

〔研究ノート〕

大豆イソフラボンによる骨量維持作用機序解明に関する研究 —アポトーシス関連遺伝子発現調節への影響

宮内智美*・海老沢秀道

Study on Bone Protective Functions of Soybean Isoflavone —In View of Osteoclastic Apoptosis

Tomomi MIYAUCHI and Hidemichi EBISAWA

There are many reports that isoflavone can prevent osteoclast proliferation and activation, but its signaling pathway in relation to osteoclastic apoptosis is still unclear.

To determine the effect of soybean isoflavone as the anti-osteoporotic agent in view of osteoclastic apoptosis, Bim expression that has a key role for osteoclastic apoptosis was measured in femur distal of ovariectomized female aging rats fed 0.2% soybean isoflavone supplemented diet (group-IF) for about 12 weeks.

As a result, the isoflavone fed rats showed that 1) no change in some organ weights including the uterus was observed, 2) decreases in femoral-bone mineral density (BMD) by OVX were prevented, 3) mRNA expression of Bim that promote osteoclastic apoptosis was increased significantly compared with the control group.

The results suggested that the bone-protective effects by soybean isoflavone feeding may attribute, in part, to promote osteoclastic apoptosis.

Key words: soybean isoflavone (大豆イソフラボン), osteoclastic apoptosis (破骨細胞のアポトーシス), aging rats (加齢ラット)

1. 緒言

大豆イソフラボンはその構造がエストロゲンと類似しているため、エストロゲンレセプターに結合し、弱いエストロゲン作用を示すことが知られている¹⁾。このことから大豆イソフラボンはエストロゲンと同様に破骨細胞の増殖・活性化を抑制することが知られている²⁾。その一方で、大豆イソフラボンは生殖器にはほとんど影響しないことが、ヒトおよび実験動物で、明らかにされている³⁾。そのため大豆イソフラボンは副作用の少ない食事性骨粗鬆症予防因子として注目されている。

破骨細胞の寿命は2週間ほどで、その際の細胞死

はアポトーシスによるものと考えられている⁴⁾。エストロゲンは破骨細胞のアポトーシスを促進することが明らかにされている。これらのことから、大豆イソフラボンもエストロゲン同様に破骨細胞のアポトーシスに対し促進的に作用する可能性が考えられる。しかし破骨細胞のアポトーシスと大豆イソフラボンの関係についての研究は少なく、その関係性も明らかにはなっていない。

本研究では、大豆イソフラボンと破骨細胞のアポトーシスとの関連を明らかにする目的で、骨粗鬆症モデルラット大腿骨におけるアポトーシス関連遺伝子の発現レベルを測定した。

* 東京健康科学専門学校健康栄養学科

2. 実験方法

実験動物および食餌条件

実験動物は24ヶ月齢ウィスター系雌ラットを用いた。それぞれのラットは麻酔下で卵巣摘除(Ovariectomy, Ovx)し、骨粗鬆症モデルラットとした。これらのラットを個別ケージに入れ、空調された動物飼育室で11~13週間飼育した。

飼育期間中、ラットに表1の実験食を投与した。実験食条件は20%カゼインタンパク食(以下、CA食)を基礎食とし、これに大豆イソフラボン抽出物(ソヤフラボンHG, 不二製油(株), 大阪)を0%添加した食餌を投与するCA群と、0.2%添加した食餌を投与するIF群を設けた。このほかに擬手術のみを行い卵巣を摘除しないSham群を設け、CA食を投与した。

実験食投与量は、摂食量をそろえるために一日あたり13gの制限食とした。

実験食組成は表1に示した。大豆イソフラボン抽出物中のイソフラボン含有率は50%だったため、IF群の実験食中イソフラボン含量は、ダイゼイン類、ゲニステイン類およびグリシテイン類合計で実

験食1gあたり1mg(0.1%)と計算された。

測定項目

実験食期間終了後、ラットをネブタール麻酔下において採血屠殺し、左右大腿骨および各種臓器(子宮, 肝臓, 心臓)を摘出し、臓器重量の測定および血液分析を行った。

DEXA(Dual energy X-ray Analysis)法により左大腿骨の骨密度を測定した。

右大腿骨遠位端を液体窒素下で破砕し、AGPC法によるT-RNAの抽出を行った。その後、RT-PCR法により海綿骨リッチな大腿骨遠位端付近におけるアポトーシス関連遺伝子BimのmRNA発現量を測定した。なお、mRNA発現量は同様に測定したGAPDH発現量の比で表した。RT-PCRに使用したプライマーとThermal cyclerでの加熱温度設定は表2に示した。

