

アトピー性皮膚炎モデル動物に対する大豆イソフラボンの免疫調節作用

酒井 徹^{*1,2}・小木曾真理²・満屋香織²・山本 茂²

¹大阪府立看護大学総合リハビリテーション学部 ²徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部

Effect of Genistein on Immune Responses in NC/Nga Mice Used as an Animal Model for Atopic Dermatitis

Tohru SAKAI, Mari KOGISO, Kaori MITSUYA and Shigeru YAMAMOTO

¹Department of Clinical Nutrition, Osaka Prefecture College of Nursing, Habikino 583-8555

²Institute of Health Bioscience, The University of Tokushima Graduate School, Tokushima 770-8503

ABSTRACT

The isoflavone genistein is a phytoestrogen found in high levels in soy products that has been associated with decreased incidence of breast and prostate cancers. In addition, a recent clinical trial suggests that supplementation with the dietary genistein may be as effective as hormone replacement therapy in attenuating menopause-related bone loss without causing the associated side effects. In this study, we examined the effect of genistein on the immune responses in NC/Nga mice that are used as an animal model for atopic dermatitis. Groups of mice were exposed to vehicle or the genistein by gavage. The doses of genistein used were 4 and 20 mg/kg body weight/day. Treatment with picrylchloride in the ear of NC/Nga mice developed dermatitis. Mice that received genistein showed mild dermatitis when compared to the control mice. We also determined serum IgE level, but significant difference was not observed between the groups. Although genistein did not affect the *in vitro* lymphocyte proliferation, it suppressed cytokine production by spleen cells. These results showed that dietary genistein modulates an inflammatory response resulting in amelioration of dermatitis in the skin of NC/Nga mice. *Soy Protein Research, Japan* **7**, 130-136, 2004.

Key words : genistein, NC/Nga mice, IgE, cytokine, dermatitis

Genisteinは大豆製品に多く含まれるイソフラボンの一種であり、様々な生理作用を有していることが報

告されている。これまでの研究で、genisteinを含んだ大豆製品の摂取は、アジア人における乳がんおよび前立腺がんの発症リスク減少と関係していることが示されており¹⁾、その集団におけるgenisteinの抗腫瘍作用

*〒583-8555 羽曳野市はびきの3-7-30

は数々の動物実験からも裏付けられている^{2~4)}。一方、genisteinは抗腫瘍効果のみならず、構造が女性ホルモンであるエストロゲンに類似していることより、閉経後の骨減少に対する治療効果も期待されている。最近のgenisteinを用いた臨床試験では、一日当たり54 mgのgenisteinを摂取することにより、閉経に伴う骨量減少に対しホルモン療法と同程度の効果があることが報告されている⁵⁾。

最近の調査より、日本人の約3人に1人はなんらかのアレルギー様症状を訴えているとされている⁶⁾。このように、近年増加傾向であるアレルギー疾患であるが、その明確な原因およびその発症に関わる因子については必ずしも十分に解明されていない。その原因の一つとしてヒトのアレルギー疾患を解明するための適切なモデル動物が存在しなかったことがあげられる。NC/Ngaマウスはヒトのアトピー性皮膚炎に類似した皮膚症状を自然発症するモデル動物として1997年に報告されたマウスである⁷⁾。NC/Ngaマウスは、specific pathogen-free (SPF) 環境下で飼育すると肉眼的に何ら異常を認めないが、conventional環境下では7~8週齢頃になると痒感の強い皮膚炎を自然発症する。これまでにこのモデル動物を用いた種々の免疫抑制剤やサイトカインが皮膚炎の病態に及ぼす影響が検証されており^{8~10)}、現在、疾患モデル動物として広く用いられている。

本研究では、大豆イソフラボンであるgenisteinのこれまで明らかにされていない機能性を見出す目的で、免疫機能との関係をアレルギーモデル動物であるNC/Ngaマウスを用いて検討を行った。

方 法

動 物

6週齢の雌NC/Ngaマウスを日本SLC（静岡）より購入した。動物は実験期間を通じSPF環境下で飼育を行った。

皮膚炎誘導および皮膚炎評価

SPF NC/Ngaマウスの胸部、および腹部に5%ピクリクロライド (PCI) を塗布し、その後、1週間間隔でオリーブオイルに溶解した1% PCIを耳部に塗布した。実験終了後、マウス耳部における皮膚炎を0（無症状）、1（軽度）、2（中程度）、および3（重度）の4段階に分類し、両耳のスコアの平均値を臨床症状として数値化した。

