

大豆イソフラボンによる認知症予防効果における 海馬ニューロン新生の役割の解明

守屋孝洋*

東北大学大学院薬学研究科細胞情報薬学分野

The Role of Hippocampal Neurogenesis in the Prevention of Cognitive Impairment by Soy Isoflavones

Takahiro MORIYA*

Department of Cellular Signaling, Graduate School of Pharmaceutical Sciences,
Tohoku University, Sendai 980-8578

ABSTRACT

It was recently reported that the soy isoflavone have the preventive effects on the symptoms of Alzheimer model animal. On the other hand, the adult neurogenesis in the hippocampal dentate gyrus was found to be involved in the learning and memory. In this study, therefore, we tried to clarify whether the popular soy isoflavones, genistein and daidzein could affect the proliferation and the differentiation of the neural stem cells using the cultured neural stem cells and mouse models. The proliferation of the cultured neural stem cells was examined by WST-8 assay and BrdU immunohistochemistry, and the differentiation to the neurons, astrocytes and oligodendrocytes was evaluated using the immunohistochemistry for MAP2, GFAP and Rip, respectively. We found that the treatment with genistein suppressed EGF-induced cell growth of the cultured neural stem cells in a concentration-dependent manner. The treatment with daidzein, in contrary, facilitated EGF-induced cell growth of the cultured neural stem cells in a concentration-dependent manner. Both compounds failed to affect the proliferation in the absence of EGF. Daidzein moderately increased the proportion of neurons and oligodendrocytes, but not astorocytes, when treated in the differentiation-preferring medium including 1% FCS. Finally, we observed that the oral administration of daidzein increased the number of BrdU-labeled cells in the subgranular zone of hippocampal dentate gyrus of ICR mouse treated with and without A β 1-42. These results suggest that daidzein has the facilitaing action on the hippocampal neurogenesis of mouse. *Soy Protein Research, Japan* **18**, 108-112, 2015.

*〒980-8578 仙台市青葉区荒巻字青葉6番3号

Key words : neural stem cell, neurogenesis, hippocampus, soybean isoflavone, daidzein

大豆イソフラボンはアルツハイマー病などの認知症を改善する効果を示すことが実験動物モデルを用いた研究¹⁾により明らかにされているが、その作用機序については十分に解明されていない。一方、記憶・学習機能を担う海馬では成体においても神経幹細胞から新生ニューロンが産生されており、ニューロン新生の低下は記憶学習機能などの高次脳機能の低下を招くことが報告されている。神経幹細胞は自己複製能とニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトへの多分化能を有する未成熟な細胞であるが、ゲニステインやダイゼインなどの大豆イソフラボンが神経幹細胞の諸機能に影響を与えている可能性を考えた。そこで本研究では、「大豆イソフラボンによる認知症予防効果は海馬ニューロン新生障害の改善作用によってもたらされている」可能性を検討することを目的とする。具体的には、アルツハイマー病モデルマウスを用い、大豆イソフラボンが海馬ニューロン新生（神経幹細胞の増殖、ニューロン分化、新生ニューロンの生存）に対してどのような影響を与えるのかを調べ、さらに培養神経幹細胞を用いて大豆イソフラボンの神経幹細胞賦活化作用の分子メカニズムを明らかにしようと考えた。

方 法

1) マウス前脳由来神経幹細胞の初代培養および増殖評価

神経幹細胞の培養は、Weissらが開発したニューロスフェア法を用いて行った^{2,3)}。妊娠15.5日目のICRマウスから胎仔を取りだし、その前脳組織を機械的に分散させて単一細胞化し、細胞密度を 10×10^4 cells/mLに調整し、EGF (20 ng/mL) およびFGF2 (20 ng/mL) を含むMHM液中で5日間培養し、神経幹細胞を分離培養した。細胞の増殖は生細胞数測定法であるWST-8アッセイおよびBrdU取込みアッセイによって行った。増殖因子を含まない培地中で神経幹細胞を12時間培養し、その後、EGF (20 ng/mL) で刺激するとともに、被検物質を処理した。その48時間に、WST-8試薬あるいはBrdU (1 μ M) を添加し、さらに4時間培養した。WST-8アッセイは450 nmの吸光度を測定することによって評価し、BrdU取込みアッセイは免疫染色によってBrdU標識細胞を可視化し、セロ

