるが、大豆たん白質自身にも抗動脈硬化作用のあることが動物モデルで証明されている⁴⁾。そこで、経口摂取する大豆たん白質に特に腸管における抗炎症・免疫調節作用があるのではないかと仮説をたて、この研究計画を立案した。この研究により、大豆たん白質の動脈硬化退縮効果とその機序を解明すれば、疾

患予防に関する食事習慣の重要性とその根拠が提示できる。

方 法

実験の方法は、動脈硬化マウスに高脂肪食投与にて動脈硬化を惹起させた後に、普通食に変更して動脈硬化プラークの安定化・退縮を観察できる疾患マウスモデルを使用し、普通食変更と同時に大豆たん白質投与の有無と上記病態への影響を検討し、その機序を主に免疫反応への影響から解明を試みた。実際には、6週齢のLDL受容体遺伝子欠損マウスに高コレステロールならびに高脂肪含有食 (1.25%コレステロール, 15%脂肪, 0.5%コール酸) を投与し、14週齢まで飼育して中等度の動脈硬化を惹起させた。ここで、食餌を正常食のカゼイン20%含有コントロールもしくは大豆たん白質(Fujipro R)含有食に変更し、4週間投与した。(Fig. 1)

当初の実験計画では、30%ラード含有食にて8週間の動脈硬化形成時期に、同時に肥満も惹起させ、その後の食事変更後の内臓肥満縮小効果を検討する計画であったが、前実験にて4週間での内臓脂肪の減少がかなり少なく、評価が困難であることが分かり、そのプロトコル自身を変更して、今回の実験の中では、動脈硬化の退縮のみを評価する研究計画に変更した。

動脈硬化巣は、14週齢と食事変更4週間後 (18週齢) にて大動脈弁直上の基部で評価した。

免疫細胞のアッセイは、脾臓と腸間膜リンパ節を使用して、主にフローサイトメトリーにて評価した。本研究で注目したのは、CD4陽性のリンパ球 (主に effector T 細胞) とCD25陽性Foxp3陽性の制御性T細胞



Fig. 1. Low-density lipoprotein receptor knockout (LDLR^{-/-}) mice were kept in a specific pathogen-free animal facility at Kobe University Institute. Six-week-old male LDLR^{-/-} mice received a high fat and cholesterol diet (21% fat, 1.25% cholesterol, and 0.5% cholate; Oriental Yeast, Tokyo, Japan) for 8 weeks. At 14 weeks of age, their diet was changed to fish powder free diet with 20% Fujipro R; Fuji Oil Co., Ltd., Osaka Japan) or 20% casein as control, and continued for 4 weeks. Mice were sacrificed at 14 or 18 weeks of age, and atherosclerotic lesions were assessed.

胞 (regulatory T cell; Treg), そして樹状細胞の成熟化 (活性化) マーカーであるCD80とCD86陽性細胞の比率である。

結 果

大豆たん白質含有食投与は, コントロールのカゼイン含有食投与と比較して, 特に体重の変化, 血中の脂質のプロファイルに統計学的に有意な影響は及ぼさなかった (Table. 1). 少しだけ悪玉コレステロールであるLDL-Cを低下させ, 善玉コレステロールであるHDL-Cの血中濃度を上昇させる傾向が観察できた。

14週齢での食餌変更により血中コレステロール濃度の低下と動脈硬化巣の安定化などの変化が生じるが, 普通食に変更して血中コレステロール濃度を低下させただけでは, 動脈硬化面積の減少 (退縮) は生じないことが分かっている⁵⁾。

本実験でも, カゼイン含有食に変更しても動脈硬化面積の減少は観察されず, 有意ではないがむしろさらに少し増加するような印象もあった (Baseline; $622 \pm 86 \mu\text{m}^2$, Control; $685 \pm 105 \mu\text{m}^2$) (Fig. 2). 大豆たん白質含有食投与群では, 血中コレステロールの変化には大きな影響を与えずに, 動脈硬化の退縮がおきることが証明できた (Soy protein; $491 \pm 13 \mu\text{m}^2$, -19.5% versus baseline, $p < 0.05$) (Fig. 2).

