

ヒト初代培養肝細胞を用いた *in vitro* 脂肪肝形成モデルにおける 大豆抽出物の品種による改善効果の差異

瀬尾 誠*

埼玉医科大学医学部基礎医学部門生化学

The Differential Effects of Several Soybean Cultivar Extracts to Improve against an *in vitro* Hepatosteatosis in Human Primary Hepatocytes

Makoto SEO*

Department of Biochemistry, Premedical Course, Faculty of Medicine,
Saitama Medical University, Saitama 350-0495

ABSTRACT

Recently, there have been many reports that soybean components (peptides and isoflavones) decrease serum cholesterol and triglyceride concentrations in an animal disease model. In this study, we examined whether soybean extracts from several cultivars show the effect of improvement of linoleic acid-induced hepatosteatosis model in human primary hepatocytes. The cells were incubated with 0.5 mM linoleic acid and several soybean extracts for 24 hours. After incubation, the cells were evaluated for morphological changes in lipid droplet accumulation, and the intracellular lipid concentrations were measured. In addition, the cells were evaluated for mRNA and protein levels that are related to lipid metabolism. The cells of linoleic acid-induced hepatosteatosis showed significant accumulation of lipid droplets and high concentrations of triglyceride. On the other hand, Tanbakuromame extract decreased the accumulation of lipid droplets and the concentration of intracellular triglyceride. In fatty acid metabolism enzymes and transcription factors, Tanbakuromame extract decreased diacylglycerol acyltransferase 2 mRNA expression and protein level, and increased acyl-CoA oxidase mRNA expression. Tanbakuromame extract increased peroxisome proliferator-activated receptor α protein levels in nuclear fraction. In cholesterol metabolism enzymes and transcription factors, Tanbakuromame extract increased cholesterol 7 α -hydroxylase and sterol-12 α -hydroxylase mRNA expressions. Tanbakuromame extract regulated the balance between liver X receptor and farnesoid X receptor protein levels in nuclear fraction. Moreover, sterol regulatory

* 〒350-0495 埼玉県入間郡毛呂山町毛呂本郷38

element-binding proteins were normalized by treatment with Tanbakuromame extract. These findings suggest that Tanbakuromame extract decreases triglyceride synthesis and enhances fatty acid β -oxidation. In addition, Tanbakuromame extract enhances the cholesterol catabolism pathway, thus decreasing lipid droplet accumulation in hepatocytes. *Soy Protein Research, Japan* **14**, 139-145, 2011.

Key words : soybean extract, hepatocyte, hepatosteatosis, triglyceride, cholesterol

近年、我が国においての食生活の欧米化に伴い、食事由来の過剰な脂質摂取による脂質代謝異常を起因とする肥満や動脈硬化症などの生活習慣病の発症率が顕著に増加しており、それらの発症予防および改善方法の確立が急務となっている。

大豆に含まれる生体に有用な生理活性物質として注目されている難溶性ペプチドやイソフラボン類は、血中コレステロールやトリグリセリド (TG) 濃度低下作用を有することが、動物実験だけでなくヒトにおいても確認されている¹⁻³⁾。

我々は、ヒト初代培養肝細胞を用いた *in vitro* 脂肪肝形成モデルを確立し、様々な食品成分による改善効果のスクリーニングを行ってきた。本実験モデルを用いた先行研究を行った際に、大豆抽出物は脂肪滴蓄積を抑制すると考えていたのであるが、結果は予想に反して改善効果が認められなかった。当時用いた大豆抽出物は青大豆であったことから、大豆の品種によって脂肪肝形成改善効果に違いがあると考えられた。

本研究では、前述した *in vitro* 脂肪肝形成モデルに対して、大豆の品種による改善効果の差異を検証し、脂肪肝形成改善効果がより期待できる大豆の品種を見出すことを目的とした検証を行った。

方 法

大豆抽出物の調製

種皮の色や産地の異なる9種類の市販されている大豆〔丹波黒豆 (兵庫県)、光黒 (北海道)、黒千石 (岩手県)、紅大豆 (山形県)、茶豆 (秋田県)、鞍掛豆 (長野県)、ひたし豆 (福島県)、とよまさり (北海道)、鶴の子 (北海道)] を準備した。各大豆10 gを秤量してミルで破碎し、60%エタノール30 mL中に室温で一晩浸した後、上清をフィルター濾過した各大豆抽出物を作製した。

in vitro 脂肪肝形成モデル

ヒト初代培養肝細胞 (ACBRI3716細胞) を無血清培地にて培養後、0.5 mMリノール酸 (LA) を添加して24時間培養することで、細胞内に顕著な脂肪滴蓄積を認める *in vitro* 脂肪肝形成モデルにて検証を行った。