血清IgE濃度

マウス血清中のIgE濃度は、Mouse IgE Quantitation

Kit (BETHYL Lab., Inc. TX. USA) を用いて測定を行った。

リンパ球増殖反応

マウスより脾臓を摘出し、スライドガラスを用い細胞溶液を調整した。96ウエルプレートに、1ウエル当たり 2.5×10^5 個の細胞を加え、固相化抗マウスCD3モノクローナル抗体 (mAb) ($2 \mu\text{g/mL}$) および抗マウスCD28 mAb ($1 \mu\text{g/mL}$) による刺激を、37℃、5% CO₂環境下で48時間行った。培養終了12時間前に1ウエル当たり $0.5 \mu\text{Ci}$ の³H標識チミジン (3H-TdR) を加え、細胞に取り込まれた³H-TdR量をβカウンターにより測定を行った。

サイトカイン産生

リンパ球増殖反応の場合と同様に細胞溶液を調整したのち、24ウエルプレートに、 5×10^6 個/mLの濃度で固相化抗マウスCD3 mAb ($2 \mu\text{g/mL}$) および抗マウスCD28 mAb ($1 \mu\text{g/mL}$) による刺激を行った。培養終了後、培養上清を回収し培養上清に含まれるサイトカイン量をELISA法により測定した。

サイトカインELISA

抗マウスIFN- γ mAb (R4-6A2) または抗マウスIL-4 mAb (11B11) を50 mM carbonate buffer (pH 9.6) で $10 \mu\text{g/mL}$ に溶解した後、ELISAプレートに1ウエル当たり $100 \mu\text{L}$ 加え、4℃で一晩インキュベートした。1% BSAを含んだPBS溶液でウエルをブロッキングしたのち、標準サイトカインたん白質あるいは培養上清を $100 \mu\text{L}$ 加え室温にて2時間インキュベートし、その後、ビオチン標識抗マウスIFN- γ mAb (XMG1.2) またはビオチン標識抗マウスIL-4 mAb (BVD6-24G2) を室温で2時間反応させた。ウエルを洗浄後、ストレプトアビジン標識アルカリフォスファターゼを1時間反応させ、p-nitrophenylphosphateを加え発色を行い、マイクロプレートリーダーにて405 nmの吸光度を測定した。サイトカインの濃度は標準サイトカインたん白質を用いた標準曲線より算出した。

リンパ球サブセット解析

リンパ球 ($1 \sim 2 \times 10^6$ cells) を0.1%牛血清アルブミンを含んだPBS溶液 $100 \mu\text{L}$ に懸濁し、phycoerythrin (PE) 標識抗マウスCD4 mAbおよびFITC標識抗マウスCD8 mAb、またはPE標識抗マウスCD3 mAbおよびfluorescein isothiocyanate (FITC) 標識抗マウスB220 mAbを加え、氷中で30分間インキュベートし染色を行った。染色した細胞は、FACScaliberおよびCELL Quest (Becton Dickinson, CA, USA) を用いて解析を行った。

結 果

NC/Ngaマウスに一日当たりgenistein 0 mg/kg, 4 mg/kg, または20 mg/kgの経口投与を行った。それぞれの群のマウスに週1回, 10週間PCIを塗布し皮膚炎の誘導を行った。経時的に体重および摂食量の測定を行ったが、群間における有意な差は認められなかった。

次にPCIの連続塗布により誘導される皮膚炎に対するgenisteinの影響について検討を行った。NC/Ngaマウスに連続的にハプテンの塗布を行うと、コンベンショナル環境下で飼育した場合に発症する皮膚炎と類似した症状を呈することが報告されている¹⁰⁾。Genistein投与10週間後の皮膚症状をスコアリングし、比較検討したところgenisteinを4 mg/kg/day投与した群はコントロール群と比較して皮膚症状に差を認めなかったが、20 mg/kg/day投与群では皮膚症状の軽減傾向が認められた (Fig. 1および2)。NC/NgaマウスではPCIの連続塗布により皮膚炎を発症すると共に血清IgEレベルの上昇が認められる。そのため、PCI処置10週後の血清中のIgEレベルをELISA法を用いて測定を行った。すると、PCIの連続投与で血清IgEレベルの上昇が認められたが、genistein投与群と非投与群との間で有意な差は認められなかった (Fig. 3)。

