

大豆素材による炎症性腸疾患の予防・改善効果に関する研究

薩 秀夫*・玄 子實・水上朋彦・濱田美影・日浦悠斗・清水 誠

東京大学大学院農学生命科学研究科

Study on the Preventive Effects of Soybean Ingredients on Inflammatory Bowel Disease

Hideo SATSU, Ja Shil HYUN, Tomohiko MIZUKAMI, Mika HAMADA,
Yuto HIURA and Makoto SHIMIZU

Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo, Tokyo 113-8657

ABSTRACT

The effect of soybean components on inflammatory bowel disease (IBD) was investigated. As IBD has been understood to be caused by dysregulation of inflammatory cytokines, including interleukin-8 (IL-8), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β), we especially focused on IL-8 and the effect of soybean components on the secretion of IL-8 in intestinal epithelial cells was examined in this study. Among soybean components, soyaflavone HG, the initial component of which is isoflavone, suppressed TNF- α -induced IL-8 secretion in human intestinal epithelial-like Caco-2 cells. However, soyhealth SA, the initial component of which is saponin, or soy peptide had little or no inhibitory effect on IL-8 secretion. The induction of IL-8 secretion by hydrogen peroxide or IL-1 β was not suppressed by soyaflavone HG, suggesting that the inhibitory effect of soyaflavone HG was specific for TNF- α -induced regulation of IL-8. The increased expression level of IL-8 mRNA by TNF- α was almost completely suppressed by soyaflavone HG. Further, the transcriptional activity of human IL-8 promoter was increased by TNF- α treatment, and soyaflavone HG suppressed its induction in a dose-dependent manner. These results show that soyaflavone HG suppressed TNF- α -induced IL-8 production at the transcriptional level, suggesting that soyaflavone HG is a promising soybean component for preventing IBD. *Soy Protein Research, Japan* **10**, 124-127, 2007.

Key words: inflammatory bowel disease, intestinal epithelial cell, interleukine-8, isoflavone, TNF- α

*〒113-8657 文京区弥生1-1-1

近年消化器における疾患が急激に増加しているが、中でも潰瘍性大腸炎およびクローン病に代表される炎症性腸疾患 (Inflammatory bowel disease; IBD) は、ここ20年でその患者数が30倍と爆発的に増加しており今後もその増加が懸念される疾患である¹⁾。IBDはやはり近年増加の一途を辿り2010年には死因の第一位を占めることが予想される大腸がんのリスクファクターでもあり、IBDの予防・改善は大腸がんの予防・改善にもつながることが期待される。IBDは腸管免疫系を制御するサイトカインの産生異常に起因する。すなわち異常亢進したマクロファージなどが産生するtumor necrosis factor-alpha (TNF- α), interleukin-1beta (IL-1 β) といった炎症性サイトカインが腸管上皮細胞に作用し、腸管上皮細胞はこれらの刺激によってさらに好中球の遊走に関与するinterleukin-8 (IL-8) を分泌、その結果腸管粘膜組織に好中球が浸潤・集積し腸管上皮に細胞傷害をもたらすことによって、腸炎症状が進展することが知られている²⁾。そこで本研究では腸管上皮細胞から分泌されるIL-8に注目することとし、炎症性サイトカインなどによって誘導されるIL-8分泌亢進に対する各種大豆素材の影響についてヒト小腸上皮モデル細胞Caco-2を用いて検討することとした。

方 法

Caco-2細胞の培養

Caco-2細胞はAmerican Type Culture Collection (Rockville, MD, U. S. A.) より購入した。培養には、10%牛胎児血清、2 mM L-グルタミン、ペニシリン (100 U/mL) およびストレプトマイシン (100 μ g/mL)、非必須アミノ酸溶液を含むダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM) を用いた。培地交換は1日おきにおこない、60~80%コンフレントの状態に継代操作をおこなった。

ELISA法による培養上清中IL-8量の測定

24ウェルプレート上で14日間培養して十分に小腸上皮様に分化させたCaco-2細胞に、TNF- α などのサイトカインおよび大豆素材を加えて24時間培養した。培養上清液を回収し、培養上清中のIL-8量をsandwich-ELISA法によって定量した。

