

〈原著〉

ダイゼインのデスモステロール経路に対する抑制効果

中川 沙織^{*}、不破 史子、清水 (太田) 美穂、大和 進

New inhibitory effect of Daidzein on desmosterol pathway in HepG2 cells

Saori Nakagawa^{*}, Fumiko Fuwa, Miho Shimizu-Ohta and Susumu Yamato

Summary For treatment of the hypercholesterolemia, it was mainly reduced a cholesterol level by an HMG-CoA reductase inhibitor. However, for cholesterol biosynthesis, there are two alternative pathways, i.e., via lathosterol and via desmosterol, from lanosterol to cholesterol. In this study, effects of Daidzein of soybean isoflavones on cholesterol biosynthetic pathways were evaluated by measuring the level of cholesterol precursors and cholesterol in human hepatoma cells by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). Daidzein slightly decreased the level of cholesterol, but increased that of desmosterol suggesting that it inhibits sterol-delta24-reductase.

Key words: Desmosterol, Daidzein, Cholesterol, sterol-delta24-reductase

1. 諸言

ポリフェノールの中でも大豆などに含まれているダイゼインは、エストロゲン様作用¹⁾、ステロイドホルモン合成酵素の3 β -ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ(HSD)の抑制作用²⁾、薬物代謝酵素であるチトクロームP450に対する阻害作用³⁾など様々な作用が報告されている。コレステロール合成の抑制作用については、脂質代謝に関わる核内レセプターであるPPAR α 、PPAR γ および脂質合成に関わるLiver X receptor (LXR) α の活性化作用、脂質合成転写因子であるSREBP-1cに対する抑制作用⁴⁾、HMG-CoAレダクターゼ阻害作用⁵⁾などが報告されており、

高コレステロール血症を伴う脂質異常症の治療の一助として期待できる食品である。しかしながら、コレステロール合成の上流に位置するHMG-CoAレダクターゼの阻害に注目した食品や薬物(スタチン系薬物)に関する報告は多く存在するが、HMG-CoAよりさらに下流に位置するコレステロール合成経路に作用する物質の報告例は少ない。そのため、コレステロール合成経路の下流を抑制する物質とスタチン系薬物の併用は、相乗的なコレステロール合成抑制効果が期待できる。

コレステロール合成経路の下流は、スクアレンからラノステロールが合成され、ラノステロールからラノステロールあるいはデスモステロ

^{*}新潟薬科大学薬学部薬品分析化学研究室
〒956-8603 新潟県新潟市秋葉区東島265-1
Tel : 0250-25-5296 Fax : 0250-25-5245
E-mail : saorin@nupals.ac.jp

^{*}Department of Bio-Analytical Chemistry, Niigata University of Pharmacy and Applied Life Sciences, 265-1, Higashijima, Akiha-ku, Niigata, 956-8603, JAPAN.

受付日 : 2018年2月14日

採択日 : 2018年4月25日

ールを経由する2つの経路により、コレステロールが合成される⁶⁾。そこで、本研究では、コレステロール合成の下流に位置するスクアレンからコレステロールまでの合成経路に対するダイゼインの効果を検討した。

II. 方法と材料

1. 試薬

コレステロール合成前駆体の標準品のうち、スクアレンは和光純薬工業社（大阪）製を用い、7-デヒドロコレステロール、デスモステロール、ラソステロールおよびコレステロールはシグマ-アルドリッチ社（セントルイス、MO）製を用いた。内部標準物質（Internal Standard, I.S.）である5 α -コレストアンは和光純薬工業社製を、ダイゼインはLKT Laboratories社（セントポール、MN）製をそれぞれ用いた。トリメチルシリル誘導体化剤であるTri-Sil HTP Reagent {ヘキサメチルジシラザン（HMDS）：トリメチルクロロシラン（TMCS）：ピリジン = 2 : 1 : 10} は Thermo Fisher Scientific社（ウォルサム、MA）製を用いた。細胞破碎用のジルコニアビーズ（直径0.5 mm）はトミー精工社（東京）製を用いた。