上記の結果より、genisteinはPCI連続投与により発症する皮膚炎を軽減するもののIgEレベルに対しては影響を及ぼさないことが示された。このメカニズムについて検討を行うために、genisteinを投与したNC/Ngaマウスのリンパ球機能およびサブセットについて解析を行った。特異抗体を用いフローサイトメトリーによりリンパ球サブセットについて解析を行ったところ、genisteinの投与によりCD4、CD8およびCD3陽性細胞の割合の有意な減少、そしてB220陽性細胞

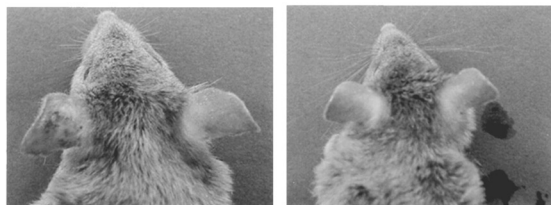


Fig. 1. Clinical skin features in NC/Nga mice administered with or without genistein. Skin features in NC/Nga mice received 0 mg/kg/day (left) and 20 mg/kg/day genistein (right) 10 weeks after PCI treatment.

の有意な増加が認められた (Fig. 4)。また、機能的な解析を行うため*in vitro*における増殖反応を測定したが、これに関してはgenistein投与群と非投与群との間で差を認めなかった (Fig. 5)。ヘルパーT細胞は産生するサイトカインパターンにより、Th1およびTh2型に分類することができる。Th1はIFN- γ やIL-2を産生し細胞性免疫を司るのに対し、Th2はIL-4、IL-5、IL-6などのサイトカインを産生し主として液性免疫に中

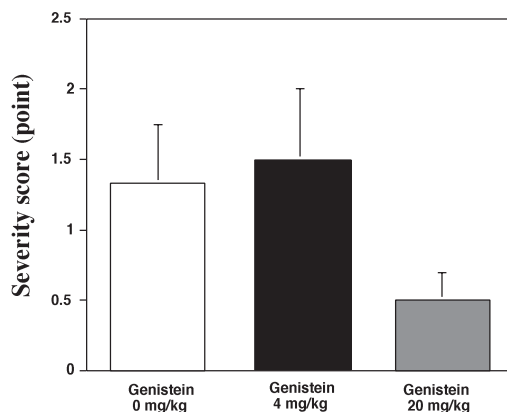


Fig. 2. Skin severity score in NC/Nga mice administered with or without genistein. Clinical severity score for dermatitis was defined as the individual score graded as 0 (none), 1 (mild), 2 (moderate) and 3 (severe) 10 weeks after PCI treatment. Data are mean $\pm$ SEM for 6 mice.

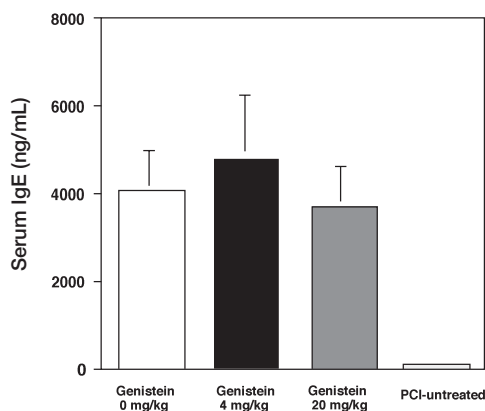


Fig. 3. Serum IgE levels in NC/Nga mice administered with or without genistein followed by PCI-treatment. Serum was obtained from each mouse and level of IgE was determined by ELISA as described in the Materials and Methods. The value represents mean $\pm$ SD.

