

ヒト破骨細胞形成に対する大豆イソフラボンの抑制効果

海老沢秀道*・腰原康子

(財) 東京都老人総合研究所栄養学部門

Inhibitory Effects of Soy-isoflavones on Osteoclastogenesis in Human Bone Marrow Cell Culture

Hidemichi EBISAWA and Yasuko KOSHIHARA

Department of Nutrition, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology, Tokyo 173-0015

ABSTRACT

Genistein and daidzein were accepted as phytoestrogen that has estrogen-like effects on bone metabolism with little side-effects on reproductive organs. But, there are very few experimental reports that determine the effects of genistein and daidzein on human bone metabolism. The purpose of the present study is to elucidate the direct effects of genistein and daidzein on bone resorption, such as osteoclast formation and osteoclastogenesis-related cytokine production. Monocyte-rich fraction was collected from human bone marrow and the cells were seeded at 5×10^5 cells/well in 8-well chamber slide. The cells were cultured for 2 weeks in a medium containing either vehicle, genistein, daidzein or 17β -estradiol at a concentration of 10^{-7} M to 10^{-5} M. Genistein, daidzein or 17β -estradiol caused a significant decrease in a formation of osteoclast-like cell. Daidzein (10^{-5} M) suppressed IL-6 and M-CSF production in bone marrow cell culture, but genistein had no effect on these cytokine productions. Genistein, daidzein and 17β -estradiol had no effect on osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) production. These results suggested that daidzein has suppressive effects on osteoclast-like cell formation through decrease in IL-6 and M-CSF production, and genistein has different mechanisms to decrease osteoclast-like cell formation in human bone marrow cell culture. *Soy Protein Research, Japan* 4, 129-134, 2001.

Key words : genistein, daidzein, cell culture, human bone marrow, osteoclastogenesis

ゲニステインやダイゼイン等のエストロゲン様構造を持つイソフラボン¹⁾は生殖器に対する副作用が少な

い骨量低下抑制因子として報告されている²⁻⁴⁾。しかし、骨代謝に対するイソフラボンの作用機序については十分明らかにされていない。さらに数少ない研究報告のほとんどは実験動物⁵⁻⁷⁾を用いた観察であり、ヒトの骨

*〒 173-0015 東京都板橋区栄町 35-2

代謝, 特に骨吸収過程に対するイソフラボンの影響を観察した報告はない。骨吸収過程は, 破骨細胞の分化・増殖によって促進される。本研究では, ヒト大腿骨髄細胞を培養して破骨細胞形成, 破骨細胞増殖関連サイトカインを測定し, イソフラボンがヒトの骨の前駆細胞に直接作用して破骨細胞増殖を抑制するか否かを確認し, さらにその作用機序の解明を試みた。

方 法

培養液条件

本研究では, 20% ウマ血清および 10^{-8} M ビタミン D_3 を含んだ α -minimum essential medium (α -MEM) に, 被検物質としてゲンステイン (Gen 群), ダイゼイン (Did 群)あるいは 17β -estradiol (Estradiol 群)を 10^{-7} M ~ 10^{-5} M 添加し, 細胞培養に用いた。また, 対照条件として, これら被検物質の溶剤として用いた dimethylsulfoxide (DMSO, (DMSO 群)) を培養液に添加した。エストロゲンを除去した透析血清およびフェノールレッドを除去した培養液では破骨細胞形成の著しい低下が認められたので, 本研究では非働化血清およびフェノールレッドを含んだ培養液条件を採用した。DMSO 群の培養液中エストロゲン濃度は 2.1×10^{-9} M だった。