ミクスアレイスキャンで陽性細胞の出現率を評価した。

2) 分化評価

神経幹細胞を被検物質を含む分化誘導培地 (1% FCS含有) で培養し、その後、経時的に4% PFAで固定した。その後、ニューロンマーカー MAP2、アストロサイトマーカー GFAP、オリゴデンドロサイトマーカー Ripに対する特異的抗体を用いて免疫染色を行い、セロミクスアレイスキャンで陽性細胞の出現率を評価した。

3) マウス海馬歯状回の神経幹細胞の増殖評価

BrdU免疫染色によって行った。雄性ICRマウスにダイゼインを経口投与し (50 mg/kg, 1回/日, 6日間連続)、最終投与の24時間後にBrdUを腹腔内投与 (50 mg/kg, 3回, 6時間間隔) した。最終BrdU投与の2時間後あるいは21日間後にマウス脳をサンプリングし、BrdU免疫染色、あるいはBrdU-NeuN二重免疫染色を行い、陽性細胞数を蛍光免疫染色によってカウントした。

結果と考察

1) 培養神経幹細胞の増殖に与える影響

大豆イソフラボン混合物およびダイゼインは濃度依存的にEGF刺激による神経幹細胞の増殖を促進することがWST-8アッセイおよびBrdU取込みアッセイにおいて観察された (Fig. 1, 2)。一方、ゲニステインは濃度依存的にEGF刺激による増殖を抑制した (Fig. 1, 2)。大豆イソフラボン混合物およびダイゼイン、ゲニステインはいずれもEGF非存在下の生細胞数ならびにBrdU取込みには影響しなかったことから (Fig. 1, 2)、大豆イソフラボンはEGFシグナルに影響を与えている可能性が示唆された。

2) 培養神経幹細胞の分化に与える影響

次に、ダイゼインを分化誘導培地中に添加し、経時的に細胞を固定し、神経幹細胞の分化に与える影響を検討した。対照群では、分化誘導に伴い、ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトが誘導3日目あたりから出現してくる様子が観察されたが (Fig. 3)、

ダイゼインの共処理はアストロサイト分化に影響を与えず、ニューロンおよびオリゴデンドロサイト分化の出現時期を早め、それぞれの陽性細胞出現率を上昇させた (Fig. 3).

3) マウス海馬歯状回の神経幹細胞の増殖に与える影響

最後に、ダイゼインがマウス海馬歯状回の神経幹細胞の増殖に与える影響をBrdU免疫染色によって検討した。Aβ1-42の脳室内投与は海馬歯状回のBrdU標識細胞数およびBrdU-NeuN二重陽性細胞数を低下させ

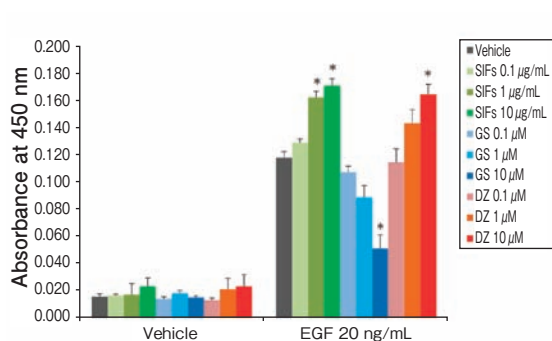


Fig. 1. Effects of soy isoflavones on the viable cell number of neural stem cells. The cells were treated with EGF 20 ng/mL or vehicle in the presence of various concentration of soy isoflavones for 48 hrs and the viable cell number of the neural stem cells was indirectly measured using WST-8 reagent. * $p < 0.05$ vs. EGF alone (Tukey-Kramer test), $n = 5$.

