

大豆イソフラボンの肝臓脂肪低下および 脂肪組織重量低下作用の検証と機構解析

堀尾文彦*

名古屋大学大学院生命農学研究科

Analysis of Lowering Effect of Isoflavones on Fat Tissue Weight, Liver Triglycerides, and Serum Triglycerides Concentration in C3H/HeN Mice

Fumihiko HORIO*

Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University, Nagoya 464-8601

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the effect of dietary soy isoflavones on fat tissue weights, liver fat accumulation and serum triglyceride concentrations. Male C3H/HeN mice were fed AIN93G diet (AIN group) or AIN93G diet supplemented with 400 ppm soy isoflavones (AIN+ISO group) for 12 weeks. From week 7 to week 12, body weight in the AIN+ISO group was significantly lower than that in the AIN group, but food intake was equivalent in both groups during the course of the experiment. Serum triglyceride concentrations and insulin concentrations were lower in the AIN+ISO group than the respective values in the AIN group. However, the hepatic triglyceride content did not differ between these two groups. Hepatic SREBP-1 mRNA levels and epididymal fat tissue lipoprotein lipase (LPL) mRNA levels were significantly lower in the AIN+ISO group than the respective values in the AIN group. These results indicate that dietary addition of 400 ppm soy isoflavones decreases fat tissue weight, and suggest that dietary soy isoflavones reduce serum triglyceride concentrations via the suppression of fatty acids synthesis in the liver by lowering serum insulin concentrations. *Soy Protein Research, Japan* **16**, 86-91, 2013.

Key words : Isoflavones, Serum triglycerides concentration, Fat tissue weight, Liver fat

*〒464-8601 名古屋市千種区不老町

結果と考察

我々は以前に、内分泌かく乱物質の低容量影響のリスク評価を可能にするマウスを用いた動物実験系の確立を進めていた。通常のマウス繁殖用飼料中には植物エストロゲンである大豆イソフラボンが300～500 ppm含まれていることから、この飼料を用いて低容量の内分泌かく乱物質の繁殖に及ぼす影響を正確に評価することは困難である。そこで、イソフラボン等を含有しないAIN93G飼料¹⁾と、AIN93Gに大豆イソフラボンを500 ppm添加した飼料を与える群と、通常マウス繁殖飼料を与える群を加えた3群で、親にこれらの飼料を与えて交配して仔の21日齢までの生存率を測定した。その結果、妊娠率と仔の生存率に3群間で有意な差はなく、マウスの繁殖率および仔の生存率に及ぼす内分泌かく乱物質の低容量影響を検討する実験系としてAIN93G飼料を与える実験系を提唱できた。その実験の中で、親マウスのイソフラボン添加飼料を摂取する群ではAIN93G群に比べて、血中トリグリセリド濃度と脂肪組織重量が低下する可能性が示された。

そこで、イソフラボンのこの興味ある作用を検証するべく、本研究では、このイソフラボンの作用の詳細な検証と機構解析を目的として、C3H/HeNマウスを用いて、通常繁殖用飼料に存在する濃度である400 ppmの大豆イソフラボンを含む飼料を摂取した際の、脂肪組織重量、肝臓脂質含量、血中脂質濃度の変化に着目して実験を行った。

方法

実験1：

6週齢、雄のC3H/HeNマウス（日本クレア（株））を用いて、AIN-93G飼料を与える群（AIN群, 11匹）と、AIN93Gに大豆イソフラボン（和光純薬）を400 mg/kg添加した飼料を与える群（AIN+ISO群, 10匹）とを設けて、12週間飼育した。全期間を通して飼料摂取量と体重変化を測定した。また、経時的に血糖値、血中トリグリセリド濃度、血中インスリン濃度などを測定した。

実験2：

実験1と同じマウスを用いて、高脂肪食（AINに20%ラード添加）を与える群（10匹）と、高脂肪食に大豆イソフラボンを400 mg/kg添加した飼料を与える群（10匹）とを設けて、12週間飼育した。実験1と同様の測定を行った。

実験1：

実験期間中、両群の飼料摂取量は全く同等であった（Fig. 1A）。しかし、7週目以降、AIN+ISO群の体重はAIN群よりも有意な低値を示した（Fig. 1B）。12週目の解剖時には、皮下脂肪、精巣上体脂肪、腸間膜脂肪組織重量がAIN+ISO群で低値を示した（Table 1）。これらのことにより、AIN93G飼料摂取下において、大

