

インスリン分泌に及ぼすエクオールの作用に関する研究

堀内寛子・白井理絵・原田直樹*

大阪府立大学大学院生命環境科学研究科応用生命科学専攻

Effects of Equol on Insulin Secretion by Pancreatic β -Cells

Hiroko HORIUCHI, Rie SHIRAI and Naoki HARADA*

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

ABSTRACT

Insulin secretion steadily decreases in the development of non-obese type 2 diabetes mellitus (T2DM) in Asian patients. Insulin is secreted by pancreatic β -cells in response to elevated glucose levels in the blood. Therefore, the improvement of insulin secretion not only by sustaining an adequate β -cell mass but also by inducing β -cells to secrete more insulin is crucial for the prevention of T2DM in Asians. In the present study, we investigated the effects of *S*-equol, which is produced from the soy isoflavone daidzein by intestinal microflora, on glucose-stimulated insulin secretion in pancreatic β -cells. *S*-Equol enhanced insulin secretion of isolated mouse islets under high, but not low, glucose conditions. *R*-Equol did not have this effect. *S*-Equol also increased insulin secretion of INS-1 rat β -cells in high glucose conditions, whereas 17β -estradiol did not. These results show that *S*-equol enantiospecifically enhances glucose-stimulated insulin secretion through a mechanism different from estrogen signaling. Thus, *S*-equol might be a potential agent for the prevention of T2DM. *Soy Protein Research, Japan* **17**, 169-173, 2014.

Key words : pancreatic β -cells; *S*-equol; glucose-stimulated insulin secretion; type 2 diabetes mellitus

2型糖尿病は、膵 β 細胞からのインスリン分泌不全と末梢組織でのインスリン抵抗性が原因となって発症する。欧米人では肥満によるインスリン抵抗性の獲得が2型糖尿病発症の主因であり、インスリン抵抗性の改

善を目的としたビグアナイド薬やチアゾリジン薬が汎用される¹⁾。一方、非肥満型の2型糖尿病を発症するアジア人は、欧米人と比較して健常時よりインスリン分泌能が低い上、発症早期からインスリン分泌低下が観察される²⁾。そのため、インスリン分泌を促進するためのスルホニル尿素薬やグリニド薬が汎用される^{3,4)}。

*〒599-8531 大阪府堺市中区学園町1-1

しかし、これらのインスリン分泌薬は、血糖値（グルコース濃度）に依存せずにインスリンを分泌させるため、低血糖を引き起こすリスクを持つ。近年、グルコース濃度に依存してインスリンを分泌させるインクレチン関連薬が注目され⁵⁾、特にアジア人型2型糖尿病への効果が関心を集めている。

生理的なインスリン分泌は主に、膵β細胞の (i) 量と (ii) グルコース応答能によって規定されるため、これらを調節する食品因子にはアジア型の2型糖尿病効果が期待できる。我々は、(i) の改善に関して、大豆イソフラボンのdaidzeinから腸内細菌により産生されるS-equol ((3S)-3-(4-hydroxyphenyl)-7-chromanol) がβ細胞の生存を亢進させる作用を持つことを見出した⁶⁾。S-equolは大豆ポリフェノールのdaidzeinから腸内細菌によって立体選択的に産生される、女性ホルモン様作用を持つ物質として知られる^{7,8)}。本研究課題では、マウス単離膵島および膵β細胞株を用いて、(ii) のグルコースに応答したインスリン分泌に対するS-equolの作用について検討を行った。

方 法

細胞培養

ラットβ細胞株であるINS-1細胞は、10%牛胎児血清、11.1 mM グルコース、1 mM ビルビン酸ナトリウム、10 mM HEPES、100 units/mL ペニシリンG、100 μg/mL ストレプトマイシン硫酸塩、50 μM 2-メルカプトエタノールを含むRPMI1640培地を用いた。培養はすべて95% air、5% CO₂、湿度98%、37°Cインキュベーター内で行った。エストロゲン様作用について検討する場合は、デキストランコートしたチャコールと混合することでステロイド物質を除去した牛胎児血清(10%)を用いて調製したステロイドフリー培地を用いて行った。

