

速筋における大豆イソフラボンによるインスリン様成長因子の 発現調節機構に関する研究

小川真弘・河田夏初・山地亮一*

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生命機能化学分野食品代謝栄養学研究室

Effect of Soy Isoflavone on Insulin-like Growth Factor Expression in Fast Muscle

Masahiro OGAWA, Natsuha KAWATA and Ryoichi YAMAJI*

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

ABSTRACT

Skeletal muscle is a tissue composed of heterogeneous muscle fibers with different biochemical and contractile properties. Fast-twitch extensor digitorum longus (EDL) muscle is characterized with regard to contractile function. EDL is required for the abilities to stand up from a chair or to recover from a stumble to prevent a fall. Soy isoflavones such as daidzein have estrogenic activities and are called phytoestrogens. To investigate the beneficial effects of daidzein on fast-twitch muscle mass, ovariectomized (OVX) mice as a model of post-menopausal women were fed daidzein. The mass of EDL muscle was higher in daidzein-fed OVX mice than in control-fed OVX mice. Dietary daidzein increased the mRNA levels of total insulin-like growth factor 1 (IGF-1) and its two alternative splicing variants (IGF-1Ea and MGF) in EDL muscle. The serum levels of daidzein and S-equol in daidzein-fed OVX mice reached approximate 2 μ M and 0.5 μ M, respectively. In C2C12 myotubes, 1 μ M daidzein increased the mRNA levels of total IGF-1, IGF-1Ea and MGF, whereas 0.5 μ M S-equol had no effect on the expression of IGF-1. The serum of daidzein-fed OVX mice increased the mRNA levels of total IGF-1, IGF-1Ea and MGF in C2C12 myotubes. Likewise, the serum of daidzein-fed female rats increased IGF-1 mRNA level, and acetone-treated serum of daidzein-fed female rats had the same effect. These results suggest that dietary daidzein directly and indirectly increases IGF-1 expression in EDL muscle. *Soy Protein Research, Japan* **18**, 123-128, 2015.

* 〒599-8531 堺市中区学園町1-1

Key words : isoflavone, daidzein, skeletal muscle, insulin-like growth factor 1, ovariectomy mice

高齢女性は男性に比べ骨格筋量が低く、骨粗鬆症の割合が高いため、加齢による筋力の低下により段差につまずいて転倒し、骨折しやすい^{1,2)}。骨折をすると安静を余儀なくされ寝たきりとなる。骨格筋には速筋と遅筋の2種類のタイプがある。持久力には主に遅筋が関与し、瞬発力には収縮速度の速い速筋が関与する³⁾。長趾伸筋は下肢の下腿にある速筋であり³⁾、長趾伸筋の筋量が減少すると足首が上手く背屈出来ず⁴⁾、段差でつまづいて転倒するリスクが高まる。そのため、骨格筋量の維持・増加に寄与する食品成分を日常の食事から摂取することは高齢者が自力で健全な生活をするために有益であると考えられる。

女性ホルモンのひとつであるエストロゲンは卵巣から分泌され、生殖器官、骨格筋、骨などの器官で多様な生理的機能を発揮する^{5,6)}。しかし、高齢で閉経になると体内のエストロゲン濃度が低下する⁵⁾。大豆イソフラボンであるダイゼインは女性ホルモン様作用を示す食品成分である⁷⁾。骨格筋量を増加させる主な因子としてインスリン様成長因子 (IGF-1) が挙げられる⁸⁾。IGF-1はシグナルペプチド、成熟型ペプチド、Eペプチドから構成される前駆体として発現する⁹⁾。ヒトではIGF-1EaとIGF-1Eb、MGFの3つのスプライシングバリエーションが存在するのに対して、マウスやラットなどのげっ歯類ではIGF-1EaとMGFの2つのスプライシングバリエーションが存在する⁹⁾。そこで本研究では、閉経モデルマウスである卵巣摘出 (OVX) マウスの長趾伸筋量に対するダイゼイン摂取の影響を検討するとともに、IGF-1発現に対するダイゼイン摂取の影響を検討することを目的とした。

