

# 大豆イソフラボンによる多嚢胞性卵巣症候群の 予防とその作用機序解明

Liyanage Geethika・岡田晋治\*

東京大学大学院農学生命科学研究科ILSI Japan寄付講座「機能性食品ゲノミクス」

## Investigating the Effect of Soy Isoflavones on Improving Polycystic Ovary Syndrome Hallmarks

Liyanage GEETHIKA and Shinji OKADA\*

ILSI Japan-Endowed Chair of Functional Food Science and Nutrigenomics, Graduate School of  
Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo, Tokyo 113-8657

### ABSTRACT

Women with Polycystic Ovary Syndrome (PCOS), a common endocrine disease during their reproductive age, are currently treated with lifestyle modifications and various medications. Some of these methods are proven to have side effects. Soy isoflavones are a type of phytoestrogens that are extensively studied for their potential health benefits. Recently, the association between gut microbiota and PCOS was also discovered. However, limited studies have been done to examine the effect of soy isoflavones on PCOS hallmarks. In the present study, 7 weeks old female SD rats were divided into 3 groups; Control, PCOS and PCOS+Soy Isoflavones (n = 8/group). The PCOS and PCOS+Soy groups were treated by oral administration of Letrozole at a concentration of 0.5 mg/kg body weight for 21 days to develop a moderate PCOS model. The PCOS+Soy group then received a diet with 0.05% isoflavones for 14 days. The PCOS group showed abnormal estrous cycles and multiple large cysts. After isoflavone treatment, the number of cysts was reduced and the estrous cyclicity was improved in the PCOS+Soy group. As for gut microbiota, *Granulicatella* and *rc4-4* levels were higher in PCOS rats compared to Control ones. When treated with isoflavones the *Granulicatella* level was reduced in the PCOS group. Collectively, these results suggested that soy isoflavones improved PCOS hallmarks by modulating the gut microbiota. *Soy Protein Research, Japan* **21**, 90-94, 2018.

\*〒113-8657 東京都文京区弥生1-1-1

Key words : soy isoflavones, PCOS, gut microbiota, polycystic ovary syndrome hallmarks

多嚢胞性卵巣症候群 (PCOS) は、卵巣内に嚢胞が多数でき、排卵障害を引き起こす病態である<sup>1)</sup>。有病率は成人女性の6-18%にも達するとされ、不妊の一因となっている。その発症原因は不明であるが、ホルモンバランスの異常や、肥満、インスリン抵抗性といったメタボリックシンドローム、そして、腸内細菌叢の悪化などが関与することが示唆されている。大豆イソフラボンは、前述の3つの原因に作用することが個別に報告されており、普段の食事での摂取によってPCOSの予防・改善に寄与しうる機能的食品素材だと考えられる。本申請研究では、動物モデルを用いて、大豆イソフラボンによるPCOSの改善効果を解析した。

## 方 法

### 1. 動物飼育

5週齢メスのSDラットを7日間の予備飼育の後、対照 (C) 群, PCOS (P) 群, PCOS+大豆イソフラボン (PS) 群の3つに分けた (各群 n=8)。その後、8日間生理周期を観察した後、P群およびPS群にレトロゾールを21日間強制経口投与することで、PCOSを発症させた。この間、各ラットにはAIN-93G組成に基づく通常飼料を自由摂食させた。その後、C群とPS群には引き続き通常飼料を給餌し、PS群には0.05%大豆イソフラボン (Soyafalavone HG, 不二製油) を含む試験飼料 (Table 1) を給餌して、14日間自由摂食させた。試験終了時に解剖を行い、血液および臓器の採取を行った。動物実験は東京大学動物実験委員会の承認を受け、実施した。

Table 1. Diet Compositions

Ingredient (g/kg)	Control Diet	Soy Diet
Casein	200	200
L-Cystine	3	3
Corn Starch	397.486	396.486
Maltodextrin	132	132
Sucrose	100	100
Cellulose, BW200	50	50
Soybean Oil	70	70
t-Butylhydroquinone	0.014	0.014
Mineral Mix S10022G	35	35
Vitamin Mix V10037	10	10
Choline Bitartrate	2.5	2.5
Soyaflavone HG (Fuji Oil)		1
Total	1,000	1,000

