

大豆たん白質の腸管における神経節形成および 運動性に与える効果の検討

鳥越大輔*

北海道大学大学院獣医学研究科動物疾病制御学講座

Effects of Soy Protein Isolate on Neurogenesis and Mobility in the Intestine

Daisuke TORIGOE*

Laboratory of Laboratory Animal Science and Medicine, Department of Disease Control,
Graduate School of Veterinary Medicine, Hokkaido University, Sapporo 060-0818

ABSTRACT

Intake of isoflavone has been suggested to limit neurodegeneration and to exhibit neuropoietic effect in the central nerve system. However, there is almost no study on the effect of isoflavone on peripheral nerve system. In this study, we investigated the effects of Soy Protein Isolate (SPI) on neurogenesis and mobility of the intestine using Hirschsprung disease (HD) and hypoganglionosis (HG) model animals. First, we compared the ratio of aganglionosis between Hirschsprung disease model rat pups of which dams were fed a diet with/without SPI. We further examined the expression level of the neurogenesis markers in the intestine of 13.5 days post coitus rat. As a result, expression level of Sox10 was significantly increased in the rat fed SPI feeding and the expression level of other two markers, PGP9.5 and Fgf13, were tended to be higher in SPI feeding group, however, SPI had no significant effect on neurogenesis of intestine. Next we investigated the effect on mobility of the intestine using HD model mice. The weight and number of feces tended to be lower in SPI feeding group. These results suggested that SPI have a potential to affect the neurogenesis and mobility of the intestine. *Soy Protein Research, Japan* **18**, 198-203, 2015.

Key words : isoflavone, Hirschsprung disease, aganglionosis, hypoganglionosis, neurogenesis

*〒060-0818 札幌市北区北18条西9丁目

大豆に多く含まれるイソフラボンは抗酸化作用や抗炎症作用などを有し、その生理機能については古くより研究が行われてきた¹⁾。近年では、イソフラボンが中枢神経系の神経保護作用や、末梢や大脳の血流を改善することにより、海馬における血管新生および神経新生を引き起こし、認知行動に対しても影響する事が報告されるなど、中枢神経に与える影響も明らかとなってきた²⁾。しかしながら抹消の神経系に与える影響についての報告は少ないのが現状である。

腸管神経系は第二の脳とも呼ばれ、食道から肛門までの消化管壁に網目状の神経線維を張りめぐらし、腸管の蠕動運動や分泌、血流の調節等を行っており、末梢神経系の中でも非常に重要な神経系である。ヒルシュスプルング病は下部消化管の粘膜下神経叢および筋間神経叢の神経節細胞の先天的欠損により、蠕動運動が障害され巨大小腸および結腸症を呈する小児の疾患であり、我々はこれまでにヒルシュスプルング病の原因遺伝子の一つであるB型エンドセリンレセプターの一部塩基配列の欠損変異 (*Ednrb*^{sl}) を有する遺伝背景の異なる系統のヒルシュスプルング病モデルラットを作製し、*Ednrb*^{sl} 個体における腸管神経節欠損部位の範囲に系統差があることや、浸透度の違いがあることなどを明らかにし、これまでのヒルシュスプルング病モデル動物には見られない形質を持つ、よりヒトの病態に近いモデル動物を開発した³⁾。さらに、日本の愛玩用マウス由来近交系であるJF1マウスは*Ednrb*^Δ変異を有し腸管神経節減少症を呈する事を明らかにした⁴⁾。本研究では、未だ報告の少ない、大豆イソフラボンが末梢神経の一つである腸管神経系に与える効果について、我々が作製した2つのモデル動物を用いて検討することを目的とした。

