

イソフラボン摂取による血管周囲脂肪における GPR120の機能と抗動脈硬化作用の検討

山崎貴紀^{*1}・泉 康雄²・佐野宗一¹・山口雄大¹・葭山 稔¹

¹大阪市立大学大学院医学研究科循環器内科学 ²大阪市立大学大学院医学研究科分子病態薬理学

Examination of the Function of the GPR120 in Perivascular Adipose Tissue and Anti-atherogenic Action by Isoflavone Ingestion

Takanori YAMAZAKI^{*1}, Yasukatsu IZUMI², Soichi SANO¹,
Takehiro YAMAGUCHI¹ and Minoru YOSHIYAMA¹

¹Department of Cardiovascular Medicine, Osaka City University
Graduate School of Medicine, Osaka 545-8585

²Department of Pharmacology, Osaka City University Graduate School of Medicine,
Osaka 545-8585

ABSTRACT

Introduction: An anti-atherogenic action by isoflavone ingestion has been shown by some reports. However, the details of the mechanism are unknown. In this study, we investigated the relation of the anti-atherogenic action by isoflavone ingestion and adipokine of perivascular adipose tissue (PVAT), and the influence on circulation dynamics. **Methods:** Spontaneously hypertensive rats (seven weeks old, male) were divided into 3 groups: a vehicle group (V), a group treated with 40 mg/kg/day of daidzein (D), and a group treated with 20 mg/kg/day of genistein (G). Wister Kyoto rats were used as control, and each treatment agent was administered for two weeks. After treatment, we compared the effects of D and G in hemodynamics, cardiac function, atherogenic action and genetic analysis of PVAT. **Results:** Although no significant intergroup differences were noted in the mean blood pressure, heart rate, left ventricular weight, and the thickening of tunica media, echocardiographic study revealed that D treatment significantly attenuated hypertension-induced left ventricular diastolic dysfunction. Compared with the V group, mRNA expressions of adiponectin, G-protein coupled receptor 120, collagen-3, and transforming growth factor- β 1 were of no significance in the PVAT of the D and G groups. On the other hand, compared with the control group, mRNA expressions of brain natriuretic protein were significantly elevated

*〒545-8585 大阪市阿倍野区旭町1-4-3

in the left ventricular tissue of the V and G groups. In contrast, D suppressed the expressions. **Conclusions:** Although the blood pressure of nine-week-old male spontaneously hypertensive rats was elevated, tunica media thickening did not cause. Daidzein may prevent hypertension-induced left ventricular diastolic dysfunction. *Soy Protein Research, Japan* **17**, 164-168, 2014.

Key words : daidzein, genistein, hypertension, left ventricular diastolic function

大豆たん白に含まれるイソフラボンの摂取による動脈硬化の予防効果は数多く報告されている^{1,2)}。これはイソフラボンが化学構造的にエストロゲンに類似していることから、抗炎症作用やLDLコレステロールの低下作用が寄与していると言われている。しかしながら、イソフラボンの抗動脈硬化のメカニズムは明らかになっていないとは言えない。

近年、動脈硬化の進展には血管内部からの血管内皮細胞障害をはじめとする内膜側からの刺激のみでなく、血管周囲脂肪組織 (PVAT) から放出される炎症性メディエーターからの刺激が大きく関与していると言われている³⁾。脂肪細胞に発現しているG-protein coupled receptor 120 (GPR120) は脂肪酸のセンサー分子であり、肥満の原因遺伝子とする報告がされ⁴⁾、今後はGPR120を標的とした動脈硬化の予防・治療への応用が期待されている。

今回、我々はイソフラボン摂取がPVATにおけるGPR120の機能を高め、抗動脈硬化作用を発揮すると考え、自然発症高血圧ラットにdaidzein, genisteinを投与し大動脈の中膜肥厚およびPVATにおけるアディポカインの発現、心機能に与える影響について検証した。

方 法

動物と実験デザイン

動物実験は大阪市立大学動物実験委員会の承認の下に行った。日本エスエルシー株式会社より購入した雄SHR/Izmラット (6週齢) と対照ラットとして雄WKY/Izmラット (6週齢) を使用した。投与するdaidzeinおよびgenisteinはフナコシ株式会社より購入した。

ラットはdaidzein 40 mg/kg/day 投与群 (Da群)、genistein 20 mg/kg/day投与群 (Ge群)、0.5%カルボキシメチルセルロース (CMC) 溶液投与群 (Ve群) の3群に分け、対照ラットには0.5%CMC投与を行い対照群 (Co群) とし、それぞれ1日1回胃内経管投与を14日間行った。tail-cuff法にて血圧測定を投与開始13日