方 法

動物実験飼育法

7週齢のddY雌性マウス (Kiwa Laboratory Animals, Wakayama, Japan) を麻酔下で、卵巣を腹腔から取り出し、卵管を縫合糸で縫合して、卵管と子宮の接合部で切断した。その後、子宮を腹腔にもどし、皮膚を接合した (卵巣摘出マウス, OVXマウスとする)。その後、OVXマウスを2群 (コントロール食群とダイゼイン食群) に分け、コントロール群にはスクロースをスターチに代えた改変AIN-76を毎日摂取させた。ダイゼイン群はゴマ油で溶かしたダイゼインを0.1%含んだ改

変AIN-76を毎日摂取させた。飼料組成はTable 1に示す。飼料の摂取を開始してから1週間後、腋窩動脈を切断して採血し、安楽殺したマウスの後肢にある骨格筋組織 (長趾伸筋) を切除し、重量を測定した。その後、液体窒素で凍結し、使用するまで-80℃で保存した。

8週齢の雌性Wistarラット (Kiwa Laboratory Animals) を2群 (コントロール食群とダイゼイン食群) に分け、コントロール群にはスクロースをスターチに代えた改変AIN-76を毎日摂取させた。ダイゼイン群はゴマ油で溶かしたダイゼインを0.1%含んだ改変AIN-76を毎日摂取させた。飼料組成はTable 1に示す。飼料の摂取を開始してから1週間後、下大静脈から採血し、安楽殺させ、血清を分離した。

マウスとラットを用いたすべての動物実験は公立大学法人大阪府立大学動物実験規程に従って実施した。

細胞培養法

マウス由来C2C12筋芽細胞 (RIKEN Bioresource Center Cell Bank, Tsukuba, Japan) は、10%牛胎児血清、100 units/mLペニシリン、100 µg/mLストレプトマイシン、1.0 g/L炭酸水素ナトリウムを含むD-MEM培地 (増殖培地) で培養した。細胞培養は95% Air, 5% CO₂, 37℃のインキュベーター内で行った。継代は70%飽和状態になった細胞をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で洗浄し、0.25%トリプシンと0.02% EDTAを含むPBSで処理することで細胞を剥がし、新鮮な培地に懸濁することで行った。C2C12筋芽細胞が飽和状態になったところで2%ウマ血清、100 units/mLペニシリン、100 µg/mLストレプトマイシン、1.0 g/L炭酸水素ナトリウムを含むD-MEM培地 (分化培地) で培養した。以降2日ごとに分化培地を交換し、筋管細胞へ分化させた。

	%
Casein	20.0
DL-Methionine	0.3
Corn starch	65.0
Cellulose	5.0
Corn oil	5.0
Vitamin mix (AIN-76)	1.0
Mineral mix (AIN-76)	3.5
Choline chloride	0.2
Total	100.0

リアルタイムRT-PCR法

凍結した骨格筋組織から全RNAを抽出後、逆転写反応でcDNAを合成した。IGF-1とIGF-1バリエーション (IGF-1EaとMGF)、ペプチジルプロリルイソメラーゼA (PPIA) 遺伝子、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) のmRNA量は、合成したcDNAと以下の特異的なプライマーを用いて定量的PCRによって測定した。定量的PCRのPCRはSYBR® Premix Ex Taq TM II (TAKARA bio, Shiga, Japan) のプロトコルに従い、Thermal Cycler Dice Real Time (TP800, TAKARA bio) を用いて行った。マウスのデータはPPIA遺伝子を、C2C12細胞のデータはGAPDH遺伝子の発現量を内部標準としてサンプル間の補正を行った：IGF-1 (Total) (センスプライマー：5'-GTGTGGACCGAGGGGCTTTACTTC-3'；アンチセンスプライマー：5'-GCTTCAGTGGGGCACAGTACATCTC-3')、IGF-1Ea (センスプライマー：5'-GCTTGCTCACCTTACCAGC-3'；アンチセンスプライマー：5'-AAATGTACTTCCTTCTGAGTCT-3')、MGF (センスプライマー：5'-GCTTGCTCACCTTACCAGC-3'；アンチセンスプライマー：5'-AAATGTACTTCCTTCTGAGTCT-3')、PPIA (センスプライマー：5'-GCAAAATGCTGGACCAAACAC-3'；アンチセンスプライマー：5'-TCACCTTCCCAAAGACCACAT-3')、GAPDH (センスプライマー：5'-AAAATGGTGAAGGTCGGTGT-3'；アンチセンスプライマー：5'-TTTGATGTTAGTGGGGTCTC-3')