### 2. 卵巣の組織観察

卵巣は10%中性ホルマリンで固定し、パラフィン切片を作製した。ヘマトキシリン-エオシン染色を行い、顕微鏡観察によって黄体および嚢胞の数を計数した。

### 3. 血中テストステロン濃度の測定

ELISA Kit (バイオベンダーラボラトリー) によって測定した。

### 4. 腸内細菌叢解析

盲腸内容物より細菌DNAを抽出した。抽出したDNAの16SリボソームRNAをPCRによって増幅し、ライブラリーを作製して、MiSeq desktopシーケンサー (イルミナ) によって解析を行った。

### 5. 統計解析

統計解析には、SPSS Statistics 20 (IBM) を使用した。一元配置分散分析のちGames Howell法で多重比較検定を行った。P<0.05を有意水準として設定した。

## 結 果

### 1. 生理周期への影響

14日間の試験食摂食期間中、生理周期の変化を解析した (Fig. 1)。発情間期の割合は、C群で25%程度であるのに対し、P群では70%程度と有意に増加していた。一方、大豆イソフラボン添加飼料を摂食していたPS群では、発情間期の割合は45%程度であり、P群より有意に低く、C群との間には有意差はみられなかった。大豆イソフラボンの摂取はPCOSモデルにおける生理周期の異常を改善する作用を持つことが示された。

### 2. 卵巣における嚢胞形成への影響

試験終了時に摘出した卵巣中の嚢胞形成について観察した (Fig. 2)。卵巣薄切片において観察される嚢胞の数は、P群においてC群の約10倍へと有意に増加していた。一方、PS群では、嚢胞の数はC群の2倍程度であり、C群との間には有意差がなかった。黄体の数は3群で変化がなかった。大豆イソフラボンの摂取はPCOSモデルにおける卵巣の嚢胞形成を改善する作用を持つことが示された。

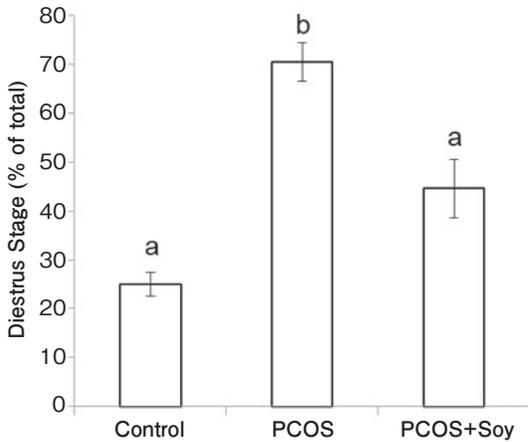


Fig. 1. The changes of diestrus stage percentages. Estrous cycle stages were examined by daily vaginal smear sampling in the last 14 days. All the values are expressed as mean  $\pm$  S.E. Statistical analysis was carried out by one-way ANOVA followed by Games-Howell test for multiple comparison analysis. a, b indicate the significant differences between the groups ( $P < 0.05$ ).

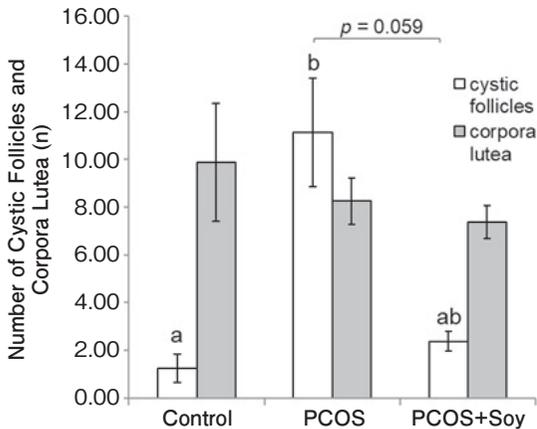


Fig. 2. Ovarian morphological changes. Ovarian sections were observed, and the numbers of cystic follicles and corpora lutea were counted. All the values are expressed as mean  $\pm$  S.E. Statistical analysis was carried out by one-way ANOVA followed by Games-Howell test for multiple comparison analysis. a, b indicate the significant differences between the groups ( $P < 0.05$ ).