脂肪染色および細胞内脂質濃度の測定

ACBRI3716細胞にLAを添加すると同時に各大豆抽出物を1% (v/v) 添加して24時間培養した。培養後、Oil Red O染色を行い、細胞内への脂肪滴蓄積を光学顕微鏡にて観察して評価した。

同様に、LAおよび各大豆抽出物を添加して培養した細胞を回収後、Folch法により細胞内脂質を抽出し、市販のキットを用いてTG、遊離脂肪酸 (NEFA)、総コレステロール (T-Cho)、リン脂質 (PL) および総胆汁酸 (TBA) 濃度を測定した。

脂質代謝関連因子のmRNA発現量の解析

ACBRI3716細胞にLAおよび大豆抽出物を添加して24時間培養後、ISOGENを添加して細胞を回収し、total RNAを抽出した。逆転写反応を行いcDNA合成後、脂質代謝関連因子のmRNA発現変動をリアルタイムPCR法にて解析した。

脂質代謝関連因子のたん白質発現量の解析

ACBRI3716細胞にLAおよび大豆抽出物を添加して24時間培養後、回収した細胞より核たん白質を抽出した。SDS-PAGEにてたん白質を分離してPVDF膜に転写後、各脂質代謝関連因子のたん白質レベルをウェスタンブロット法にて解析した。

統計解析

データは平均値±標準誤差で示した。また、各群間の有意差は、Student's *t*-testまたはTukey-Kramerにより検定を行い、 $p < 0.05$ で有意差ありとした。