血清中のダイゼイン濃度測定法

マウス血清100 μ lに10 μ lの β -Glucuronidase type

(glucuronidase activity; \geq 85,000 U/mLと sulfatase activity; \leq 7,500 U/mL) H-2 from *Helix pomatia* (Sigma, St. Louis, MO, USA) を含む100 mMの酢酸 (pH 5.0) を100 μ l加え、37°Cで一晩インキュベートした。反応後、抽出内部標準として100 pmolのBiochanin Aを添加し、200 μ lの酢酸エチルと混合した後、4°C、20,000 \times gで5分間遠心した。上清を別のチューブに移し、残りの下層にさらに200 μ lの酢酸エチルを加えて混合後、4°C、20,000 \times gで5分間遠心した。全量 (400 μ l) を窒素ガスで完全に蒸発させた。その後、300 μ lのメタノールに再溶解したものを、高速液体クロマトグラフィーによる解析を行った。ダイゼインは254 nm、S-エクオールは280 nmでそれぞれ検出した。

結果と考察

ダイゼインの長趾伸筋量に及ぼす影響

ダイゼイン摂取の骨格筋量に及ぼす影響を閉経モデルマウス (OVXマウス) で評価した。その結果、ダイゼインを摂取することによって後肢の速筋である長趾伸筋の重量がOVXマウスで増加した (Table 2)。

Table 2. Extensor digitorum longus muscle weights in daidzein-fed OVX mice

	Control	Daidzein
Muscle mass ratio*	0.587 \pm 0.057	0.688 \pm 0.039 ^a

*Ratio of muscle mass (mg)/body weight (g)

^aSignificant difference between the control group and daidzein group ($p < 0.05$)

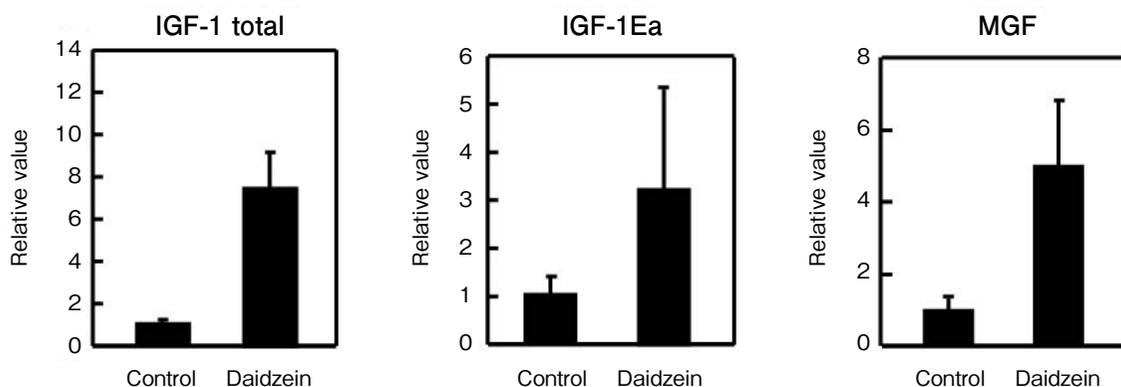


Fig. 1. Effects of daidzein on IGF-1 expression in OVX mice

OVX mice were fed diets containing 0.1% daidzein for 7 days. Total RNAs were prepared from extensor digitorum longus muscles. Quantitative RT-PCR was performed for *IGF-1*, *IGF-1Ea*, *MGF*, and *PPIA* mRNA. Data were normalized to *PPIA* mRNA. Values are indicated as mean \pm SD. (n=5).