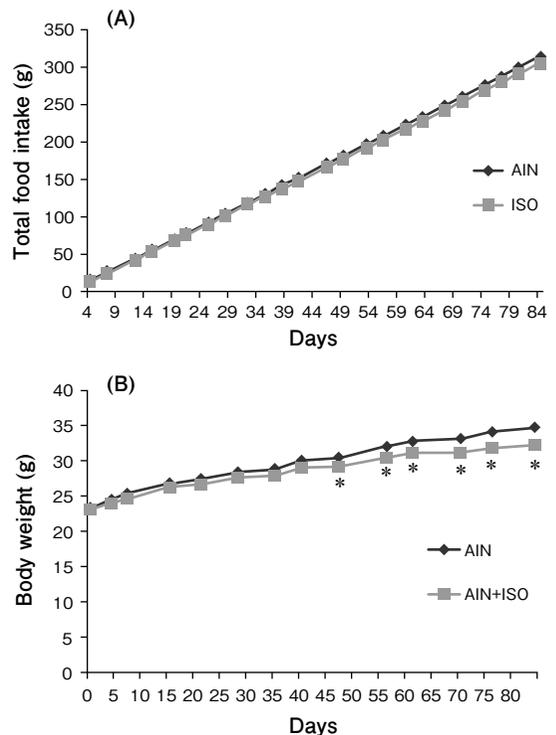


Fig. 1. Food intake (A) and growth (B) in the AIN and AIN+ISO group. *, $p < 0.05$ by Student's t test.

Table 1. Liver weight, fat tissue weights, and pancreas weight in the AIN and AIN+ISO group. *, $p < 0.05$ by Student's t test.

Parameter	AIN (n=11)	AIN+ISO (n=10)
Tissue weights (g/100 g body weight)		
Liver	3.83 ± 0.08	4.05 ± 0.08
Subcutaneous fat	2.14 ± 0.09	1.81 ± 0.10*
Epididymal fat	3.06 ± 0.07	2.62 ± 0.11**
Mesenteric fat	1.46 ± 0.05	1.26 ± 0.06*
Retroperitoneal fat	0.60 ± 0.03	0.61 ± 0.02
Interscapular BAT	0.72 ± 0.03	0.58 ± 0.02**
Pancreas	0.60 ± 0.02	0.62 ± 0.03

*: $p < 0.05$ by Student's t test.

豆イソフラボン摂取（400 ppm添加飼料摂取）は飼料摂取量を変えずに皮下脂肪組織および内臓脂肪組織の重量低下作用を持つことが示された。

血中脂質濃度を測定した結果、3週目、6週目、12週目において、AIN+ISO群では血中トリグリセリド濃度はAIN群に比べて低値を示した（Fig. 2A）。血中コレステロール濃度は両群間で差がなかった（Fig. 2B）。血中インスリン濃度は、AIN+ISO群で7週目に低下傾向が観察され、12週目では有意に低下した（Fig. 3）。血糖値は3、6、9、12週目ともにAIN+ISO群で低下傾向はあるものの有意な差ではなかった。これらの結果から、大豆イソフラボン摂取は血中トリグリセリド濃度を低下させることが明らかになり、この低下は脂肪組織重量の減少に貢献していることが推定される。大豆イソフラボンが血中トリグリセリド濃度を低下させる報告例は少ないが、ラットにイソフラボン添加飼料を5週間摂取させた時に血中トリグリセリド濃度が低下する報告²⁾がある。肝臓での脂肪合成を促進するインスリンの血中濃度がAIN+ISO群で低下したことが血中トリグリセリド濃度の低下に繋がっていることが推定される。イソフラボンの摂取が血中インスリン濃

度を低下させる理由としては、末梢組織のインスリン感受性の上昇が考えられる。大豆たん白質をラットに摂取させた場合に、血中インスリン濃度が低下することが報告されており^{3,4)}、大豆イソフラボンがこの大豆たん白質の作用に貢献していると推定される。

肝臓の重量は両群間で差がなかった（Table 1）。肝臓の総脂質およびトリグリセリド濃度はAIN+ISO群で低下することを期待したが、両群間で差がなかった（Table 2）。

Table 2. Hepatic concentrations of triglyceride, total cholesterol, and total lipids in the AIN and AIN+ISO group. *, $p < 0.05$ by Student's t test.