方 法

実験1

ヒルシュスプルング病モデル動物としてLEH/Hkv-*Ednrb*^{sl} (LEH) およびF344-*Ednrb*^{sl} (F344) ラット (自家繁殖) を用いて各系統の雌雄同士を交配した。各系統の妊娠雌において、妊娠期間中および授乳期間中にAIN-93G飼料を給餌する群 (SPI (-)) とAIN-93G飼料に大豆イソフラボン (和光純薬) を1 mg/kg/日となるように給餌した群 (SPI (+)) とを設けて飼育した。生後14日齢のLEHラットおよびF344ラットより腸管を摘出し、全長および大腸長を測定し、過去の報告を参考にしてAcetylcholinesterase (AChE) 染色にて腸管神経節の染色を行い、神経節欠損割合を求めた⁵⁾。

また、F344ラットの13.5日胚の腸管を用いてRNA抽出を行い、神経発生マーカーであるSox10、PGP9.5、Fgf13についてリアルタイムPCRを行い発現量の定量を行った。

実験2

神経節細胞減少症モデル動物としてJF1/Ms (JF1) マウス (自家繁殖) を用いた。生後4週のJF1マウスを実験1同様にSPI (-) 群、SPI (+) 群にて4週間飼育し、大腸便を採取して数量および重量の測定を行った。

結果と考察

実験1

F344ラットの腸管神経節欠損割合は両群間で有意な差は認められなかったが、雌においてSPI (+) 群の方が腸管神経節欠損割合が小さい傾向を示した (Fig. 1A, B)。LEHラットにおいても両群間で腸管神経節欠損割合に有意な差は認められなかったが、雌雄ともにSPI (+) 群の方が腸管神経節欠損割合が小さい傾向を示した (Fig. 1C, D)。また、SPI (-) 群において両系統ともに雌より雄の方が腸管神経節欠損割合が大きい傾向を示した。ヒトヒルシュスプルング病においても女性より男性で発症率が高い事が報告されており、また我々の過去の報告とも一致していた⁶⁾。

F344ラットの13.5日胚腸管における神経発生マーカーの発現量をSPI (+) 群とSPI (-) 群間で比較した結果、SPI (+) 群でSox10の発現量が有意に増加していた (Fig. 2A)。また、PGP9.5およびFgf13においても両群間で有意差は認められないものの、SPI (+) 群で発現量が増加している傾向が認められた。これらの事より、イソフラボンは末梢神経系である腸管神経節の形成に有意な影響は与えないが、未投与群と比較すると投与群で腸管神経節の欠損割合が低い傾向を示した事や、神経発生マーカーの発現量も上昇していた事から、腸管神経節形成に関して何らかの影響は与えている可能性が示唆された。

今回我々が研究に用いたヒルシュスプルング病モデルは*Ednrb*遺伝子変異を有する系統であったが、これ以外にも*Edn3*、*Gdnf*、*Sox10*、*Ret*、*Ecel1*、*Zfxh1b*、*Phox2b*など多くの遺伝子変異がヒトヒルシュスプルング病患者およびヒルシュスプルング病モデル動物において報告されている^{7~13)}。また*Ednrb*遺伝子は*Sox10*や*L1cam*などと相互作用して腸管神経節の形成に影響を与える事が報告されている^{14, 15)}。今回の結果において、*Sox10*の発現量はSPI (+) 群で増加してい

