

大豆イソフラボンの免疫調節作用を標的とした 新たな抗肥満・糖尿病療法

堤 理恵*・首藤恵泉・喜岡美久・酒井 徹

徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部実践栄養学分野

A Novel Treatment of Anti-Obesity and Diabetes by Targeting Immune Regulation of Soy Isoflavone

Rie TSUTSUMI*, Emi SHUTO, Miku KIOKA and Tohru SAKAI

Department of Public Health and Applied Nutrition, Institute of Health Biosciences,
The University of Tokushima Graduate School, Tokushima 770-8503

ABSTRACT

Metabolic syndrome is the underlying factor process in critical disorders such as diabetes, diabetes, stroke, etc. Recently it was reported that T cell-infiltrated into adipose tissues regulated differentiation of macrophages, so macrophages cause chronic inflammation in adipose tissue and the whole body. We previously reported the immune function of soy isoflavone. In this study, we examined the effects of equol on inflammation in diet induced-obese mice. Groups of mice were administered to vehicle or equol. The doses of equol used were 20 mg/kg body/day. There was no difference between the two groups in body weight. However, mice administered equol showed a ameliorated lipid metabolism, and a declining trend in accumulation of body fat. In addition, mice administered equol had significantly inhibited expression of gene-associated macrophage. Thus, it is suggested that equol might possibly prevent metabolic syndrome. *Soy Protein Research, Japan* **16**, 156-161, 2013.

Key words : Inflammation, equol, metabolic syndrome, macrophage

大豆はたん白質が豊富な食材として知られているとともに¹⁾、古くから日本人の食生活に活用されてきた。大豆イソフラボンの生理機能に関しては、骨粗鬆症²⁾、乳癌³⁾、心血管疾患⁴⁾ のリスクを下げるなど、脂質代謝、骨代謝および悪性腫瘍に対する影響に関する研究が世

界中で行われている。しかしながら、大豆成分と免疫機能に関する研究は少ないのが現状である。

現在、日本人男性の2人に1人、女性では5人に1人がメタボリックシンドロームあるいはその予備群であるとされている。メタボリックシンドロームは、糖尿病や脳梗塞等の重篤な疾患に進展する基礎疾患であり、我が国の重要な健康問題となっている。エネルギー

*〒770-8503 徳島市蔵本町3-18-15

ギー過剰状態は、全身の慢性炎症を引き起こし、脂肪組織においてはTNF- α やIL-6といった炎症性サイトカインの発現が亢進し、インスリン抵抗性に促進的に働き糖尿病発症につながる。これら炎症性サイトカインは、肥大化した脂肪細胞よりもむしろそこに浸潤してきたマクロファージにより由来する⁵⁾。近年、免疫細胞のT細胞が肥満・メタボリックシンドロームの根本的な病態制御機構を司るという衝撃的な報告がなされた。これは、脂肪組織に浸潤したT細胞が炎症性マクロファージの分化を調節し、その結果、脂肪組織および全身の慢性炎症を決定づけることを示したものであり、実際に脂肪組織の悪玉T細胞を除去することで、全身の慢性炎症が改善し、インスリン抵抗性が改善する⁶⁾。これまで我々は、大豆に含まれる生理活性物質である大豆イソフラボンとT細胞機能に関する研究を行い、免疫調節作用があることを見出してきた^{7,8)}。そこで、本研究では、これまで我々が明らかにしてきた大豆イソフラボンの免疫調節作用を基に、脂肪組織に浸潤するT細胞に焦点を絞り、大豆イソフラボンが脂肪組織における免疫細胞にどのように制御し、全身の慢性炎症に影響するのかを検討した。

方 法 結 果

実験デザイン

4週齢の雄C57BL/6Jマウスを、コントロール群とエクオール投与群に分け、脂質エネルギー比60%の高脂肪食HFD-60（オリエンタル酵母）で16週飼育した。餌は自由摂取とし、エクオールは20 mg/kg/dayとなるように調整し、ゾンデにて毎日経口投与を行った。