目に施行した。

投与開始14日後に、後述する方法にて経胸壁心エコーによる心機能評価を行った。心臓を直ちに摘出し、心房を切り離し、心室は右心室自由壁を切り離し右心室 (RV) とし、残りの中隔を含む左心室 (LV) に分けてそれぞれ重量測定後、LVは基部と心尖部に分割し基部を速やかに液体窒素にて凍結させ、-80℃下にて保存した。心尖部は4% paraformaldehydeにて固定しパラフィンに包埋した。また、下行大動脈を摘出後、周囲脂肪組織を分離。下行大動脈は上述の通りパラフィン包埋し、脂肪組織は凍結保存した。

心エコー評価

以前に我々が報告している通りの方法^{5,6)} で、チレタミン (10 mg/kg, i.p.) およびキシラジン (10 mg/kg, i.p.) による麻酔下で東芝社製Xarioを用いて施行した。計測内容は、左室拡張末期径 (LVDd)、収縮末期径 (LVDs)、M-mode法およびSimpson法による左室駆出率 (LVEF)、左室流入速波形を計測、A波高およびE波高を測定しその比率 (E/A) を算出し、さらに組織ドップラー法にて左室自由壁側の僧帽弁輪速度 (e) を計測しE波高との比率 (E/e') も算出した。

動脈硬化の評価

大動脈は短軸を5μmの厚さで切片を作製し、HE染色を行い、画像解析ソフト (Micro Analyzer) を用いて内腔面積、中膜面積を算出した。

RNA採取と定量的リアルタイムPCR法 (qRT-PCR)

過去の我々の報告通り⁵⁾、左室とPVAT由来のRNAをISOGEN (Nippon Gene) を用いて単離した。このRNAサンプルをApplied Biosystems社7500 FastにてqRT-PCRを行い、それぞれのGAPDHにて補正を行った。

統計解析

統計学的解析は、JMP Ver.10.0 (SAS Institute Inc.) を用いてVe群をコントロールとし、Dunnettの

検定を行い、 $p < 0.05$ で有意差ありと判定した。

結 果

Ve群と投薬群は同程度の平均血圧の上昇を認め、左室重量も同程度に上昇し、有意差は認めなかった (Table 1)。

下行大動脈の内腔面積は各群ともに高血圧により有意に拡大し、中膜面積はCo群も含めて各群間に有意差は認めず、動脈硬化の指標となる大動脈中膜肥厚は来さなかった (Fig. 1)。

心エコー図法により、左室の形態および左室収縮能に差は認めなかったが、拡張能の指標となるE/e'は高血圧により増加したVe群に対し、Da群で有意に改善を認めた (25.7 ± 1.3 vs 19.6 ± 1.2 , respectively) (Fig. 2)。

PVATにおける各種アディポカインのmRNA発現は各群間に有意差を認めず、イソフラボン摂取によるアディポカインはGPR120の発現も含めて明らかな影響は及ぼさないという結果であった (Fig. 3)。一方、左室における心負荷関連遺伝子である脳性ナトリウム利尿ペプチドは、SHRラットでは増加したがdaidzein投与により有意に抑制された (Fig. 4)。

考 察

今回の我々の実験モデルでは大動脈における中膜肥厚は来さず、動脈硬化の評価は不可能であった。9週齢と比較的若い時点での評価となったことが原因として考えられるが、早期投薬を行わなければ予防効果の判定ができないため、今後は対象モデルを再検討する

Table 1. Hemodynamic parameters and heart weight

	Co	Ve	Da	Ge
HR (bpm)	361.5 ± 12.0	372.1 ± 10.4	$330.3 \pm 10.4^*$	$335.4 \pm 10.4^*$
sBP (mmHg)	$118.5 \pm 2.19^*$	170.6 ± 1.9	$162.6 \pm 1.9^*$	$162.6 \pm 1.9^*$
mB (mmHg)	$94.0 \pm 2.7^*$	136.3 ± 2.3	131.0 ± 2.3	128.1 ± 2.3
dBp (mmHg)	$81.8 \pm 3.4^*$	119.4 ± 3.0	115.6 ± 3.0	111.1 ± 3.0
BW (g)	253.5 ± 3.6	251.9 ± 3.1	249.6 ± 3.1	242.1 ± 3.1
LV/BW (mg/g)	$2.07 \pm 0.06^*$	2.72 ± 0.06	2.56 ± 0.06	2.56 ± 0.06

Values are mean $\pm$ S.E.M. Co, control WKY rats; Ve, non-treated vehicle SHR rats; Da 40 mg/kg/day daidzein-treated SHR rats; Ge, 20 mg/kg/day genistein-treated SHR rats, respectively. $^*p < 0.05$ vs. Ve group.