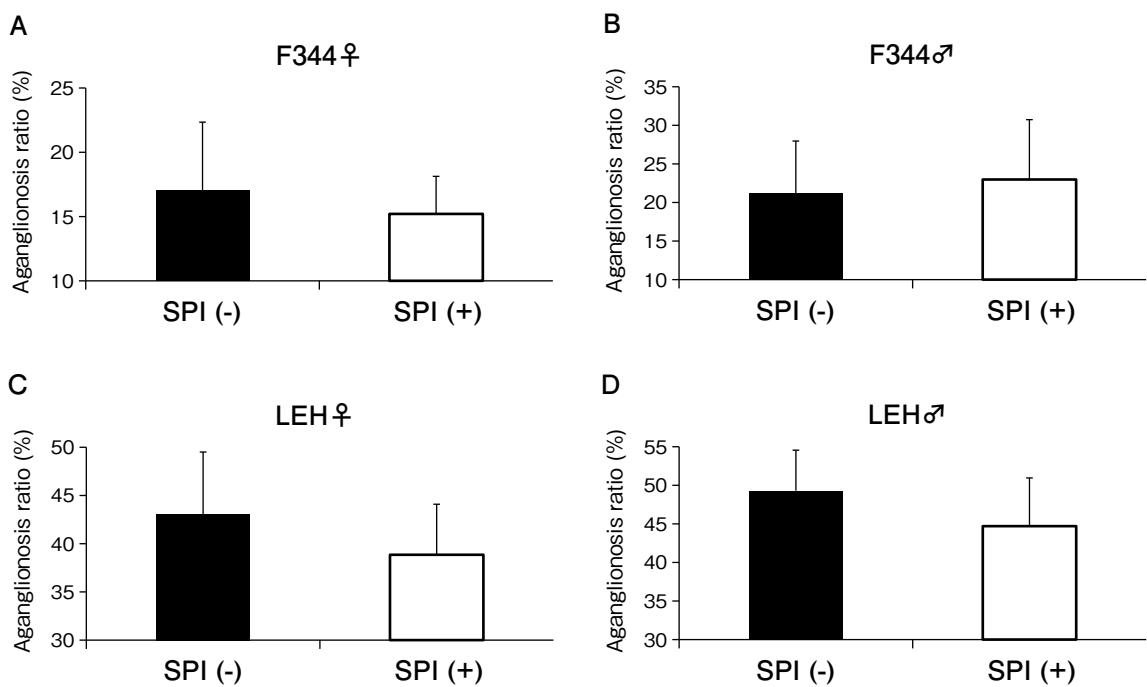


Fig. 1. The ratio of aganglionosis in 2-weeks-old pups of each strains. A:F344 female, B:F344 male, C:LEH female, D:LEH male. Intestine was stained by acetylcholinesterase and the length of the aganglionic segment was divided by the whole large intestine length to yield an aganglionosis ratio.

