

膵β細胞の増殖における大豆関連ポリフェノールの有用性に関する研究

堀内寛子・原田直樹*

大阪府立大学大学院生命環境科学研究科

The Benefits of Soy-Related Polyphenols in Pancreatic β -Cell Growth

Hiroko HORIUCHI and Naoki HARADA*

Division of Applied Life Sciences, Graduate School of Life and Environmental Sciences,
Osaka Prefecture University, Sakai 599-8531

ABSTRACT

Type 2 diabetes mellitus (T2DM) is a serious health problem in developed countries. The loss of balance between insulin secretion and insulin sensitivity is associated with the development of T2DM. To sustain an adequate pancreatic β -cell mass is important for prevention of T2DM because the decrease of β -cell mass, which is caused by the suppression of proliferation or an increase in cell death, results in impaired insulin secretion. In the present study, we assessed the effects of S-equol, which is enantiospecifically metabolized from the soy isoflavone daidzein, on pancreatic β -cell growth. In INS-1 rat β -cells, S-equol, but not R-equol and daidzein, enhanced the proliferation of INS-1 cells. The estrogen receptor antagonist (ICI 182,780) did not inhibit the S-equol-increased proliferation of INS-1 cells. S-equol suppressed alloxan-induced INS-1 cell death. The protein kinase A signal inhibitor (H89), but not PI3K/Akt signal inhibitor (LY294002), diminished S-equol-induced proliferation and survival in INS-1 cells. These results show that S-equol increased proliferation and survival through activation of protein kinase A signaling. *Soy Protein Research, Japan* **16**, 169-172, 2013.

Key words : pancreatic β -cells; S-equol; protein kinase A signaling; type 2 diabetes mellitus

2型糖尿病は、膵臓β細胞におけるインスリンの分泌と末梢組織におけるインスリン感受性のバランスが崩壊することによって発症する。西洋人では、肥満を

伴ってインスリンの感受性が著しく低下する 경우가多く、2型糖尿病発症前段階の耐糖能不全の段階では、インスリン分泌を増強することで、インスリンの感受性低下を補償する。しかし、糖尿病の発症、進行につれてインスリン分泌不全を起こす¹⁾。一方で、日本を

*〒599-8531 堺市中区学園町1-1

含む東洋人では、西洋人と比較して健常時からインスリン分泌能が低く、耐糖能不全の段階から、インスリンの分泌が低下するため、東洋人の2型糖尿病の発症には β 細胞でのインスリン分泌不全の寄与が大きいと考えられる²⁾。東洋人では、2型糖尿病発症時に、既に β 細胞量の減少が見られることから、 β 細胞の増殖促進作用や細胞死抑制作用を持つ物質は、特に東洋人における2型糖尿病の発症予防作用が期待できる。

β 細胞の増殖にかかわる主要なシグナル経路として、cyclic AMP/protein kinase A (PKA) 経路と、PI3K/Akt経路がある。これらのシグナルは、抗酸化酵素の発現が低くて酸化ストレスに脆弱な β 細胞において酸化ストレスによる細胞死を抑制する作用も持つ。

我々は、 β 細胞の増殖を促進する因子として、S-equol ((3S)-3-(4-hydroxyphenyl)-7-chromanol) を既に見出している。S-equolは、大豆イソフラボンであるdaidzeinから腸内細菌によって産生される³⁾、女性ホルモン(エストロゲン)様作用⁴⁾を持った物質である。腸内細菌はS体のみを選択的に産生し、鏡像立体異性体であるR-equolは産生されない。本研究課題では、ラット β 細胞株であるINS-1細胞を用いて、S-equolの β 細胞の増殖促進機構と細胞死に対する作用について検討を行った。

方 法

細胞培養

INS-1細胞は、10%牛胎児血清、11.1 mMグルコース、1 mMピルビン酸ナトリウム、10 mM HEPES、100 units/mLペニシリンG、100 μ g/mLストレプトマイシン硫酸塩、50 μ M 2-メルカプトエタノールを含むRPMI1640培地を用いて、5% CO₂、98%湿度、37℃のインキュベーター内で行った。細胞増殖アッセイ時には、牛胎児血清を2%、グルコースを5.5 mMに変更した培地を用いた。また、エストロゲン様作用について検討する場合は、デキストランチャコール処理によりステロイド物質を除去した牛胎児血清(10%)を用いて行った。

細胞増殖アッセイ

INS-1細胞を48ウェルプレートに播種して接着後、S-equol、R-equolまたはdaidzeinを加えて48時間培養した。アロキサン(3 mM)は最後の24時間のみ加えて培養した。培地を5% AlamarBlueを含む新鮮な

培地に交換して、斜光下でさらに4時間培養後、蛍光(excitation: 544 nm, emission: 590 nm)を測定した。生存率は、アロキサン存在下での蛍光強度/アロキサン非存在下での蛍光強度で表した。

