

大豆イソフラボンのマウス抗肥満効果に関する時間栄養学的研究

田原 優^{*1,2}・桑原麻里²・柴田重信²

¹早稲田大学高等研究所

²早稲田大学先進理工学部電気・情報生命工学科生理・薬理学研究室

Chrono-nutritional Study for Anti-obesity Effect of Isoflavone

Yu TAHARA^{*1,2}, Mari KUWAHARA² and Shigenobu SHIBATA²

¹Waseda Institute of Advanced Study

²Laboratory of Physiology and Pharmacology, School of Advanced Science and Engineering,
Waseda University, Tokyo 162-8480

ABSTRACT

Chrono-nutritional research is important to enhance the function of functional foods by considering the timing of consumption, because circadian clock system regulates many physiological processes with daily variations. Quercetin is one of functional flavonoids, and has antioxidant, anti-inflammatory, and anti-obesity effects. Here we show that quercetin prevents absorption of fats at the morning time but not at the evening time. In addition, daily morning intake of quercetin reduced fasting blood glucose and obesity-induced hyperinsulinemia. These results indicate that quercetin should be taken in the morning to prevent obesity. *Soy Protein Research, Japan* **18**, 213-220, 2015.

Key words : circadian clock, liver, obesity, quercetin

健康維持、肥満予防には、食・栄養の摂取総量や摂取栄養素のバランスのみならず、1日の総量をどのような時間にどのように分食して食べていくのが大事かを調べる「時間栄養学」の発想が必要である。申請者はこれまでに、肥満・体内時計に対して朝食の有効性を示してきた^{1,2)}。また、大豆イソフラボンのダイゼインやゲニステインが、培養細胞の体内時計の周期を延長させる作用があることが分かり、大豆ペプチドが体内時計に作用する可能性が指摘できた。本研究では、

まずゲニステイン、ダイゼインについて、抗肥満効果を検証したが、当研究室の実験系ではその効果を認めなかった。そこで、様々な植物に含まれるポリフェノールであり、抗炎症、抗酸化、抗肥満作用の報告があるケルセチンについて、抗肥満効果、脂肪吸収抑制効果の検証を、摂取タイミングの違いを考慮に入れて検証した。

*〒162-8480 東京都新宿区若松町2-2

方 法

実験動物

動物実験は、早稲田大学動物実験審査委員会の許可を得た上で行った。ICRマウス、オスを東京実験動物株式会社より購入して、使用した。マウスは $22 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度は $60 \pm 5\%$ で、明暗条件は12-h light-12-h dark cycle (L:D=12:12) で飼育した。明期は午前8:00 (ZT0) から、暗期は午後8:00 (ZT12) からと設定した。

飼料、試薬

餌はオリエンタル酵母工業株式会社より購入したMF (通常食; ND), RESEARCH DIETS社より購入した45 kcal%脂肪の高脂肪食 (HFD) を与えた。Quercetin (Sigma-Aldrich, Q4951-10), ラード (Sigma-Aldrich, L0657-500ML), D (+)-Glucose (和光純薬工業, 049-311165) を使用した。Mercodia Mouse Insulin ELISA (Mercodia, 10-1247-01), NEFA C-テストワコー (ACS・ADOD法) (和光純薬工業, 279-75401), トリグリセライド E-テストワコー (GPO・DAOS法) (和光純薬工業, 432-40201) を使用した。

RT-PCR

採取した臓器からRNAを抽出後、One-Step SYBR RT-PCR kit (TaKaRa Bio), PikoReal 96ウェルシステム (Thermo Fisher Scientific, TCR0096) を用いてRT-PCRを行った。

糖負荷試験

経口投与前の血糖値を0分とし、マウスにグルコース溶液を経口投与後15分、30分、60分、120分の血糖値を測定した。グルコース溶液は0.1 mL/10 g BWを投与し、濃度は2 g/kg BWとなるよう調整した。測定中は絶食した。