マウスの膵島単離法

8週令の雄性ICRマウス (Kiwa experimental animal, Wakayama) から膵島の単離を行った。イソフルラン麻酔下にて安楽殺後、ハンクスバッファーに溶解したコラゲナーゼP (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) を総胆管から注入し、切り出した膵臓を37°Cでインキュベートした。KRBバッファーで膵臓を懸濁後、フィコール-コンレイを比重液とした密度勾配遠心法を用いて膵島を分離した。動物実験は、大阪府立大学の動物実験委員会の承認を受けて行った。

インスリン分泌アッセイ

単離膵島またはINS-1細胞をKRBバッファーで30分間プレインキュベート後、2.8 mMあるいは16.7 mMグルコースを含むKRBバッファー中にS-equol (10 μM)、R-equol (10 μM) または17β-エストラジオール (E2, 10 nM) 存在下で1時間培養後、分泌されたインスリン量を測定した。単離膵島でのインスリン分泌量は1.5% HClを含む70%エタノールで抽出した膵島内在のインスリン量で、INS-1細胞のインスリン分泌量は細胞のたん白質量でそれぞれ標準化した。インスリンの測定はサンドイッチELISA法⁹⁾で、たん白質の定量はBradford法で行った。

エストロゲン受容体 (ER) レポーターアッセイ

INS-1細胞をステロイドフリー培地を用いて48ウェルプレートで培養後、pCAGGS-ERα¹⁰⁾ またはpCAGGS-ERβ¹¹⁾ とp3xERE-TATA-Luc¹⁰⁾、pGL4.74 [hRluc/tk]をGenePORTER (Genlantis, San Diego, CA, USA) を用いて形質導入した。5時間後に新鮮な培地に交換して19時間培養した。S-equol (10 μM) またはE2 (10 nM) 存在下でさらに24時間培養した後、Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega, Madison, WI, USA) を用いてルシフェラーゼレポーター活性測定を行った。fireflyルシフェラーゼの値をRenillaルシフェラーゼの値で割った値を相対化したものをrelative light units (RLU) とし、グラフ化した。

統計解析

統計解析にはGraphPad Prism 5 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) を用いてStudent's *t* 検定またはANOVA法により解析し、*p* < 0.05をもって統計的有意とした。post-hoc分析にはBonferroni法またはTukey-Kramer法を用いた。

結 果

単離膵島のインスリン分泌におよぼすS-equolの作用

インスリン分泌におけるS-equolの特異性を検討するために、8週令の雄性ICRマウスの単離膵島をS-equolまたはR-equol存在下で1時間培養し、インスリン分泌量を測定した。その結果、S-equol (10 μM) は高グルコースによって上昇したインスリン分泌をさらに促進させた (Fig. 1)。一方で、低グルコース時のインスリン分泌には影響を与えなかった。R-equol (10 μM) はグルコース濃度に関わらず、インスリン分泌に影響しなかった。

INS-1細胞のインスリン分泌におよぼすS-equolの作用

S-equolのインスリン分泌促進作用がβ細胞への直接的な作用かを調べるために、β細胞株を用いてS-equolの作用を検討した。ラットβ細胞株であるINS-1細胞をS-equol存在下で1時間培養し、インスリン分泌量を測定した結果、高グルコース濃度下でのみ、S-equolはインスリン分泌を促進させた (Fig. 2)。

S-equolのインスリン分泌促進作用におけるエストロゲン様活性の関与

S-equolによるインスリン分泌促進作用へのエストロゲン活性の関与を検討した。ERの2つのアイソフォーム (ERαまたはERβ) を発現させたINS-1細胞において、S-equol (10 μM) は女性ホルモンであるE2 (10 nM) と同程度までERαまたはERβの転写活性を促進した (Fig. 3A)。一方、転写活性測定と同じ濃度のE2を用いてインスリン分泌アッセイを行った結果、高グルコース濃度下におけるインスリン分泌促進作用はE2では観察されなかった (Fig. 3B)。