2. HepG2細胞を用いたコレステロール合成系に対するイソフラボンの作用

ヒト肝がん由来のHepG2細胞を100 mmディッシュ中に1 $\times 10^6$ cells /10 mLとなるように播種し、10% FBSを含むDMEM培地を用いて6時間前培養後、10% LPDS含有DMEM培地に交換することで、コレステロール合成を亢進させる細胞培養系を作製した。この細胞培養系に、ダイゼインのDMSO溶液（5、10、25、50 μ mol/L）を加え、40時間培養後、細胞サンプルを得た。また、コレステロールに対する作用については、ダイゼインを添加し72時間培養後、細胞サンプルを得た。細胞サンプルは、trypsin-EDTA処理を行って回収し、細胞数を計測した。なお、ダイゼインの濃度は、Cell counting kit-8（同仁化学研究所、熊本）を用いて、細胞毒性の認められない（生存率90%以上）濃度を評価に用いた。

3. 細胞サンプル中のコレステロール前駆体のGC-MS定量

細胞サンプル（2 $\times 10^6$ 個）に、メタノール2 mLおよびジルコニアビーズ0.9 gを加え、室温で5分間振とうし、細胞を破碎した。そこに、内標準物質（I.S.）である5 α -コレストアン250 ngを溶解したメタノール3 mLおよび10 mol/L水酸化カリウムの2 mLを加え、室温で1時間攪拌し、けん化を行った。その後、50%リン酸を加えて中和し、水5 mLおよび*n*-ヘキサン10 mLを加え、室温で5分間振とうして溶媒抽出を2回行った。*n*-ヘキサン層を窒素気流下で溶媒を乾固させ、Tri-Sil HTP Reagentを70 μ L加え、60 $^{\circ}$ C、30分、窒素雰囲気下でトリメチルシリル誘導体化を行った⁷⁾。窒素気流下で溶媒を乾固させ、*n*-ヘキサン100 μ Lで再溶解してGC-MS定量した。コレステロール定量ではさらに10倍希釈してGC-MS定量した。なお、GC-MSの条件は以下に示した。

キャピラリーカラム：DB-5MS（30 m \times 0.25 mm, 0.25 μ m thickness）、キャリアーガス：Helium（1 mL/min）、カラム温度：180 $^{\circ}$ C（1 min） \rightarrow 20 $^{\circ}$ C /min \rightarrow 250 $^{\circ}$ C \rightarrow 5 $^{\circ}$ C /min \rightarrow 280 $^{\circ}$ C \rightarrow 3 $^{\circ}$ C /min \rightarrow 300 $^{\circ}$ C（12 min）、注入口温度：230 $^{\circ}$ C、イオン源温度：250 $^{\circ}$ C、インターフェース温度：250 $^{\circ}$ C、注入量：1 μ L、検出モード：Selected Ion Monitoring（SIM）、GC-MS装置：shimadzu QP5050A

4. 細胞からの添加回収率の検討

HepG2細胞にコレステロール合成前駆体標準品（50, 150, 300, 500 ng）あるいはコレステロール標準品（1.56, 3.13, 6.25, 12.5, 25.0 μ g）を、添加あるいは無添加した細胞サンプルを調整し、3と同様の前処理後、GC-MS測定し、検量線を作成した。そして、TMS誘導体化のみのコレステロール合成前駆体およびコレステロール標準品と上記に示した細胞サンプル濃度を比較し、添加回収率を求めた。

5. 統計学的分析

ダイゼインの添加濃度とコレステロールおよびコレステロール合成前駆体の濃度について、Excel 2013を用いて一元配置分散分析およびstudent *t*-testを行い、*p* < 0.05を統計学的有意とした。

Ⅲ. 結果

スクアレン、5 α -コレスタン (I.S.)、コレステロール、7-デヒドロコレステロール、デスモステロールおよびラソステロールは、それぞれ保持時間が11.82 min、12.53 min、15.72 min、16.74 min、16.67 minおよび17.02 minに検出され、これらはすべて良好に分離できた。さらに、3 ~ 10 $\mu\text{g/mL}$ の範囲において濃度とピーク面積の相関係数は0.997 ~ 0.999、添加回収率は、100 \pm 2.8% (スクアレン, $n=3$)、103.7 \pm 3.2% (コレステロール, $n=3$)、100.2 \pm 1.9% (7-デヒドロコレステロール, $n=3$)、99.9 \pm 0.9% (デスモステロール, $n=3$) および100.2 \pm 3.7% (ラソステロール, $n=3$) と良好な回収率が得られた。また、培養培地にLPDSを用いる培養条件を検討したところ、培養時間が36 ~ 48時間で、デスモステロールおよびラソステロールの増加が確認でき、72時間でコレステロールの増加が確認できたため、コレステロール合成前駆体の評価は培養時間を40時間、コレステロールの評価には72時間として評価した。