Parameter	AIN (n=11)	AIN+ISO (n=10)
Liver lipids (mg/g liver)		
Triglycerides	16.7 ± 0.9	15.7 ± 0.8
Total cholesterol	2.95 ± 0.05	3.02 ± 0.07
Total lipid	47.7 ± 1.7	47.0 ± 1.3

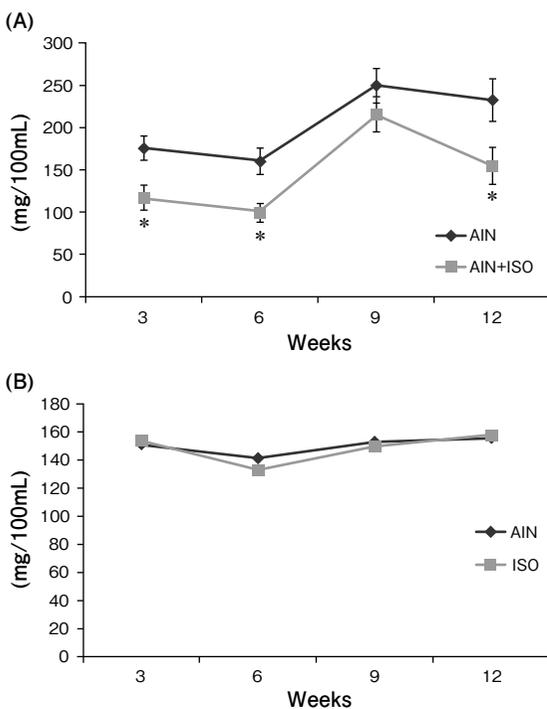


Fig. 2. Time course of serum triglyceride concentration (A) and serum total cholesterol concentration (B) in the AIN and AIN+ISO group. *, $p < 0.05$ by Student's t test.

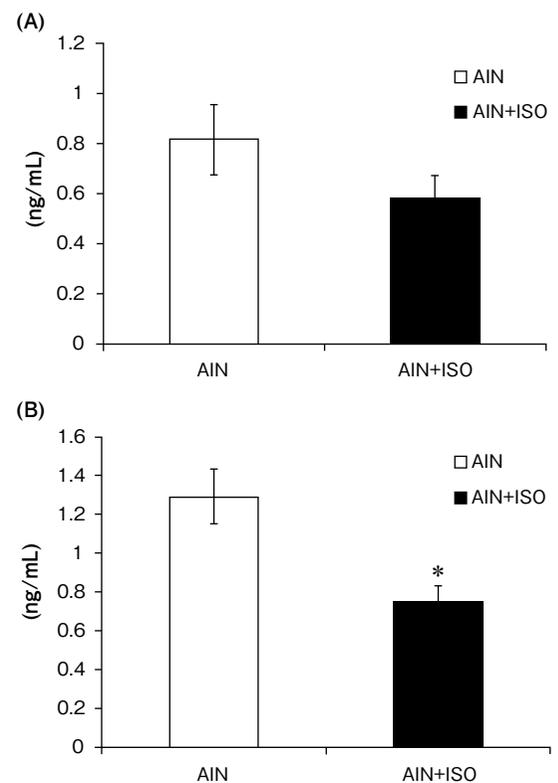


Fig. 3. Serum insulin concentrations at 7 weeks (A) and 12 weeks (B) of the course of experiment in the AIN and AIN+ISO group. *, $p < 0.05$ by Student's t test.