ヒト破骨細胞の培養方法

ヒト破骨細胞は以下のように分離した。ヒト大腿骨骨頭骨折による人工骨頭置換手術の際に得られる骨髄を採取し, Histopaque1077 を用いて未分化 monocyte に富む画分を分離した。培養液で洗浄した後, ラボテックチャンバーに 5×10^5 個/well にこの細胞を播種し, 被検物質を添加した培養液で培養した。各培養液条件について 4 wells で培養を行った。培養開始後 5 日目にチャンバー内の培養液を全量交換し, その後は 4 日間隔で培養液の半量を新しい培養液と交換した。培養開始後 5 日目の培養液はサイトカイン測定のために保存した。2 週間培養して多核細胞を形成させた後, チャンバー内の細胞をプロナーゼ処理してストローマ細胞および単核の細胞を除いて破骨細胞様細胞を得た。本培養法で形成されてくる破骨細胞様細胞は, 酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ (TRAP) の染色に陽性であること, アクチンリングを形成すること, 骨吸収能を有することおよびカルチトニン受容体を発現すること等から破骨細胞であることが確認されている^{8,9)}。

測定項目

2 週間の培養で形成された TRAP 染色陽性の 3 核

以上の多核細胞を破骨細胞として計数した。培養 5 日目の培養液について, IL-6, マクロファージコロニー刺激因子 (macrophage colony stimulating factor, M-CSF) および破骨細胞形成阻害因子 (osteoclastogenesis inhibitory factor/osteoprotegerin, OCIF/OPG) を ELISA 法で測定した。

統計処理

測定結果は, 一元配置分散分析 (ANOVA) 後, Bonferroni の multiple-range test を用いて各群間の有意差を検定した。

結果と考察

破骨細胞形成

骨吸収において, 破骨細胞の数は主要な因子である。そこで, チャンバー中に形成された TRAP 染色陽性の多核細胞 (破骨細胞様細胞) 数を観察した (Fig. 1)。

2 週間の培養後に well 中に確認された破骨細胞様細胞数は, DMSO 群で 3102 ± 510 cells/well であった。DMSO 群に比べて, Gen 群および Did 群における破骨細胞様細胞数は, 10^{-7} M ではいずれも低下傾向, 10^{-6} M および 10^{-5} M では有意な低値を示した。一方 Estradiol 群の破骨細胞様細胞数は, DMSO 群のに比べて, 10^{-7} M および 10^{-6} M では低下傾向, 10^{-5} M では有意な低値を示し, エストロゲンは破骨細胞形成を抑制した。以上のように大豆イソフラボンのゲンステインとダイゼインは, ヒトの骨の細胞に直接作用して破骨細胞形成を抑制した。

培養液中 Interleukin-6 (IL-6) 濃度

IL-6 は破骨細胞の活性化および monocyte から破骨細胞前駆細胞への分化を促進し, 骨吸収過程に重要な役割を果たすといわれている。培養 5 日目の培養液中 IL-6 濃度を測定し, IL-6 産生に対するゲンステインおよびダイゼインの影響を観察した (Fig. 2)。DMSO 群の培養液中 IL-6 濃度は 259 ± 28 pg/mL であった。DMSO 群に比べて, Did 群の培養液中 IL-6 濃度は有意に低く, ダイゼインは IL-6 産生を抑制することが明らかにされた。しかし, ゲンステインは培養液中 IL-6 濃度を低下しなかった。一方, Estradiol 群の培養液中 IL-6 濃度は, DMSO 群に比べて低下し, 10^{-5} M では 161 ± 6 pg/mL の有意な低値を示した。

培養液中 macrophage-colony stimulating factor (M-CSF) 濃度

M-CSF は必須の破骨細胞分化誘導因子で, M-CSF 産生の増加は破骨細胞の増殖を促進する。M-CSF 産生に対する大豆イソフラボンの影響を Fig. 3 に示した。