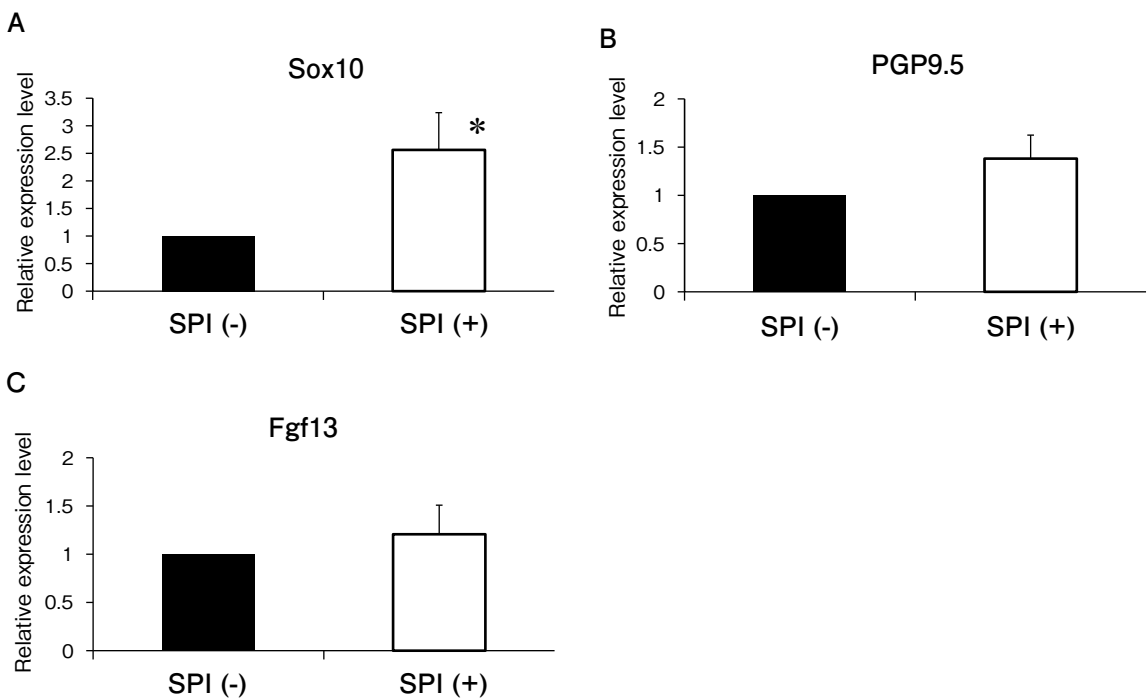


Fig. 2. The relative expression level of neurogenesis markers in the intestine at 13.5dpc. A:Sox10, B:PGP9.5, C:Fgf13. * $p < 0.05$ by Student's t -test.

た事から、Ednrb遺伝子は正常で他の原因遺伝子に変異を有するモデル動物を用いる事で、優位な神経節形成効果が見られる可能性があるかと推察される。

実験2

神経節細胞減少症モデルであるJF1マウスにおいて、体重、総大腸便重量、大腸便数、1個当たりの大腸便

重量、体重に占める大腸便量の値のいずれにおいてもSPI(-)群とSPI(+)群間で優位な差は認められなかった(Fig. 3A-E)。しかしながら、総大腸便重量や大腸便数においてSPI(+)群の方が小さい傾向を示した事から、イソフラボンは腸管の運動性にも何らかの影響を与えている可能性が示唆された。