測定結果の解析

実験データは一元配置分散分析(ANOVA)を行った後、t-testにより各群の有意差検定を行った。

Table 1. Compositions of experimental diet

Ingredients	CA, Sham	IF
Isoflavone extract(g)	0	2
Casein(g)	220	220
α -corn starch(g)	407	405
Sucrose(g)	203	203
Cellulose powder(g)	50	50
Mineral mixture(g)	50	50
Vitamin mixture(g)	20	20
Corn oil(g)	50	50
Isoflavone contents mg/1000 g	0	1000

Table 2. Primers and the setting of heat cycle for RT-PCR

Gene	Primers	Setting of heat cycle
Bim	F: 5'-AGTCTCAGGAGGAACCTGAAGATCT-3' R: 5'-TCCGATCCTCCGCAGCT-3'	94°C·1 min. - 58°C·1 min. - 72°C·1 min. ×40 cycle

3. 実験結果および考察

血液分析

血清アルブミン、カルシウム、GOTおよびGPTを測定し、その結果は表3に示した。アルブミン値はどの群も正常範囲内であった。カルシウム値はSham群において他の2群より有意な高値を示したものの、数値としては正常範囲内であった。GOT、GPTはどの群も正常範囲より著しい高値を示したが、CA群やSham群と比較してIF群に有意差は観察されなかった。以上の結果から、これら3群のラットは正常な栄養状態であり、肝機能、肝障害、カルシウム代謝異常は観察されなかった。

子宮重量

イソフラボンの過剰摂取によって子宮が腫脹することはよく知られている。

一方エストロゲン欠乏で子宮は著しく萎縮するため、卵巣摘除ラットの子宮重量は一般的に低下する。子宮重量を表4に示した。

Sham群の子宮重量(4.94±5.19 g/kg BW)に比べてCA群では2.89±0.88 g/kg BWの68.2%低値を示した。しかし、Sham群ラットの子宮重量を個

別に見ると、10.9 g/kg BWを示した個体が1例含まれていた。そしてこの個体を除くと、Sham群の平均子宮重量は1.85±0.08 g/kg BWとなった。すなわち、Sham群とCA群の子宮重量に有意差は観察されず、本研究で用いた24ヶ月齢の加齢ラットでは卵巣摘除による子宮の萎縮は観察されなかった。

一方、IF群の子宮重量(3.01±1.48 g/kg BW)はCA群とほぼ同値を示し、加齢ラットにおいても大豆イソフラボンは子宮重量を増加させなかった。

臓器重量

大豆イソフラボンの摂取が過剰になると肥大するとされている肝臓および心臓の重量は、子宮と同様に、イソフラボン摂取による有意な増加を示さなかった。

以上、血液分析の結果と臓器重量の結果から、さらに肝臓の障害の程度を血清GOTおよびGPTにおいてもCA群に比べてIF群で有意差は観察されなかった。すなわち、大豆イソフラボンによる生殖器や他の臓器への障害は認められなかった。

大腿骨骨密度

大腿骨骨密度を測定し、その結果は図1に示した。

Table 3. Effect of dietary isoflavone on blood analysis in OVX rats

	Serum albumin	Serum calcium	Serum GOT	Serum GPT
	g/100 ml	mg/100 ml	karmen unit	karmen unit
CA	4.87±0.65 ^a	9.96±0.35 ^a	191±151 ^a	60±54 ^a
IF	4.74±0.49 ^a	9.88±0.42 ^a	153±41 ^a	61±7 ^a
Sham	4.09±0.36 ^a	10.85±0.52 ^b	289±242 ^a	60±15 ^a

Numbers with different superscripts expressed significant difference (P<0.05).

Table 4. Effect of dietary isoflavone on organ weight in OVX rats

	Uterus	Liver	Heart
	g/kg BW	g/kg BW	g/kg BW
CA	2.89±0.88 ^a	3.23±5.09 ^a	3.21±0.30 ^a
IF	3.01±1.48 ^a	34.6±2.43 ^a	3.07±0.63 ^a
Sham	4.94±5.19 ^a	37.9±13.8 ^a	2.86±1.04 ^a

The significant differences were not observed among the groups.