実験1：ケルセチン食による抗肥満作用

実験開始時6週齢のマウスを使用した。高脂肪食にケルセチン (Q) を0.05% (HFD+Q0.05)³⁾、もしくは0.33% (HFD+Q0.33)⁴⁾ 混ぜた餌を用意し、これらのマウスに自由摂食させた。(各群n=6) また、20% sucrose水および水道水を自由摂水させた。マウスは各群3匹飼いし、1週間ごとに体重、摂食量、摂水量を測定した。測定から4週間経過後、サンプリングを行った。また、サンプリング2日前にグルコース負荷試験を行った。グルコース負荷試験でのグルコース経口投

与およびサンプリングはZT0に行った。

実験2：ケルセチンによる肥満改善効果

実験開始時に50 g以上のマウスを用いて、水、またはケルセチン (100 mg/kg) を2週間、ZT12 (活動期の始め、朝) に投与した。各群n=8。

2週間の投与後、ZT12にサンプリングした。また、実験開始時と投与2週間後に、耐糖試験を行った。

実験3：ケルセチンによる脂肪吸収抑制作用

制限給餌装置を用い、活動期の始まりと終わりそれぞれ2時間ずつ (ZT12-14およびZT22-24) のみ摂食できるよう制限給餌を行った。餌は通常餌を用いた。これらのマウスに、ZT12 (朝に相当) もしくはZT22 (夕に相当) にケルセチン混合ラードを経口投与し、血清トリグリセリド (TG) 値を測定した。経口投与前のTG値を0分とし、マウスにケルセチン混合ラードを経口投与後60分、120分、180分で採血を行った。ラードは0.1 mL/30 g BWを投与し、ケルセチン濃度は100 mg/kg BWとなるよう調整した。マウスは実験時9-10週齢、各群n=7。同様のプロトコルで、代謝装置を使用して呼吸商およびエネルギー代謝量 (EE) を測定した。

結 果

実験1において、まずケルセチン添加高脂肪食を自由摂食させ、高脂肪食誘導性の肥満に対する抑制効果を検討した。添加濃度は先行論文を参考にして設定した^{3,4)}。その結果、0.33%ケルセチン添加群において、対照群に比べて体重増加を抑制する結果を得た (Fig. 1A)。その際に、糖負荷試験における血糖値上昇の抑制、また肝臓トリグリセリド量の低下も同時に見られた (Fig. 1B, D)。しかし、対照群に比べて、ケルセチン添加群では摂食量が大きく減少してしまった (Fig. 1C)。摂食量の減少による肥満抑制の可能性を排除するのは難しいと考え、この実験系では実験を進めていくことを断念した。

実験2では、高脂肪食負荷により既に肥満 (50 g以上) 傾向のマウスに対して、ケルセチンの経口投与による肥満抑制効果を検討した。ケルセチンは活動期の始めであるZT12 (ZT0は明期の始め、8時と定義する。ZT12は暗期の始め、20時となる) に2週間連続で投与した (Fig. 2A)。その結果、絶食時の血糖値は対照群にて有意に上昇したが、ケルセチン投与群では見られなかった (Fig. 2B, C)。また、ケルセチン群ではイン

スリン分泌量が減少していた (Fig. 2D). 血清中の遊離脂肪酸は両群で共に減少していた (Fig. 2E). 以上より, ケルセチンによるインスリン抵抗性の改善効果を確認することができた.

実験3では, 朝夕それぞれの時刻における, ケルセチンの脂肪吸収抑制作用を検討した. ラードを経口投与し, 血中トリグリセリド濃度を経時的に測定することで脂肪吸収を評価した (Fig. 3A). 結果, 朝 (ZT12) においてケルセチンによる脂肪吸収抑制効果を確認したが, 夕 (ZT22) ではその効果を確認できなかった (Fig. 3B). また, 経口投与2時間後に肝臓, 腓腹筋における *Ppara* の発現量が朝のケルセチン投与群でのみ有意に上昇していた (Fig. 4). 同時に代謝ケージにて, 呼吸商, エネルギー代謝の変化を測定したが, 対照群, ケルセチン群の間に大きな差は見られなかった. しかし, 朝夕で比較してみると, 朝の方が投与前後でエネルギー代謝の増加が著しかった (Fig. 5).