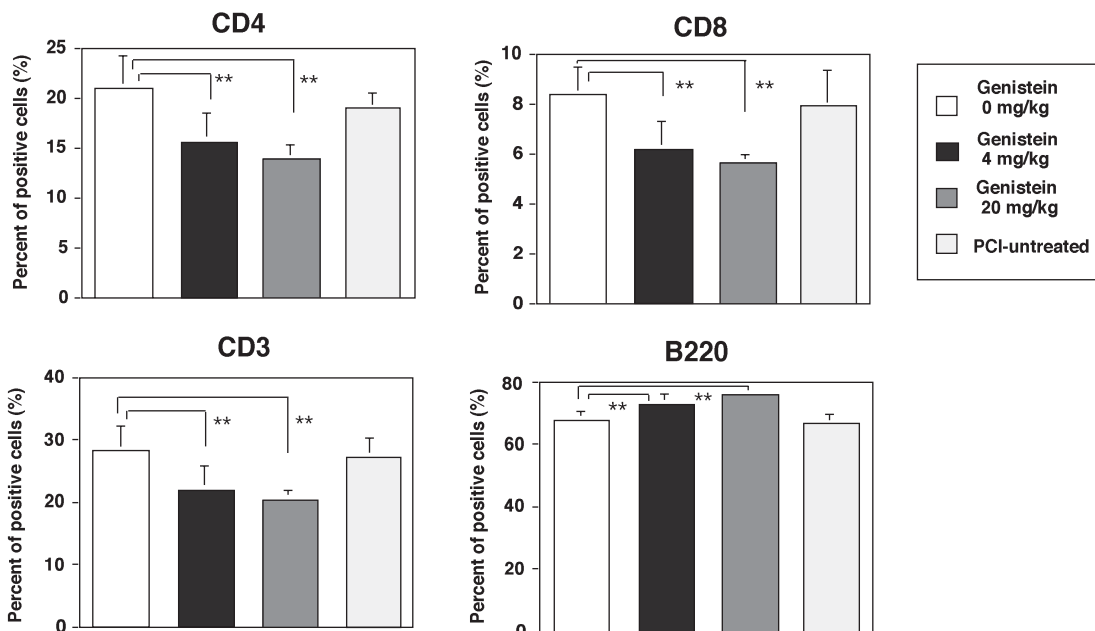


Fig. 4. Expression of CD4, CD8, CD3 and B220 in spleen cells from NC/Nga mice administered with or without genistein. Spleen cells were stained with PE-conjugated anti-CD4 mAb and FITC-conjugated anti-CD8 mAb, or PE-conjugated anti-CD3 mAb and FITC-conjugated anti-B220 mAb. Percentages of positive cells were quantified by using flowcytometry. The value represents mean $\pm$ SD.

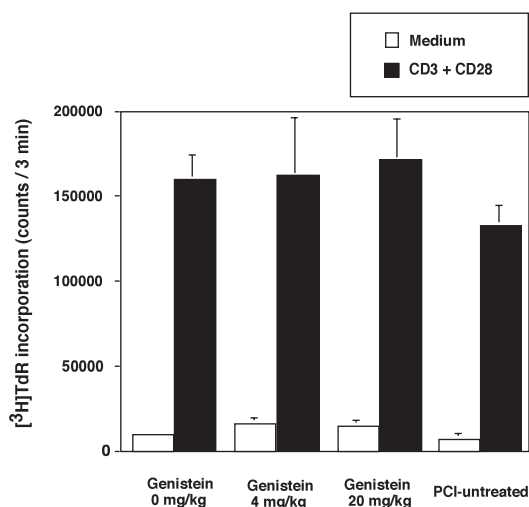


Fig. 5. Proliferation responses of splenocytes upon stimulation with anti-CD3/CD28 mAb in NC/Nga mice administered with or without genistein. Spleen cells were stimulated with plate-bound anti-CD3/CD28 mAb. After 48 hr incubation, DNA synthesis was determined by measuring incorporated ³H-TdR. The value represents mean $\pm$ SD.