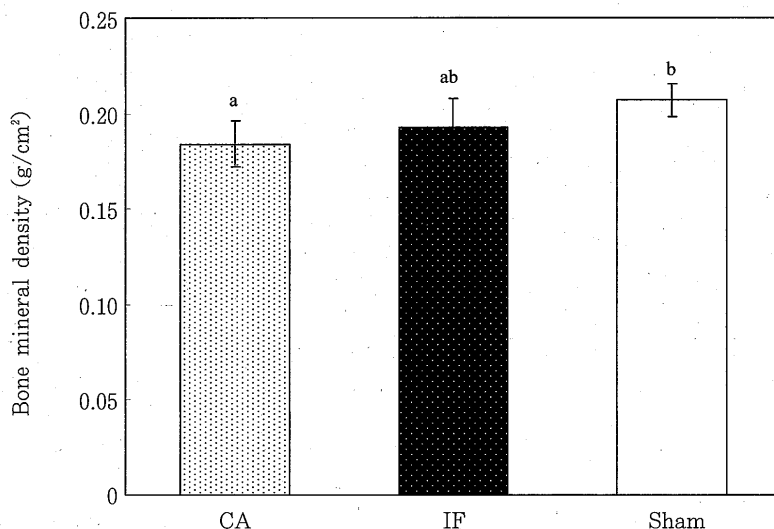


Figure 1. Effect of dietary isoflavone on bone mineral density in OVX rats. Columns with different alphabets expressed significant difference ($P < 0.05$).

Sham 群の大腿骨骨密度に比べて CA 群のそれは有意な低値を示した。このことから、高齢期ラットを用いた本研究においても、卵巣摘除による骨密度の低下が観察された。一方、IF 群の大腿骨骨密度は有意とはならなかったが CA 群よりも高値傾向を示し、大豆イソフラボン摂取は高齢期ラットの骨密度維持に有効である可能性が示された。

大豆イソフラボンはエストロゲン様作用を持ち生殖器にはほとんど影響しない特徴を持つが、これはエストロゲンレセプター (ER) の種類と分布の相違によるものであると説明されている。すなわち、ER には α と β の 2 種があり、子宮や乳腺には α 型が多く、骨には β 型が多く発現している。大豆イソフラボンは α 型よりも β 型 ER との結合親和性が強く、そのためイソフラボンは子宮などの生殖器よりも骨に対する作用が相対的に強い。

IF 群で生殖器である子宮の重量にほとんど影響せず骨密度の低下を抑制する傾向を示した理由の一つとして、イソフラボンの ER- β への親和性が ER- α 型より充分高いことが考えられた。

遺伝子解析

次に、この様なラット大腿骨を用いて、遠位端付近の海綿骨リッチな分画における mRNA 発現を測定した。

破骨細胞は分裂能を持たない最終形態の細胞である。生体内での寿命は約 2 週間といわれ、その際の細胞死はアポトーシスによるものと考えられている。アポトーシスとは遺伝的に制御された細胞死の様式で、細胞がなんらかの障害を受け、生命活動に支障をきたす場合に、その細胞は周囲の細胞へのダメージを最小限に抑えた方法で自発的に死に向かう。アポトーシスは様々な遺伝子が関与するシグナル伝達によって厳重に制御されている⁵⁾。その発現経路には主にデスレセプター経路とミトコンドリア経路の 2 種類が知られている。デスレセプター経路ではデスリガンドがデスレセプターに結合すると Caspase-8 が活性化される。ミトコンドリア経路ではミトコンドリアからのシトクロム C の放出によりアポトソームが形成され、Bcl-2 ファミリーや IAP ファミリーなどによって制御を受け Caspase-9 が活性化される。どちらの経路によっても最終的にはアポトーシス実行因子である Caspase-3 (-7) や DNase などが活性化され、特定タンパク質の限定分解、DNA の断片化、アポトーシス小体の形成と被貪食によってアポトーシスは完了する⁵⁾。

我々は、破骨細胞の死を促進することによって骨吸収が抑制され、骨密度の低下が抑制されると推測している。破骨細胞のアポトーシスをエストロゲンが促進することは明らかになっているが⁴⁾、エスト