考 察

本研究では, 大豆に含まれるフラボノイドであるイソフラボンに着目し, 抗肥満作用の時間栄養学を展開する予定であった. しかし, 予備検討の段階でイソフラボンによる抗肥満効果を認めなかったため (混餌投与, 飲水投与試験にて), 同時に研究を遂行していたフラボノイドの一つであるケルセチンを用いた時間栄養学研究にテーマを変更した.

ケルセチンはタマネギやソバ, リンゴに含まれるフラボノイドの一種であるが, フラボノイドの中でもケルセチンは特に強い抗酸化作用を有する. 血管や赤血球は活性酸素により柔軟性を失う, つまり活性酸素は血栓の原因となり, 動脈硬化や血圧上昇が引き起こされる. 抗酸化物は活性酸素によるダメージを軽減するため, ケルセチンはこれらの疾患の予防に役立つ⁵⁾. このほか, 抗炎症作用⁶⁾, インスリン抵抗性改善⁷⁾, ホルモン感受性リパーゼ活性による脂肪分解能⁸⁾, アディポネクチン発現上昇⁹⁾などの機能を持つ. 近年, この脂肪分解能に注目した特定保健用食品も発売されており, ケルセチン摂取によりメタボリックシンドローム予防や改善への寄与が期待されている.

本研究では, 先行研究と同様に, ケルセチン投与における抗肥満効果, 脂肪吸収抑制効果を確認することができた. さらに, この脂肪吸収抑制作用は活動期の始めのみに効果が見られることが分かった. 朝のケルセチン投与により, 肝臓や腓腹筋において, β 酸化関連遺伝子である *Ppara* 発現の増加が見られた. 代謝測

定により朝方はエネルギー消費量が夕方より高いことが分かった. これらの結果もまた, 血清TGの増加抑制に寄与したのではと考えている. 今後は, 腸管における脂肪の動態, ケルセチンによる脂肪吸収抑制機構のどこに日内制御があるのか調べていく. 抗肥満効果については, 実験プロトコルの検討に時間がかかってしまい, 朝夕投与の比較が出来なかったが, 脂肪吸収作用と同様に朝の投与にてインスリン抵抗性の改善効果が見られた. 今後は夕方投与における効果を同様のプロトコルで実験していく. 以上の研究より, ケルセチンの摂取タイミングの違いによって, その素材がもつ機能を高めたり損なわせたりすることが分かった. 今後, 同様の研究を行うことで, 時間薬理学を応用した時間栄養学の発展に寄与できると考えている.