免疫機能への影響を検討するために, 18週齢での脾臓 (Spleen) と腸間膜リンパ節 (MLN) の免疫細胞の解析を行った。

CD4陽性のT細胞の数に関して, 特に腸間膜リンパ節での数が少し減少する傾向が認められた。しかし, 免疫抑制系細胞として機能する制御性T細胞 (Treg) の比率は, 大豆たん白質によって変化は認められなかった (Fig. 3). 以上より, カゼインに比較して大豆たん白質は, effector T細胞の数を少し減少させる可能性が示唆されるが, 統計学的には有意なものではないと結論した。

次に, 大豆たん白質投与の樹状細胞表現型への影響をCD80とCD86という樹状細胞の成熟化もしくは活性化のマーカーで評価した。脾臓と腸間膜リンパ節両方において, 大豆たん白質投与によって上記の成熟化

マーカーに大きな変化は認められなかった (Fig. 4)。

考 察

マウス動脈硬化退縮モデルにおいて, 大豆たん白質投与はコントロールのカゼイン投与に比較して退縮を促進し, 動脈硬化性疾患に良い影響を及ぼすことが示された。急性心筋梗塞などの心血管イベント発生予防のためには動脈硬化プラークを安定化させ, 退縮させることが重要であることは臨床研究にて示されている。今回の実験結果は, 大豆たん白質の摂取がこのような動脈硬化性疾患の発症リスクの高い患者にとって予防的に作用する可能性を示唆するものであると考えられる。

しかし, その作用機序に関しては, 今回の研究の中では十分に示す事ができず, さらなる機序解明の実験を進めなければならない。Tリンパ球の数が, 少し減少することが示され, 我々の以前の研究結果において, この低下は動脈硬化退縮に大きく関わっていることが分かっているので, 大豆たん白質の良い効果の一部を説明できるものかもしれないが, その他の機序がもっと中心的な役割を担っているであろうことは容易に想像できる。

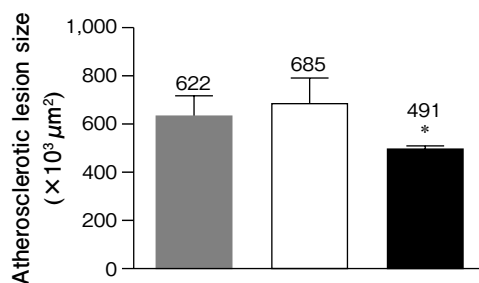


Fig. 2. Quantitative analysis of atherosclerotic lesion size in the aortic sinus of LDLR^{-/-} mice at 14 weeks old (Baseline; gray square) and after changing to normal chow with casein control (open squares) or with soy protein (black squares) at 18 weeks old. Data represent means $\pm$ SEM of $n=6$ at 14 weeks old and $n=5$ at 18 weeks old in both groups. * $p < 0.05$ versus baseline.

Table 1. Body weight and lipid profiles in LDLR-KO mice

	Body weight	Total cholesterol	LDL cholesterol	HDL cholesterol	Triglycerides
Control	25.5 $\pm$ 0.5	194.0 $\pm$ 23.5	67.0 $\pm$ 10.2	47.3 $\pm$ 3.4	67.0 $\pm$ 18.5
Daizu	25.8 $\pm$ 0.4	196.6 $\pm$ 24.4	61.0 $\pm$ 16.4	54.8 $\pm$ 4.7	73.0 $\pm$ 11.4

