

高親和性IgE受容体を標的とした抗アレルギー性大豆成分に関する研究

立花宏文*・矢野知美・山田耕路

九州大学大学院農学研究院

Study on Anti-Allergic Effects of Soybean Components on High Affinity IgE Receptor Expression

Hirofumi TACHIBANA*, Satomi YANO and Koji YAMADA

Faculty of Agriculture, Kyushu University Fukuoka 812-8581

ABSTRACT

Mast cells and basophils express the high affinity IgE receptor $Fc\epsilon RI$ on their cell surface, and the cross-linking of the allergen-specific IgE bound to $Fc\epsilon RI$ leads to the release of inflammatory mediators. In this study, we examined the effect of soybean components, isoflavones and equol on the cell surface expression of $Fc\epsilon RI$ in human basophilic KU812 cells. Genistein, daidzein and equol suppressed the cell surface expression of $Fc\epsilon RI$. Immunoblot analysis revealed that the total cellular expression of the $Fc\epsilon RI$ α chain was decreased upon treatment with these compounds. However, there were no effects of these compounds on mRNA levels of $Fc\epsilon RI$ α and γ chains. In our previous work, the reduction of extracellular signal-regulated kinase1/2 (ERK1/2) phosphorylation was involved in the downregulation of the $Fc\epsilon RI$ expression and it was found that (–)-epigallocatechin-3-O-gallate (EGCG) suppressed the receptor expression through the reduction of ERK1/2 phosphorylation levels. As opposed to EGCG, ERK1/2 phosphorylation level was not affected by the two isoflavones and equol. These results suggest that isoflavones and equol suppressed $Fc\epsilon RI$ expression through the mechanism that differs from EGCG action. *Soy Protein Research, Japan* **9**, 133-137, 2006.

Key words : isoflavone, equol, $Fc\epsilon RI$, basophils

Genisteinやdaidzeinなどの大豆イソフラボンは、大豆、特に大豆胚芽に多く含まれるフラボノイドの一種である。大豆イソフラボンは抗がん作用、骨粗鬆症予

防作用などが見出されており、生体機能調節作用が期待されている食品成分の一つである¹⁻³⁾。大豆イソフラボン配糖体は大腸で加水分解を受け、genisteinやdaidzein等のアグリコンが生成される。さらに、腸内細菌の作用によりdaidzeinからequolが産生し、この

*〒812-8581 福岡市東区箱崎6-10-1

equolによる作用が大豆イソフラボンの生理作用の一部を担うとされている。

近年、増加の著しい花粉症に代表されるようなI型アレルギー反応には、IgE型抗体の過剰産生とそれに続く高親和性IgE受容体FcεRIの活性化を介したマスト細胞や好塩基球からの炎症物質の遊離が大きく関与している。つまり、IgE産生やFcεRI発現を抑制することは、アレルギー反応の予防・軽減化が期待できる。アレルギー治療は長期にわたるため、日常摂取する食品から抗アレルギー成分を見出すことはアレルギー軽減化に大きく貢献するものと考えられる。そこで本研究では、大豆イソフラボンを含む豆腐、味噌、納豆といった大豆食品が日常的に摂取されていることを踏まえ、大豆イソフラボンであるgenistein, daidzeinおよびその代謝産物であるequolのFcεRI発現調節作用について検討した。

方 法

細胞培養と試薬

ヒト好塩基球様細胞株KU812は、10%ウシ胎児血清(FCS)を含むRPMI 1640培地で37℃、5%炭酸ガス加湿下で継代・維持した。Genisteinおよびdaidzeinは、東京化成工業株式会社より、equolはLC Laboratoriesより購入し、dimethylsulfoxide (DMSO)に溶解した。タイロッド緩衝液(pH 7.4)は137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 1.0 mM MgCl₂, 12 mM NaHCO₃, 0.4 mM NaH₂PO₄となるように調製した。カルシウムイオノフォアA23187は、Sigmaより購入した。

高親和性IgE受容体FcεRI発現の測定

KU812細胞(3.5×10⁵ cells/mL)を0, 5, 10, 25 μMのgenistein, daidzeinまたはequolを添加した5% FCS含有RPMI 1640培地で24時間培養した。培養後、細胞を回収し、抗FcεRIα鎖抗体を用いたフローサイトメトリ解析により細胞表面上に発現するFcεRIを測定した。

FcεRIたん白質発現レベルに対するイソフラボンまたはequolの作用については、イムノプロット解析により検討を行った。KU812細胞を25 μM genistein, daidzein, equolもしくはその溶媒であるDMSOを添加した5% FCS含有RPMI 1640培地で24時間培養を行った後、細胞溶解液をSDS-PAGEに供し、抗FcεRIα, γ鎖抗体を用いてFcεRIα, γ鎖を検出した。