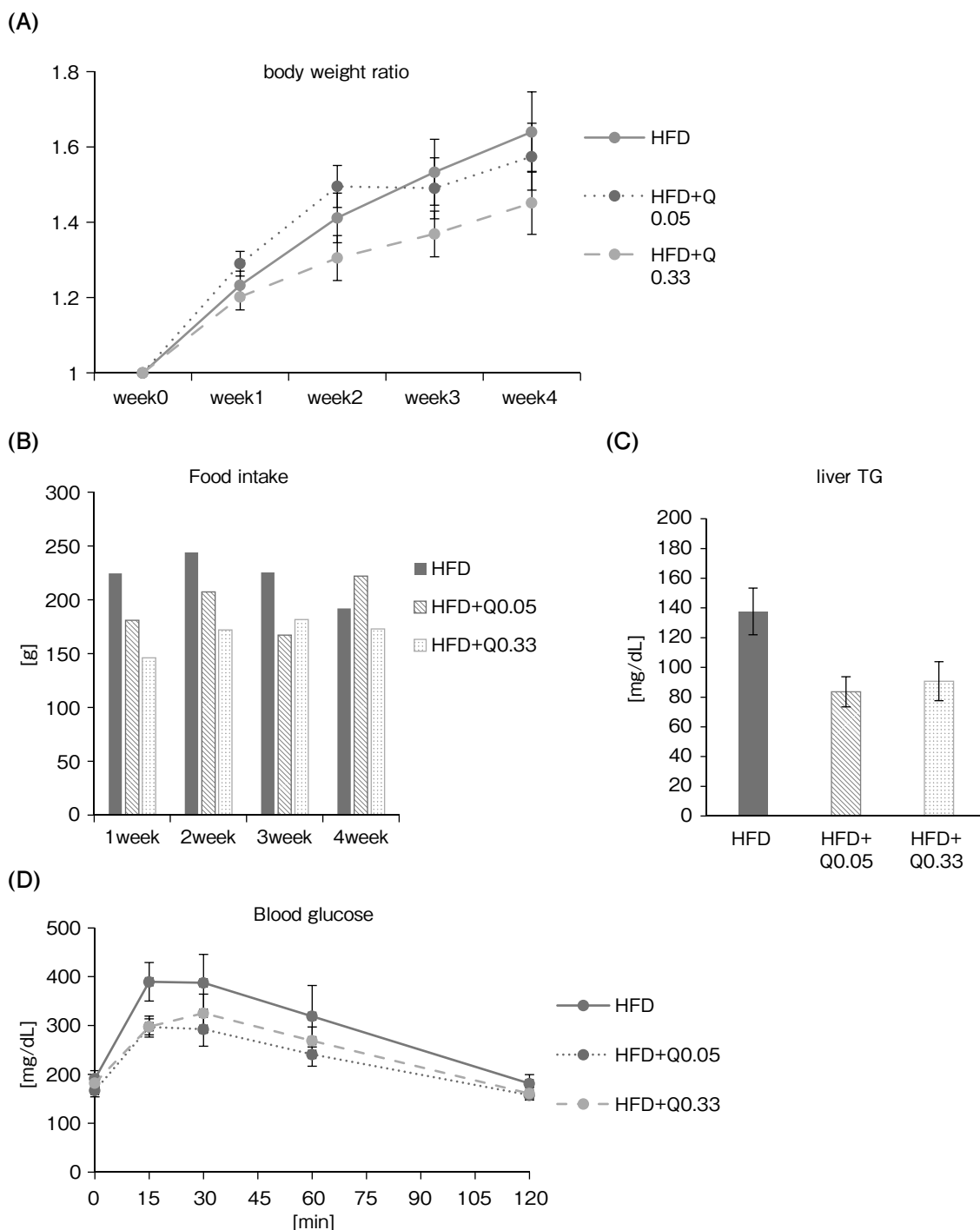


Fig. 1. Experiment 1: Preventive effects of obesity by Quercetin.

(A) Body weight increase ratio.

(B) Food intake during each 1 week.

(C) Liver TG contents at the week 4.

(D) Blood glucose changes in OGTT.