た。一方、ダイゼイン (50 mg/kg p.o.) の6日間連続投与はAβ1-42投与マウスおよび非投与マウスの両群において、BrdU標識細胞数およびBrdU-NeuN二重陽性細胞数を増加させた。以上の結果より、大豆イソフラボンのダイゼインは、神経幹細胞の増殖、およびニューロン分化、オリゴデンドロサイト分化を促進する作用を有することが明らかになった。今後は、神経幹細胞機能調整作用におけるダイゼインの標的分子、作用機序を明らかにすると同時に、認知機能障害改善作用におけるニューロン新生促進の寄与を明らかにしていく必要がある。

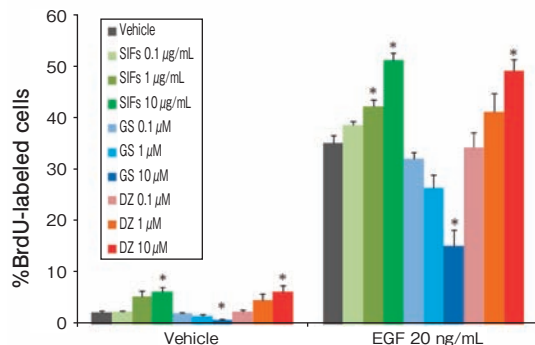


Fig. 2. Effects of soy isoflavones on BrdU incorporation of neural stem cells. The cells were treated with EGF 20 ng/mL or vehicle in the presence of various concentrations of soy isoflavones for 48 hrs. BrdU 1 μM was exposed to the cells for last 4 hrs and cells were fixed using 4% PFA. BrdU-labeled cells were visualized by immunocytochemistry using anti-BrdU antibody and their proportion against the total cell number calculated from hoechst 33258-stained nuclei was evaluated. * $p < 0.05$ vs. EGF alone (Tukey-Kramer test), $n = 5$.