長趾伸筋におけるIGF-1発現に及ぼすダイゼインの影響

ダイゼインによる長趾伸筋量の増加にIGF-1が関与しているかを検討するため、長趾伸筋からRNAを抽出し、リアルタイムPCR法によりIGF-1のmRNA発現量を測定した。IGF-1発現量はコントロール食群に比べてダイゼイン食群で発現が上昇した (Fig. 1)。またダイゼイン摂食はIGF-1遺伝子の2つのバリエーションであるIGF-1EaとMGFの発現量を増加させた。

C2C12筋管細胞におけるIGF-1発現に及ぼすダイゼインの影響

ダイゼインは腸内細菌によってS-エクオールに代謝されるので、ダイゼイン摂取マウスのダイゼインとS-エクオールの血中濃度を測定した。ダイゼイン摂取群では、ダイゼイン濃度は2.35 μ M、S-エクオール濃度は0.43 μ Mであった (Table 3)。一方、コントロール食摂取群の血中では、ダイゼインもS-エクオールも検出されなかった。そこで、ダイゼインが筋管細胞のIGF-1発現に及ぼす影響を検討するために、C2C12筋管細胞を1 μ Mのダイゼイン存在下で培養し、IGF-1の発現レベルをRT-PCR法により測定した。その結果、C2C12筋管細胞においてダイゼインはIGF-1発現を増加させた (Fig. 2)。この際、ダイゼインは2つのスプライシングバリエーション (IGF-1EaとMGF) の発現を増加させた。一方、0.5 μ MのS-エクオール存在下で培養したC2C12筋管細胞では、IGF-1発現に影響はなかった (Fig. 3)。

Table 3. Serum daidzein and S-sequol concentration in daidzein-fed OVX mice

	Daidzein (μ M)	S-Equol (μ M)
Control	N.D.	N.D.
Daidzein	2.35 \pm 0.57	0.43 \pm 0.20

Values are means \pm SD, n=5. N.D., not detectable. Serum daidzein concentration was measured by HPLC. Biochanin A was used as an internal standard.

ダイゼインを摂取したマウスの血清がC2C12筋管細胞のIGF-1発現に及ぼす影響

ダイゼインを摂取したマウスの長趾伸筋においてIGF-1の発現が上昇した要因として、S-エクオール以外のダイゼインの2次代謝物、あるいはダイゼインまたはその代謝物の刺激により生体内で産生された因子が関与する可能性がある。そこで、ダイゼインを摂食させたOVXマウスの血清をC2C12筋管細胞に添加することで、IGF-1発現に対する血清成分の影響を検討した。その結果、コントロール食を摂取したマウスの血清に比べて、ダイゼイン食を摂取したマウスの血清存在下で培養した細胞ではIGF-1 mRNA量が増加した (Fig. 4)。またダイゼイン食のマウス血清はIGF-1EaとMGFの発現量を増加させた。

C2C12筋管細胞におけるIGF-1発現に及ぼすダイゼイン食のラット血清の影響

IGF-1発現を増加させる血清成分をさらに評価するため、ダイゼインを摂取させたラット血清を用いて検

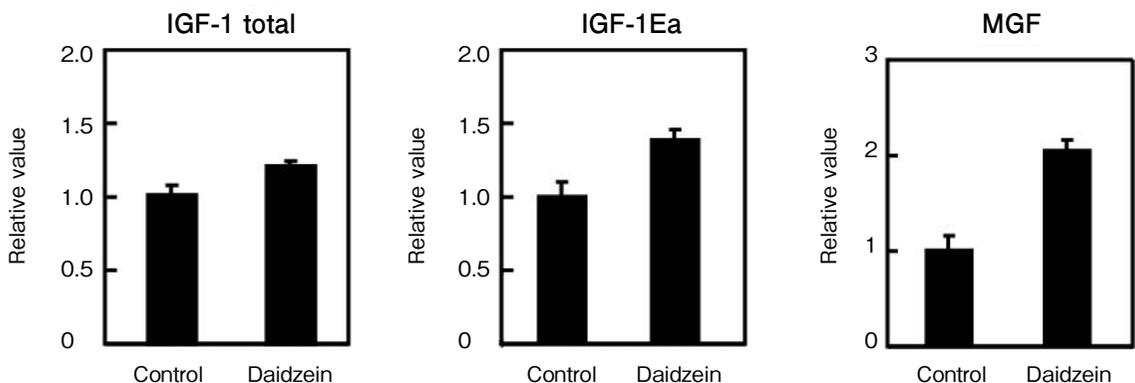


Fig. 2. Effects of daidzein on IGF-1 expression in C2C12 myotubes

C2C12 myotubes were incubated in differentiation medium containing 1 μ M daidzein for 3 h. Quantitative RT-PCR was performed for *IGF-1*, *IGF-1Ea*, *MGF*, and *GAPDH* mRNA. Data were normalized to *GAPDH* mRNA. Values are indicated as mean \pm SD. (n=3).