FcεRIの構成鎖mRNA発現レベルに対するイソフラボンまたはequolの作用については、RT-PCRおよびサザンハイブリダイゼーションにより検討した。

ERK1/2リン酸化の検出

KU812細胞を25 μM genistein, daidzein, equolもしくはその溶媒であるDMSOを添加した5% FCS含有RPMI 1640培地で6時間もしくは24時間培養を行った後、細胞溶解液をSDS-PAGEに供し、抗ERK1/2リン酸化抗体を用いてリン酸化ERK1/2を検出した。

ヒスタミン放出量の測定

KU812細胞(5×10⁵ cells/mL)を25 μM genistein, daidzein, equolもしくはその溶媒であるDMSO添加タイロッド緩衝液(1 mM CaCl₂を再添加)で37℃、20分間インキュベートし、さらに5 μM A23187を加えて37℃、20分間インキュベートした。インキュベート後、水中で5分間放置し、上清および超音波破碎物の上清中に含まれるヒスタミン量を蛍光法により測定した。ヒスタミン放出量は、細胞中の総ヒスタミン量からA23187を加えていないときの放出量を差し引いたものを100%としたときの相対放出量として表した。

結果と考察

高親和性IgE受容体FcεRI発現に及ぼす大豆イソフラボンおよびequolの影響

ヒト好塩基球様細胞株KU812のFcεRI細胞表面発現に対するgenistein, daidzein, equolの効果をフローサイトメトリ解析により検討した。その結果、genisteinおよびdaidzeinは10 μM, equolは5 μM以上の濃度でFcεRI発現を抑制し、その低下効果は、equolの方がイソフラボンのgenisteinやdaidzeinよりも強いことが示された(Fig. 1)。そこで、FcεRIを構成するαおよびγ鎖のたん白質発現レベルに対するこれらイソフラボンおよびequolの効果を検討したところ、γ鎖の発現レベルには影響はないものの、いずれもα鎖のたん白質発現レベルを減少させることが示された(Fig. 2)。一方、αおよびγ鎖両鎖のmRNA発現レベルに対しては、これらイソフラボンおよびequolによる著しい低下効果は認められなかった(Fig. 3)。これらの結果から、大豆イソフラボンおよびequolはFcεRIα鎖のたん白質発現レベルを低下させることでFcεRI発現を抑制することが示唆された。

ERK1/2リン酸化に及ぼす大豆イソフラボンおよびequolの影響

これまでの研究により、MAPキナーゼの一つであるextracellular-signal regulated kinase 1/2 (ERK1/2)がFcεRIの発現を正に制御していること、また、緑茶カテキンの一種であるepigallocatechin-3-O-gallate (EGCG)がERK1/2のリン酸化レベルの低下作用(活