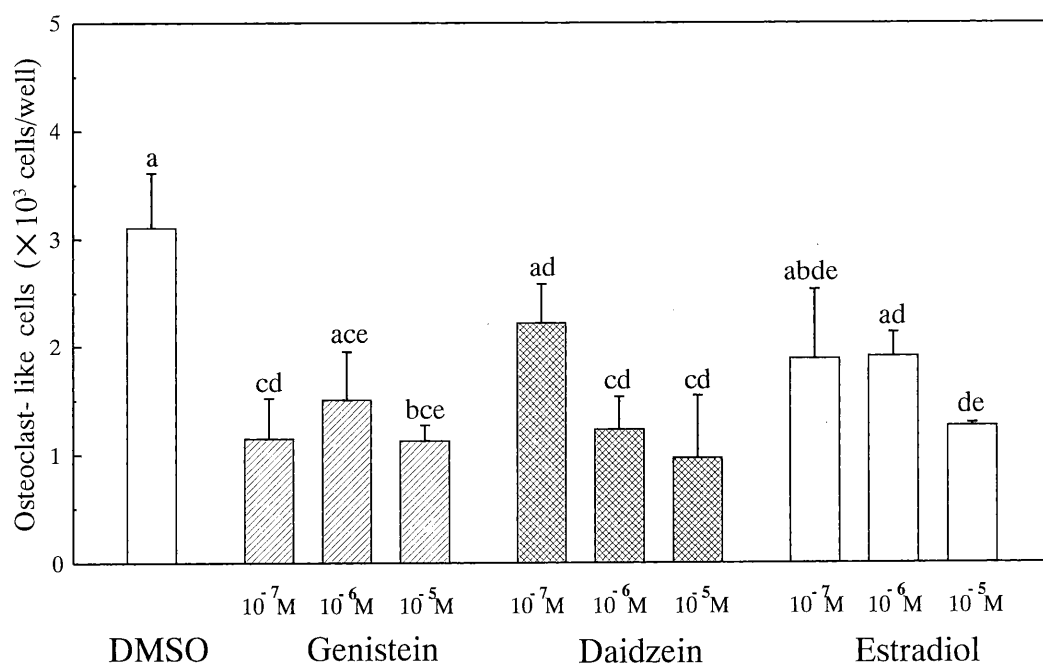


Fig. 1. Effects of genistein and daidzein on osteoclast-like cell formation in bone marrow cell culture. TRAP-staining positive multinuclear cells were counted as osteoclast-like cells. Values are mean $\pm$ SE (n=4). Columns with different superscripts were significantly different at $P<0.05$.