討した。ダイゼインを摂取したラットの血清によるC2C12筋管細胞のIGF-1発現に及ぼす影響を検討した結果、OVXマウスと同様にダイゼイン食を摂取したラットの血清存在下で培養した細胞ではIGF-1 mRNA量が増加した (Fig. 5, 左パネル)。ダイゼインを摂取

したラットの血清はアセトン処理によりたん白質を除去してもIGF-1の発現を増加させた (Fig. 5, 右パネル)。つまり、IGF-1発現を増加させたダイゼイン摂取したラットの血清成分は高分子のたん白質ではなく、低分子化合物であると示唆された。

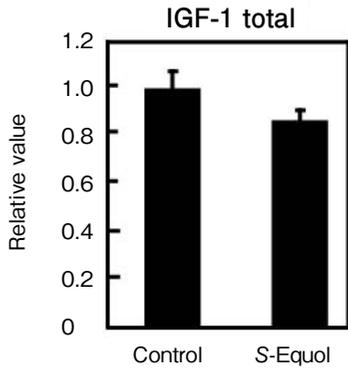


Fig. 3. Effects of S-equol on IGF-1 expression in C2C12 myotubes
C2C12 myotubes were incubated in differentiation medium containing 0.5 μ M S-equol for 3 h. Quantitative RT-PCR was performed for *IGF-1* and *GAPDH* mRNA. Data were normalized to *GAPDH* mRNA. Values are indicated as mean \pm SD. (n = 3).

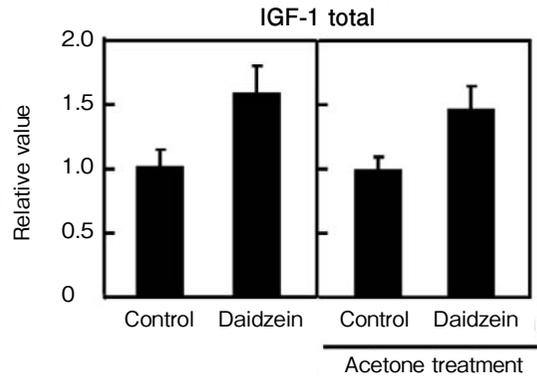


Fig. 5. Effects of serum of daidzein-fed rats on IGF-1 expression in C2C12 myotubes
(Left panel) C2C12 myotubes were incubated in D-MEM medium supplemented with serum (2% v/v) from daidzein-fed rats, and 100 units/mL penicillin and 100 μ g/mL streptomycin for 3 h. (Right panel) C2C12 myotubes were incubated in D-MEM medium supplemented with acetone-treated serum (2% v/v). Quantitative RT-PCR was performed for *IGF-1* and *GAPDH* mRNA. Data were normalized to *GAPDH* mRNA. Values are indicated as mean \pm SD. (n = 5).

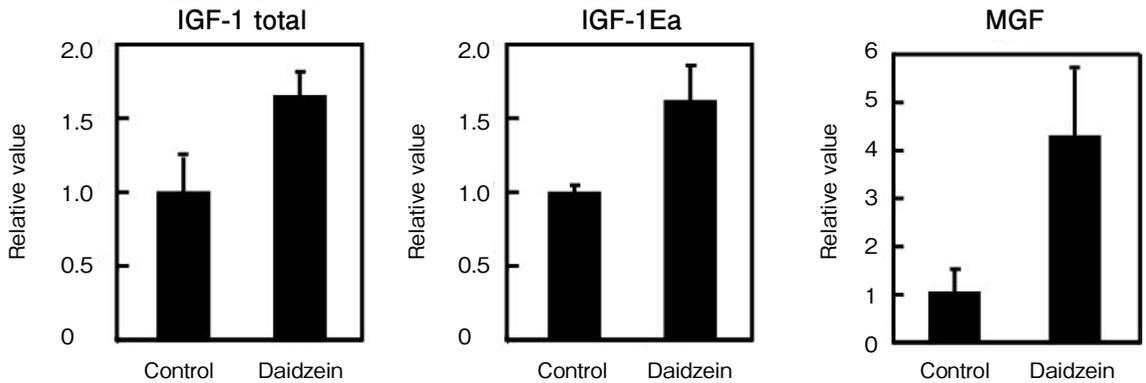


Fig. 4. Effects of serum of daidzein-fed mice on IGF-1 expression in C2C12 myotubes
C2C12 myotubes were incubated in D-MEM medium supplemented with serum (2% v/v) from control diet-fed or daidzein-fed mice, and 100 units/mL penicillin and 100 μ g/mL streptomycin for 3 h. Quantitative RT-PCR was performed for *IGF-1*, *IGF-1Ea*, *MGF*, and *GAPDH* mRNA. Data were normalized to *GAPDH* mRNA. Values are indicated as mean \pm SD. (n = 5).