HFD+Q 0.05 or HFD+Q 0.33; 0.05% or 0.33% of quercetin in HFD, respectively

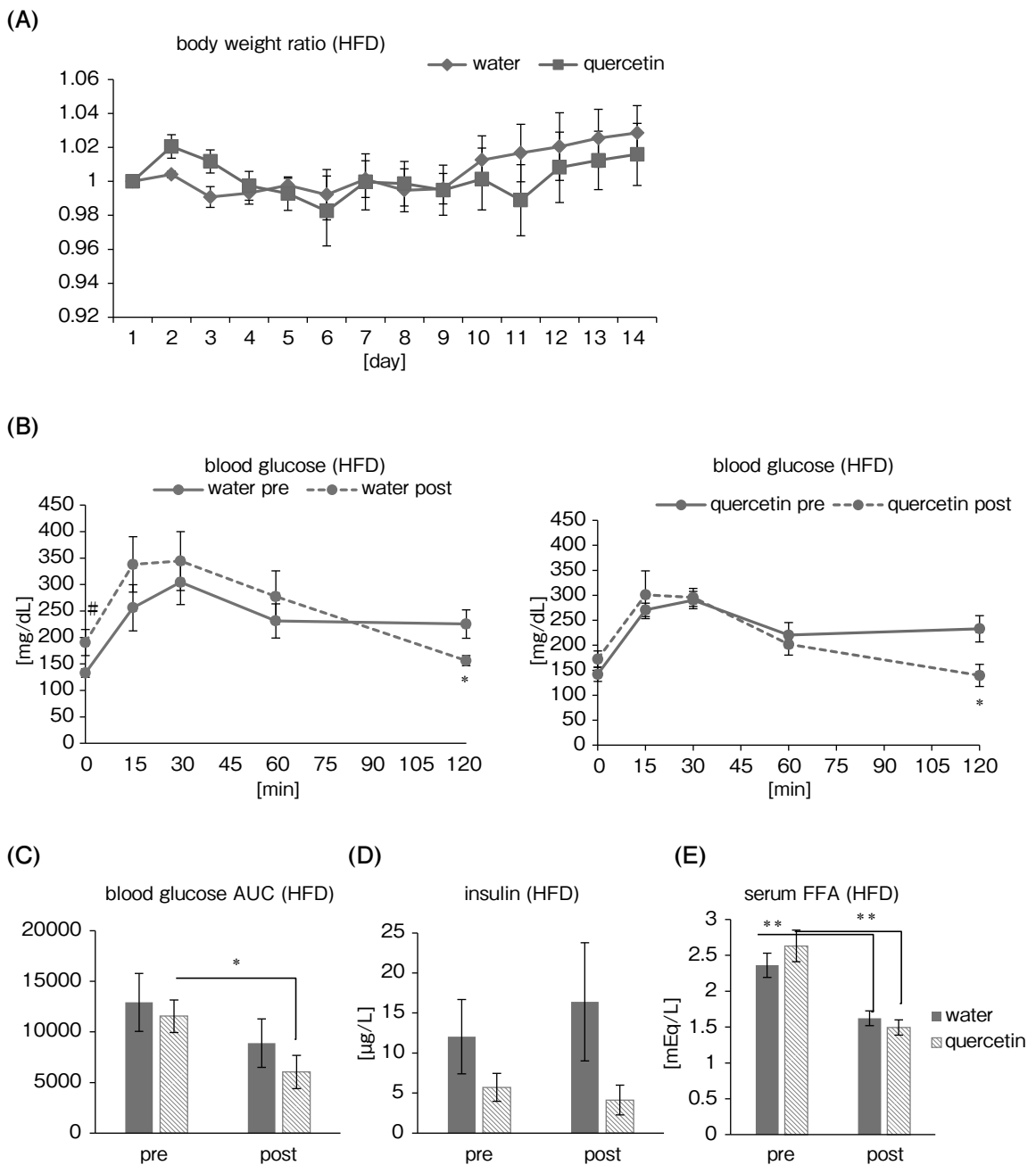


Fig. 2. Experiment 2: Improvement effects of obesity by Quercetin.

(A) Body weight increase ratio. (B) Blood glucose changes in OGTT before and after quercetin treatment.

* $p < 0.05$ vs. pre by Student's *t*-test, # $p < 0.05$ vs. pre by Mann-Whitney test.