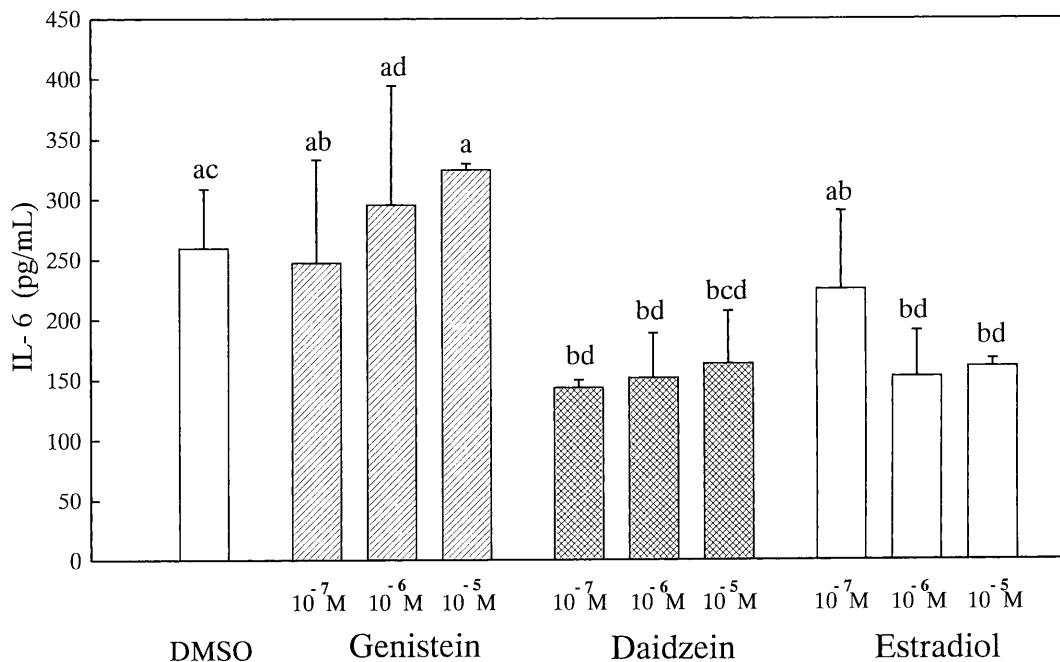


Fig. 2. Effects of genistein and daidzein on IL-6 production in bone marrow cell culture. IL-6 concentrations in conditioned medium on 5 days of cell culture were measured by means of ELISA. Values are mean $\pm$ SE (n=4). Columns with different superscripts were significantly different at $P<0.05$.

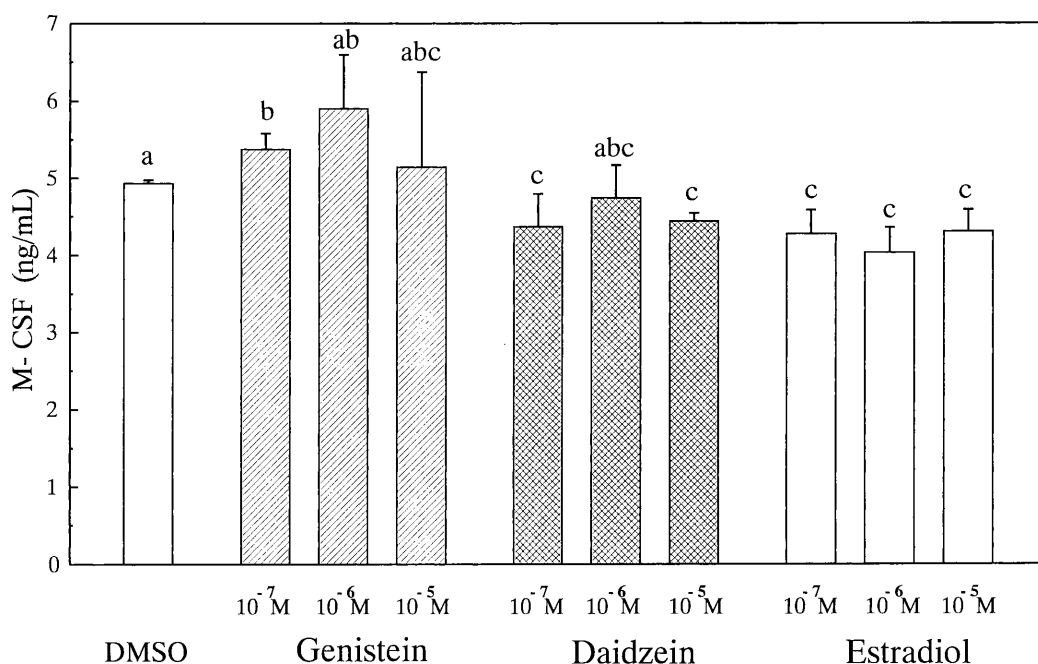


Fig. 3. Effects of genistein and daidzein on M-CSF production in bone marrow cell culture. M-CSF concentrations in conditioned medium on 5 days of cell culture were measured by means of ELISA. Values are mean $\pm$ SE (n=4). Columns with different superscripts were significantly different at $P<0.05$.