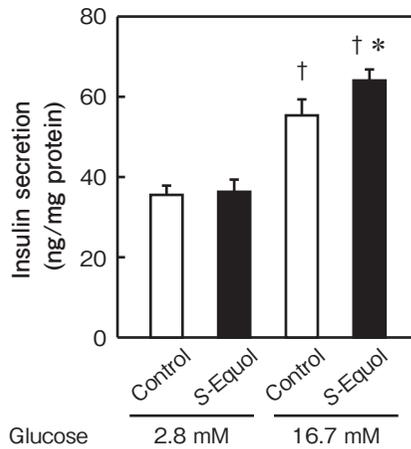


Fig. 2. Effects of S-equol on insulin secretion in INS-1 cells. INS-1 cells were incubated with 10 μM S-equol in the presence of 2.8 mM or 16.7 mM glucose for 1 h. Secreted insulin was measured by ELISA and normalized to the cellular protein content. † $p < 0.05$ versus the value at low glucose concentration (2.8 mM) in each group, and * $p < 0.05$ versus the value at control treatment in each glucose concentration. Data are expressed as means \pm SD (n=4).

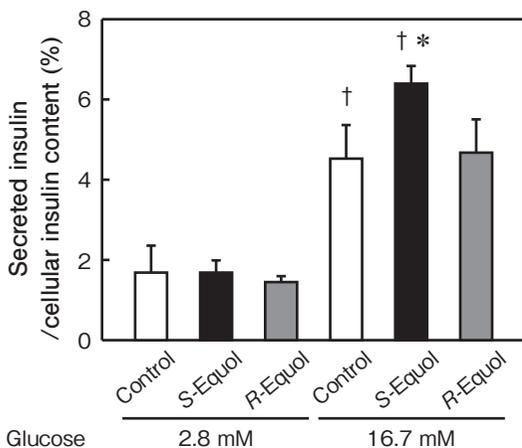


Fig. 1. Effects of S-equol on insulin secretion by isolated mice islets. Mice islets were incubated with 10 μM S-equol or R-equol in the presence of 2.8 or 16.7 mM glucose for 1 h. Secreted insulin and intracellular insulin were measured by ELISA. † $p < 0.05$ versus the value at low glucose concentration (2.8 mM) in each group, and * $p < 0.05$ versus the value at control treatment in each glucose concentration. Data are expressed as means \pm SD (n=4).

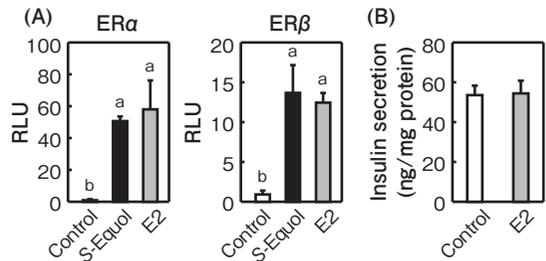


Fig. 3. Effects of estrogenic activity of S-equol on insulin secretion. (A) Effects of S-equol and E2 on the transcriptional activities of ERα and ERβ. INS-1 cells that had been incubated in steroid-free medium were transiently transfected with pCAGGS-ERα or pCAGGS-ERβ, p3xERE-TATA-Luc, and pGL4.74[hRluc/tk]. Cells were incubated with 10 μM S-equol or 10 nM E2 for 24 h, and luciferase activities were determined. Data are expressed as means \pm SD (n=4). (B) Effects of E2 on insulin secretion in INS-1 cells. INS-1 cells were exposed to 10 nM E2 in the presence of 16.7 mM glucose for 1 h. Secreted insulin was measured by ELISA and normalized by cellular protein. Data are expressed as means \pm SD (n=4).

考 察

本研究により、マウス単離膵島および β 細胞株であるINS-1細胞において、S-equolは高グルコースに誘導されたインスリン分泌を促進することが明らかとなった。S-equolによるインスリン分泌促進作用は低グルコース下では観察されなかったことから、低血糖を生じさせるリスクがないことが示唆された。また、インスリン分泌促進作用は鏡像立体異性体であるR体では観察されなかったことから、立体選択的な作用であることが判明した。

インクレチンであるglucagon-like peptide-1 (GLP-1)は、細胞内cAMPを増加させ、protein kinase A (PKA)シグナルを活性化することでグルコース濃度依存的にインスリン分泌を促進する¹²⁾。PKAシグナルはグルコース刺激によるインスリン分泌を増強する“増幅経路”を増強する。我々は、S-equolが鏡像立体選択的にINS-1細胞のcAMPを増加させ、PKAシグナルを活性