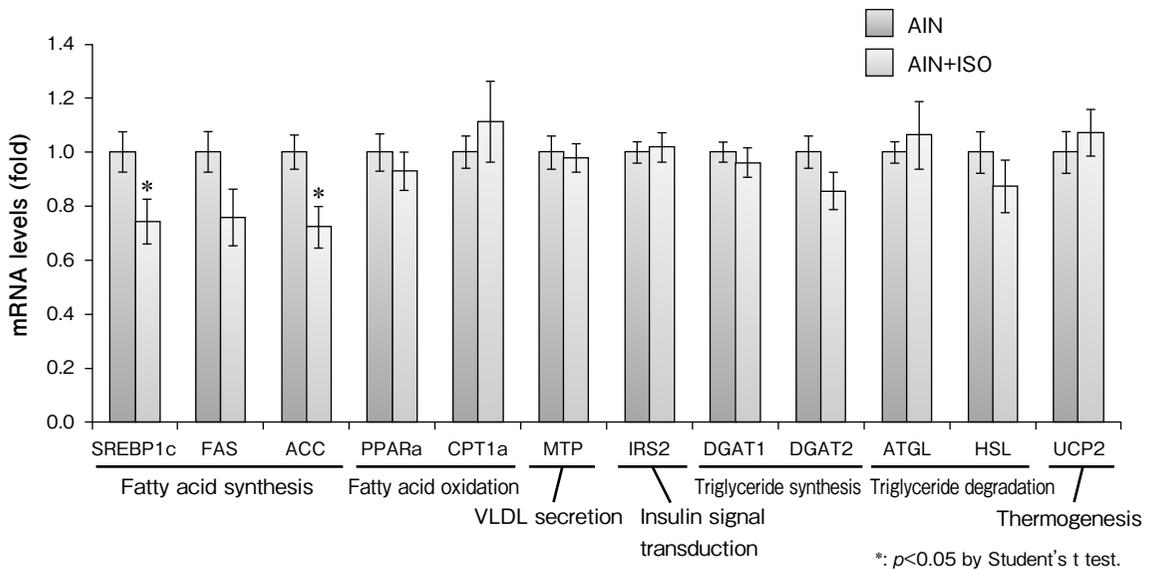


Fig. 4. Hepatic mRNA levels of genes relating to triglyceride metabolism in the AIN and AIN+ISO group. *, $p < 0.05$ by Student's t test.

しかし、肝臓での脂質代謝関連遺伝子の変動は期待されることから、それらのmRNAレベルを測定した結果、脂肪酸合成系のSREBP-1、ACCのmRNAレベルがAIN+ISO群で有意に低下していた (Fig. 4)。そのほかの脂質代謝関連遺伝子のmRNAレベルの変化は観察されなかった。SREBP-1 mRNAレベルはインスリンにより上昇し⁵⁾、AMPKにより低下する^{6,7)}。両群の活性型AMPKレベルを測定したが、差は観察されなかった (Fig. 5)。SREBP-1 mRNAレベルは血中インスリンに正に制御されていることから、大豆イソフラボンによる血中インスリン濃度の低下が肝臓のSREBP-1 mRNAレベルを低下させていることが推定され、肝臓での脂肪酸合成の抑制が起こっていることが考えられた。

脂肪組織の脂肪酸合成、脂肪合成・分解、脂質取り込み、インスリン抵抗性に関連した遺伝子のmRNAレベルを測定した中で、lipoprotein lipase (LPL) のレベルがAIN+ISO群で低下していた (Fig. 6) このことは、大豆イソフラボン摂取が血中から脂肪組織への脂肪酸の取り込みを低下させていることを示唆している。AIN+ISO群では早期から血中トリグリセリド濃度が低いことと合わせると、脂肪組織への脂肪酸取り込み低下の可能性は高い。一方、脂肪組織およびその他の抹消組織のインスリン抵抗性を惹起するアディポサイトカインであるTNF- α ⁸⁾ のmRNAレベルがAIN+ISO群で有意に低下していた。今後、血中のTNF- α 濃度を

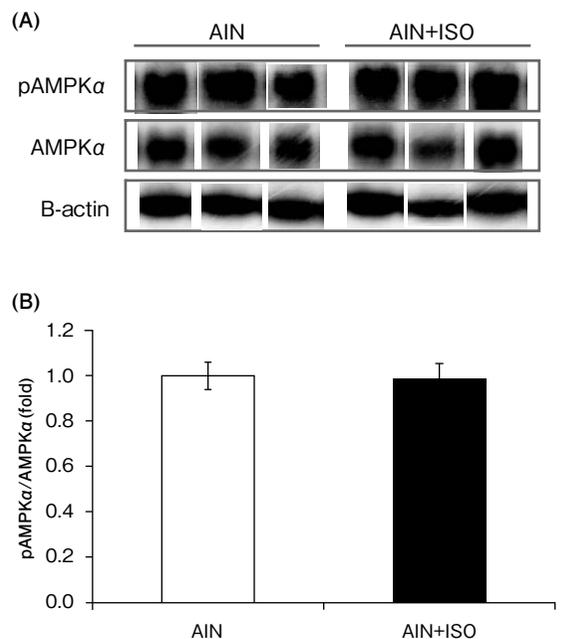


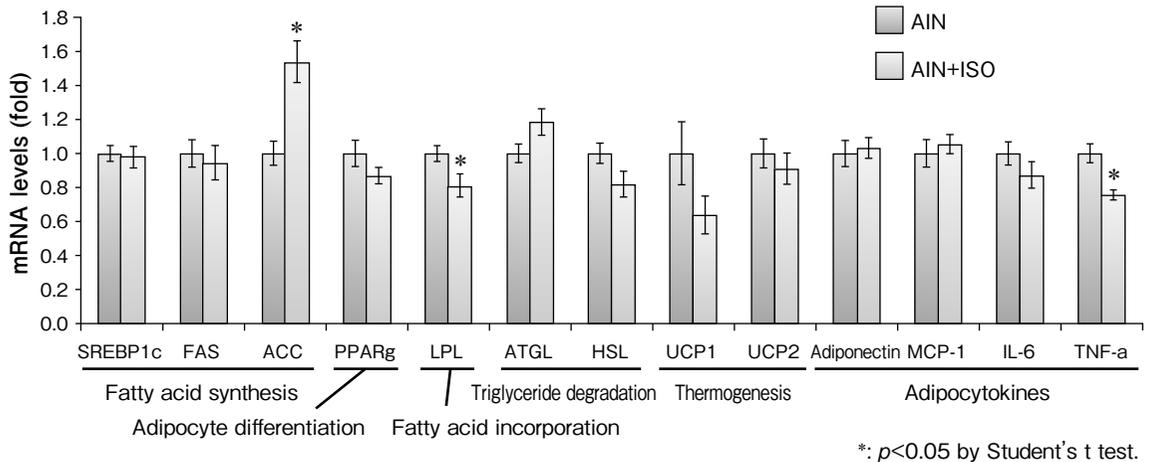
Fig. 5. AMPkinase (AMPK) protein levels and phosphorylated AMPK levels in the AIN and AIN+ISO group.