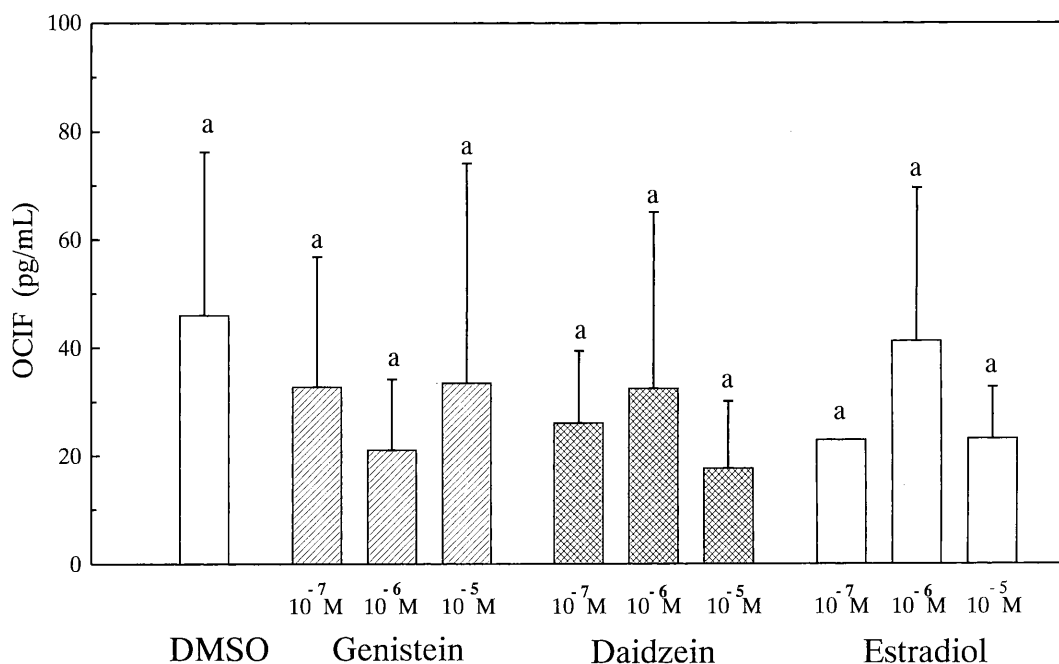


Fig. 4. Effects of genistein and daidzein on OCIF production in bone marrow cell culture. OCIF (Osteoprotegerin) concentrations in conditioned medium on 5 days of cell culture were measured by means of ELISA. Values are mean $\pm$ SE (n=4). Columns with different superscripts were significantly different at $P<0.05$.

DMSO 群における培養液中 M-CSF 濃度は 930 ± 45 pg/mL だった。Did 群の培養液中 M-CSF 濃度は DMSO 群に比べて低値傾向を示し、 10^{-5} M では有意な低値を示した。しかし、Gen 群の培養液中 M-CSF 濃度は有意な低下を示さなかった。一方、Estradiol 群の培養液中 M-CSF 濃度は、DMSO 群に比べて有意な低値を示し、エストロゲンによって M-CSF 産生は抑制された。

ゲニステインとダイゼインの骨量低下抑制作用を比較した研究は殆ど行われていないため、両者の作用機序が異なるか否かについての一致した結果は得られていない^{6,10)}。しかし我々の研究結果は、ダイゼインは IL-6 および M-CSF 産生の抑制を介して破骨細胞形成を減少することおよびゲニステインはダイゼインとは異なるメカニズムで破骨細胞増殖を抑制している可能性を示している。

培養液中 OCIF 濃度

OCIF は破骨細胞誘導因子 (ODF) の作用を阻害して、破骨細胞形成を抑制する¹¹⁾。破骨細胞形成抑制因子に対する大豆イソフラボンの影響を調べるために、培養液中の OCIF を測定し、その結果を Fig. 4 に示した。DMSO 群における培養液中 OCIF 濃度は 14.6 ± 12.9 pg/mL とこれまでの測定値に比べて低値であった。Gen 群、Did 群および Estradiol 群の培養液中 OCIF 濃度は、いずれもバラツキが大きく、DMSO 群との間に有意差は認められなかった。

今回の研究では、OCIF 産生量の相違からゲニステインとダイゼインの破骨細胞形成抑制作用の作用機序の相違を説明することはできなかった。ゲニステインの破骨細胞形成抑制作用を明らかにするためには、OCIF 産生について再度検討すると共に、TGF- β などの破骨細胞形成抑制因子についてもさらに検討を加える必要があるものと考えた。

