

大豆イソフラボン腸内細菌代謝物エコールによる
雌特異的抗肥満作用の機構解明

愛媛大学大学院 農学研究科

藤谷 美菜

大豆イソフラボン摂取がエストロゲン欠乏による肥満を予防・改善する可能性が指摘されているが、その作用機構は未だ解明されていない。大豆イソフラボンはその構造類似性からエストロゲン様作用または抗エストロゲン作用を持ち、エストロゲン欠乏状態ではエストロゲン様作用を、エストロゲン充足状態では抗エストロゲン作用を示すことにより様々な健康効果をもたらすと考えられている。エストロゲンが食欲を抑制することから、我々は大豆イソフラボンもエストロゲン様作用により食欲を抑制するのではないかと考え、内因性エストロゲン量の異なる雄、雌、卵巣摘出ラットを用いて検討したが、大豆イソフラボンの摂取はラットにおいて卵巣の有無にかかわらず雌特異的に食欲を低下させたが、エストラジオールによる食欲低下作用は雌では見られず雄や卵巣摘出ラットでは顕著に見られたことから、大豆イソフラボン摂取は食欲の低下を引き起こすが、エストロゲン様作用によるものではないことが示唆された (Kishida et al., 2008)。この機構解明を目指す中で、食欲抑制作用に関与するのはゲニステインではなくダイゼインであること、ダイゼインを摂取したラットの血液中にはダイゼインよりその腸内細菌代謝物エコールの方がはるかに高濃度であること (Fujitani et al., 2019)、エコールの混餌投与でも雌特異的に食欲が抑制されることが明らかとなり、作用物質はエコールであると考えられた。雌ラットにエコールを混餌投与した場合、投与開始後数日間には有意な食欲低下がみられなかったことから、この期間に起こる何らかの変化が本効果の発現に重要であると推測し、エコールの体内分布の変化を摂取開始から5日目まで調べたところ、エコールは体循環中に比べてはるかに多く腸肝循環中に存在し、エコールの胆汁中濃度は数日の摂取によって次第に上昇していくことが明らかとなった。さらに、ダイゼインを投与された雌ラットの胆汁を、ダイゼインを投与されていない雌ラットの十二指腸より注入することにより11時間後以降で飼料摂取量が有意に低下したことから、エコールそのものではなく胆汁中に含まれるエコール代謝物が食欲抑制作用に関与する可能性が考えられた。ラットの胆汁中にはエコール4'位グルクロン酸抱合体および7位硫酸抱合体が存在しており、エコール4'位グルクロン酸抱合体は雌ではメジャーな抱合体であるが雄ではほとんど存在しないのに対し、エコール7位硫酸抱合体濃度に雌雄差は見られなかった。ラットの胆汁中に雌特異的に存在するエコール4'位グルクロン酸抱合体が雌特異的な作用に関与している可能性が考えられた。そこで本研究では、胆汁中エコール4'位グルクロン酸抱合体濃度またはエコール7位硫酸抱合体濃度と飼料摂取量との関連性を検討した (実験1)。先の研究により、ダイゼイン摂取により胃排出が遅延すること、食欲抑制および胃排出遅延作用を持つ視床下部 urocortin の遺伝子発現がダイゼイン摂取により有意に増加することが明らかとなった。これらのことから、エコールによる食欲抑制作用は視床下部 urocortin 遺伝子発現増加を介した胃排出遅延に起因する可能性が考えられるが、エコールが視床下部 urocortin 遺伝子発現を増加させる機構は不明であった。我々は、エコール4'位グルクロン酸抱合体が小腸で作用し、消化管ホルモンの分泌を介して視床下部 urocortin 遺伝子発現を増加させるのではと推測した。本研究では、urocortin ニューロンを活性化させ、胃排出を抑制することが示唆されている消化管ホルモン・オベスタチンおよびデスアシルグレリン (Yagi et al., 2013) の分泌をダイゼイン摂取が増加させるのかを検討した。

【実験方法】

1. 実験動物および飼育方法

6週齢雌性 Sprague-Dawley ラット（日本 SLC 株式会社、春野支所）を用いた。実験動物搬入から実験開始までの期間は、コントロール飼料（AIN-76 組成）で飼育した。搬入の翌日にすべてのラットにイソフルラン麻酔下で両側卵巣摘出術（OVX）を施した。実験中は体重および飼料摂取量を毎日記録した。

実験 1：OVX 後 6 日間回復させた後、コントロール飼料摂取群（C 群、n = 8）、エコール添加飼料摂取群（E25 群：25 mg/kg 飼料、n = 6；E50 群：50 mg/kg 飼料、n = 7；E100 群：100 mg/kg 飼料、n = 6）の 5 群に分け、28 日間飼育後、イソフルラン麻酔下で胆汁を 30 分間採取した。

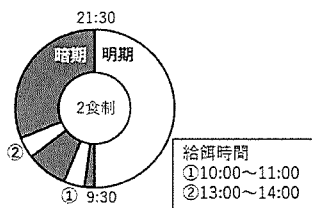


図 1. 2 食制のタイムスケジュール.