心的な役割を果たす。これらTh1/Th2バランスの不均衡はアレルギー疾患や自己免疫疾患の発症あるいは病態と強く関係していることが多くの報告により示されている。PCI非処置群に比べコントロール群はIFN- γ およびIL-4の両者の産生量が増加しており、これは炎症反応を反映したものと推察される。これに対しgenistein投与群はコントロール群と比較しIFN- γ に関しては低下傾向そしてIL-4に関しては有意な低下を示した (Fig. 6)。このことより、genisteinによる皮膚炎症状の改善作用の一部はサイトカイン産生の抑制が関与しているものと思われる。

考 察

Genisteinの代表的な生理作用の一つとして抗腫瘍作用がある。その機構として腫瘍の増殖に関与するprotein tyrosine kinaseやtopoisomerase II等の酵素阻害が推測されている。しかしながら、genisteinの抗腫瘍効果は、先天的に胸腺を欠くT細胞欠損マウスでは認められないことから¹²⁾、*in vivo*レベルでは免疫機能を調節し、その結果として抗腫瘍作用を発揮していることが示唆されている。Guoらは、genisteinを投与し

たマウスにおいて、腫瘍の排除に関わる細胞群である細胞傷害性T細胞およびNK細胞活性が有意に上昇することを報告している¹³⁾。大豆イソフラボン的一种であるgenisteinの免疫機能に対する影響については腫瘍免疫との関連研究が多く、免疫制御機構およびアレルギー反応との関連は十分に解明されていない。

今回の我々の研究よりgenisteinはハプテン連続塗布により誘導される皮膚炎を軽減する作用を有していることが示された (Fig. 1および2)。Th2細胞が産生するIL-4はIgE抗体の誘導に関与する代表的なサイトカインである。そのためgenisteinによる皮膚炎改善作用の機序を解明する目的でT細胞からのサイトカイン産生を測定したところIL-4のみならずIFN- γ 産生を抑制することが明らかになった (Fig. 6)。一方、リンパ球増殖反応は抑制しないことから (Fig. 5), genisteinは特にサイトカイン産生に至るシグナル伝達系路に作用していることが推察される。サイトカインはアレルギー反応に重要な役割を演じているが、4 mg/kgと20 mg/kg genistein投与群で比較した場合、サイトカイン産生レベルが同程度にも関わらず、皮膚炎症状の程度が異なることから、サイトカイン産生の抑制はgenisteinによる病態制御に関わるが、そのみか原因ではないことを示している。これまで、NC/Ngaマウスの皮膚炎症状に関連する遺伝子と高IgE血症を引き起こす遺伝子は独立していることが遺伝学的な手法により明らかにされている¹⁴⁾。さらに、近年、IL-4レセプターを介したシグナル伝達系路に関わる転写因子の

一つであるsignal transducers and activators of transcription (STAT) 6欠損NC/Ngaマウスを用いた研究より、IL-4はNC/Ngaマウスにおける皮膚炎発症には直接的には関与していないことが報告されている¹⁵⁾。これらのことより、genisteinによる抗炎症作用はT細胞レベル以外に、アレルギー反応のエフェクター細胞である肥満細胞に対して作用している可能性があるが、この点に関しては現在解析中である。

Genisteinは女性ホルモンの一種である17 β -estradiolと構造が類似しているため、その生理作用は共通する面も多い。17 β -estradiolのリンパ球に対する影響として*in vitro*では、T細胞やB細胞に対する増殖抑制作用¹⁶⁾そしてIL-2産生およびIL-2レセプターの発現抑制が報告されている¹⁷⁾。一方、*in vivo*では17 β -estradiolの投与によりTh1細胞の分化誘導の亢進¹⁸⁾、IFN- γ 等のサイトカイン産生の増加が起こることが示されており¹⁹⁾、その作用は必ずしも*in vitro*と*in vivo*での実験系で一致した知見が得られていない。Genisteinの胸腺萎縮作用はエストロゲンレセプター依存性と非依存性の両者が存在していることが報告されており²⁰⁾、免疫細胞に対してはgenisteinとエストロゲンは必ずしも同様の作用を発揮しないことが推察される。今後は本実験で明らかとなったgenisteinの抗アレルギー作用の詳細なメカニズムの解明と共に他の免疫疾患モデルでも検討を行うことにより大豆製品の新たな免疫機能に関する三次機能を見いだせることと思われる。