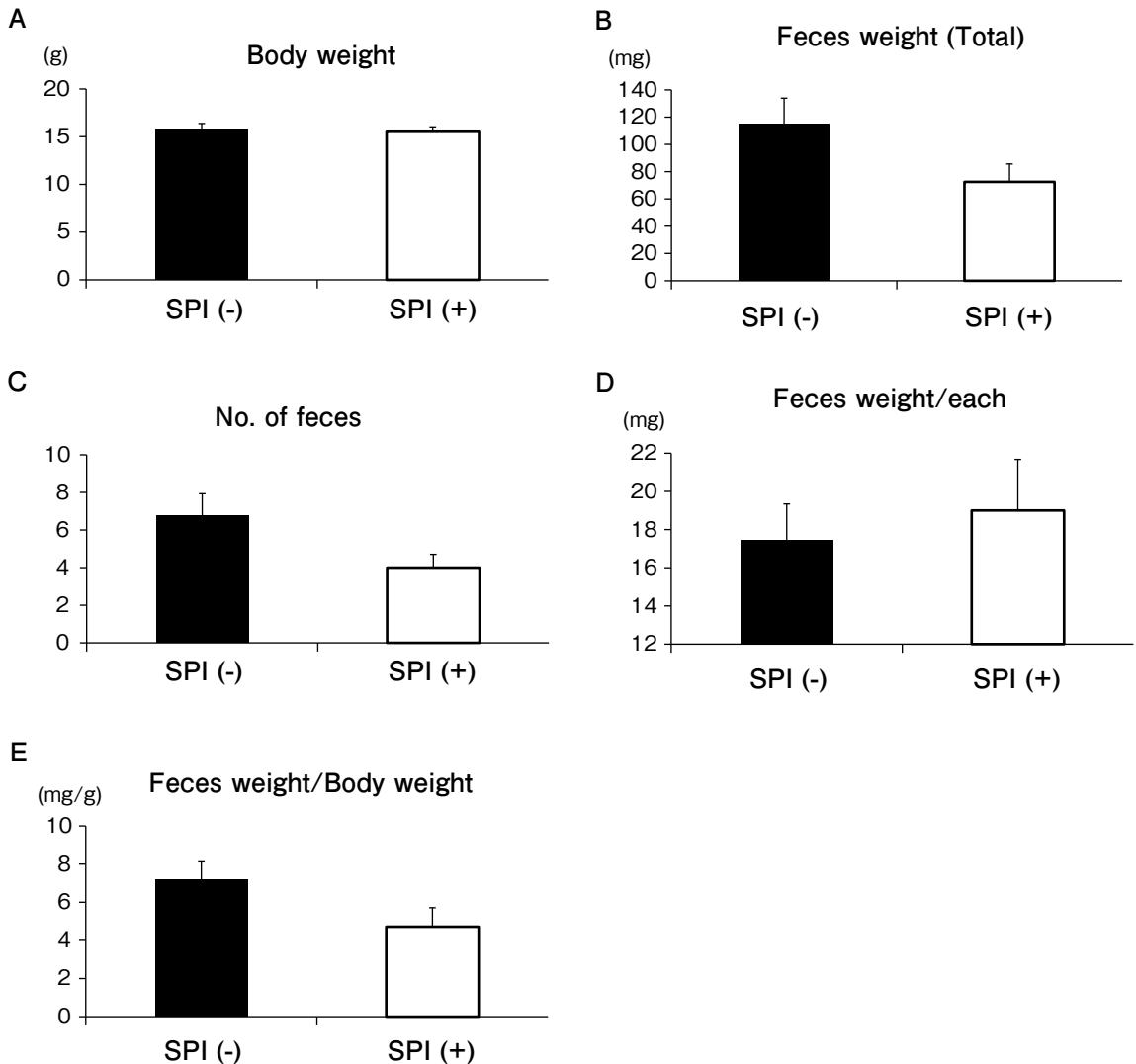


Fig. 3. Feces weight and number in the large intestine as an indicator of the mobility of the intestine. A: Body weight, B: Total feces weight, C: No. of feces, D: Feces weight/each, E: Feces weight/Body weight.

要 約

大豆に含まれるイソフラボンは抗肥満、抗炎症など様々な生理活性機能を持つことは古くから知られており、近年では中枢神経系の神経保護作用や神経新生作用を示すことも報告されているが、末梢神経系に対しても同様の効果を示すかどうかは明らかとなっていない。そこで本研究では、大豆イソフラボンが末梢神経系である腸管神経の形成および機能に与える影響をヒルシュスプリング病モデルラットと神経節減少症モデルマウスを用いて検討した。妊娠および授乳期間中に母親にイソフラボン給餌、無給餌飼育を行い、得られた産子について腸管神経節欠損割合を調べたところ、イソフラボン給餌群および無給餌群間で優位な差は見られなかったが、イソフラボン給餌群の方で欠損割合が小さくなる傾向が見られた。神経新生マーカーであるSox10、PGP9.5、Fgf13の発現は、Sox10においてイソフラボン給餌群で優位に発現が上昇していた。PGP9.5およびFgf13においてもイソフラボン給餌群の方で発現が上昇している傾向が見られた。また、神経節減少症モデルマウスにおける大腸便は糞便の個数、総重量ともにイソフラボン給餌群の方で小さい傾向が見られた。以上から、大豆イソフラボンは腸管神経節の形成および機能において何かしらの影響を与えている可能性が示唆された。