結果と考察

LA負荷による細胞内脂肪滴蓄積に対する各大豆抽出物の効果

まず、ACBRI3716細胞へのLA負荷による細胞内脂肪滴蓄積に対し、9種類の各大豆抽出物の改善効果のスクリーニングを行った。

脂肪染色による形態観察を行ったところ、丹波黒豆や光黒などの黒色系大豆において、脂肪滴の小型化が認められた (Fig. 1)。

LAおよび各大豆抽出物処理した細胞内の脂質濃度を測定した結果をTable 1に示した。脂肪滴の主要成

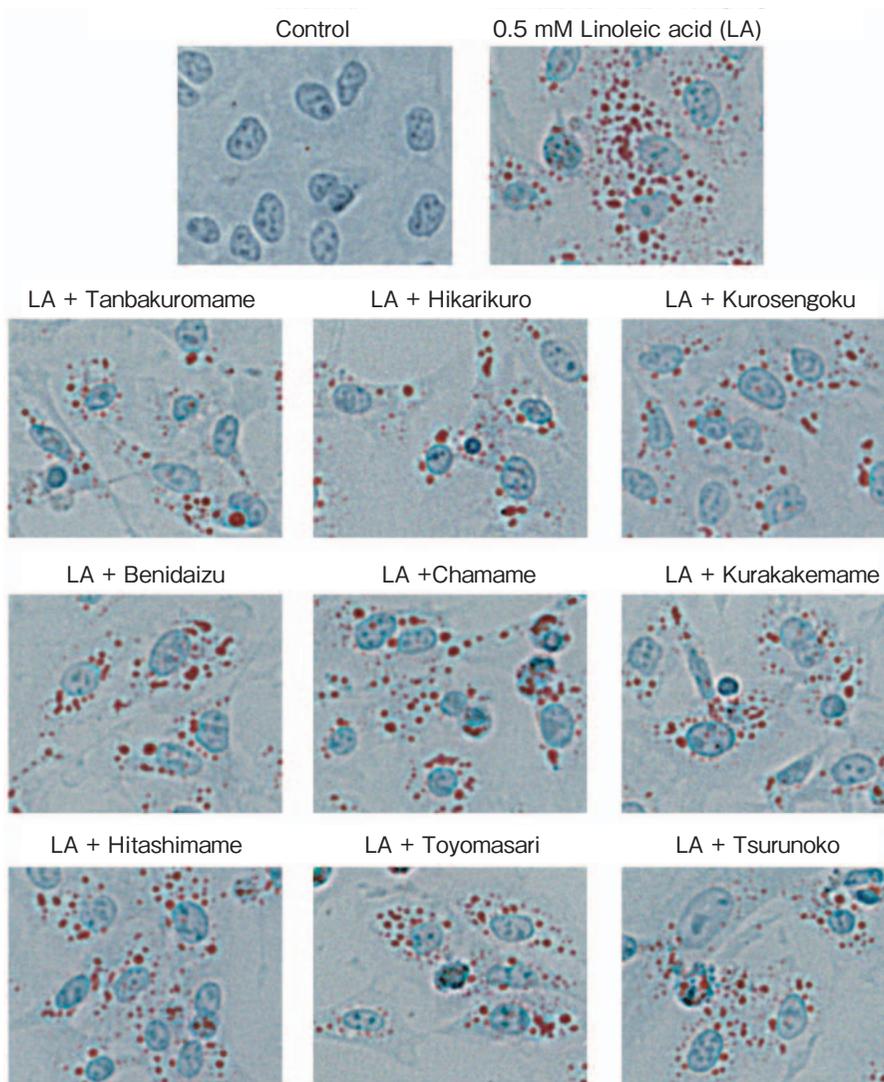


Fig. 1. Effect of several soybean extracts on linoleic acid-induced hepatosteatosis in human primary hepatocytes ACBRI3716 cells. Cells were fixed with formalin and stained using Oil Red O and Mayer's hematoxylin. Intracellular lipid droplets were stained in red, and nuclei were stained in blue.

Table 1. Lipid concentration of ACBRI3716 cells treated with linoleic acid and soybean extract.

	0.5 mM linoleic acid											
	-	-	Tanbakuromame	Hikarikuro	Kurosengoku	Benidaizu	Chamame	Kurakakemame	Hitashimame	Toyomasari	Tsurunoko	
TG (mg/g protein)	143.0±16.3	569.5±21.4	499.4±7.3*	514.2±62.7	693.8±23.2*	717.1±78.8	636.2±16.9*	642.0±43.5	574.0±17.6	548.5±28.5	637.5±69.8	
NEFA (mEq/g protein)	0.10±0.01	0.21±0.01	0.26±0.02*	0.25±0.02	0.29±0.01*	0.30±0.03*	0.25±0.01*	0.25±0.01*	0.25±0.02	0.25±0.01*	0.26±0.01*	
T-Chol (mg/g protein)	96.6±6.2	149.6±5.0	151.9±3.9	151.5±13.1	188.2±5.6*	167.6±11.6	169.2±4.3*	140.8±7.9	134.1±4.9	148.4±1.7	152.3±4.9	
PL (mg/g protein)	704.3±23.8	677.3±6.7	686.3±12.7	711.9±13.4	747.7±11.1*	719.4±11.7*	785.8±13.8*	763.4±22.1*	700.6±9.9	691.1±7.3*	692.7±10.8	
TBA (mM/g protein)	5.06±0.23	5.50±0.14	7.71±0.72*	6.98±0.40*	6.17±0.31	6.48±0.38	6.16±0.44	7.01±0.42*	6.45±0.11*	4.50±0.14*	4.11±0.17*	

* $p < 0.05$ versus 0.5 mM linoleic acid.