糖代謝評価

エクオール投与開始12週目に経口ブドウ糖負荷試験（OGTT: Oral Glucose Tolerance Test）を行った。18時間絶食後、ブドウ糖1.5 g/kg体重を経口投与した。0, 30, 60, 120分後に尾静脈より血液を採取し、血糖を測定した。

エクオール投与開始15週目にインスリン負荷試験（ITT: Insulin Tolerance Test）を行った。8時間絶食後、インスリン0.75 U/kg体重を腹腔内投与し、0, 30, 60, 90, 120分後に同様に測定した。曲線下面積（AUC: Area Under Curve）は、線形台形法にて求めた。

CT撮影

解剖前日にALOKAラシータ（日立アロカメディカル株式会社）を用いて測定した。

生化学検査

血清T-Chol, TG, NEFAは、それぞれコレステロールE-テスト、トリグリセライドE-テスト、NEFA C-テスト（以上すべて和光純薬工業株式会社）、血清MCP-1産生量はELISA MAXTM Standard (Bio Legend)を用いて酵素学的に測定した。

Real time PCRによる遺伝子発現の定量化

RNeasy Lipid Tissue Mini Kit（株式会社Qiagen）を用いて脂肪細胞からRNAを抽出し、total RNA（2 μ g）を1st standaed cDNA 合成キット（Invitrogen life technologies）によりcDNAを合成した。mRNAの発現量解析は、SYBR Premix Ex TaqTM II（TaKaRa）を用いてStep One Plus Real-Time PCR System（Applied Biosystems）により行った。

統計処理

データは、平均 \pm 標準誤差として示した。群間の統計的有意差（* p <0.05, ** p <0.01）はMicrosoft Office Excel Statcel 3を用いてt-testを行った。 p <0.05を統計的に有意であると判断した。

摂餌量と体重変化

摂餌量（Fig. 1A）体重（Fig. 1B）ともに、飼育期間中、有意な差は見られなかった。

経口ブドウ糖負荷試験（OGTT）とインスリン負荷試験（ITT）

エクオール投与開始12週目にOGTT（Fig. 2 A,B）を、15週目にITT（Fig. 2 C,D）を行ったが、有意な差は見られなかった。

脂質代謝

解剖時の血清におけるTG（Fig. 3A）、T-Cho（Fig. 3B）、NEFA（Fig. 3C）について検討したところ、コントロール群と比較してエクオール投与群において、全ての項目について有意な減少が見られた。

CT撮影による脂肪組織重量・皮下脂肪・精巣上体脂肪・脂肪率

体重当たり脂肪組織重量において、エクオール投与群に減少傾向が見られた（Fig. 4A）。また、体脂肪率（Fig. 4B）においてもエクオール投与群において減少傾向が見られた。なお、皮下脂肪重量（Fig. 4C）、内

臓脂肪組織重量 (Fig. 4D) においても、同様にエクオール投与群に減少傾向が見られた。

炎症性サイトカイン

精巢上体脂肪におけるマクロファージの指標となるEmr-1 (Fig. 5A), 単球・マクロファージの遊走因子であるMCP-1 (Fig. 5B), その受容体であるCCR2 (Fig. 5C), 炎症性サイトカインであるTNF- α (Fig. 5D) の遺伝子発現について検討を行ったところ、特にマクロファージに関連したEmr-1およびMCP-1について、エクオール投与群で有意な抑制が見られた。さらに、血清MCP-1濃度についても確認したところ、エクオール投与群において有意な減少が見られた (Fig. 6)。