結 果

S-equolのINS-1細胞増殖促進作用

β 細胞増殖促進におけるS-equolの特異性を検討するために、ラット β 細胞株であるINS-1細胞をS-equol、R-equolまたはdaidzeinを加えて培養した。その結果、S-equolはINS-1細胞の増殖を促進したが、R-equolとdaidzeinは増殖を促進しなかった(Fig. 1 left and right panels)。

S-equolのINS-1細胞増殖促進作用におけるエストロゲン様活性の関与

S-equolのINS-1細胞増殖促進作用におけるエストロゲン活性の関与を検討するために、エストロゲン受容体アンタゴニストであるICI 182,780を加えて培養した結果、ICI 182,780存在下でもS-equolの増殖促進作用は抑制されなかった。また、S-equolと異なり17 β -estradiolには増殖促進作用は認められなかった(Fig. 2)。

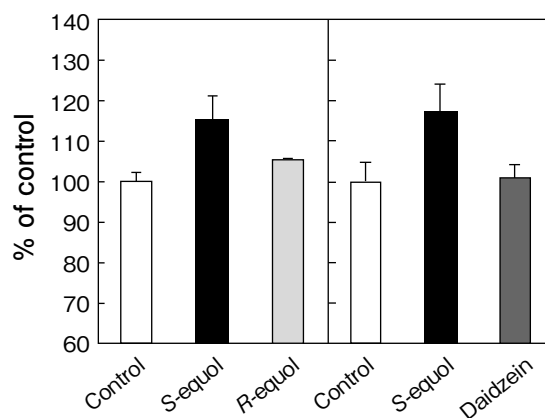


Fig. 1. Growth-stimulating effects of S-equol in INS-1 cells. INS-1 cells were incubated in the presence or absence of 10 μ M S-equol, R-equol or daidzein for 48 h. Cell viability was determined with AlamarBlue dye. Data are expressed as means $\pm$ SD (n=4).

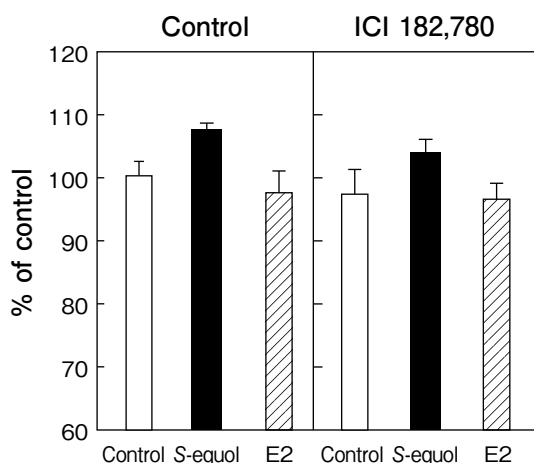


Fig. 2. Evaluation of estrogenic activity of *S*-equol in INS-1 cell growth. INS-1 cells were incubated in steroid-stripped medium with *S*-equol (10 μ M) or E2 (10 nM) in the presence or absence of ICI 182,780 (1 μ M) for 48 h. After incubation, cell viability was evaluated using AlamarBlue dye. Data are expressed as means $\pm$ SD (n=4).

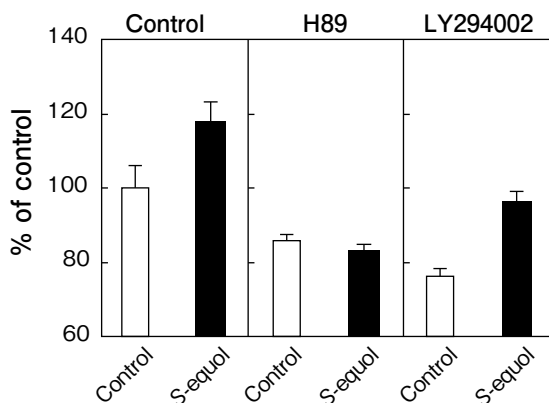


Fig. 3. Role of PKA signaling in *S*-equol-enhanced proliferation of INS-1 cells. INS-1 cells were incubated with 10 μ M of *S*- or *R*-equol in the presence or absence of 3 μ M H89 or 3 μ M LY294002 for 48 h, followed by determination of cell viability using AlamarBlue dye. Data are expressed as means $\pm$ SD (n=4).

S-equolのINS-1細胞増殖促進作用におけるPKAシグナルの関与

S-equolのINS-1細胞増殖促進作用におけるPKAシグナルとPI3K/Aktシグナルの関与を調べるために、それぞれのシグナルを阻害剤するH89とLY294002を用いて検討を行った。どちらの阻害剤もINS-1細胞の増殖を抑制したが、*S*-equolによる細胞増殖促進作用はH89でのみ抑制され、LY294002では抑制されなかった (Fig. 3)。

S-equolのアロキサンによる細胞死抑制作用

β 細胞に酸化ストレスを与えるアロキサンを用いて、INS-1細胞の細胞死に対する*S*-equolの作用について検討した。*S*-equolまたは存在下*R*-equolで24時間培養後、アロキサンを加えてさらに24時間培養を行った後、細胞増殖能を測定した。その結果、*S*-equolでのみINS-1細胞のアロキサンに対する生存能低下を抑制した (Fig. 4A)。さらに、*S*-equolによる細胞死抑制に関与するシグナル経路について阻害剤を用いて検討した結果、細胞死抑制作用はH89存在下で消失した (Fig. 4B)。一方で、LY294002存在下では消失しなかった。