Real-time PCR法による細胞中IL-8 mRNA発現量の測定

Caco-2細胞は24ウェルプレートに2週間培養し小腸上皮様に分化させたものを用いたTNF- α および大豆素材で3時間処理した後ISOGEN (ニッポンジーン) を用いて細胞を溶解させプロトコールに従って抽出操作をおこない、最終的に20 μ LのRNase free水に溶

解しTotal RNAサンプルを得た。得られたTotal RNA 5 μ gを用いて逆転写反応をおこなってcDNAを合成し、それをReal-time PCRのテンプレートDNAとして用いた。Real-time PCRはQuantiTect SYBR Green PCR マスターミックス (QIAGEN) を用い、95 $^{\circ}$ Cで15分間変性させた後、さらに95 $^{\circ}$ Cで5秒間変性、56 $^{\circ}$ Cで15秒間アニーリング、72 $^{\circ}$ Cで10秒間伸長の条件で40サイクル増幅させた。IL-8、 β -actinのプライマーは以下のものを用いた。: human IL-8 sense, 5'-AGAGTGATTGAGAGTGGACC-3'; human IL-8 antisense, 5'-ACTTCTCCACAACCCTCTG-3'; human β -actin sense, 5'-CCACGAACTACCTTCAAC-3'; human β -actin antisense, 5'-GATCTTCATTGTGTGCTGGG-3'。実験の結果はIL-8の結果を β -アクチンで割り、コントロールの値を100%に換算したときの相対値を示した。

ルシフェラーゼアッセイ

Caco-2細胞を12 well plateに0.6 \times 10⁵/wellで播いて培養し、80% confluentになった時点でlipofection法を用いて、ヒトIL-8プロモーター領域 (-300 bpから+50 bp) を含むpGL3-basicベクターおよびpRL-CMVを一過的に遺伝子導入した。細胞をさらにTNF- α および大豆素材を加えて培養した後、lysis bufferで溶解し、Dual-Luciferase reporter assay 試薬 (プロメガ) を用いてルシフェラーゼ活性を測定した。

結果と考察

Caco-2細胞におけるTNF- α によるIL-8分泌亢進に対する大豆素材の影響

ヒト小腸上皮様に分化させたCaco-2にTNF- α を100 ng/mLの濃度で処理し、また同時に大豆イソフラボン を主成分とするソヤフラボンHG、大豆サポニンを主成分とするソイヘルスSA、および大豆ペプチドを1, 5, 10 mg/mLの濃度で作用させた。その結果、TNF- α によるIL-8分泌亢進がソヤフラボンHGによって濃度依存的に抑制されることが明らかとなった (Fig. 1)。一方大豆ペプチドを添加した場合は、TNF- α によるIL-8分泌亢進は変化がみられなかった (データ省略)。またソイヘルスSAを作用させた場合は若干のIL-8分泌抑制作用がみられたものの、その作用はソヤフラボンHGに比べごくわずかであった (データ省略)。ソイヘルスSAはソヤフラボンHGに含まれる大豆イソフラボンをサポニンに置き換えた素材であることから、ソヤフラボンHGによるIL-8分泌抑制作用はソヤフラボンHGに含まれる大豆イソフラボンに起因することが示唆された。

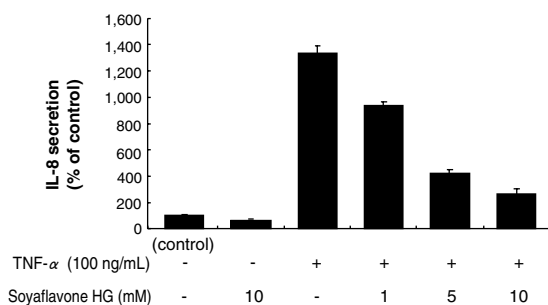


Fig. 1. Effect of soyaflavone HG on TNF- α -induced IL-8 secretion in human intestinal Caco-2 cells. Caco-2 cells were treated with various concentrations of soyaflavone HG and TNF- α (100 ng/mL) for 24 hours. The culture medium was collected and IL-8 level was determined by ELISA. Each value is the mean \pm S.D. (n=4).