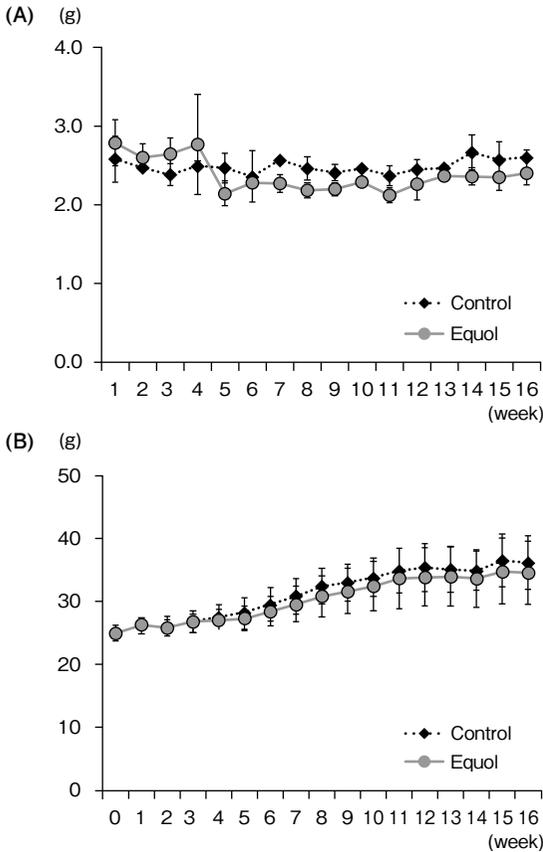


Fig. 1. The effect on food consumption and body weight of isoflavone administration. A: food consumption B: change of body weight. Average \pm S.D. (Control n=8, Equol n=7).

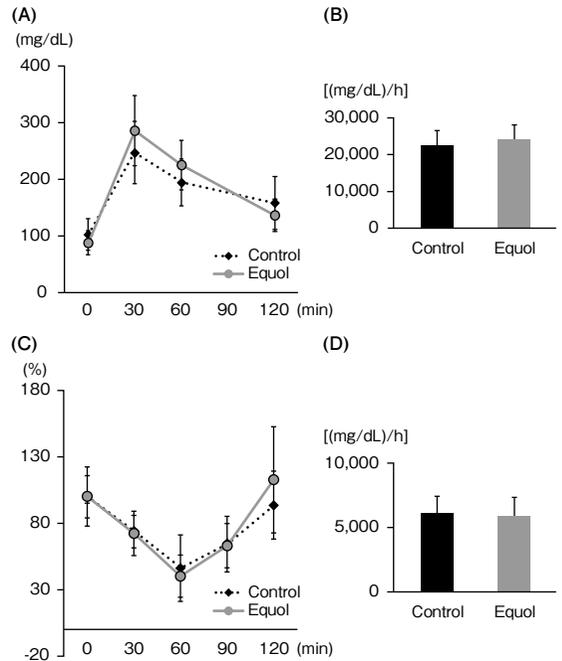


Fig. 2. The effect on oral glucose tolerance test (OGTT) and insulin tolerance test (ITT) of isoflavone administration. A: OGTT, B: Area under curve (AUC) for OGTT, C: ITT, D: AUC for ITT. Average \pm S.D. (Control n=8, Equol n=7)

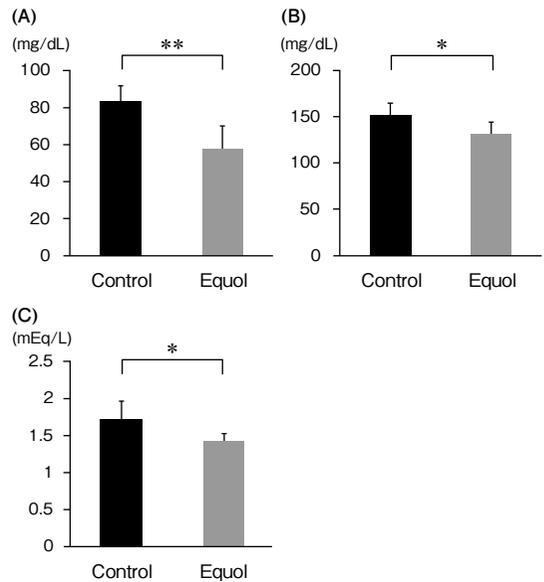


Fig. 3. The effect on lipid metabolism of isoflavone administration. A: triacylglycerol (TG) B: Total cholesterol C: non-esterified fatty acid (NEFA). Average \pm S.D. (Control n=8, Equol n=7). * p <0.05 vs control, ** p <0.01 vs control.