この方法を用いて、ダイゼインによる作用を検討したところ、コレステロール合成前駆体の測定結果は、スクアレンについては、コントロール (12.28 \pm 10.64 $\mu\text{g} / 10^6\text{cells}$) に対して100 ~ 115% と、大きな変化は認められなかった。また、7-デヒドロコレステロールおよびラソステロールについては、ダイゼインの終濃度50 $\mu\text{mol/L}$ において、有意差が認められた {7-デヒドロコレステロール $F(4,10) = 46.27, p < 0.05$ 、ラソステロール $F(4,10) = 6.50, p < 0.05, n = 3$ } ものコントロール (7-デヒドロコレステロール 0.46 \pm 0.12 $\mu\text{g} / 10^6\text{cells}$ 、ラソステロール 2.99 \pm 0.76 $\mu\text{g} / 10^6\text{cells}$) と比べそれぞれ138 \pm 4.8%、131 \pm 7.8% と大きな増減ではなかった。一方、デスモステロール (コントロール 0.35 \pm 0.10 $\mu\text{g} / 10^6\text{cells}$) については、ダイゼイン終濃度25, 50 $\mu\text{mol/L}$ において、125 \pm 13.9% ($n = 3$)、217 \pm 14.5% ($n = 3$) と、濃度依存的な顕著な増加 { $F(4,10) = 46.27, p < 0.05, n = 3$ } が認められた。コレステロールについては、ダイゼイン終濃度25, 50 $\mu\text{mol/L}$ において、一次元配置分散分析においては有意差が認められなかったが、Student t testにおいて $p < 0.05$ となり、

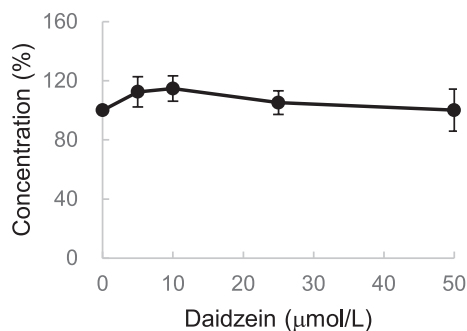
コントロール (372.94 \pm 88.16 $\mu\text{g} / 10^6\text{cells}$) と比べ82 \pm 10.3% ($n = 3$) と、微減傾向であることが示された (Fig. 1)。

Ⅳ. 考察

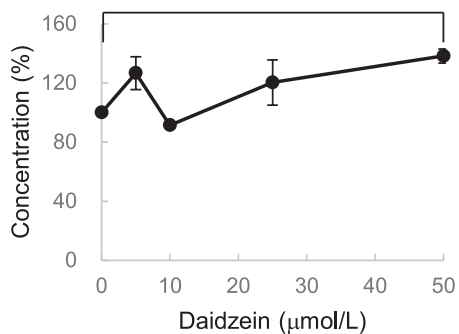
ヒト肝がん由来HepG2細胞にLPDS含有培地で培養することにより、コレステロール合成経路が亢進される評価系を用いてダイゼインを評価したところ、デスモステロール量が増加し、コレステロール量の微減が認められた。