化することを見出しており⁶⁾、GLP-1と同様にPKAシグナルを活性化させることで“増幅経路”を促進する機構が考えられる。またS-equolの作用はINS-1細胞のみならずマウス単離膵島においても観察されたことから、*in vivo*においてもPKAシグナル活性化作用が期待される。

INS-1細胞においてS-equol (10 μ M) とE2 (10 nM) はエストロゲン受容体の転写活性を同程度まで上昇させたが、S-equolのみがインスリン分泌を促進し、E2はインスリン分泌を促進しなかった。S-equolは、女性ホルモン様作用を介して骨粗鬆症や顔面紅潮などの更年期障害を予防することが知られるが^{13,14)}、本研究は、S-equolは女性ホルモン様作用とは独立した生理作用も有することを支持する結果であった。

本研究により、S-equolは β 細胞の (i) 量の調節に加えて、(ii) グルコース応答能を亢進することでインスリン分泌量を増加させ、アジア人型2型糖尿病に有益な抗糖尿病物質としての効果が示唆された。

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がマウス単離膵島およびINS-1細胞においてインスリン分泌を促進する作用を持つことを明らかにした。この作用は低グルコース濃度下では見られず、高グルコース濃度下でのみ観察された。また、鏡像異性体であるR-equolにはインスリン分泌促進作用は観察されなかった。S-equolによるインスリン分泌促進作用は女性ホルモン様作用とは異なるメカニズムで発揮されることが示唆された。これらの結果から、S-equolはグルコース応答能を亢進することでインスリン分泌量を増加させる抗2型糖尿病物質としての効果が示唆された。

文 献

- 1) Inzucchi SE, Bergenstal RM, Buse JB, Diamant M, Ferrannini E, Nauck M, Peters AL, Tsapas A, Wender R and Matthews DR (2012): Management of hyperglycemia in type 2 diabetes: a patient-centered approach position statement of the American Diabetes Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD). *Diabetes Care*, **35**, 1364–1379.
- 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) 稲垣暢也 (2012) : 糖尿病治療薬のサイエンス, 南山堂.
- 4) 笈田耕治 (2008) : 経口糖尿病薬の使い方 (5), 福井県医師会より, **562**, 30–31.
- 5) Drucker DJ and Nauck MA (2006): The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes. *Lancet*, **368**, 1696–1705.
- 6) Horiuchi H, Harada N, Adachi T, Nakano Y, Inui H and Yamaji R (2014): S-Equol enantioselectively activates cAMP-protein kinase A signaling and reduces alloxan-induced cell death in INS-1 pancreatic β -cells. *J Nutr Sci Vitaminol*, **60**, 291–296.
- 7) 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 alpha and beta. *Bioorg Med Chem*, **12**, 1559–1567.
- 8) Satchell KD and Clerici C (2010): Equol: history, chemistry, and formation. *J Nutr*, **140**, 1355S–1362S.
- 9) Cao Y, Smith WC and Bowsher RR (2001): A sensitive chemiluminescent enzyme immunoassay for the bioanalysis of carboxyl-terminal B-chain analogues of human insulin. *J Pharm Biomed Anal*, **26**, 53–61.
- 10) Harada N, Yasunaga R, Higashimura Y, Yamaji R, Fujimoto K, Moss J, Inui H and Nakano Y (2007): Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase enhances transcriptional activity of androgen receptor in prostate cancer cells. *J Biol Chem*, **282**, 22651–22661.
- 11) Ogawa M, Yamaji R, Higashimura Y, Harada N, Ashida H, Nakano Y and Inui H (2011): 17 β -estradiol represses myogenic differentiation by increasing ubiquitin-specific peptidase 19 through estrogen receptor α . *J Biol Chem*, **286**, 41455–41465.
- 12) Drucker DJ (2006): The biology of incretin hormones. *Cell Metab*, **3**, 153–165.
- 13) Magee PJ (2011): Is equol production beneficial to health? *Proc Nutr Soc*, **70**, 10–18.
- 14) Jackson RL, Greiwe JS and Schwen RJ (2011): Emerging evidence of the health benefits of S-equol, an estrogen receptor β agonist. *Nutr Rev*, **69**, 432–448.