HR, heart rate; sBP, systolic blood pressure; mBP, mean blood pressure; dBp, diastolic blood pressure; BW, body weight; LV, left ventricle.

必要がある。また、PVATにおけるGPR120の発現もdaidzeinおよびgenistein投与による影響は受けておらず、イソフラボンのPVATを介した動脈硬化予防作用は否定的であった。

一方で心エコーの結果は高血圧性の拡張障害をdaidzeinが抑制するということがわかった。高血圧性拡張障害はうつ血性心不全の原因ともなり、臨床においては高齢女性に多いと言われている。これはエストロゲンの枯渇が一因である⁷⁾との報告からも、エストロゲン受容体に作用するイソフラボンが拡張障害を抑制したと考えられる。左室拡張障害に対する有効な治療法は未だ確立されていないが、daidzeinは高血圧由来の左室拡張障害に対する有効性が示唆された。

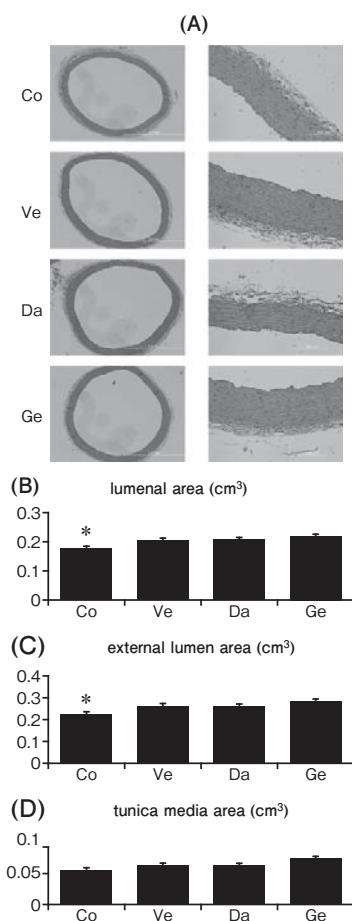


Fig. 1. (A) Representative photomicrographs of the cross-sections (original magnification $\times 4$ and $\times 20$) with hematoxylin-eosin staining. Bar 2 mm and 200 μ m, respectively. (B), (C) and (D) are quantitative results of the lumen area of descending aorta. Values are reported as the mean $\pm$ S.E.M. $^*p < 0.05$ vs. Ve.

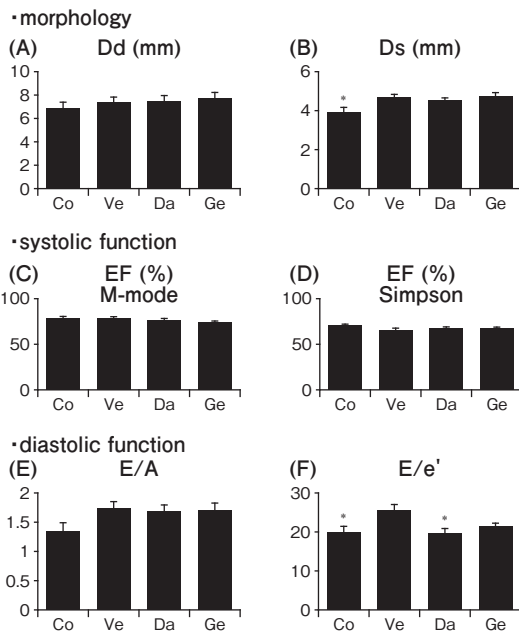


Fig. 2. Echocardiographic measurements at 2 weeks after treatment. Graphs show echocardiographic assessments of Dd (A), Ds (B), EF by M-mode (C), EF by Simpson's measurement (D), E/A (E), E/e' (F) in rats. Ds was significantly lower in group Co than group Ve. E/e' was significantly increased in Ve group compared to that of the Co group. Da group had significantly greater improvement in E/e' than the Ve group. Dd, left ventricular end-diastolic demension; Ds, left ventricular end-systolic demension; EF, left ventricular ejection fraction. Other abbreviations are the same as in the Table 1 legend. Values are reported as the mean $\pm$ S.E.M. * p <0.05 vs. Ve.