実験 2：OVX 後 3 日間回復させた後、2 食制の給餌パターン（図 1）に慣れさせた。その 8 日後、コントロール飼料摂取群（C 群、n = 10）、ダイゼイン添加飼料摂取群（D300：300 mg/kg 飼料、n = 10）の 2 群に分け、2 食制で飼育した。本飼育 8 日目の 2 食目摂食開始 11 分後から 1 分間隔で断頭採血し、視床下部を採取した。小腸中央から回腸側へ 20 cm の粘膜を採取した。

2. 胆汁中エコール抱合体濃度の測定

ラットの胆汁から 0.1%ギ酸アセトニトリルでエコール抱合体を抽出した。遠心エバポレーターで蒸発乾固させた後、溶離液 A:B=9:1 溶液 100 μL に溶解し、フィルター濾過後、液体クロマトグラフー飛行時間型質量分析計（LC-Tof/MS）で分析した。内部標準としてゲニステインを用いた。測定条件は表 1 に示した。

表 1. 液体クロマトグラフー飛行時間型質量分析計測定条件.

装置	LC-TOF-MS (XEVO G2-S qTOF)		
	Xterra MS C18 (5 μm, 2.1 x 150mm)		
カラム	時間 (min)	A: 0.1% ギ酸 / 水 (%)	B: 0.1% ギ酸 / アセトニトリル (%)
溶離液	0	90	10
	12	40	60
	14	40	60
	20	90	10
カラム温度	40°C		
流速	0.50 mL/min		
インジェクション量	7.5 μL		
イオン化モード	エレクトロスプレー法、ネガティブイオンモード		
キャピラリー電圧	2500 V		
コーンガス	50 L/h		
脱溶媒ガス	1000 L/h		

3. 脳視床下部および小腸粘膜における食欲関連遺伝子発現測定

セパゾール RNA I Super G (ナカライテスク) を用い、製造元のプロトコールに従って total RNA を抽出し、逆転写酵素 Reverse Transcriptase XL (AMV) (タカラ) を用いて cDNA を合成した。定量的 PCR は、合成した cDNA を鋳型とし、THUNDERBIRD SYBR qPCR MIX (東洋紡) を用いて StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems) の 2 ステップ反応系で行った。視床下部の各遺伝子のプライマー配列は表 2 に、小腸粘膜の各遺伝子のプライマー配列は表 3 に示した。

表 2. 視床下部食欲調節因子のプライマーリスト.

遺伝子	プライマー配列	
食欲調節因子		
NPY	sense	GCCCAGAGCAGAGCACCC
	antisense	CAAGTTTCATTTCCCATCACCA
Galanin	sense	TTGGCCACCTCCTCAGAAGA
	antisense	AATGACTTTAAATTATAGCAGAGGACACA
MCH	sense	GTTCCCAGGTCTAAGTCTGAA
	antisense	TGAAGAAGCGGCAGTAGCAC
Orexin	sense	GCTCCAGACACCATGAACCT
	antisense	GAACACGTCCTTCTGGCGA
AGRP	sense	GTTCCCAGGTCTAAGTCTGAA
	antisense	TGAAGAAGCGGCAGTAGCAC
Urocortin	sense	CGGCGAATGTGGTCCAGGAT
	antisense	CCGATCACTTGCCCACCGAA
CART	sense	TAAAGTTTGCGTTCCCCC
	antisense	CGAAAGTCCCTCTTCTCCC
POMC	sense	GACACCAAACCCTCATCA
	antisense	CAAACCTCAGAATGGGGTGAA
CRH	sense	CGCAGCCGTTGAATTTCTTG
	antisense	AGCAGCGGGACTTCTGTTGA
ハウスキーピング遺伝子		
Tbp	sense	AGAGAGCCACGAACAACTGC
	antisense	TGTTCTTCACTCTTGGCTCCTG

NPY, ニューロペプチド Y; MCH, メラニン凝集ホルモン; AgRP, アグーチ関連タンパク質; CART, コカインおよびアンフェタミン調節転写物; POMC, プロオピオメラノコルチン; CRH, 副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン; Tbp, TATA 結合タンパク質.