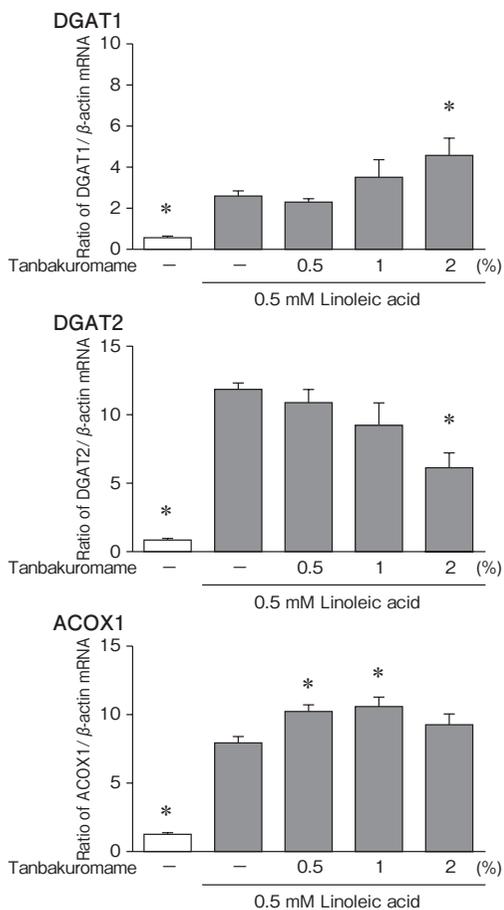


Fig. 2. Effect of Tanbakuromame extract on mRNA expression of fatty acid catabolism enzymes DGAT1, DGAT2 and ACOX1 in ACBRI3716 cells. Each value is expressed as mean \pm SEM. The asterisks indicate significant differences from 0.5 mM linoleic acid-treated cells ($p < 0.05$). DGAT, diacylglycerol acyltransferase; ACOX1, acyl-CoA oxidase.

分であるTG濃度は、丹波黒豆のみ有意な低下が認められた。一方、他の大豆では、逆にTG濃度が上昇した品種もあった。NEFA, T-ChoおよびPLの各濃度は、LA負荷した際と比較して変化なし、または逆に有意に上昇させた品種が多かった。またTBA濃度は、丹波黒豆や光黒などの黒色系大豆、また鞍掛豆やひたし豆などの青色系大豆において、有意な上昇が認められた。

本スクリーニングの結果、丹波黒豆が、形態学的に脂肪滴蓄積を軽減し、細胞内TG濃度を有意に減少したことから、脂肪肝形成改善効果が最も高い品種であると考えられた。

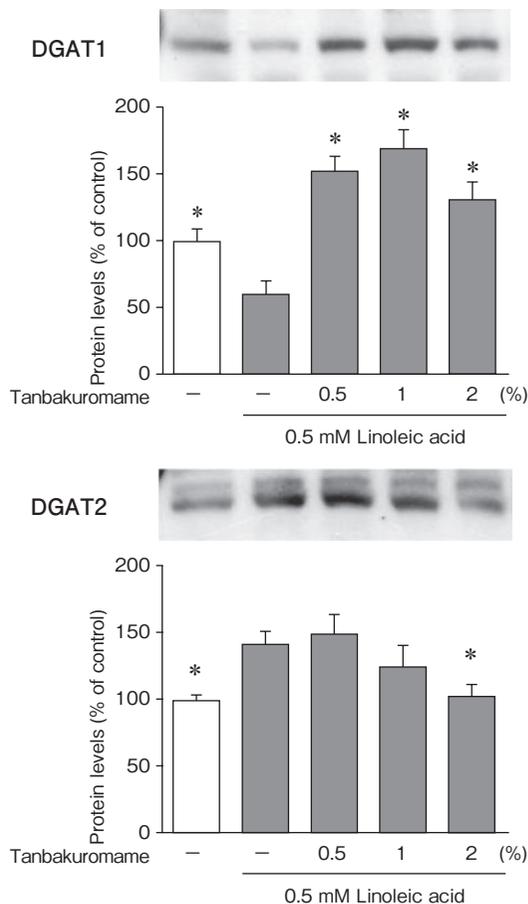


Fig. 3. Western blots and quantifications of DGAT1 and DGAT2 protein content from ACBRI3716 cells treated with 0.5 mM linoleic acid and Tanbakuromame. Each value is expressed as mean \pm SEM. The asterisks indicate significant differences from 0.5 mM linoleic acid-treated cells ($p < 0.05$). DGAT, diacylglycerol acyltransferase.

脂肪酸代謝関連因子の発現変動に対する丹波黒豆の効果

脂肪酸代謝関連酵素のmRNA発現変動に対する丹波黒豆の効果としては、TG合成酵素であるdiacylglycerol acyltransferase (DGAT) 1を増加させ、逆にDGAT2を減少させた (Fig. 2)。また、DGAT1, 2のたん白質発現に関してもmRNA発現と同様の傾向を示した (Fig. 3)。肝臓において、DGAT1はVLDL産生に、DGAT2は脂肪滴形成に関与する⁴⁾ことが報告されており、丹波黒豆がDGATs発現調節を介したTG合成抑制作用により、脂肪滴蓄積を改善したと考えられた。

また丹波黒豆は、 β 酸化関連酵素であるacyl-CoA oxidase (ACOX1) のmRNA発現を増加させた (Fig. 2)。さらにACOX1 mRNA発現を調節するperoxisome proliferator-activated receptor (PPAR) α は、丹波黒豆によって核内たん白質レベルが増加した (Fig. 4)。sterol regulatory element-binding protein (SREBP) 1 は、LA処理により活性型たん白質レベルが減少したが、丹波黒豆により正常レベルまで回復傾向が認められた (Fig. 4)。よって、丹波黒豆は、肝臓への過剰な脂肪酸供給に対して、 β 酸化を亢進させて脂肪酸異化経路を活性化すると考えられた。