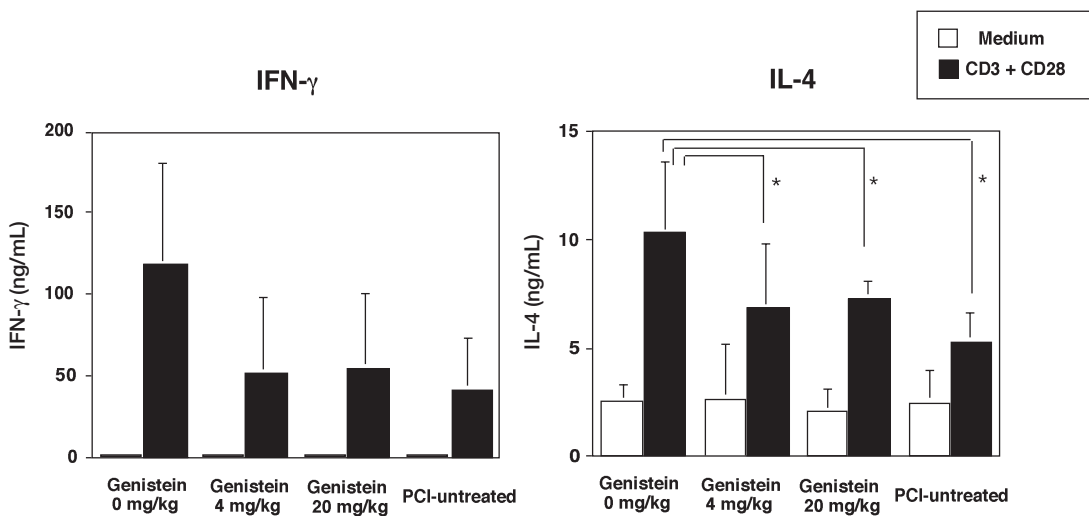


Fig. 6. Cytokine productions of splenocytes upon stimulation with anti-CD3/CD28 mAb in NC/Nga mice administered with or without genistein. Spleen cells were stimulated with plate-bound anti-CD3/CD28 mAb. After 48 hr, supernatants were removed and contents of IFN- γ and IL-4 were determined by ELISA. The value represents mean $\pm$ SD.

要 約

Genisteinは大豆製品に多く含まれるイソフラボン的一种である。本研究では、アトピー性皮膚炎発症モデル動物であるNC/Ngaマウスを用いてgenisteinが皮膚炎をはじめとするアレルギー反応に及ぼす影響について検討を行った。NC/Ngaマウスの耳部にピクリクロライドの連続塗布を行い皮膚炎を発症させ、それらのマウスに0 mg/kg/day, 4 mg/kg/day, 又は20 mg/kg/dayのgenisteinを10週間連続して経口投与を行った。ピクリクロライドにより誘導された皮膚炎は、4 mg/kg/day投与群ではコントロール群と比較して差を認めなかったが、20 mg/kg/dayの投与群で皮膚炎の改善が認められた。一方、血清IgEレベルおよびリンパ球増殖反応は3群間で有意な差は認められなかった。またサイトカイン産生においてはgenistein投与群でIFN- γ およびIL-4産生の抑制が認められた。以上の結果よりgenisteinは抗アレルギー作用を有することが明らかとなり、そのメカニズムの一部にはサイトカイン産生の抑制が関与していることが推察される。