表 3. 小腸粘膜食欲調節因子のプライマーリスト.

遺伝子	プライマー配列	
食欲調節因子		
CCK	sense	CGCACTGCTAGCCCGATACA
	antisense	TTTCTCATTCCGCCTCCTCC
PPG	sense	CTGGTGAAAGGCCGAGGAAG
	antisense	AGCATGTCTGCGCCCAAGT
PYY	sense	GCAGCGGTATGGGAAAAGAG
	antisense	CTTCTGGCCGAGACCTGA
Preproghrelin	sense	CAGGTCCAGCTTCTTGA
	antisense	GACAGCTTGATGCCAACA
ハウスキーピング遺伝子		
cyclophilin	sense	ATGGTCAACCCACCGTGTT
	antisense	CGTGTGAAGTCACCACCT

CCK, コレシストキニン; PPG, プレプログルカゴン; PYY, ペプチド YY.

4. 血漿オベスタチン・アシルグレリン・デスアシルグレリン濃度の測定

血漿オベスタチン濃度は、市販のキット YK230 Mouse/Rat Obestatin EIA (矢内原研究所) を用いて測定した。血漿アシルグレリン濃度は、血漿をミリ Q 水で 3 倍希釈し、市販のキット Acylated Ghrelin (mouse, rat) Easy Sampling Enzyme Immunoassay kit (bertin) を用いて測定した。血漿デスアシルグレリン濃度は、血漿をミリ Q 水で 6 倍希釈し、市販のキット Unacylated Ghrelin (mouse, rat) Easy Sampling Enzyme Immunoassay kit (bertin) を用いて測定した。

5. 統計処理

実験結果は各群の平均値±標準誤差で表した。実験 1 では、各データの統計処理にはダネット検定 (体重、体重増加量、総飼料摂取量、胆汁中エコール抱合体濃度) または二元配置反復測定分散分析とボンフェローニの多重比較 (週別の飼料摂取量の推移) を用いた。実験 2 では、各データの統計処理は t 検定 (体重、体重増加量、総飼料摂取量、視床下部遺伝子発現、小腸粘膜遺伝子発現、血漿ホルモン濃度) または三元配置反復測定分散分析とボンフェローニの多重比較 (日別の飼料摂取量の推移) を用いた。P<0.05 をもって有意とし、P<0.10 を傾向有りとした。

【実験結果】

実験 1

総飼料摂取量、総体重増加量、最終体重では、C 群と比較して E25 群では有意な変化は見られなかったが、E50 群および E100 群では有意に減少した (図 2)。1~4 週目の飼料摂取量でも、C 群と比較して E25 群では有意な変化は見られなかったが、E50 群では 2~4 週目で、E100 群では 1~4 週目で有意に減少した (図 2)。C 群の胆汁中からエコール 4' 位グル

クロン酸抱合体および7位硫酸抱合体は検出されなかった。胆汁中エコール4'位グルクロン酸抱合体濃度は、E25群と比較してE50群では有意な変化は見られなかったが、E100群では有意に上昇した。胆汁中エコール7位硫酸抱合体濃度は、E25群と比較してE50群、E100群で有意な変化は見られなかった(図3)。

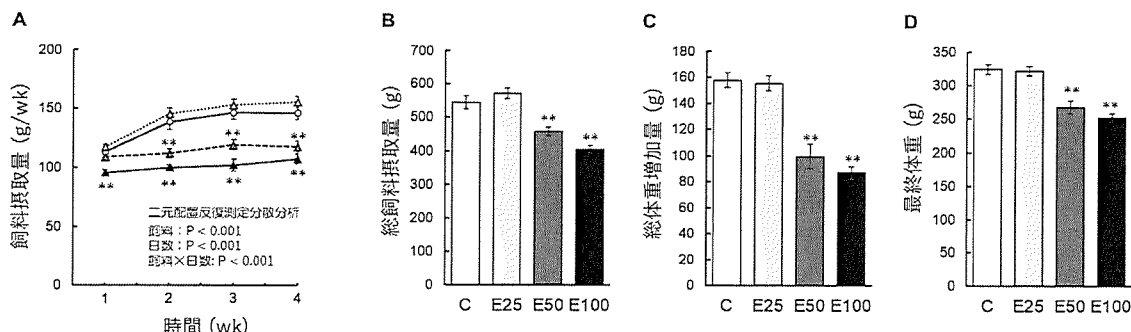


図2. エコール摂取量の違いが卵巣摘出ラットの週別飼料摂取量(A)、総飼料摂取量(B)、総体重増加量(C)、最終体重(D)に与える影響。平均値±標準誤差。C群とE25群、E50群またはE100群の間に有意差ありの場合、図中に示した(** P < 0.01)。