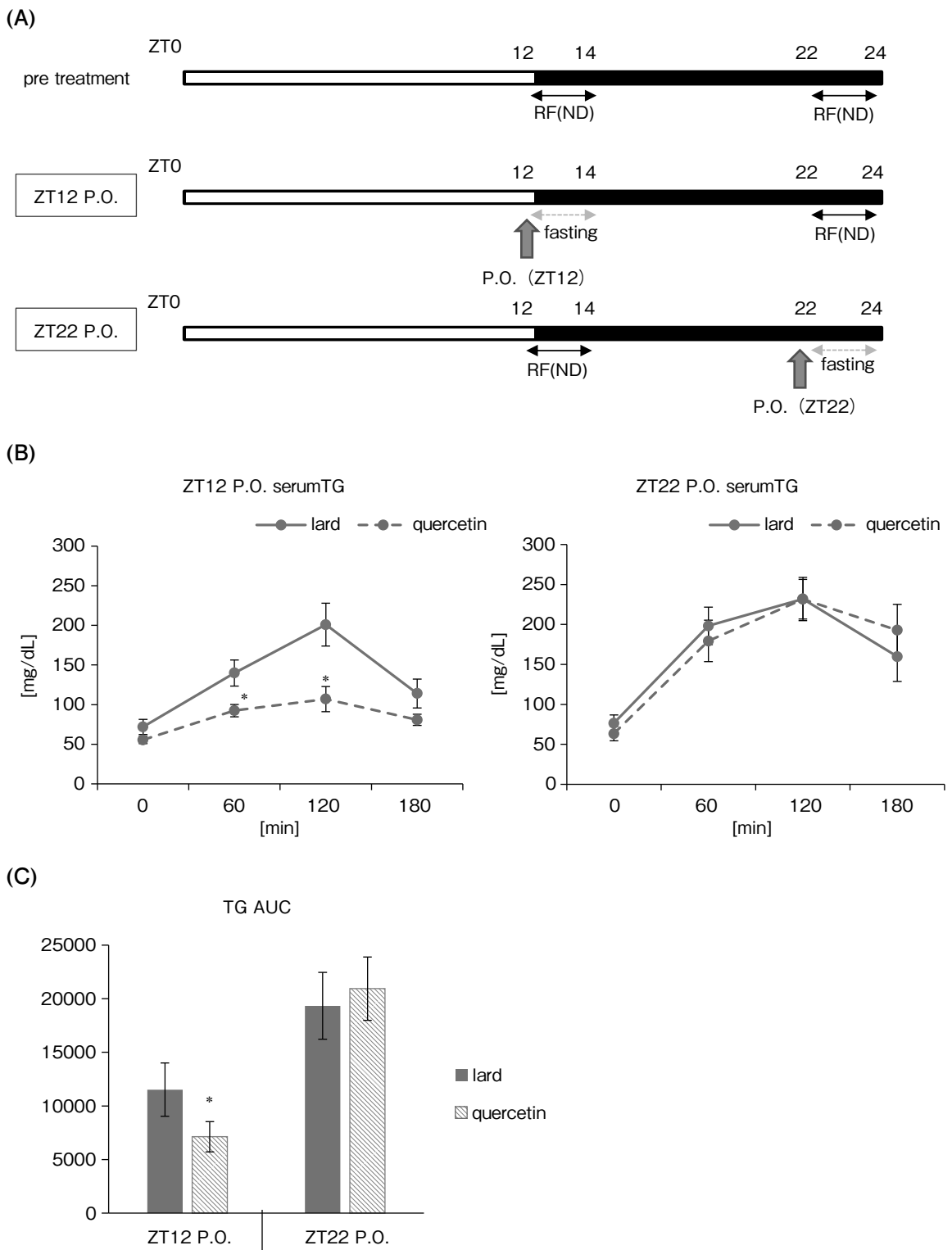


Fig. 3. Experiment 3: Decrease of absorption of fat by Quercetin (1).
 (A) Experimental protocol. (B) Blood TG contents after injection. * $p < 0.05$ vs. lard by Student's t -test.
 (C) TG AUC. * $p < 0.05$ vs. lard by Student's t -test.

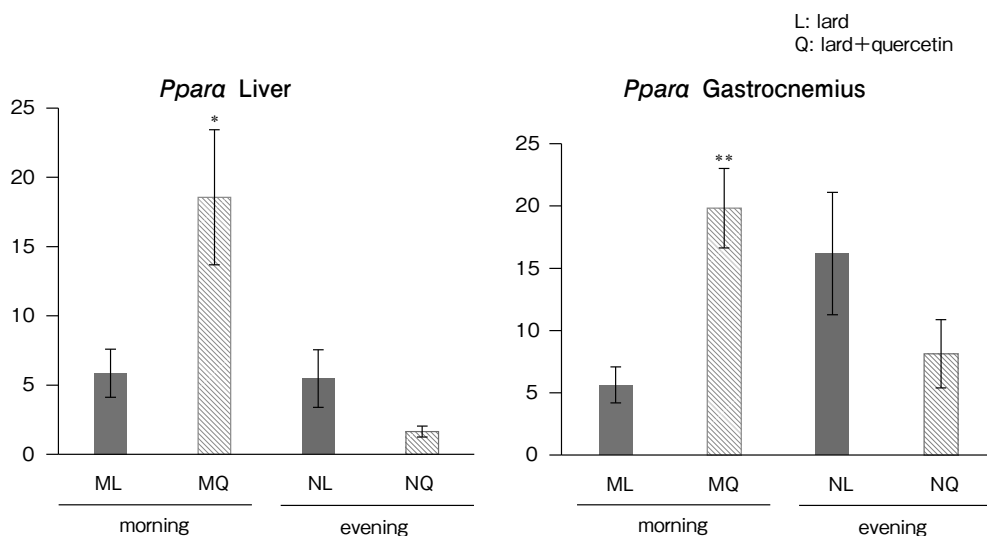


Fig. 4. Experiment 3: Decrease of absorption of fat by Quercetin (2).
 (A) mRNA expressions in the liver.
 (B) mRNA expressions in the gastrocnemius. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. lard by Student's *t*-test.