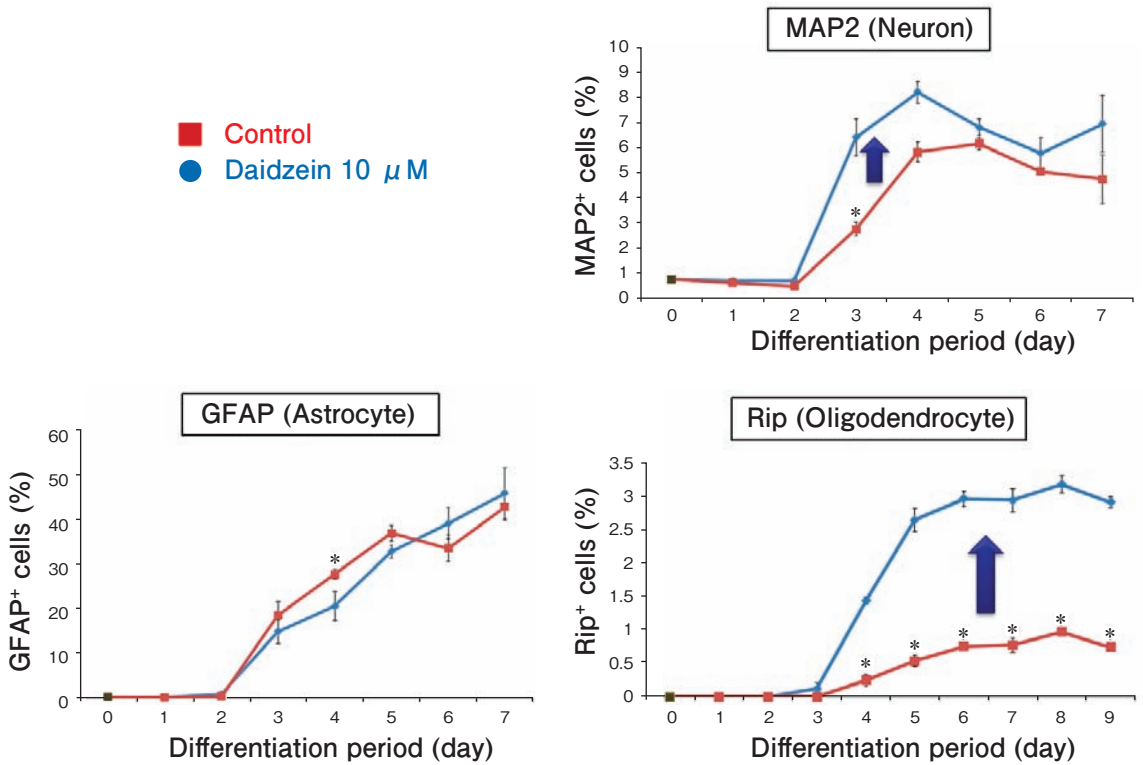


Fig. 3. Effects of soy isoflavones on the differentiation of neural stem cells. The cells were differentiated by 1% FCS-containing medium in the presence of daidzein for indicated time and were fixed by 4% PFA solution. Each cell marker was visualized by immunocytochemistry using anti-MAP2, anti-GFAP and anti-Rip antibody and their proportion against the total cell number calculated from hoechst 33258-stained nuclei was evaluated. * $p < 0.05$ (Tukey-Kramer test). $n=5$.

要 約

大豆イソフラボンはアルツハイマー病などの認知症を改善する効果を示すことがヒトおよび実験動物モデルを用いた研究により明らかにされているが、その作用機序については十分に明らかにされていない。一方、記憶・学習機能を担う海馬では成体においても神経幹細胞から新生ニューロンが産生されており、ニューロン新生の低下は記憶学習機能などの高次脳機能の低下を招くことが報告されている。そこで本研究では、「大豆イソフラボンによる認知症予防効果は海馬ニューロン新生障害の改善作用によってもたらされている」という可能性を検証することを目的とした。

胎生15日目のマウス前脳よりニューロスフィア法によって神経幹細胞を分離培養し、増殖因子EGFによる神経幹細胞の増殖に対する大豆由来イソフラボン混合物および主要イソフラボンであるdaidzeinならびにgenisteinの効果をWST-8アッセイおよびBrdU取込みアッセイによって検討した。その結果、genisteinの共処理はEGFによる神経幹細胞の増殖に対して抑制作用を示したのに対して、大豆由来イソフラボン混合物およびdaidzeinは濃度依存的な促進作用を示した。大豆由来イソフラボン混合物およびdaidzeinそれ自身には神経幹細胞の増殖誘発作用は見られなかった。次に神経幹細胞の分化を低濃度血清（1%FCS）で誘発した際の効果を免疫染色法によって検討したところ、daidzeinはMAP陽性のニューロンの割合を増加させ、ニューロン分化促進作用があることが明らかになった。In vivoにおける大豆イソフラボンの効果を検討するために、アミロイド β (A β 1-42)の海馬内注入によるアルツハイマー病モデルマウスを作成して実験を行ったところ、A β 1-42投与は海馬ニューロン新生を抑制した。Daidzeinの経口投与は対照マウスおよびA β 1-42投与マウスにおいて、神経幹細胞の増殖およびニューロン新生を促進した。以上の結果より、大豆イソフラボンの中でdaidzeinは神経幹細胞増殖促進作用を有し、これがニューロン新生の促進作用に寄与し、アルツハイマー病などにおける認知症予防効果に寄与している可能性が示唆された。

文 献

- 1) Zhao L, Mao Z, Chen S, Schneider LS and Brinton RD (2013): Early intervention with an estrogen receptor β -selective phytoestrogenic formulation prolongs survival, improves spatial recognition memory, and slows progression of amyloid pathology in a female mouse model of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*, **37**, 403-419.
- 2) Reynolds BA, Tetzlaff W and Weiss S (1992): A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes. *J Neurosci*, **12**, 4565-4574.
- 3) Rivera P, Pérez-Martín M, Pavón FJ, Serrano A, Crespillo A, Cifuentes M, López-Ávalos MD, Grondona JM, Vida M, Fernández-Llebrez P, de Fonseca FR and Suárez J (2013): Pharmacological administration of the isoflavone daidzein enhances cell proliferation and reduces high fat diet-induced apoptosis and gliosis in the rat hippocampus. *PLoS One*, **8**, e64750.