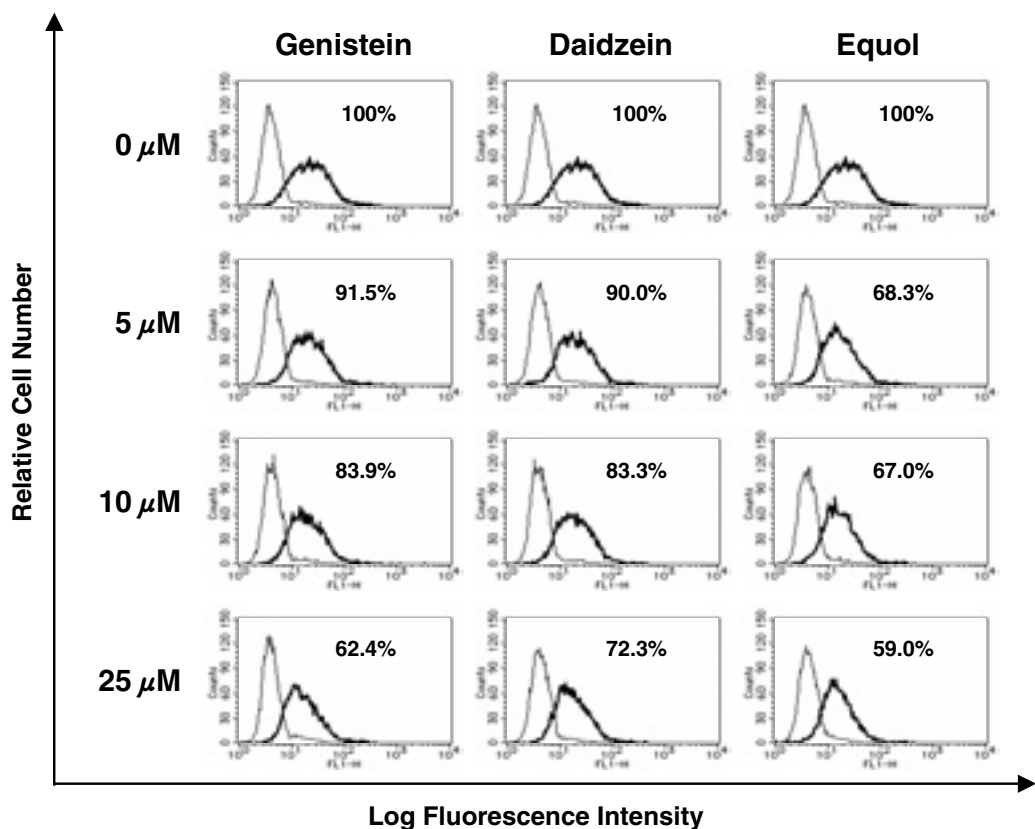


Fig. 1. Effect of isoflavones and equol on the cell surface expression of Fc ϵ RI. KU812 cells were cultured with genistein, daidzein or equol for 24 h in 5% FCS-RPMI 1640 medium. Cells were examined by immunolabeling using the anti-Fc ϵ RI α chain antibody followed by staining with the FITC-conjugated goat anti-mouse IgG antibody. Mouse IgG2b antibody was used as the isotype-matched negative control. Data acquisition was performed on a FACSCalibur flow cytometer.

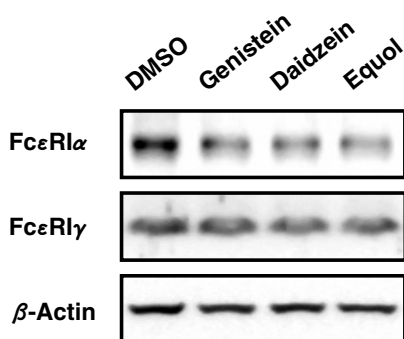


Fig. 2. Immunoblot (IB) analysis of the expression of the cellular Fc ϵ RI α and γ chain proteins in KU812 cells treated with equol, genistein or daidzein. Cells were treated with isoflavones or equol (25 μ M) in 5% FCS-RPMI 1640 medium for 24 h. Cell lysates were fractionated by 10% or 15% SDS-PAGE, and then immunoblotted using the anti-Fc ϵ RI α or anti-Fc ϵ RI γ chain antibody.

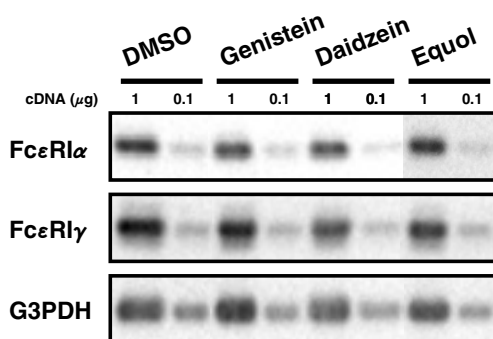


Fig. 3. Analysis of the mRNA level for Fc ϵ RI α and γ chains. KU812 cells were cultured in the presence of isoflavones or equol (25 μ M) for 24 h in 5% FCS-RPMI 1640 medium. After total mRNA isolation from KU812 cells was performed, Fc ϵ RI α , γ and G3PDH mRNA was analyzed by RT-PCR. Southern blotting using specific probes for Fc ϵ RI α , γ and G3PDH was performed to assess the PCR products.

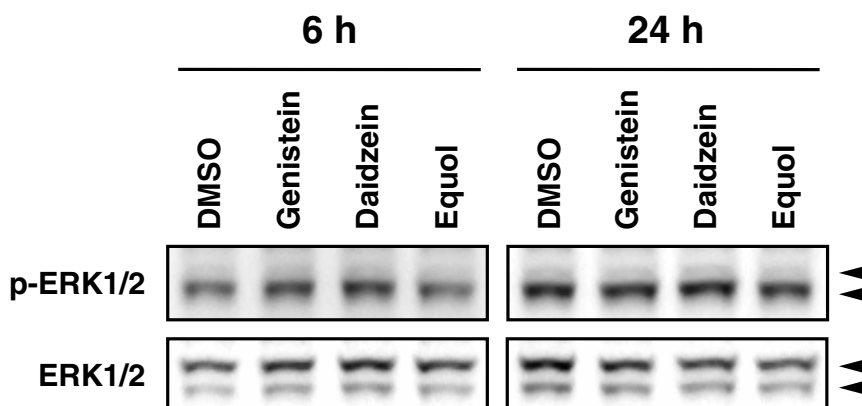


Fig. 4. Effects of isoflavones or equol on ERK1/2 phosphorylation in KU812 cells. KU812 cells were cultured in the presence of 25 μ M of genistein, daidzein or equol for 6 and 24 h under 5% FCS-RPMI 1640 medium. The cell lysates were prepared and subjected to 10% SDS-PAGE. Phosphorylated ERK1/2 was detected by immunoblotting using the anti-phospho-ERK1/2 or anti-ERK1/2 antibody.