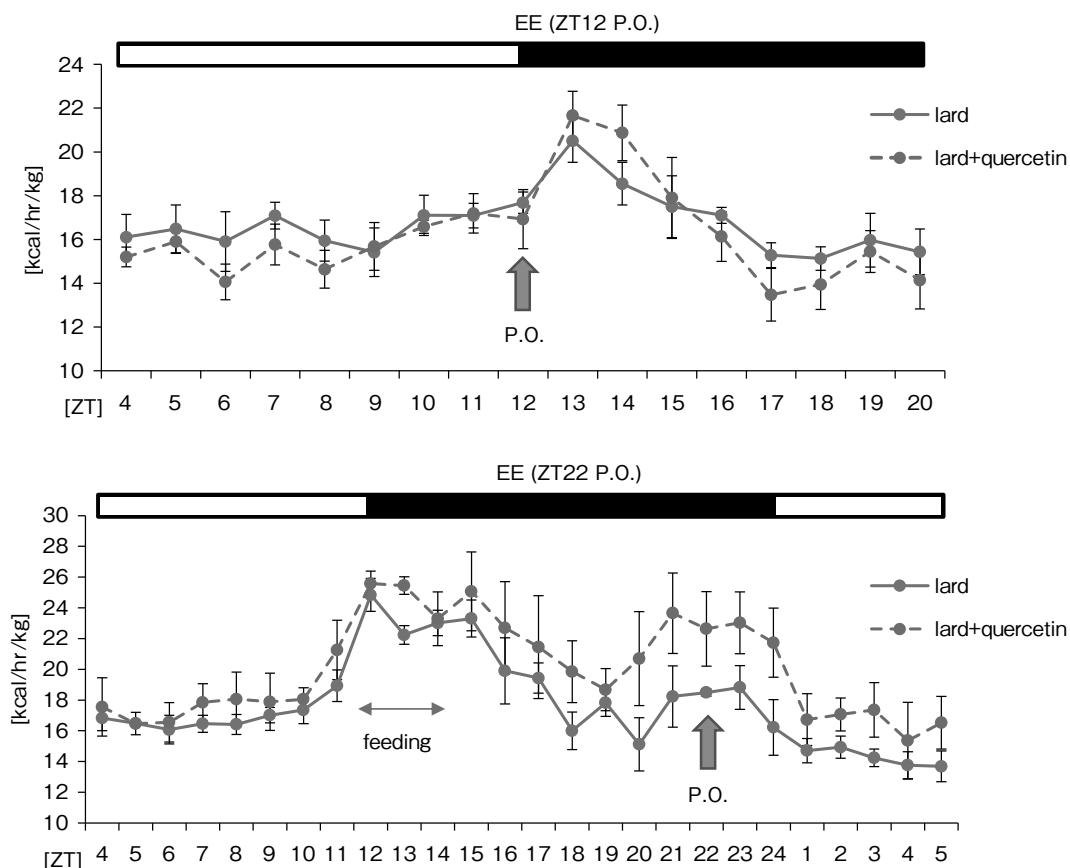


Fig. 5. Experiment 3: Decrease of absorption of fat by Quercetin (3).
 Time course of energy expenditure (EE).