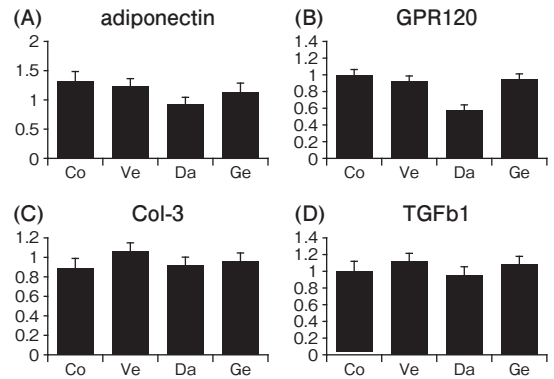


Fig. 3. mRNA expression. Gene expression in the perivascular adipose tissue of rats. The bar graphs shows the value of each mRNA, corrected for the GAPDH mRNA value. There were no significance between each group. GPR120, G-protein coupled receptor 120; Col-3, collagen type 3; TGFb1, transforming growth factor-beta1. Values are reported as the mean $\pm$ S.E.M.

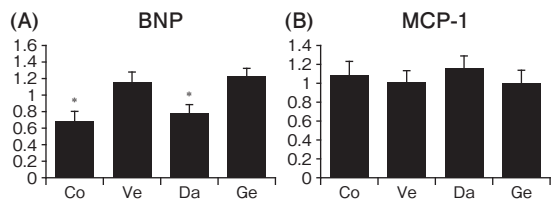


Fig. 4. mRNA expression. Gene expression in the left ventricle of rats. The bar graphs shows the value of each mRNA, corrected for the GAPDH mRNA value. (A) The hypertension-induced up-regulation of BNP was significantly decreased in the Da group. BNP, brain natriuretic peptide; MCP-1, monocyte chemoattractant protein-1. Values are reported as the mean $\pm$ S.E.M. * p <0.05 vs. Ve.

要 約

9週齢のSHRラットは血圧の上昇は認めるが、大動脈における中膜肥厚は来さず、PVATおよびGPR120の発現との関連は明らかにはならなかった。一方、daidzeinの習慣的な摂取は、高血圧由来の左室拡張障害に対し有効であることが示唆された。

文 献

- 1) Hodis HN, Mack WJ, Kono N, Azen SP, Shoupe D, Hwang-Levine J, Petitti D, Whitfield-Maxwell L, Yan M, Franke AA, Selzer RH and for the Women's Isoflavone Soy Health Research Group (2011): Isoflavone soy protein supplementation and atherosclerosis progression in healthy postmenopausal women: A randomized controlled trial. *Stroke*, **42**, 3168-3175.
- 2) Nagarajan S (2010): Mechanisms of anti-atherosclerotic functions of soy-based diets. *J Nutr Biochem*, **4**, 255-260.
- 3) Eringa EC, Bakker W and van Hinsbergh VWM (2012): Paracrine regulation of vascular tone, inflammation and insulin sensitivity by perivascular adipose tissue. *Vascul Pharmacol*, **56**, 204-209.
- 4) Ichimura A, Hirasawa A, Poulain-Godefroy O, Bunnefond A, Hara T, Yengo L, Kimura I, Leloire A, Liu N, Iida K, Choquet H, Besnard P, Lecoecur C, Vivequin S, Ayukawa K, Takeuchi M, Ozawa K, Tauber M, Maffei C, Morandi A, Buzzeti R, Elliott P, Pouta A, Jarvelin MR, Korner A, Kiess W, Pigeyre M, Caiazzo R, Hul WV, Gaal LV, Horber F, Balkau B, Levy-Marchal C, Rouskas K, Kouvatsi A, Hebebrand J, Hinney A, Scherag A, Pattou F, Meyre D, Koshimizu T, Wokowczuk I, Tsujimoto G and Froguel P (2012): Dysfunction of lipid sensor GPR120 leads to obesity in both mouse and human. *Nature*, **483**, 350-354.
- 5) Yamazaki T, Nakamura Y, Shiota M, Osada-Oka M, Fujiki H, Hanatani A, Shimada K, Miura K, Yoshiyama M, Iwao H and Izumi Y (2013): Tolavaptan attenuates left ventricular fibrosis after acute myocardial infarction in rats. *J Pharmacol Sci*, **123**, 58-66.
- 6) Yamazaki T, Izumi Y, Nakamura Y, Yamashita N, Fujiki H, Osada-Oka M, Shiota M, Hanatani A, Shimada K, Iwao H and Yoshiyama M (2012): Tolvaptan improves left ventricular dysfunction after myocardial infarction in rats. *Circ Heart Fail*, **5**, 794-802.
- 7) Zhao Z, Wang H, Jessup JA, Lindsey SH, Chappell MC and Groban L (2014): Role of estrogen in diastolic dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **306**, H628-H640.