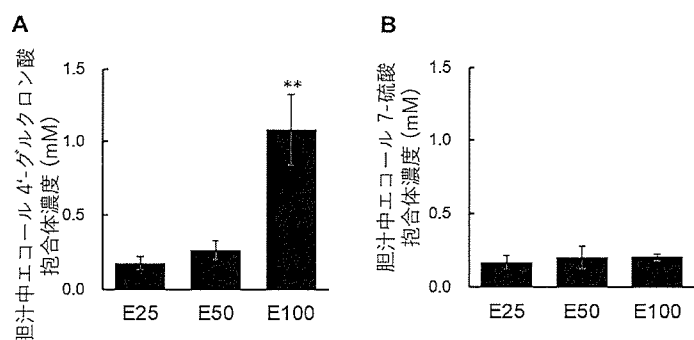


図3. エコールを摂取した卵巣摘出ラットの胆汁中エコール4'-グルクロン酸(A)および7-硫酸抱合体濃度(B)。平均値±標準誤差。E25群とE50群またはE100群の間に有意差ありの場合、図中に示した(** P < 0.01)。

実験2

総飼料摂取量、総体重増加量、最終体重は、C群と比較してD300群で有意に減少した(図4)。2食目の飼料摂取量は、C群と比較してD300群で3、5、6、7日目に有意な減少が見られたが、1食目の飼料摂取量は実験期間を通してC群とD300群の間に有意差は見られなかった(図5)。視床下部 urocortin 遺伝子発現は、C群と比較してD300群で増加傾向が見られた。その他の食欲促進因子 NPY、AgRP、orexin および MCH の遺伝子発現、食欲抑制因子 POMC、CART および CRH の遺伝子発現では、C群とD300群の間に有意差はなかった(表4)。小腸粘膜では preproghrelin 遺伝子発現が有意に増加したが、その他の食欲調節因子の遺伝子発現に有意な差はなかった(表5)。血漿オベスタチン、デスアシルグレリン、アシルグレリン濃度については、C群とD300群の間に有意差はなかった(図6)。

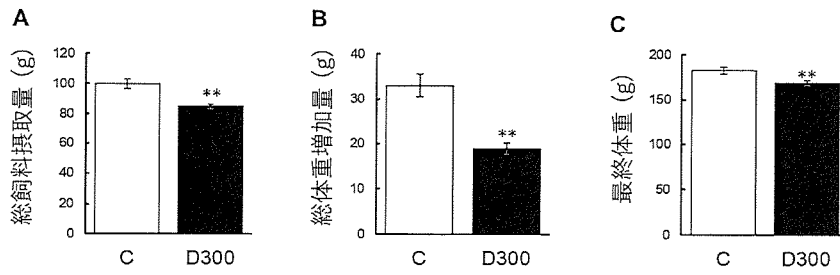


図 4. ダイゼイン摂取が 2 食制で飼育した卵巣摘出ラットの総飼料摂取量 (A)、総体重増加量 (B)、最終体重 (C) に与える影響。平均値±標準誤差。C 群と D300 群の間に有意差ありの場合、図中に示した (** P < 0.01)。

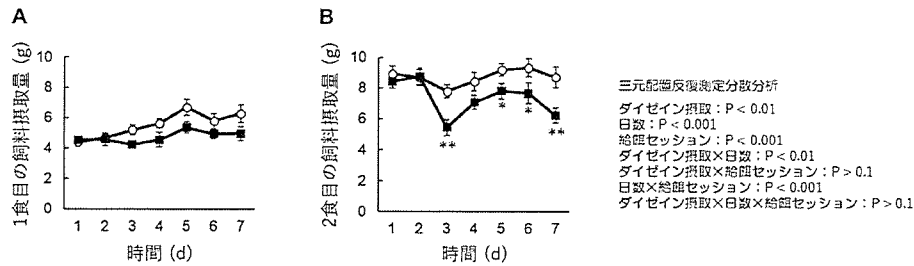


図 5. ダイゼイン摂取が 2 食制で飼育した卵巣摘出ラットの 1 食目 (A) と 2 食目 (B) の飼料摂取量に与える影響。平均値±標準誤差。C 群と D300 群の間に有意差ありの場合、図中に示した (* P < 0.05、** P < 0.01)。