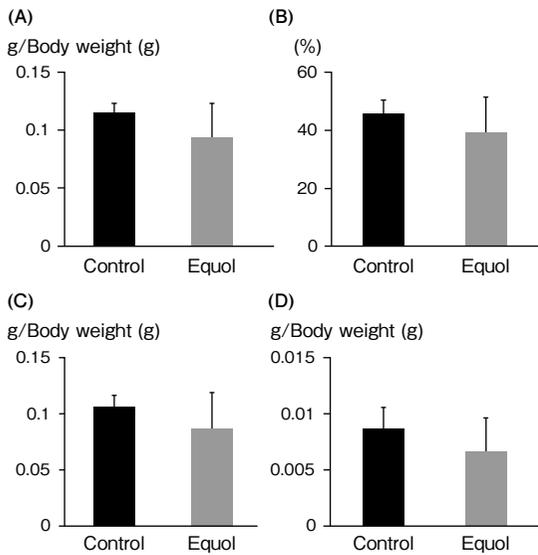


Fig. 4. The effect on body composition of isoflavone administration. A: adipose tissue B: percent of body fat C: subcutaneous adipose tissue D: epididymal adipose tissue. Average \pm S.D (Control n=4, Equol n=4). * p <0.05 vs control, ** p <0.01 vs control.

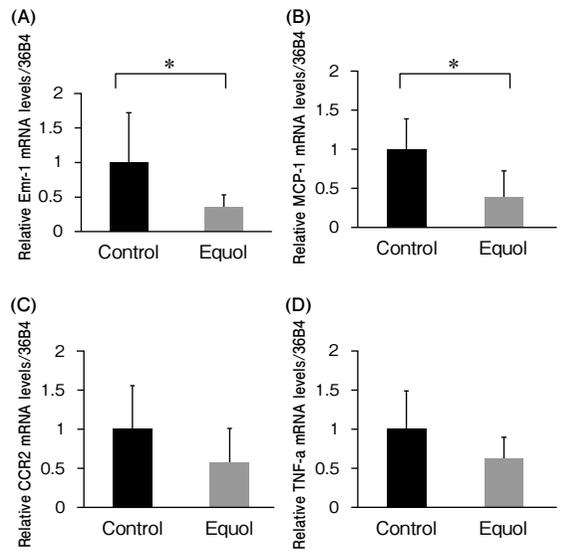


Fig. 5. The effect on relative mRNA levels of isoflavone administration. A: Emr-1 B: MCP-1 C: CCR2 D: TNF- α . Average \pm S.D (Control n=8, Equol n=7). * p <0.05 vs control.

考 察

メタボリックシンドロームは、糖尿病や脳梗塞等の重篤な疾患に進展する基礎疾患である。近年、脂肪組織に浸潤したT細胞が炎症性マクロファージの分化を調節し、その結果、脂肪組織および全身の慢性炎症を決定づけることが報告された⁶⁾。これまで我々は、大豆に含まれる生理活性物質である大豆イソフラボンとT細胞機能に関する研究を行い、免疫調節作用があることを見出してきた^{7,8)}。そこで、これまで我々が明らかにしてきた大豆イソフラボンの免疫調節作用を基に、肥満によって誘導された免疫異常に対するエクオールの効果について、脂肪組織に浸潤するT細胞に焦点を絞り検討した。

エクオール投与マウスにおいて摂餌量と体重に有意な差は見られなかったにも関わらず、脂肪組織重量、皮下脂肪、精巣上体脂肪、体脂肪率に減少傾向が認められたことから、エクオールには、脂肪組織に直接作用し、脂肪蓄積が抑制されることが示唆された。内臓脂肪の増加は、糖尿病や心血管疾患を始めとするメタボリックシンドロームを引き起こすことが知られている⁹⁾。また、ダイゼインからエクオールを産生できな

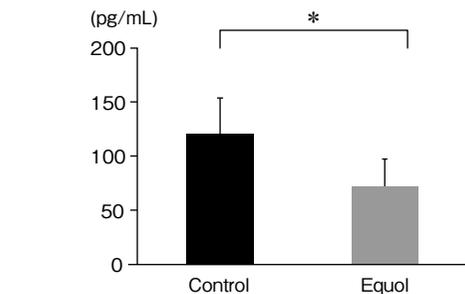


Fig. 6. The effect on serum MCP-1 of isoflavone administration. Average \pm S.D (Control n=8, Equol n=7). * p <0.05 vs control.