これまでに、ダイゼインにおいて3 β -hydroxysteroid dehydrogenase (3 β -HSD)、CYP3A4、HMG-CoAレダクターゼなどの生体内酵素の抑制作用が多数報告^{2), 3), 5)} されており、本研究でも酵素抑制作用が推察され、中でもデスモステロールからコレステロールの生合成に関与しているDHCR24の酵素抑制作用が推察された (Fig. 2)。今回の実験だけでは酵素抑制作用を直接証明できていないが、DHCR24のみの酵素阻害剤 N, N -dimethyl-3 β -hydroxycholeamide、(3*S*, 20*S*)-20-(methyl-carbamoyl)-pregn-7-en-3 β -yl) において、デスモステロールのみが蓄積し、チモステロールおよび7-デヒドロデスモステロールの大きな変化は認められていないことが報告されている⁸⁾ ことから、ダイゼインもこれらと同様にDHCR24の抑制と考えられる。また、DHCR24の基質であるラノステロール、チモステロール、5 α -Cholesta-7, 24-dien-3 β -ol およびデスモステロールにおいて、 K_{cat} (V_{max}/K_m) がそれぞれ0.0033、0.0201、0.0586および0.0180と報告⁹⁾ されており、その中でも5 α -Cholesta-7, 24-dien-3 β -ol の K_{cat} が高く、酵素反応が他に比べて17.8倍 (ラノステロールを1として) 高いことが報告⁹⁾ されている。そのため、ラノステロールからラソステロール、7-デヒドロコレステロールを通る経路 (Fig.2 右) が、迅速に反応し、DHCR24の抑制効果においては、デスモステロールが中心に蓄積されることが考えられる。また、ダイゼインを含むイソフラボンには、スタチン系薬物に代表されるコレステロール合成阻害薬と同様のHMG-CoAレダクターゼの阻害が報告⁵⁾ されており、本研究によって新たにコレステロール合成経路の下流に位置するDHCR24酵素阻害作用が認められた。した

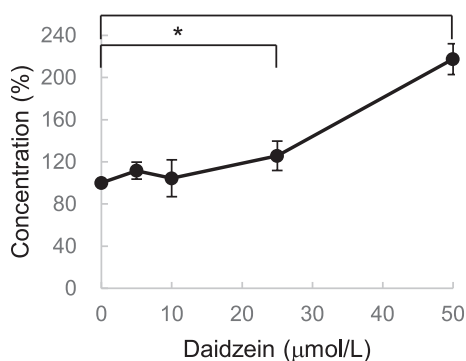
A Squalene



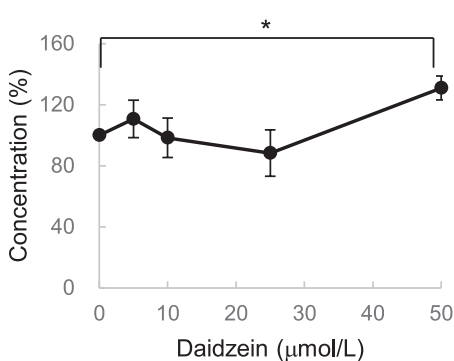
B 7-dehydrocholesterol



C Desmosterol *



D Lathosterol



E Cholesterol **

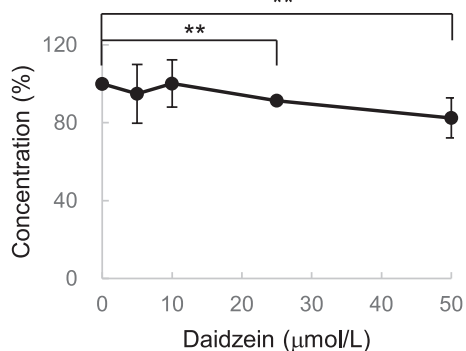


Fig. 1 Effect of Daidzein on the levels of cholesterol precursors and cholesterol produced by HepG2 cells.

A Squalene

($12.28 \pm 10.64 \mu\text{g} / 10^6 \text{cells}$ for control)

B 7-dehydrocholesterol

($0.46 \pm 0.12 \mu\text{g} / 10^6 \text{cells}$ for control)

C Desmosterol

($0.35 \pm 0.10 \mu\text{g} / 10^6 \text{cells}$ for control)

D Lathosterol

($2.99 \pm 0.76 \mu\text{g} / 10^6 \text{cells}$ for control)

E Cholesterol

($372.94 \pm 88.16 \mu\text{g} / 10^6 \text{cells}$ for control)

Concentration(%) means the value of each compounds in the absence of Daidzein represents as 100%.