表 4. ダイゼイン摂取が 2 食目の視床下部食欲調節因子遺伝子発現への影響。

	C	D300
NPY ($\times 10^3$)	1.90 ± 0.72	1.14 ± 0.43
AgRP ($\times 10$)	0.76 ± 0.18	1.18 ± 0.34
Orexin ($\times 10$)	1.60 ± 0.45	1.92 ± 0.59
MCH ($\times 10^2$)	3.49 ± 1.30	2.36 ± 0.60
POMC ($\times 10$)	3.94 ± 1.57	4.08 ± 0.49
CART ($\times 10$)	2.82 ± 0.61	2.79 ± 0.40
CRH ($\times 10^{-1}$)	3.74 ± 0.59	3.17 ± 0.59
Urocortin ($\times 10^{-2}$)	4.88 ± 0.47	7.47 ± 1.27 [#]

相対遺伝子発現 (対 Tbp 比) の平均値±標準誤差。C 群と D300 群の間に傾向有りの場合、図中に示した (# P < 0.1)。

表 5. ダイゼイン摂取が 2 食目の小腸粘膜食欲調節因子への影響。

	C	D300
CCK ($\times 10^{-1}$)	1.53 ± 0.14	1.23 ± 0.13
PYY ($\times 10^{-1}$)	1.15 ± 0.19	1.04 ± 0.13
PPG ($\times 10^{-1}$)	1.01 ± 0.13	0.95 ± 0.08
Preproghrelin ($\times 10^{-3}$)	1.08 ± 0.13	1.67 ± 0.21*

相対遺伝子発現 (対 cyclophilin 比) の平均値±標準誤差。C 群と D300 群の間に有意差ありの場合、図中に示した (* P < 0.05)。

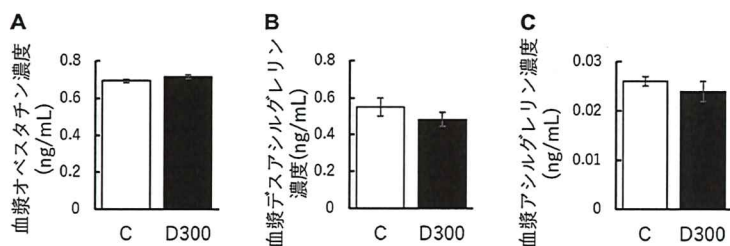


図 6. ダイゼイン摂取が 2 食目の血漿オベスタチン (A)、デスアシルグレリン (B)、アシルグレリン (C) 濃度に与える影響. 平均値 ± 標準誤差. C 群と D300 群の間に有意差や傾向はなかった.

【考察】

実験 1 では、E50 群および E100 群では有意な食欲抑制効果が見られたが、E25 群では有意な効果は見られなかった。胆汁中エコール 4' 位グルクロン酸抱合体濃度は、E25 群と比較して E100 群では有意に上昇し、E50 群では統計的に有意ではないものの平均値は高い値を示した。エコール摂取による食欲抑制効果は摂取開始数日後以降で見られることから、2 週目から 4 週目までの飼料摂取量と胆汁中エコール 4' 位グルクロン酸抱合体濃度との関連性を検討したところ、負の相関が認められた (図 7)。エコールの摂取量の増加に伴い腸肝循環中に蓄積されるエコール 4' 位グルクロン酸抱合体が増加し、それが有効濃度に達することで食欲抑制作用が発現するのかもしれない。一方、胆汁中エコール 7 位グルクロン酸抱合体濃度ではエコールの摂取量を増やしたことによる上昇は見られず、食欲抑制効果との間に関係性は見られなかった。

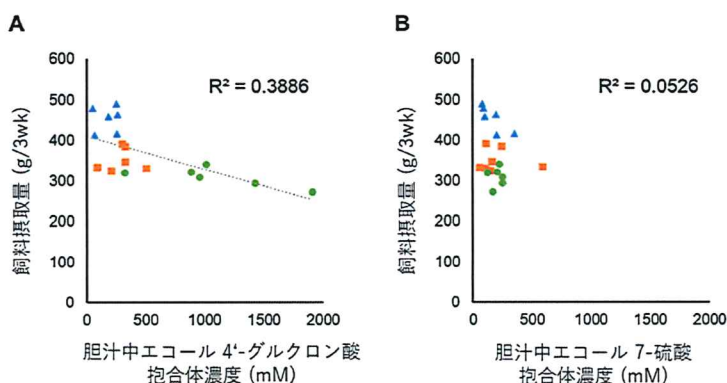


図 7. 卵巣摘出ラットのエコール摂取 2 週目から 4 週目までの飼料摂取量と胆汁中エコール 4' -グルクロン酸または胆汁中エコール 7-硫酸抱合体濃度 (B) との関係.