いは糖尿病や肥満といった生活習慣病に罹患しやすいことも報告されている¹⁰⁾。そこで、中性脂肪、総コレステロール、遊離脂肪酸の測定を行ったところ、エクオール投与群において有意な減少が認められた。このように、エクオールは脂質代謝動態を変化させることにより、肥満やメタボリックシンドロームに影響を与えることが示唆された。

一方で、我々はこれまでに、イソフラボンは免疫機能に作用していると報告していた^{7, 8)}。そこで、肥満によって誘導された炎症に対するエクオールの影響について検討するために、精巣上体脂肪におけるマクロファージや炎症性サイトカインの遺伝子発現について検討した。Emr-1は主に肥大した脂肪細胞に存在する成熟マクロファージに発現していることが知られている¹¹⁾。また、MCP-1は肥大を始めた初期の段階から脂肪細胞に存在し、単球の遊走を促進してマクロファージ沈着、炎症反応を促進する分子として知られており¹²⁾、CCR2はその受容体である¹³⁾。一方、TNF- α は炎症性のサイトカインであり、インスリン抵抗性を生

じさせる原因物質として知られている¹⁴⁾。これらの遺伝子発現を検討した結果、エクオール投与群においてEmr-1、MCP-1の遺伝子発現が優位に抑制される結果を得た。さらに、血清中のMCP-1の濃度も、エクオール投与群で有意な減少が見られたことから、エクオールにはマクロファージの浸潤を抑える作用があることが示唆された。マクロファージは、肥満などにより脂肪組織が増加すると脂肪組織に浸潤し、メタボリックシンドロームを増悪させる¹⁵⁾。このマクロファージにはM1マクロファージとM2マクロファージが存在し、肥満ではM1マクロファージが増加し¹⁶⁾、M2マクロファージが減少することによりインスリン抵抗性が増悪化することが知られており¹⁷⁾、抗酸化作用¹⁸⁾や炎症反応を惹起する遺伝子を抑える作用¹⁹⁾が知られている。本研究では、マクロファージの局在化や分化にエクオールが関わっており、エクオールがマクロファージの沈着を抑制することにより、免疫機能を改善する可能性があることが示唆された。

要 約

メタボリックシンドロームは、糖尿病や脳梗塞等の重篤な疾患に進展する基礎疾患である。近年、脂肪組織に浸潤したT細胞が炎症性マクロファージの分化を調節し、脂肪組織および全身の慢性炎症を決定づけることが知られるようになった。これまで我々は、大豆に含まれる生理活性物質である大豆イソフラボンとT細胞機能に関する研究を行ってきた。そこで今回、脂肪組織に浸潤する免疫細胞に着目し、エクオールがどのように肥満に伴う慢性炎症状態に影響するのか検討した。エクオールは、脂肪細胞におけるマクロファージの沈着を抑制し、また、血中の脂質代謝を改善することが示唆された。さらに、メタボリックシンドローム発症早期の段階で、脂肪組織および全身の炎症状態を抑制することによりメタボリックシンドロームを予防できる可能性があることが示唆された。しかし、これらのメカニズムについて明らかとなっていないため、今後は詳細な作用機序の解明が求められる。

文 献

- 1) Messina M (2010): Insights gained from 20 years of soy research. *J Nutr*, **140**, 2289S-2295S.
- 2) Setchell KD and Lydeking-Olsen E (2003): Dietary phytoestrogens and their effect on bone evidence from *in vitro* and *in vivo*, human observational, and dietary intervention studies. *Am J Clin Nutr*, **78**, 593-609.
- 3) Cui HB, Na XL, Song DF and Liu Y (2005): Blocking effects of genistein on cell proliferation and possible mechanism in human gastric carcinoma. *World J Gastroenterol*, **11**, 69-72.
- 4) Anthony MS, Clarkson TB and Williams JK (1998): Effects of soy isoflavones on atherosclerosis potential mechanisms. *Am J Clin Nutr*, **68**, 1390-1393.