### 3. 血中テストステロン濃度への影響

試験終了時に採取した血液中のテストステロン濃度について解析を行った (Fig. 3). その結果, P群においてC群に対して有意ではないもののテストステロン濃度は高値を示した. 一方, PS群のテストステロン濃度はP群とはほぼ同等であった. 大豆イソフラボンの摂取はPCOSモデルにおける高アンドロゲン血症を改善する作用を持たないことが示唆された.

### 4. 腸内細菌叢への影響

試験終了時に採取した盲腸内容物中の腸内細菌叢について解析を行った (Fig. 4). その結果, C群と比較して, P群では*Granulicatella*と*rc4-4*の割合が有意に増加していた. これらの細菌のうち*Granulicatella*はPS群では減少し, C群との間に有意差がなかった. PCOSモデルでは, 腸内細菌叢が変化すること, また, その一部が大豆イソフラボンの摂取によって回復することが示された.

## 考 察

本研究では, PCOSモデルラットに対して, 14日間0.05%大豆イソフラボン添加飼料を摂取させることによって, 生理周期の異常と嚢胞形成という2つの症状が改善することを示した. 大豆イソフラボンによるPCOS改善効果については, 改善効果を示すという報

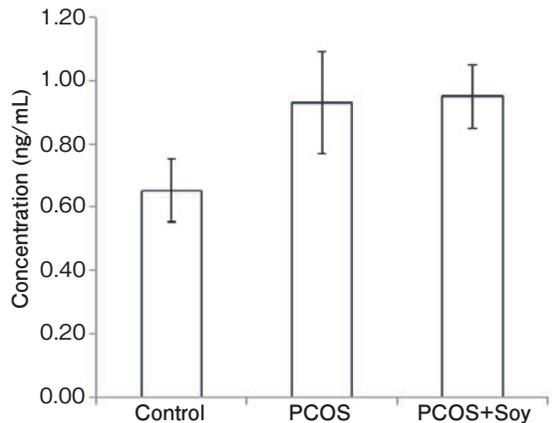


Fig. 3. Serum testosterone concentration changes. The concentrations of testosterone in the serum were quantified with ELISA kit. All the values are expressed as mean  $\pm$  S.E. Statistical analysis was carried out by one-way ANOVA followed by Games-Howell test for multiple comparison analysis.

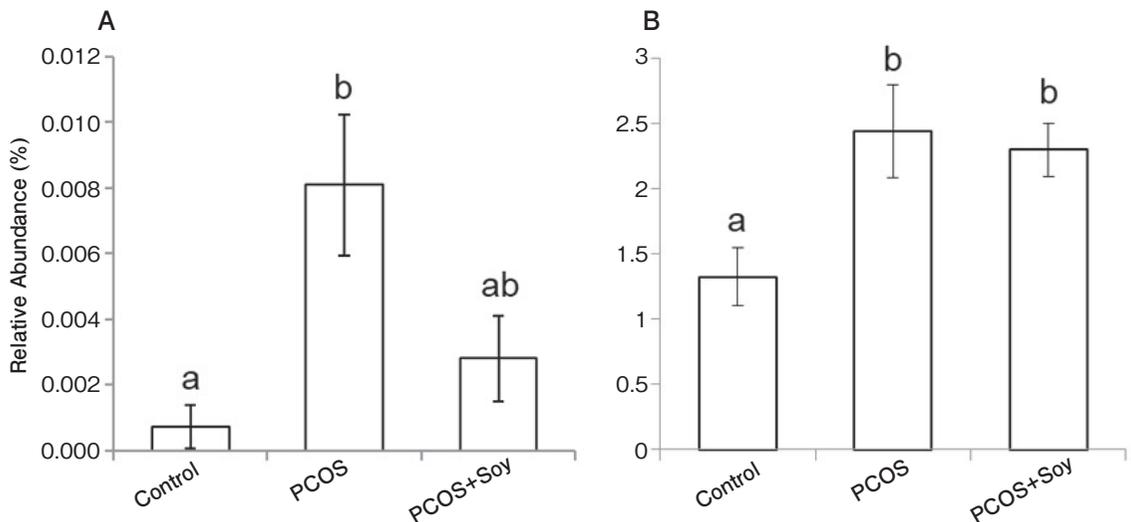


Fig. 4. The changes of relative abundances of gut microbial genera. Gut microbiota were examined by 16S rRNA metagenome analysis. A. Relative abundance of *Granulicatella*. B. Relative abundance of *rc4A*. a, b indicate the significant differences between the groups ( $P < 0.05$ ).