IL-1 β および過酸化水素刺激によるIL-8分泌亢進に対する大豆素材の影響

Caco-2細胞におけるIL-8産生はTNF- α だけでなくIL-1 β あるいは過酸化水素 (H₂O₂) などの酸化ストレス, 食品由来因子などによっても亢進することが知られている^{3,4}). そこでIL-1 β およびH₂O₂によって誘導されたIL-8分泌亢進に対するソヤフラボンHGの作用を検討することとした. IL-1 β を1 ng/mLの濃度で添加しさらにソヤフラボンHGを1, 5, 10 mg/mLの濃度で作用させた後IL-8分泌量を測定したところ, IL-1 β 処理によって増加したIL-8分泌量はソヤフラボンHGの添加によって影響を受けなかった (Fig. 2). 同様にH₂O₂を2 mMの濃度で添加した場合のソヤフラボンHGの作用を検討したところ, H₂O₂によるIL-8分泌亢進に対するソヤフラボンHGの抑制作用はみられなかった (Fig. 3). これよりソヤフラボンHGによるIL-8分泌抑制作用は, TNF- α によるIL-8分泌亢進に対して特異的であることが示唆された.

TNF- α によるIL-8 mRNA発現および転写活性亢進に対するソヤフラボンHGの影響

TNF- α によるIL-8分泌亢進に対するソヤフラボンHGの分泌抑制の作用機序を明らかにするため, TNF- α によるIL-8 mRNA発現亢進に対するソヤフラボンHGの作用を検討した. TNF- α および各濃度のソヤフラボンHGを含んだ培地でCaco-2細胞を培養した. 3時間後Caco-2細胞よりRNAを抽出しcDNAを合成, Real-time PCRに用いた. その結果, TNF- α によるIL-8 mRNA発現量の増加は添加したソヤフラボンHGによって顕著に抑制された (Fig. 4). さらにヒトIL-8プロモーター領域を約300 bp含むレポーターベクターを構築し,

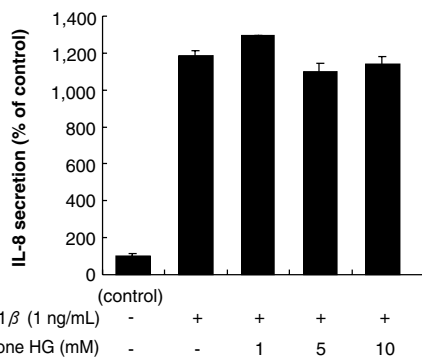


Fig. 2. Effect of soyaflavone HG on IL-1 β -induced IL-8 secretion in human intestinal Caco-2 cells. Caco-2 cells were treated with various concentrations of soyaflavone HG and IL-1 β (1 ng/mL) for 24 hours. The culture medium was collected and IL-8 level was determined by ELISA. Each value is the mean \pm S.D. (n=4).

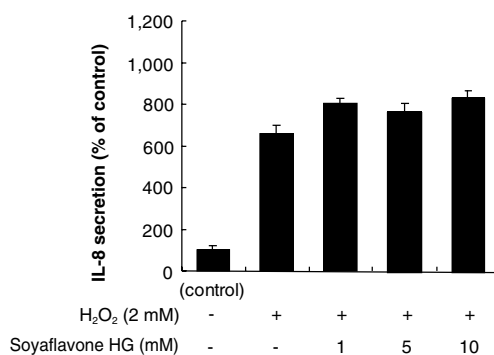


Fig. 3. Effect of soyaflavone HG on hydrogen peroxide-induced IL-8 secretion in human intestinal Caco-2 cells. Caco-2 cells were treated with various concentrations of soyaflavone HG and hydrogen peroxide (2 mM) for 24 hours. The culture medium was collected and IL-8 level was determined by ELISA. Each value is the mean \pm S.D. (n=4).

IL-8転写活性に対するソヤフラボンHGの影響を調べた. その結果, TNF- α 処理によって増加したIL-8プロモーター活性は添加したソヤフラボンHGの濃度依存的に抑制された (Fig. 5). これより, ソヤフラボンHGはTNF- α によるIL-8産生亢進を転写レベルで抑制していることが示された.