また、このマウスで示された大豆たん白質摂取の動脈硬化に対する良い効果は、人でも存在するのか？、どの程度の量で達成できるのか？、どのような環境に

て発揮するのか？など、さらなる課題を提唱することになる。

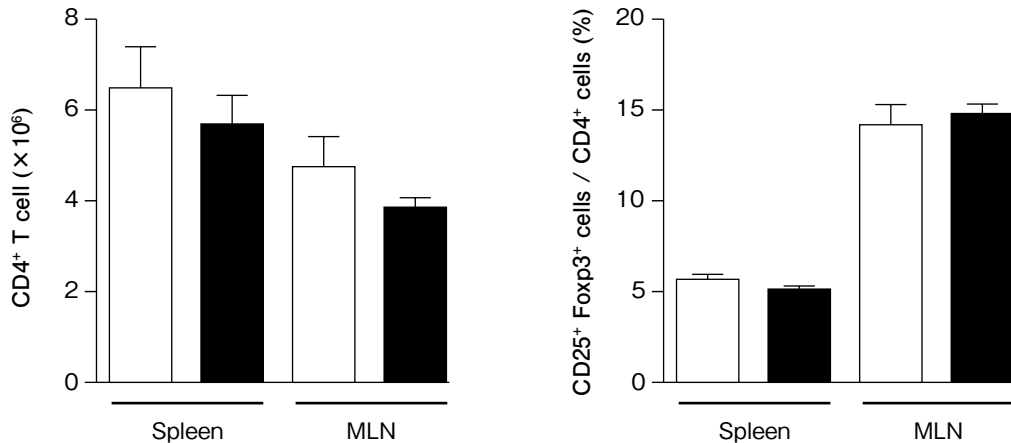


Fig. 3. Effect of soy protein on the number of CD4⁺ T cells and the percentage of CD25⁺FoxP3⁺T cells *in vivo*. CD4⁺ lymphocytes from spleens and MLNs of 18-week old (Casein control; open white bars, Soy protein; closed black bars) mice were prepared, stained with FITC-conjugated anti-CD4, and counted by flow cytometry. The left graph represents the number of CD4⁺ T cells and the right graph indicates the percentage of CD25⁺Foxp3⁺ cells within the CD4⁺ population in spleens and MLNs of 18-week old mice. n=5 in both groups.

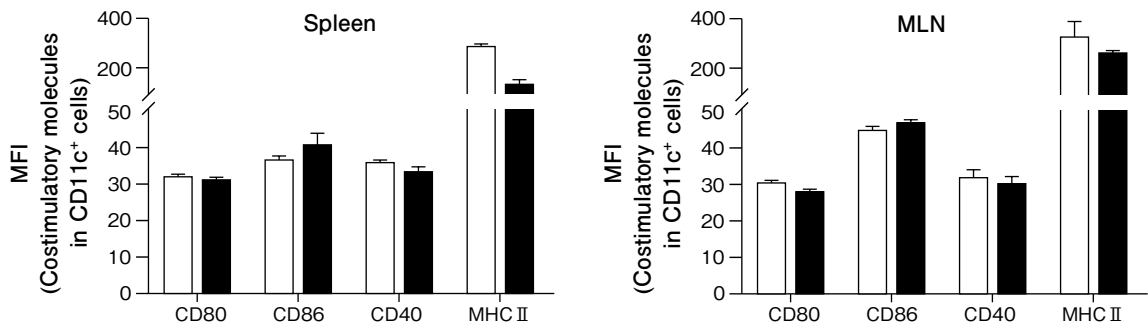


Fig. 4. Effect of soy preprotein on DCs *in vivo*. Quantitative analysis of surface expression for each marker was determined as mean fluorescence intensity (MFI). Casein control; open bars. Soy protein; closed bars. n=5 in both groups.

要 約

この研究により、大豆たん白質の摂取が動脈硬化の面積を減少させ、病態を安定化させる退縮を促進し、動脈硬化性疾患を発症するであろう患者さんに良い作用を及ぼす可能性が示された。その機序の解明がすすみ、どのような使用方法が良いかが明らかにされ、将来実際の患者さんへ提示できるようになることを祈りながら、この度の研究報告とさせていただきます。

文 献

- 1) Sacks FM, Lichtenstein A, Van Horn L, Harris W, Kris-Etherton P and Winston M; American Heart Association Nutrition Committee (2006): Soy protein, isoflavones, and cardiovascular health: an American Heart Association Science Advisory for professionals from the Nutrition Committee. *Circulation*, **113**, 1034-1044.
- 2) Takeda M, Yamashita T, Sasaki N, Nakajima K, Kita T, Shinohara M, Ishida T and Hirata K (2010): Oral administration of an active form of vitamin D3 (calcitriol) decreases atherosclerosis in mice by inducing regulatory T cells and immature dendritic cells with tolerogenic functions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **30**, 2495-2503.
- 3) Atarashi K, Tanoue T, Shima T, Imaoka A, Kuwahara T, Momose Y, Cheng G, Yamasaki S, Saito T, Ohba Y, Taniguchi T, Takeda K, Hori S, Ivanov II, Umesaki Y, Itoh K and Honda K (2011): Induction of colonic regulatory T cells by indigenous *Clostridium* species. *Science*, **331**, 337-341.
- 4) 津田恭征, 神代美和, 洪美珠, 佐藤匡央, 今泉勝己 (1999): 大豆たん白質によるアポE欠損マウスの動脈硬化進展の抑制機構, 大豆たん白質研究, **20**, 138-142.
- 5) Nakajima K, Yamashita T, Kita T, Takeda M, Sasaki N, Kasahara K, Shinohara M, Rikitake Y, Ishida T, Yokoyama M, Hirata K (2011): Orally administered eicosapentaenoic acid induces rapid regression of atherosclerosis via modulating the phenotype of dendritic cells in LDL receptor-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **31**, 1963-1972.