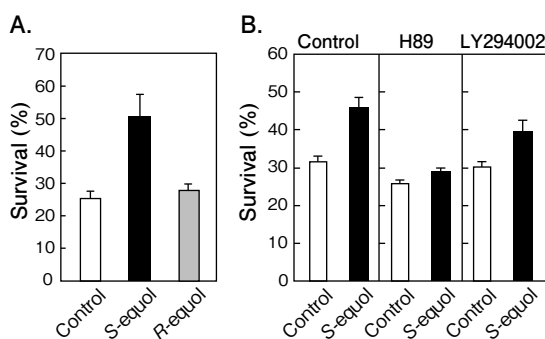


Fig. 4. Protective effects of *S*-equol in alloxan-induced INS-1 cell death. INS-1 cells were incubated with *S*-equol or *R*-equol for 24 h in the presence or absence of H89 (3 μ M) or LY294002 (3 μ M), and were further incubated with 3 mM alloxan for an additional 24 h. Cell survival was measured by AlamarBlue assay. Data were expressed as means $\pm$ SD (n=4).

考 察

本研究で、S-equolがINS-1細胞の増殖促進作用を有することを明らかにした。細胞増殖促進作用はR-equolには観察されず、S-equolに特異的であった。S-equolによる作用は、H89によって抑制されたことから、PKAシグナリングの関与が示唆された。一方で、S-equolが有するエストロゲン様作用は、INS-1細胞における増殖促進には関与しないことが明らかとなった。また、S-equolは細胞死を抑制する作用を持つことが明らかとなり、この細胞死抑制作用にもPKAシグナルが関与することが示唆された。本研究によってS-equolが β 細胞を標的とした抗糖尿病作用を有することが示された。また、R-equolにはないS-equol特異

的な作用はこれまでに報告がなく、PKAシグナルを介したS-equolの新たな作用機構の存在が示された。

大豆の摂取と2型糖尿病の発症リスクの関連について評価した疫学調査は複数存在するが、その結果は一貫したものではない。近年報告された、東洋人を調査した幾つかの研究では、大豆の摂取量や頻度と糖尿病発症リスクが逆相関を示す結果も報告されている⁵⁻⁷⁾。東洋人では、S-equolの産生者の割合が高いことと2型糖尿病の発症にインスリン分泌不全の寄与が大きいことから²⁾、このような研究結果の不一致は、人種や被験者のS-equol産生能も関わっている可能性が考えられる。

要 約

本研究では、大豆イソフラボンであるダイゼインから腸内細菌によって産生されるS-equolが β 細胞の増殖を促進することに加えて、 β 細胞の細胞死を抑制する作用を持つことを明らかにした。この作用は、女性ホルモン様作用とは異なり、protein kinase Aシグナルを介した新たなS-equolの作用であり、鏡像異性体であるR-equolには見られない作用であった。これらの結果から、S-equolが β 細胞を標的とした抗糖尿病作用を持つことが示唆された。

文 献

- 1) Weir GC and Bonner-Weir S (2004): Five stages of evolving β -cell dysfunction during progression to diabetes. *Diabetes*, **53**, S16-S21.
- 2) Fukushima M, Suzuki H and Seino Y (2004): Insulin secretion capacity in the development from normal glucose tolerance to type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract*, **66**, S37-S43.
- 3) Setchell KD and Clerici C (2010): Equol: history, chemistry, and formation. *J Nutr*, **140**, 1355S-1362S.
- 4) Muthyala RS, Ju YH, Sheng S, Williams LD, Doerge DR, Katzenellenbogen BS, Helferich WG and Katzenellenbogen JA (2004): Equol, a natural estrogenic metabolite from soy isoflavones: convenient preparation and resolution of R- and S-equols and their differing binding and biological activity through estrogen receptors α and β . *Bioorg Med Chem*, **12**, 1559-1567.
- 5) Nanri A, Mizoue T, Takahashi Y, Kirii K, Inoue M, Noda M and Tsugane S (2010): Soy product and isoflavone intakes are associated with a lower risk of type 2 diabetes in overweight Japanese women. *J Nutr*, **140**, 580-586.
- 6) Villegas R, Gao YT, Yang G, Li HL, Elasy TA, Zheng W and Shu XO (2008): Legume and soy food intake and the incidence of type 2 diabetes in the Shanghai Women's Health Study. *Am J Clin Nutr*, **87**, 162-167.
- 7) Mueller NT, Odegaard AO, Gross MD, Koh WP, Yu MC, Yuan JM and Pereira MA (2012): Soy intake and risk of type 2 diabetes mellitus in Chinese Singaporeans: Soy intake and risk of type 2 diabetes. *Eur J Nutr*, **51**, 1033-1040.