実験 2 では、2 食目でダイゼイン摂取による食欲抑制効果が見られたため、2 食目摂食中の視床下部を採取したところ、先の研究と同様にダイゼイン摂取により視床下部では urocortin 遺伝子発現が増加し、小腸粘膜ではオベスタチン、デスアシルグレリンおよびアシルグレリンの前駆体である preproghrelin 遺伝子発現が増加していた。しかし、オベスタチンおよびデスアシルグレリンの血漿濃度にはダイゼイン摂取による有意な影響は見られなかった。ダイゼイン摂取による視床下部 urocortin 遺伝子発現の増加および食欲抑制作用は、血液を介したオベスタチン、デスアシルグレリンの作用によるものではないと考えられる。また、同じ前駆体プログレリンに由来するアシルグレリンは食欲亢進および胃排出促進作用を持つが、ダイゼイン摂取は血漿アシルグレリン濃度にも影響を与えなかった。オベスタチンは血液を介してだけでなく迷走神経を介して視床下部 urocortin ニューロンを活性化させる可能性もあるため [Yagi et al., 2013]、迷走神経を介してオベスタチンの作用がダイゼイン

摂取による食欲抑制作用に関与するののかについては今後検討していく必要がある。

【要約】

我々は大豆イソフラボン・ダイゼイン摂取により雌特異的にラットの食欲が低下することを見出し、その作用機構の解明を目指して研究を続けてきた。その中で、ラットの胆汁中に雌特異的に存在しているエコール 4' 位グルクロン酸抱合体が雌特異的な作用に関与している可能性が考えられたことから、胆汁中エコール 4' 位グルクロン酸抱合体濃度、または、ラットで主要なもう一つのエコール抱合体であるエコール 7 位硫酸抱合体の胆汁中濃度と飼料摂取量との関連性を検討した。エコールは用量依存的に卵巣摘出ラットの食欲を低下させた。胆汁中エコール 4' 位グルクロン酸抱合体濃度はエコールの摂取量の増加に伴い上昇し、飼料摂取量との間に負の相関が見られた。一方で、胆汁中エコール 7 位グルクロン酸抱合体濃度と食欲抑制効果との間に関係性は見られなかった。これらのことから、胆汁中エコール 4' 位グルクロン酸抱合体が食欲抑制効果に関与すると推測された。

先の研究により、ダイゼイン摂取により食欲および胃排出を抑制する視床下部 urocortin 遺伝子発現が増加することが明らかとなった。オベスタチンおよびデスアシルグレリンが血液を介して視床下部 urocortin ニューロンで作用し胃腸の運動性を抑制する可能性が示唆されていることから、これらの血漿濃度へのダイゼイン摂取の影響を検討したが、ダイゼイン摂取による有意な影響は見られなかった。ダイゼイン摂取による視床下部 urocortin 遺伝子発現の増加および食欲抑制作用は、血液を介したオベスタチン、デスアシルグレリンの作用によるものではないと考えられる。

【文献】

Fujitani M, Mizushige T, Bhattarai K, Adhikari S, Ishikawa J, Kishida T. Dietary daidzein induces accumulation of S-equol in enterohepatic circulation to far higher levels than that of daidzein in female rats with and without ovariectomy. *Biomed Res.* 2019;40(3):97-105.

Kishida T, Mizushige T, Ohtsu Y, Ishikawa S, Nagamoto M, Izumi T, Obata A, Ebihara K. Dietary soy isoflavone-aglycone lowers food intake in female rats with and without ovariectomy. *Obesity (Silver Spring)*. 2008;16(2):290-297.

Yagi T, Asakawa A, Ueda H, Miyawaki S, Inui A. The role of ghrelin in patients with functional dyspepsia and its potential clinical relevance (Review). *Int J Mol Med.* 2013;32(3):523-531.