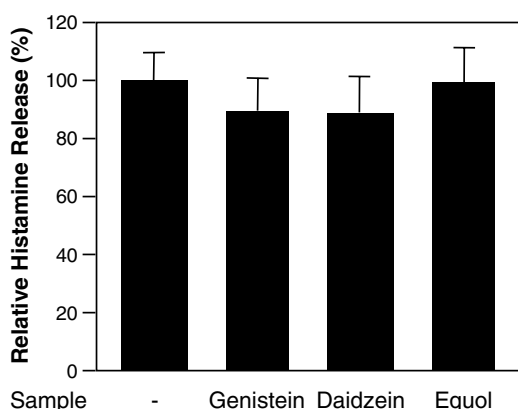


Fig. 5. Effects of flavonoid compounds on histamine release from KU812 cells. After KU812 cells were pre-incubated with isoflavones or equol (25 μ M) for 20 min, cells were stimulated with A23187 (5 μ M) for 20 min at 37°C. The amount of histamine in the supernatant was measured by a fluorometric assay. The percentage histamine release was calculated as follows: histamine release (%) = (test-negative control)/(total-negative control) $\times$ 100. Supernatant from unstimulated cells was used as the negative control.

性低下)を介して、Fc ϵ RIの発現を抑制することを明らかにしている⁴⁾。そこで、ERK1/2リン酸化に対するgenistein, daidzeinおよびequolの影響について検討したところ、いずれもリン酸化低下作用は観察されなかった (Fig. 4)。この結果から、大豆イソフラボンおよびequolはEGCGとは異なった作用機構でFc ϵ RI発現を抑制することが示唆された。

ヒスタミン放出に及ぼす大豆イソフラボンとequolの影響

カルシウムイオノフォアA23187誘導性のヒスタミン放出量に与える大豆イソフラボンおよびequolの影響を検討したが、ヒスタミン放出量に差は見られなかった (Fig. 5)。これらの結果から、大豆イソフラボンおよびequolがFc ϵ RI発現を抑制する一方で、細胞内カルシウム濃度上昇に伴うヒスタミン放出には影響を与えないことが示唆された。

要 約

アトピー性皮膚炎をはじめ、アレルギー性鼻炎、気管支喘息などのアレルギー反応は免疫グロブリンE (IgE) を介した高親和性IgE受容体Fc ϵ RIの活性化が関与している。つまり、その発現を抑制する食品成分にはFc ϵ RI活性化により誘導されるアレルギー反応の予防・軽減化作用が期待される。そこで、多彩な生理作用が報告されている大豆イソフラボンとその代謝産物equolに着目し、

ヒト好塩基球におけるFcεRI発現に対する作用を検討した。その結果, genistein, daidzeinおよびequolはいずれもヒト好塩基球様細胞株KU812のFcεRI発現を抑制した。また, これら大豆イソフラボンおよびequolは, FcεRIの構成サブユニットであり, 細胞表面への発現に必須であるFcεRIαおよびγ鎖のmRNA発現レベルには影響を与えないものの, α鎖のたん白質発現レベルを顕著に低下させた。Epigallocatechin-3-O-gallate (EGCG) はFcεRI発現を正に制御しているextracellular-signal regulated kinase 1/2 (ERK1/2) の活性を低下させることで, FcεRI発現を低下させるが, 大豆イソフラボンはERK1/2の活性を低下させなかった。以上の結果より, 大豆イソフラボンおよびequolはFcεRI発現を抑制することで抗アレルギー作用を発現する可能性が明らかになるとともに, その作用機構はEGCGとは異なることが示唆された。

文 献

- 1) Stephen B (1995): Effect of genistein on *in vitro* and *in vivo* models of cancer. *J Nutr*, **125**, 777S-783S.
- 2) 森田恭子, 濱松由子, 木戸慎介, 竹谷 豊, 宮本賢一, 武田英二 (1999): 大豆由来イソフラボンによる骨代謝調節機序. 大豆たん白質研究, **2**, 76-82.
- 3) 松崎 茂, 佐賀 烈, 市村 薫 (1999): 大豆に含まれる骨粗鬆症の予防に有効な成分についての研究. 大豆たん白質研究, **2**, 83-87.
- 4) Fujimura Y, Tachibana H and Yamada K (2004): Lipid raft-associated catechin suppresses the FcεRI expression by inhibiting phosphorylation of the extracellular signal-regulated kinase1/2. *FEBS Lett*, **556**, 204-210.