告<sup>2,3)</sup>と示さないという報告<sup>4)</sup>の両方が存在する。本研究結果は前者を支持するものである。

本研究では、PCOSモデルラットにおいて腸内細菌叢が変化し、大豆イソフラボン摂取によってその変化の一部を回復することを示した。これまでに、動物モデルとヒトにおいてPCOS発症個体の腸内細菌叢の乱れが報告されている<sup>5,6)</sup>。本研究の結果は、腸内細菌叢の乱れという点でこれらの報告と同様であった。しかし、変化する菌属について、本研究で同定した2つは新規のものであった。また、介入によってPCOS症状の改善した際における腸内細菌叢の変化の解析事例は

これまでになく、本研究で、PCOS症状の改善に相関して回復する菌属を初めて明らかにした。大豆イソフラボン摂取によるPCOS症状改善の機序として腸内細菌叢の調節が関与することが示唆された。

今後は、プレバイオティクスを用いて腸内細菌叢を修飾し、大豆イソフラボンの腸内代謝を調節することや、本研究で明らかにしたPCOS症状の改善に相関して回復する細菌をプロバイオティクスとして投与すること、などによって、大豆イソフラボン摂取によるPCOS症状改善の作用機序を腸内細菌叢との関係を中心により詳細に解明する必要がある。

## 要 約

多嚢胞性卵巣症候群 (PCOS) は、卵巣内に嚢胞が多数でき、排卵障害を引き起こす病態である。本申請研究では、大豆イソフラボンによるPCOSの改善効果を解析した。7週齢メスのSDラットを対照 (C) 群、PCOS (P) 群、PCOS+大豆イソフラボン (PS) 群の3つに分け、P群およびPS群にPCOSを発症させた。その後、PS群には通常飼料に替えて大豆イソフラボンを含む試験飼料を給餌して、14日間自由摂食させた。C群と比較して、P群では発情周期の異常、卵巣での嚢胞形成が観察され、PCOSを発症していることが確認された。一方、PS群では発情周期の異常が改善され、卵巣で観察される嚢胞数もC群と同程度であった。腸内細菌叢については、P群で生じた変化の一部がPS群で回復した。これらのことから大豆イソフラボン摂取がPCOSを改善すること、その機序として腸内細菌叢の調節が示唆された。

## 文 献

- 1) Roe AH and Dokras A (2011): The diagnosis of polycystic ovary syndrome in adolescents. *Rev Obstet Gynecol*, **4**, 45-51.
- 2) Rajan RK, Kumar M SSK and Balaji B (2017): Soy isoflavones exert beneficial effects on letrozole-induced rat polycystic ovary syndrome (PCOS) model through anti-androgenic mechanism. *Pharm Biol*, **55**, 242-251.
- 3) Jamilian M and Asemi Z (2016): The effects of soy isoflavones on metabolic status of patients with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*, **101**, 3386-3394.
- 4) Romualdi D, Costantini B, Campagna G, Lanzone A and Guido M (2008): Is there a role for soy isoflavones in the therapeutic approach to polycystic ovary syndrome? Results from a pilot study. *Fertil Steril*, **90**, 1826-1833.
- 5) Liu R, Zhang C, Shi Y, Zhang F, Li L, Wang X, Ling Y, Fu H, Dong W, Shen J, Reeves A, Greenberg AS, Zhao L, Peng Y and Ding X (2017): Dysbiosis of gut microbiota associated with clinical parameters in polycystic ovary syndrome. *Front Microbiol*, **8**, 324.
- 6) Kelley ST, Skarra DV, Rivera AJ and Thackray VG (2016): The gut microbiome is altered in a letrozole-induced mouse model of polycystic ovary syndrome. *PLoS One*, **11**, e0146509.