要 約

ヒトの骨代謝、特に骨吸収過程に対する大豆イソフラボンの有効性および作用機序を明らかにする目的で、ヒト骨髄細胞培養系を用いて、破骨細胞形成および関連サイトカイン産生量に対するゲニステインおよびダイゼインの影響を調べた。その結果、1) 破骨細胞の形成はゲニステインおよびダイゼインによって有意に低下した、2) 破骨細胞形成を促進するサイトカインの IL-6 と M-CSF 産生量はダイゼインによって有意に抑制されたが、ゲニステインはこれらサイトカイン産生を抑制しなかった、3) 破骨細胞形成に抑制的に作用する OCIF の産生量は、バラツキが大きく、ゲニステインおよびダイゼイン共に有意な影響を示さなかった。以上から、ゲニステインおよびダイゼインはヒトの骨の細胞に直接作用して破骨細胞形成を抑制することが明らかとなった。しかし、その作用機序はゲニステインとダイゼインで異なることが示唆された。

文 献

- 1) Miksicek JF(1995): Estrogenic flavonoids : structural requirements for biological activity. *Proc Soc Exp Biol Med*, **208**, 44-50.
- 2) Yamaguchi M and Gao YH(1998): Inhibitory effect of genistein on bone resorption in tissue culture. *Biochem Pharmacol*, **55**, 71-76.
- 3) Barnes S(1998): Evolution of the health benefits of soy isoflavones. *Proc Soc Exp Biol Med*, **217**, 386-392.
- 4) Ishida H, Uesugi T, Hirai K, Toda T, Nukaya H, Yokotsuka K and Tsuji K(1998): Preventive effects of the plant isoflavones, daidzein and genistein, on bone loss ovariectomized rat fed calcium-deficient diet. *Biol Pharm Bull*, **21**, 62-66.
- 5) Ishimi Y, Miyamura C, Ohmura M, Onoe Y, Sato T, Uchiyama Y, Ito M, Wang X, Suda T and Ikegami S(1999): Selective effects of genistein, a soybean isoflavone, on B-lymphopoiesis and bone loss caused by estrogen deficiency. *Endocrinology*, **140**, 1893-1900.
- 6) Gao YH and Yamaguchi M(1999): Anabolic effect of daidzein on cortical bone in tissue culture: comparison with genistein effect. *Mol Cell Biochem*, **194**, 93-97.

- 7) Gao YH and Yamaguchi M(1999): Inhibitory effect of genistein on osteoclast-like cell formation in mouse marrow cultures. *Biochem Pharmacol*, **58**, 767-72.
- 8) Nishikawa T, Ishikawa H, Yamamoto S and Koshihara Y(1999): A novel calcitonin receptor gene in human osteoclasts from normal bone marrow. *FEBS Letter*, **458**, 409-414.
- 9) Koshihara Y, Kodama S, Ishibashi H, Azuma Y, Ohta T and Karube S(1999): Reversibility of alendronate-induced contraction in human osteoclast-like cells formed from bone marrow cells in culture. *J Bone Miner Metab*, **17**, 98-107.
- 10) Picherit C, Coxam V, Bennetau-Pelissero C, Kati-Coulibaly S, Davicco MJ, Lebecque P and Barlet JP(2000): Daidzein is more efficient than genistein in preventing ovariectomy-induced bone loss in rats. *J Nutr*, **130**, 1675-1681.
- 11) Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelly M, Chang MS, Lüthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T, Shimamoto G, DeRose M, Elliott R, Colombero A, Tan HL, Trail G, Sullivan J, Davy E, Bucay N, Renshaw-Gegg L, Hughes TM, Hill D, Pattison W, Campbell P, Sander S, Van G, Tarpley J, Derby P, Lee R and Boyle WJ(1997): Osteoprotegerin; a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*, **89**, 309-319.