- 5) Bastard JP, Maachi M, Lagathu C, Kim MJ, Caron M, Vidal H, Capeau J and Feve B (2006): Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. *Eur Cytokine Netw*, **17**, 4-12.
- 6) Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, Eto K, Yamashita H, Ohsugi M, Otsu M, Hara K, Ueki K, Sugiura S, Yoshimura K, Kadowaki T and Nagai R (2009): CD8⁺ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. *Nat Med*, **15**, 914-920.
- 7) Sakai T, Kogiso M, Mitsuya K and Yamamoto S (2004): Effect of Genistein on Immune Responses in NC/Nga Mice Used as an Animal Model for Atopic Dermatitis. *Soy Protein Research, Japan*, **7**, 130-136.
- 8) Sakai T, Nakamoto M, Furoku S, Hirota Y and Shuto E: Effect of Soy Isoflavones on the Antigen-specific, Immune Responses in Mice. *Soy Protein Research, Japan*, **12**, 142-148.
- 9) Arsenault BJ, Lachance D, Lemieux I, Alméras N, Tremblay A, Bouchard C, Pérusse L and Després JP (2007): Visceral adipose tissue accumulation, cardiorespiratory fitness, and features of the metabolic syndrome. *Arch Intern Med*, **167**, 1518-1525.
- 10) Usui T, Tochiya M, Sasaki Y, Muranaka K, Yamakage H, Himeno A, Shimatsu A, Inaguma A, Ueno T, Uchiyama S and Satoh-Asahara N (2013): Effects of natural S-equol supplements on overweight or obesity and metabolic syndrome in the Japanese, based on sex and equol status. *Clin Endocrinol (Oxf)*, **78**, 365-372.
- 11) Lin HH, Faunce DE, Stacey M, Terajewicz A, Nakamura T, Zhang-Hoover J, Kerley M, Mucenski ML, Gordon S and Stein-Streilein J (2005): The macrophage F4/80 receptor is required for the induction of antigen-specific efferent regulatory T cells in peripheral tolerance. *J Exp Med*, **201**, 1615-1625.
- 12) Weisberg SP, McCann D and Desai M (2003): Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest*, **112**, 1796-1808.
- 13) Rodríguez-Frade JM, Vila-Coro AJ, de Ana AM, Albar JP, Martínez-A C and Mellado M (1999): The chemokine monocyte chemoattractant protein-1 induces functional responses through dimerization of its receptor CCR2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 3628-3633.
- 14) Moller DE (2000): Potential role of TNF-alpha in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Trends Endocrinol Metab*, **11**, 212-217.
- 15) Bouloumié A, Curat CA, Sengenès C, Lolmède K, Miranville A and Busse R.: Role of macrophage tissue infiltration in metabolic diseases. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, **8**, 347-354.
- 16) Lumeng CN, Bodzin JL and Saltiel AR (2007): Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest*, **117**, 175-184.
- 17) Fujisaka S, Usui I, Bukhari A, Ikutani M, Oya T, Kanatani Y, Tsuneyama K, Nagai Y, Takatsu K, Urakaze M, Kobayashi M and Tobe K (2009): Regulatory mechanisms for adipose tissue M1 and M2 macrophages in diet-induced obese mice. *Diabetes*, **58**, 2574-2582.
- 18) Pereboom D, Gilaberte Y, Sinues B, Escanero J and Alda JO (1999): Antioxidant intracellular activity of genistein and equol. *J Med Food*, **2**, 253-256.
- 19) Blay M, Espinel AE, Delgado MA, Baiges I, Bladé C, Arola L and Salvadó J (2010): Isoflavone effect on gene expression profile and biomarkers of inflammation. *J Pharm Biomed Anal*, **51**, 382-390.