要 約

骨格筋量は男性に比べ女性の方が少なく、さらに加齢と共に骨格筋量は減少するため、閉経後の女性は転倒のリスクが高い。つま先が段差を越えるのを助ける速筋である長趾伸筋の重量を維持・増量できれば高齢女性の転倒による寝たきりを予防できると考えられる。そこで本研究では、閉経モデルマウスである卵巣摘出 (OVX) マウスの長趾伸筋に対するダイゼイン摂取の影響を検討した。OVXマウスにダイゼインを摂取させた結果、OVXマウスの後肢の速筋である長趾伸筋の重量が増加した。長趾伸筋において、ダイゼイン摂取は骨格筋量を増加させるIGF-1の発現を増加させた。またIGF-1遺伝子の2つのバリエーションであるIGF-1EaとMGFの発現も増加させた。そこで、C2C12筋管細胞におけるIGF-1発現に及ぼすダイゼインの影響を検討したところ、ダイゼイン摂取マウスの血中濃度に相当する1 μ MのダイゼインはIGF-1遺伝子と2つのバリエーションの発現を増加させた。一方、ダイゼイン摂取マウスの血中濃度に相当する0.5 μ MのS-エクオールはIGF-1発現に影響を与えなかった。さらにダイゼインを摂取させたOVXマウスの血清存在下で筋管細胞を培養したところ、コントロール食のマウスの血清に比べてIGF-1と2つのバリエーションの発現が増加した。ダイゼイン食を摂取したラットの血清存在下で培養した細胞ではIGF-1発現が増加した。さらにダイゼインを摂取させたラットの血清はアセトン処理によりたん白質を変性除去してもIGF-1の発現を増加させた。長趾伸筋では、ダイゼインそのものがIGF-1の発現を上昇させるだけでなく、S-エクオール以外のダイゼイン摂取によって生じた低分子化合物がIGF-1発現を上昇させることで筋重量を増加させたと推測された。

文 献

- 1) Lord SR, Sherrington C and Menz HB (2001): Falls in older people: risk factors and strategies for prevention. In: Cambridge University Press.
- 2) Kanis JA, Melton LJ 3rd, Christiansen C, Johnston CC and Khaltav N (1994): The diagnosis of osteoporosis. *J Bone Miner Res*, **9**, 1137-1141.
- 3) James RS, Altringham JD and Goldspink DF (1995): The mechanical properties of fast and slow skeletal muscles of the mouse in relation to their locomotory function. *J Exp Biol* **198**, 491-502.
- 4) Kwon OY, Tuttle LJ, Johnson JE and Mueller MJ (2009): Muscle imbalance and reduced ankle joint motion in people with hammer toe deformity. *Clin Biomech (Bristol, Avon)* **24**, 670-675.
- 5) Heldring N, Pike A, Andersson S, Matthews J, Cheng G, Hartman J, Tujague M, Ström A, Treuter E, Warner M and Gustafsson JA (2007): Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. *Physiol Rev* **87**, 905-931.
- 6) Frost HM (1999): On the estrogen-bone relationship and postmenopausal bone loss: A new model. *J Bone Miner Res* **14**, 1473-1477.
- 7) Cederroth CR and Nef S (2009): Soy, phytoestrogens and metabolism: A review. *Mol Cell Endocrinol* **304**, 30-42.
- 8) Schiaffino S and Mammucari C (2011): Regulation of skeletal muscle growth by the IGF1-Akt/PKB pathway: insights from genetic models. *Skelet Muscle* **1**, 4.
- 9) Matheny RW Jr and Nindl BC (2011): Loss of IGF-1Ea or IGF-1Eb impairs myogenic differentiation. *Endocrinology* **152**, 1923-1934.