文 献

- 1) Naim Michael, Gestetner Benjamin, Bondi Aron and Birk Yshudith (1976): Antioxidative and antihemolytic activities of soybean isoflavones. *J Agric Food Chem*, **24**, 1174-1177.
- 2) Spencer JP (2010): Beyond antioxidants: the cellular and molecular interactions of flavonoids and how these underpin their actions on the brain. *Proc Nutr Soc*. **69**, 224-260.
- 3) Dang Ruihua, Torigoe Daisuke, Sasaki Nobuya and Agui Takashi (2011): QTL analysis identifies a modifier locus of aganglionosis in the rat model of Hirschsprung disease carrying *Ednrb*^{sl} mutations. *PLoS One*, **6**, e27902.
- 4) Dang Ruihua, Sasaki Nobuya, Torigoe Daisuke and Agui Takashi (2012): Anatomic modifications in the enteric nervous system of JF1 mice with the classic piebald mutation. *J Vet Med Sci*, **74**, 391-394.
- 5) Enomoto Hideki, Araki Toshiyuki, Jackman Alana, Heuckeroth OR, Snider DW, Johnson ME and Milbrandt Jeffrey (1998): GFRa1-deficient mice have deficits in the enteric nervous system and kidneys. *Neuron*, **21**, 317-324.
- 6) Dang Ruihua, Torigoe Daisuke, Suzuki Sari, Kikkawa Yoshiaki, Moritoh Kanako, Sasaki Nobuya and Agui Takashi (2011): Genetic background strongly modifies the severity of symptoms of Hirschsprung disease, but not hearing loss in rats carrying *Ednrb*^{sl} mutations. *PLoS One*, **6**, e24086.
- 7) Edery Patric, Attie Tania, Amiel Jaenne, Pelet Anna, Eng Charis, Hofstra MR, Martelli Helene, Bidaud Christelle, Munnich Arnold and Lyonnet Stanislas (1996): Mutation of the endothelin-3 gene in the Waardenburg-Hirschsprung disease (Shah-Waardenburg syndrome). *Nat Genet*, **12**, 442-444.
- 8) Angrist Misha, Bolk Stacey, Halushka Marc, Lapchak PA and Chakravarti Aravinda (1996): Germline mutations in glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) and RET in a hirschsprung disease patient. *Nat Genet*, **14**, 341-344.

- 9) Pingault Veronique, Bondurand Nadege, Kuhlbrodt Klristen, Goerich DE, Prehu MO, Puliti Aldamaria, Herbarth Beate, Borgmeyer IH, Leglus Eric, Matthijs Gert, Amiel Jeanne, Lyonnet Stanislas, Ceccherini Isabella, Romeo Giovanni, Smith JC, Read AP, Wegner Michael and Goossens Michel (1998): SOX10 mutations in patients with Waardenburg-Hirschsprung disease. *Nat Genet*, **18**, 171-173.
- 10) Ruiz FM, Torroglosa Ana, Luzon TB, Fernandez RM, Antnolo Guillermo, Mulligan LM and Borrego Salud (2011): Novel mutations at RET ligand genes preventing receptor activation are associated to Hirschsprung's disease. *J Mol Med*, **89**, 471-480.
- 11) Jiang Qian, Ho YY, Hao Li, Berrios CN and Chakravarti Aravinda (2011): Copy number variants in candidate genes are genetic modifiers of Hirschsprung disease. *PLoS One*, **6**, e21219.
- 12) Sasongko TH, Sadewa AH, Gunadi, Lee MJ, Koterazawa Keiko and Nishino Hisahide (2007): Nonsense mutations of the ZFHX1B gene in two Japanese girls with Mowat-Wilson syndrome. *Kobe J Med Sci*, **53**, 157-162.
- 13) Fitze Guido, Konig IR, Paditz Ekkehart, Serra Alexandre, Schlafke Marianne, Roesner Dietmar, Ziegler Andreas and Schackert HK (2008): Compound effect of PHOX2B and RET gene variants in congenital central hypoventilation syndrome combined with Hirschsprung disease. *Am J Med Genet A*, **146A**, 1486-1489.
- 14) Laure Stanchina, Viviane Baral, Fabienne Robert, Veronique Pingault, Nicole Lemort, Vassilis Pachnis, Michel Goossens and Nadege Bondurand (2006): Interactions between Sox10, Edn3 and Ednrb during enteric nervous system and melanocyte development. *Dev Biol*, **295**, 232-249.
- 15) Wallace AS, Tan MX, Schachner Melitta and Anderson RB (2011): L1cam acts as a modifier gene for members of the endothelin signalling pathway during enteric nervous system development. *Neurogastroenterol Motil*, **23**, 510-522.