*: $p < 0.05$, One-way ANOVA

** : $p < 0.05$, Student t test

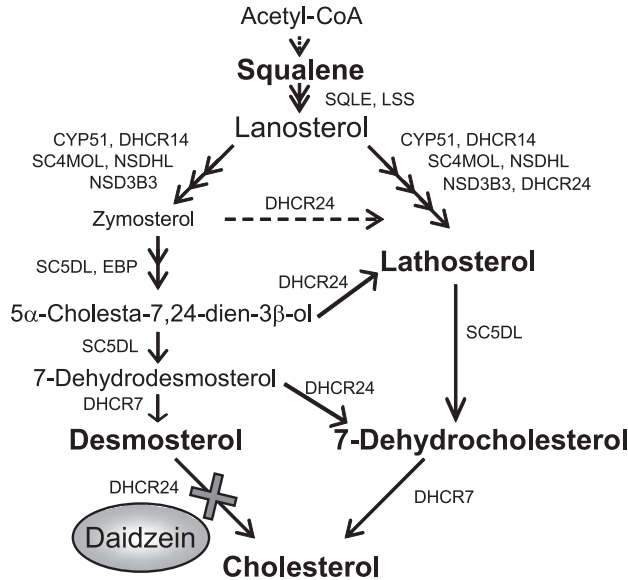


Fig. 2 Suspected inhibition site of Daidzein on cholesterol biosynthesis
 HMG-CoA, 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A; SQLE, squalene epoxidase; LSS, lanosterol synthase; CYP51, Lanosterol 14 α -demethylase; DHCR14, Sterol Δ 14-reductase; SC4MOL, Sterol C4 methyl-oxidase; HSD3B3, 3 β -ketoreductase; NSDHL, 3 β -hydroxy Δ 5-steroid dehydrogenase; EBP, sterol 8, 7-isomerase; SC5DL, Sterol C5-desaturase; DHCR7, Sterol Δ 7-reductase; DHCR24, Sterol Δ 24-reductase

がって、この阻害作用はスタチン系薬物との併用により、相乗的なコレステロール合成抑制作用が得られると思われる。また、ダイゼイン自身にもHMG-CoAレダクターゼ阻害作用があるので⁵⁾、コレステロール合成経路に対する相乗的効果も期待できるとと思われる。

助成源

本研究は、文部科学省「私立大学等戦略的研究基盤形成支援事業」(事業期間：2010年度～2014年度、事業番号：S1001030)の支援を受けて行われた。

利益相反 (COI)

本論文に対して、著者に開示すべきCOIはありません。

文献

- 1) Messina M: A brief historical overview of the past two decades of soy and isoflavone research. *J Nutr*, 140:1350S-1354S, 2010.
- 2) Hasegawa E, Nakagawa S, Sato M, Tachikawa E, Yamato S: Effect of polyphenols on production of steroid hormones from human adrenocortical NCI-H295R cells. *Biol Pharm Bull*, 36:228-237, 2013.
- 3) Ronis MJ: Effects of soy containing diet and isoflavones on cytochrome P450 enzyme expression and activity. *Drug Metab Rev*. 48:331-341, 2016.
- 4) Ronis MJ, Chen Y, Badeaux J, Badger TM: Dietary soy protein isolate attenuates metabolic syndrome in rats via effects on PPAR, LXR, and SREBP signaling. *J Nutr*, 139:1431-1438, 2009.
- 5) Sung JH, Lee SJ, Park KH, Moon TW: Isoflavones inhibit 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in vitro. *Biosci Biotechnol Biochem*, 68:428-432, 2004.
- 6) Acimovic J, Lövgren-Sandblom A, Monostory K, Ro-

- zman D, Golicnik M, Lutjohann D, Björkhem I: Combined gas chromatographic/mass spectrometric analysis of cholesterol precursors and plant sterols in cultured cells. *J Chromatogr B*, 877:2081-2086, 2009.
- 7) 平山 哲、中川 沙織、大和 進、三井田 孝: I. 脂質・コレステロール2. コレステロール合成および吸収マーカー. *The Lipid*, 21:20-26, 2010.
- 8) Müller C, Hemmers S, Bartl N, Plodek A, Köner A, Mirakaj V, Giera M, Bracher F: New Chemotype of selective and potent inhibitors of human Δ^{24} -dehydrocholesterol reductase. *Eur J Med Chem*, 140:305-320, 2017.
- 9) Bae S and Paik Y: Cholesterol biosynthesis from lanosterol: development of a novel assay method and characterization of rat liver microsomal lanosterol Δ^{24} -reductase. *Biochem J*, 326:609-616, 1997.