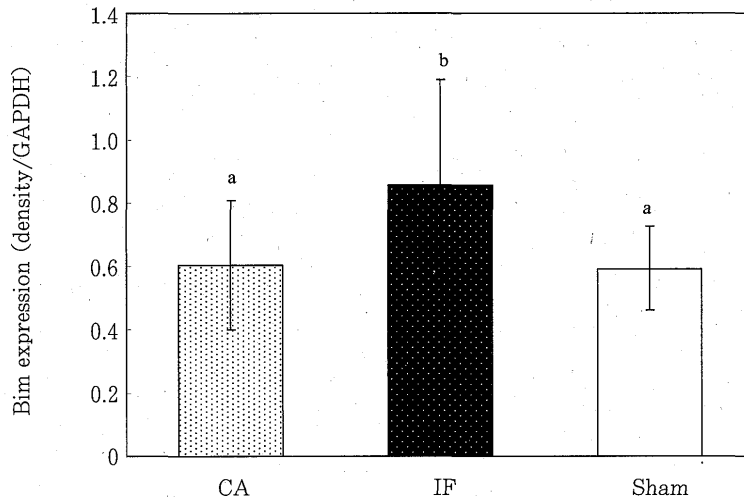


Figure 2. Effect of dietary isoflavone on expression of Bim in Ovx rats
Columns with different alphabets expressed significant difference ($P < 0.05$).

ロゲン作用を持つ大豆イソフラボンが同様の作用を有するか否かについてはほとんど研究されていない。そこで本研究では、破骨細胞のアポトーシスと大豆イソフラボンの関連について、アポトーシス関連遺伝子である Bim に注目し、大腿骨遠位端における Bim の mRNA 発現レベルを測定した。

Bim はアポトーシスを制御する Bcl-2 ファミリーのひとつであるが、BH 3 only protein と呼ばれるサブファミリーに属する。Bcl-2 ファミリーの代表的な構造に BH ドメインがあり、BH 1, BH 2 および BH 4 はアポトーシス抑制に必要な構造で、BH 3 はアポトーシス促進に必要な構造である。BH 3 only protein は構造中に BH 3 しか持たないため、アポトーシスに促進的に作用する⁵⁾。Bim はまた、破骨細胞のアポトーシスを直接誘導することが報告されている⁶⁾。

本研究における Bim 発現量は図 2 に示した。IF 群の Bim 発現量は 0.6046 ± 0.2014 で、CA 群に比べて有意に増加した ($P < 0.05$)。すなわち、大豆イソフラボン摂取は、大腿骨遠位端における骨の細胞において、Bim の発現を促進することが明らかにされた。

大豆イソフラボン摂取による骨粗鬆症予防効果は主に破骨細胞の増殖・活性化の抑制によるものであることが報告されているが、本研究結果は大豆イソ

フラボンが破骨細胞のアポトーシスを直接誘導する Bim の発現を促進する可能性を in vivo で初めて明らかにしたものである。大豆イソフラボン摂取と破骨細胞のアポトーシスに関する研究はほとんどされていないため、現段階で本研究の妥当性を証明することはできない。さらなる研究を重ねてこの可能性を証明していくことが今後の課題である。

4. 要 約

食事性骨粗鬆症予防因子としての大豆イソフラボンの効果を、破骨細胞のアポトーシス関連遺伝子発現調節レベルで観察する目的で、骨粗鬆症モデルラットに 0.2%大豆イソフラボン添加食を約 12 週間投与した。

その結果、コントロール群である CA 群に比べて、大豆イソフラボン添加食を与えた IF 群は、①子宮重量およびその他の臓器重量は増加せず、副作用は観察されなかった。②大腿骨の骨密度の低下は抑制される傾向を示した。③破骨細胞のアポトーシスを直接的に促進する Bim の発現量は有意に増加した。

以上のことから、大豆イソフラボンによる骨密度低下抑制効果は、破骨細胞の増殖、活性化の抑制だけでなく、アポトーシスを促進することにも起因する可能性が示唆された。

5. 参考文献

- 1) Miksicek RJ: Estrogenic flavonoids: structural requirements for biological activity. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 208 (1): 44-50, 1995.
- 2) Riggs BL: The Mechanisms of estrogen regulation of bone resorption. *J. Clin. Invest.* 106(10): 1203-1204, 2000.
- 3) Ishida H et al.: Preventive effects of the plant isoflavones, daizein and genistein, on bone loss in ovariectomized rats fed calcium-deficient diets. *Biol. Pharm. Bull.* 21: 62-66, 1998.
- 4) 松本俊夫: 骨シグナルと骨粗鬆症 (羊土社): 58-63, 1997.
- 5) 山本雅・仙波健太郎: シグナル伝達イラストマップ (羊土社): 158-169, 2004.
- 6) Akiyama T et al.: Regulation of osteoclast apoptosis by ubiquitylation of proapoptotic BH3-only Bcl-2 family member Bim. *EMBO J.* 22 (24): 6653-64. 2003.

(みやうち ともみ 東京健康科学専門学校健康栄養学科)

(えびさわ ひでみち 生活機構研究科)