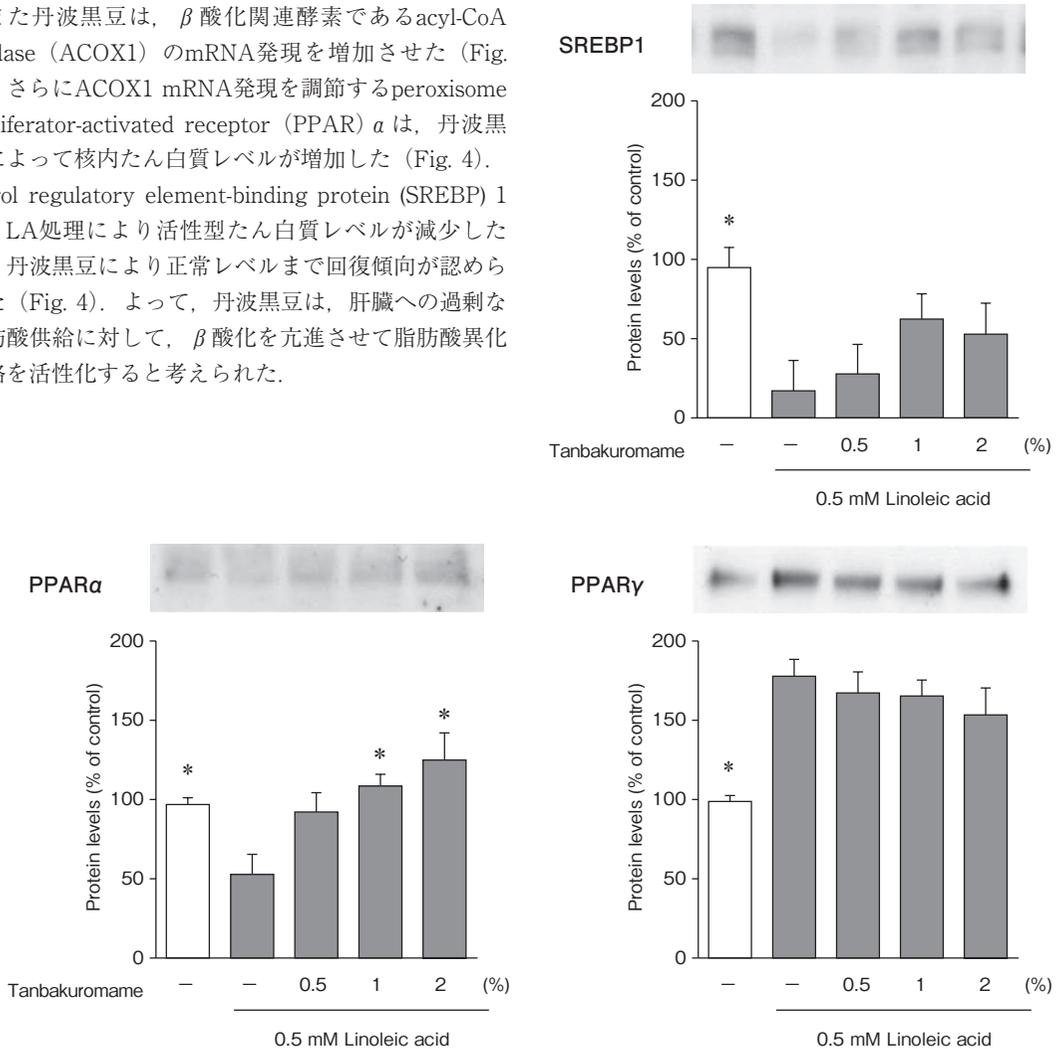


Fig. 4. Western blots and quantifications of PPAR α , PPAR γ and SREBP1 protein content from ACBRI3716 cells treated with 0.5 mM linoleic acid and Tanbakuromame. Each value is expressed as mean \pm SEM. The asterisks indicate significant differences from 0.5 mM linoleic acid-treated cells ($p < 0.05$). PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor; SREBP, sterol regulatory element-binding protein.