要 約

健康維持、肥満予防には、食・栄養の摂取総量や摂取栄養素のバランスのみならず、1日の総量をどのような時間にどのように分食して食べていくのが大事かを調べる「時間栄養学」の発想が必要である。本研究では、まずゲニステイン、ダイゼインについて、抗肥満効果を検証したが、当研究室の実験系ではその効果を認めなかった。そこで、様々な植物に含まれるポリフェノールであり、抗炎症、抗酸化、抗肥満作用の報告があるケルセチンについて、抗肥満効果の検証を、摂取タイミングの違いを考慮に入れて行った。

通常食を朝、夜2時間ずつのみ摂食できるよう制限給餌し、水道水を自由飲水させたマウスを用意し、朝食前もしくは夜食前にラードもしくはケルセチン混合ラードを単回経口投与した。その後の血清TGの推移を追ったところ、朝でのケルセチン投与でTG上昇を抑えた。これはケルセチンが脂肪吸収抑制を示したことが考えられる。さらに同様のプロトコルで代謝測定を行った。呼吸商は経口投与前後、および対照群、ケルセチン群間に変化を及ぼさなかった。エネルギー代謝量は夜よりも朝でのケルセチン投与で増加した。次に、通常食自由摂食条件下で飼育され、実験開始時肥満(体重50 g以上、平均58.5 g)のマウスに、純水、もしくはケルセチン水溶液を2週間経口投与し肥満改善効果を検証した。これまでの実験で、朝でのケルセチン投与が効果的である可能性が示唆されたため、本実験では朝での経口投与を行った。結果、体重変化率は対照群と差はなかったものの、血糖値AUC、血清TGおよび肝臓TG、血清FFAは、ケルセチン群でより減少した。以上より、ケルセチンは朝での摂取がメタボリックシンドローム改善に効果的であることが示された。

文 献

- 1) Kuroda H, Tahara Y, Saito K, Ohnishi N, Kubo Y, Seo Y, Otsuka M, Fuse Y, Ohura Y, Hirao A and Shibata S (2012): Meal frequency patterns determine the phase of mouse peripheral circadian clocks. *Sci Rep*, **2**, 711.
- 2) Fuse Y, Hirao A, Kuroda H, Otsuka M, Tahara Y and Shibata S (2012): Differential roles of breakfast only (one meal per day) and a bigger breakfast with a small dinner (two meals per day) in mice fed a high-fat diet with regard to induced obesity and lipid metabolism. *J Circadian Rhythms*, **10**, 4.
- 3) Kobori M, Masumoto S, Akimoto Y and Oike H (2011): Chronic dietary intake of quercetin alleviates hepatic fat accumulation associated with consumption of a Western-style diet in C57/BL6J mice. *Mol Nutr Food Res*, **55**, 530-540.
- 4) Hoek-van den Hil EF, van Schothorst EM, van der Stelt I, Swarts HJ, Venema D, Sailer M, Vervoort JJ, Hollman PC, Rietjens IM and Keijer J (2014): Quercetin decreases high-fat diet induced body weight gain and accumulation of hepatic and circulating lipids in mice. *Genes Nutr*, **9**, 418.
- 5) Boots AW, Haenen GR and Bast A (2008): Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical. *Eur J Pharmacol*, **585**, 325-337.
- 6) Valério DA, Georgetti SR, Magro DA, Casagrande R, Cunha TM, Vicentini FT, Vieira SM, Fonseca MJ, Ferreira SH, Cunha FQ and Verri WA Jr. (2009): Quercetin reduces inflammatory pain: inhibition of oxidative stress and cytokine production. *J Nat Prod*, **72**, 1975-1979.
- 7) Arias N, Macarulla MT, Aguirre L, Martinez-Castaño MG and Portillo MP. (2014): Quercetin can reduce insulin resistance without decreasing adipose tissue and skeletal muscle fat accumulation. *Genes Nutr*, **9**, 361.
- 8) 立石法史, 江川香, 神崎範之, 北川義徳, 柴田浩志, 木曾良信, 榎本操一郎, 福田大受, 永井良三, 佐田政隆 (2009): ケルセチン配糖体のマウス食餌性肥満モデルに及ぼす影響. 薬理と治療, **37**, 123-131.
- 9) Wein S, Behm N, Petersen RK, Kristiansen K and Wolfram S (2010): Quercetin enhances adiponectin secretion by a PPAR-gamma independent mechanism. *Eur J Pharm Sci*, **41**, 16-22.