以上の結果より, ソヤフラボンHGは腸管上皮におけるIL-8産生を抑制することが示唆され, 炎症性腸疾患の改善が期待できる食品素材となり得る可能性が示唆された.

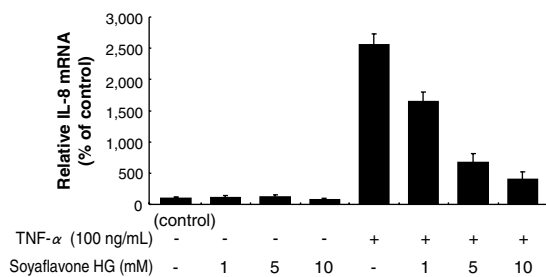


Fig. 4. Effect of soyaflavone HG on TNF- α -induced IL-8 mRNA expression in human intestinal Caco-2 cells. Total RNA from the cells was extracted after incubating with soyaflavone HG and TNF- α (100 ng/mL) for 3 h. First-strand cDNA was prepared from 5 mg of total RNA. A real-time PCR analysis was performed with SYBR Green, β -actin being used as a stable housekeeping gene. Each value is the mean \pm S.D. (n=3).

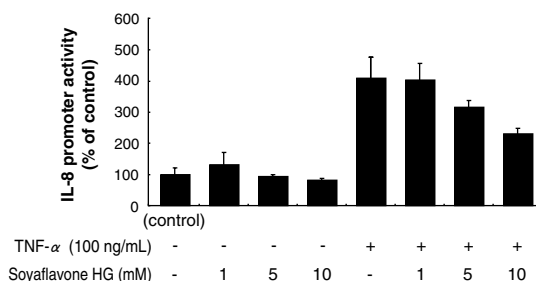


Fig. 5. Effect of soyaflavone HG on TNF- α -induced transcriptional activity of the 5'-flanking region of the human IL-8 gene in Caco-2 cells. Caco-2 cells cotransfected with the pGL3-basic vector containing the IL-8 promoter region and pRL-CMV were treated with soyaflavone HG and TNF- α (100 ng/mL) for 24 h. The transcriptional activity was estimated by a luciferase assay. Each value is the mean \pm S.D. (n=3).

要 約

近年患者数の増加が懸念されている炎症性腸疾患は腸管免疫系を制御するサイトカインの異常亢進に起因することが知られていることから、本研究では腸管上皮細胞が産生する炎症性サイトカインの一種であるinterleukin-8 (IL-8) に対する大豆素材の影響を検討した。腸管上皮モデルCaco-2細胞を用いてTNF- α によるIL-8分泌亢進に対する各種大豆素材の作用を検討したところ、大豆イソフラボンを主成分とするソヤフラボンHGを添加することによってIL-8産生が顕著に抑制されることが見出された。またIL-1 β およびH₂O₂によるIL-8産生亢進に対してソヤフラボンHGは抑制作用を示さず、その抑制効果はTNF- α 刺激に特異的であることが示唆された。またTNF- α によるIL-8 mRNA発現量およびIL-8転写活性亢進に対してソヤフラボンHGはいずれも濃度依存的に抑制することが明らかとなり、これよりソヤフラボンHGはTNF- α によるIL-8産生亢進を転写レベルで抑制することで抗炎症作用を示す可能性が明らかとなった。

文 献

- 1) Shanahan F (2001): Inflammatory bowel disease: immunodiagnostics, immunotherapeutics, and eotherapeutics. *Gastroenterology*, **120**, 622-635.
- 2) Baggiolini M, Loetscher P and Moser B (1995): Interleukin-8 and the chemokine family. *Int J Immunopharmacol*, **17**, 103-108.
- 3) Satsu H, Matsuda T, Toshimitsu T, Mori A, Mae T, Tsukagawa M, Kitahara M and Shimizu M (2004): Regulation of interleukin-8 secretion in human intestinal epithelial Caco-2 cells by α -humulene. *Biofactors*, **21**, 137-139.
- 4) Son DO, Satsu H and Shimizu M (2005): Histidine inhibits oxidative stress- and TNF-alpha-induced interleukin-8 secretion in intestinal epithelial cells. *FEBS Lett*, **579**, 4671-4677.