コレステロール代謝関連因子の発現変動に対する丹波黒豆の効果

コレステロール代謝関連酵素のmRNA発現変動に対する丹波黒豆の効果としては、胆汁酸合成の律速酵素であるcholesterol 7 α -hydroxylase (CYP7A1) およびsterol-12 α -hydroxylase (CYP8B1) を増加させた (Fig. 5)。次に、CYP7A1およびCYP8B1 mRNA発現調節を行うliver X receptor (LXR) α およびfarnesoid X receptor (FXR) は、丹波黒豆により両者ともたん白質レベルが増加した (Fig. 6)。また、SREBP2は、LA

処理により活性型たん白質レベルが増加したが、丹波黒豆によって正常レベルまで戻る傾向が認められた (Fig. 6)。

本研究において、様々な大豆の中でも丹波黒豆が、脂肪肝形成改善効果を有することを見出した。その作用機構として、肝臓への過剰な脂肪酸供給に対して転写因子レベルから調節作用を示し、脂肪酸プール調節とコレステロール代謝異化経路の活性化を介して脂質ホメオスタシスを正常に維持する可能性が示唆された。

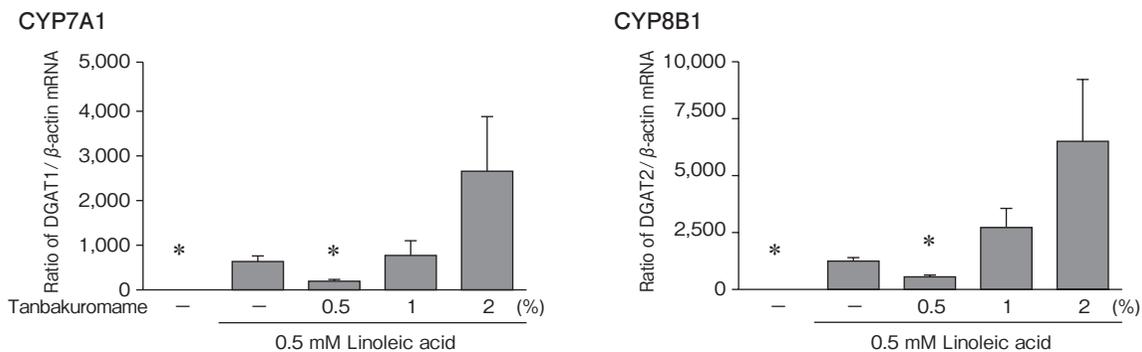


Fig. 5. Effect of Tanbakuromame extract on mRNA expression of cholesterol catabolism enzymes CYP7A1 and CYP8B1 in ACBRI3716 cells. Each value is expressed as mean \pm SEM. The asterisks indicate significant differences from 0.5 mM linoleic acid-treated cells ($p < 0.05$). CYP7A1, cholesterol 7 α -hydroxylase; CYP8B1, sterol-12 α -hydroxylase.