文 献

- 1) Messina MJ, Persky V, Setchell KD and Barnes S (1994): Soy intake and cancer risk: a review of the *in vitro* and *in vivo* data. *Nutr Cancer*, **21**, 113-131.
- 2) Constantinou AI, Mehta RG and Vaughan A (1996): Inhibition of N-methyl-N-nitrosourea-induced mammary tumors in rats by the soybean isoflavones. *Anticancer Res*, **16**, 3293-3298.
- 3) Record IR, Broadbent JL, King RA, Drwosti IE, Head RJ and Tonkin AL (1997): Genistein inhibits growth of B16 melanoma cells *in vivo* and *in vitro* and promotes differentiation *in vitro*. *Int J Cancer* **72**, 860-864.
- 4) Lamartiniere CA, Murrill WB, Manzollillo PA, Zhang JX, Barnes S, Zhang X, Wei H and Brown NM (1998): Genistein alters the ontogeny of mammary gland development and protects against chemically-induced mammary cancer in rats. *Proc Soc Exp Biol Med*, **217**, 358-364.
- 5) Cotter A and Cashman KD (2003): Genistein appears to prevent early postmenopausal bone loss as effectively as hormone replacement therapy. *Nutr Reviews*, **61**, 346-351.
- 6) 坂井堅太郎「食物アレルギーの実態と食生活」(1999): 上田伸男編著「食物アレルギーがわかる本」日本評論社 東京
- 7) Matsuda H, Watanabe N, Geba GP, Sperl J, Tsudzuki M, Hiroi J, Matsumoto M, Ushio H, Saito S, Askenase PW and Ra C (1997): Development of atopic dermatitis-like skin lesion with IgE hyperproduction in NC/Nga mice. *Int Immunol*, **9**, 461-466.
- 8) Suzuki R, Shimizu T, Kudo T, Ohtsuka Y, Yamashiro Y and Oshida K (2002): Effects of n-3 polyunsaturated fatty acids on dermatitis in NC/Nga mice. *Prostaglandins, Leukot Essent Fatty Acids*, **66**, 435-440.
- 9) Sasakawa T, Higashi Y, Sakuma S, Hirayama Y, Sasakawa Y, Ohkubo Y and Mutoh S (2004): Topical application of FK506 (Tacrolimus) ointment inhibits mite antigen-induced dermatitis by local action in NC/Nga mice. *Int Arch Allergy Immunol*, **133**, 55-63.
- 10) Sakamoto T, Miyazaki E, Aramaki Y, Arima H, Takahashi M, Kato Y, Koga M and Tsuchiya S (2004): Improvement of dermatitis by iontophoretically delivered antisense oligonucleotides for interleukin-10 in NC/Nga mice. *Gene Ther*, **11**, 317-324.
- 11) 松田浩珍, 田中あかね (1998): アトピー性皮膚炎モデルとしてのNC/Ngaマウスの有効性 *CRJ Letters*, **11**, 1-8.
- 12) Santell SC, Kieu N and Helferich WG (2000): Genistein inhibits growth of estrogen-independent human breast cancer cells in culture but not in athymic mice. *J Nutr*, **130**, 1665-1669.
- 13) Guo TL, McCay JA, Zhang LX, Brown RD, You BL, Karrow NA, Germolec DR and White KL (2001): Genistein modulates immune responses and increases host resistance to B16F10 tumor in adult female B3C3F1 mice. *J Nutr*, **131**, 3251-3258.
- 14) Tsudzuki M, Watanabe N, Wada A, Nakane Y, Hiroi J and Matsuda H (1997): Genetic analyses for dermatitis and IgE hyperproduction in the

- NC/Nga mouse. *Immunogenetics*, **47**, 88-90.
- 15) Yagi R, Nagai H, Iigo Y, Akimoto t, Arai T and Kubo M (2002): Development of atopic dermatitis-like skin lesions in STAT6-deficient NC/Nga mice. *J Immunol*, **168**, 2020-2027.
 - 16) Sakazaki H, Ueno H and Nakamuro K (2002): Estrogen receptor a in mouse splenic lymphocytes: possible involvement in immunity. *Toxicol Lett*, **133**, 221-229.
 - 17) McMurray RW, Ndbele K, Hardy KJ and Jenkins JK (2001): 17- β -estradiol suppressed IL-2 and IL-2 receptor. *Cytokine*, **14**, 324-333.
 - 18) Maret A, Coudert JD, Garidou L, Foucras G, Gourdy P, Krust A, Dupont S, Chambon P, Druet P, Bayard F and Guery JC (2003): Estradiol enhances primary antigen-specific CD4 T cell responses and Th1 development *in vivo*: essential role of estrogen receptor a expression in hematopoietic cells. *Eur J Immunol*, **33**, 512-521.
 - 19) Karpuzoglu-Sahim E, Zhi-Jun Y, Lengi A, Sriranganathan N and Ahmed SA (2001): Effects of long-term estrogen treatment on IFN- γ , IL-2 and IL-4 gene expression and protein synthesis in spleen and thymus of normal C57BL/6 mice. *Cytokine*, **14**, 208-217.
 - 20) Yellayi S, Naaz A, Szewczykowski MA, Sato T, Woods JA, Chang J, Segre M, Allred CD, Helferich WG and Coole PS (2002): The phytoestrogen genistein induces thymic and immune changes: a human health concern? *Proc Natl Acad Sci USA*, **99**, 7616-7621.