測定することにより、この低下が血中インスリン濃度の低下に繋がっている可能性を確かめる必要がある。

実験2：

20%ラードを含む高脂肪食を12週間摂取させたこの実験において、大豆イソフラボンの抗肥満効果を期待したが、脂肪組織重量に変化は観察されなかった。ま

た、大豆イソフラボン摂取の血中トリグリセリド濃度および血中インスリン濃度の低下作用も観察されなかった。このように高脂肪食の摂取により肥満とインスリン抵抗性が強く誘導された場合には、大豆イソフラボンの実験1で見られた作用の発現には至らないことが推察された。



*: $p < 0.05$ by Student's t test.

Fig. 6. Epididymal fat tissue mRNA levels of genes relating to triglyceride metabolism in the AIN and AIN+ISO group. *, $p < 0.05$ by Student's t test.

要 約

マウスの通常の繁殖用飼料に含まれるレベルの低濃度 (400 ppm) の大豆イソフラボンを AIN93G飼料に添加してC3H/HeNマウスに与えた結果 (AIN+ISO群), 対照群であるAIN群 (AIN93G飼料) に比べて皮下脂肪および内臓脂肪組織重量が低下作用が観察された。また、血中トリグリセリド濃度および血中インスリン濃度もイソフラボン摂取によってAIN群に比べて有意な低値が観察された。肝臓の脂肪酸合成系のSREBP-1およびACCのmRNAレベルがAIN+ISO群で低下しており、これらの低下は血中インスリン濃度の低下によるものと推定された。大豆イソフラボンの摂取はインスリン感受性を向上させることにより血中インスリン濃度を低下させ、このことが血中トリグリセリド濃度の低下と脂肪組織重量の低下とをもたらす要因の一つであると推定された。

文 献

- 1) Reeves PG, Nielsen FH and Fahey GC (1993): AIN-93 purified diets for laboratory rodents: Final report of the American Institute of nutrition Ad Hoc writing committee on the reformation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr*, **123**, 1939-1951.
- 2) Kawakami Y, Tsurugasaki W, Yoshida Y, Igarashi Y, Nakamura S and Osada K (2004): Regulative actions of dietary soy isoflavone on biological antioxidative system and lipid metabolism in rats. *J Agric Food Chem*, **24**, 1764-1768.
- 3) Noriega-López L, Tovar AR, Gonzalez-Granillo M, Hernández-Pando R, Escalante B, Santillán-Doherty P and Torres N (2007): Pancreatic insulin secretion in rats fed a soy protein high fat diet depends on the interaction between the amino acid pattern and isoflavones. *J Biol Chem*, **282**, 20657-20666.
- 4) Ascencio C, Torres N, Isoard-Acosta F, Gómez-Pérez FJ, Hernández-Pando R and Tovar AR (2004): Soy protein affects serum insulin and hepatic SREBP-1 mRNA and reduces fatty liver in rats. *J Nutr*, **134**, 522-529.
- 5) Fleischmann M and Iynedjian PB (2000): Regulation of sterol regulatory-element binding protein 1 gene expression in liver: role of insulin and protein kinase B/cAkt. *Biochem J*, **349**, 13-17.
- 6) Yang J, Craddock L, Hong S and Liu ZM (2009): AMP-activated protein kinase suppresses LXR-dependent sterol regulatory element-binding protein-1c transcription in rat hepatoma McA-RH7 cells. *J Cell Biochem*, **106**, 414-426.
- 7) Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, Wu M, Ventre J, Doebber T, Fujii N, Musi N, Hirshman MF, Goodyear LJ and Moller DE (2001): Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest*, **108**, 1167-1174.
- 8) Hotamisligil GS, Shargill NS and Spiegelman BM (1993): Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science*, **259**, 87-91.