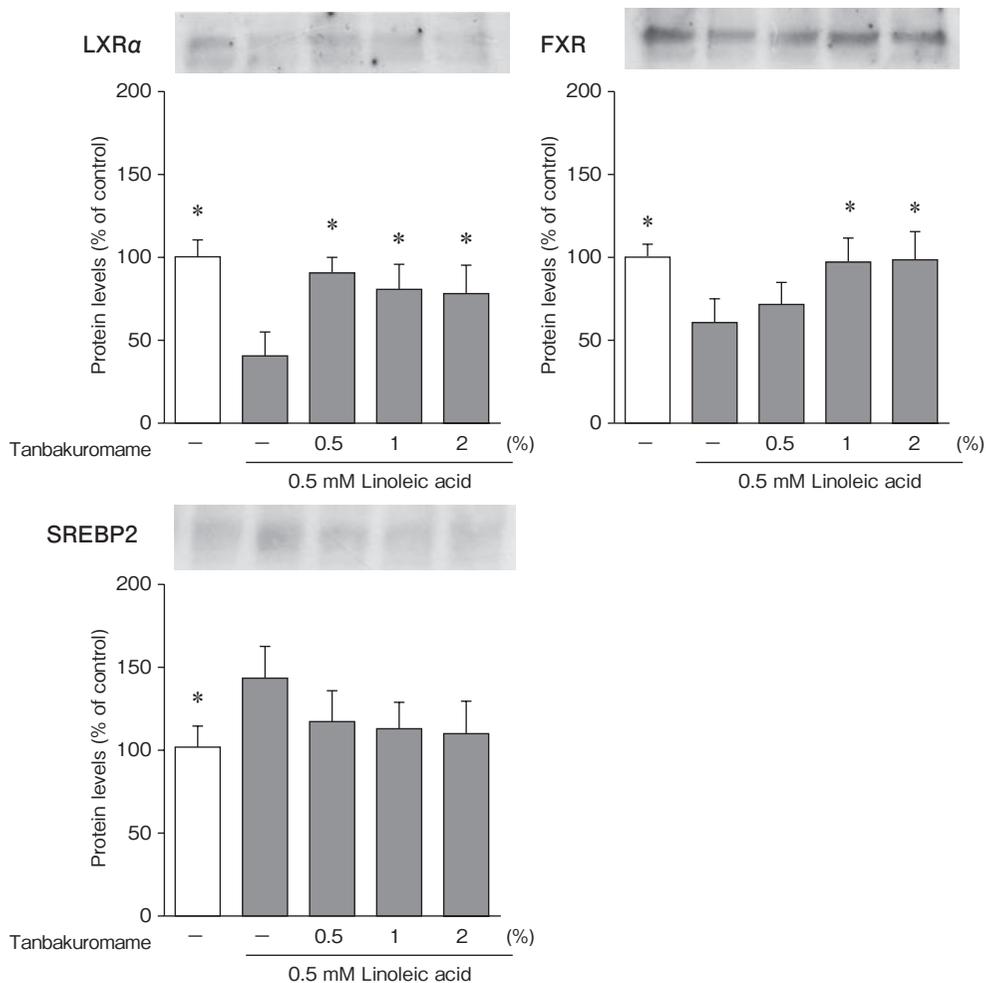


Fig. 6. Western blots and quantifications of LXR α , FXR and SREBP2 protein content from ACBRI3716 cells treated with 0.5 mM linoleic acid and Tanbakuromame. Each value is expressed as mean \pm SEM. The asterisks indicate significant differences from 0.5 mM linoleic acid-treated cells ($p < 0.05$). LXR, liver X receptor; FXR, farnesoid X receptor; SREBP, sterol regulatory element-binding protein.

要 約

本研究では、大豆の品種による脂肪肝形成改善効果の差異を検討し、有用性の高い大豆の品種を見出すことを目的とした検証を行った。ヒト初代培養肝細胞を用いた*in vitro*脂肪肝形成モデルに対し、9品種の大豆抽出物を添加した。丹波黒豆は、細胞内に蓄積した脂肪滴を小型化し、細胞内TG濃度を有意に低下させた。そこで、丹波黒豆による脂肪滴蓄積抑制作用機構を検証したところ、DGAT2発現抑制およびACOX1発現亢進、またCYP7A1およびCYP8B1発現亢進など胆汁酸合成促進が寄与すると考えられた。さらに丹波黒豆は、上記の脂質代謝関連酵素発現を調節するPPAR α 、LXR α 、FXRおよびSREBPsの発現・活性化の調節作用を有することを見出した。本研究により、大豆の中でも丹波黒豆が、脂肪肝形成改善効果を有することを見出した。その作用機構としては、肝臓への過剰な脂肪酸供給に対して転写因子レベルから調節作用を示し、脂肪酸プール調節とコレステロール代謝異化経路の活性化を介して、脂質ホメオスタシスを正常に維持する可能性が示唆された。

文 献

- 1) Kohno M, Hirotsuka M, Kito M and Matsuzawa Y (2006): Decrease in serum triacylglycerol and visceral fat mediated by dietary soybean β -conglycinin. *J Atheroscler Thromb*, **13**, 247-255.
- 2) Velasquez MT and Bhathena SJ (2007): Role of dietary soy protein in obesity. *Int J Med Sci*, **4**, 72-82.
- 3) Torre-Villalvazo I, Tovar AR, Ramos-Barragán VE, Cerbón-Cervantes MA and Torres N (2008): Soy protein ameliorates metabolic abnormalities in liver and adipose tissue of rats fed a high fat diet. *J Nutr*, **138**, 462-486.
- 4) Yamazaki T, Sasaki E, Kakinuma C, Yano T, Miura S and Ezaki O (2005): Increased very low density lipoprotein secretion and gonadal fat mass in mice overexpressing liver DGAT1. *J Biol Chem*, **280**, 21506-21514.