大豆イソフラボン成分の免疫調節作用に関する研究

酒井　徹*・中本真理子・府録咲奈・廣田優子・首藤恵美

徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部

Effect of Soy Isoflavones on the Antigen-specific Immune Responses in Mice

Tohru SAKAI, Mariko NAKAMOTO, Sakina FUROKU,
Yuko HIROTA and Emi SHUTO

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

ABSTRACT

The soy isoflavone is a phytoestrogen found in high levels in soy products that has been associated with decreased incidences of breast and prostate cancers. In this study, we examined effect of daidzein and equol on the antigen-specific immune responses in ovalbumin (OVA)-immunized BALB/c mice. Groups of mice were exposed to the vehicle, daidzein or equol by gavage. The doses of soy isoflavones used were 4 and 20 mg/kg body/d. OVA–specific proliferative responses, IFN-γ and IL-4 productions were compared to those in control mice. OVA-specific IgE productions were increased in 20 mg/kg equol administered mice. IL-13 production in mice administered with 20 mg/kg equol was significantly increased. Therefore, the mechanism for the elevation of the level of IgE by equol is responsible for the increment of IL-13 production by T cells. *Soy Protein Research, Japan* **12**, 142-148, 2009.

Key words : soy isoflavone, daidzein, equol, mice, IL-13

大豆は良質なたん白質および脂質に富み，日本人の食生活を代表する食品である[1]．多くの疫学的研究，*in vivo*および*in vitro*での研究から大豆イソフラボンは乳がん，前立腺がんの発症抑制[2, 3]，骨粗鬆症予防および更年期障害の緩和[4] などに効果があるとされている．疫学的な例としては，日本をはじめとするアジアの国々は欧米諸国と比較して大豆製品を多く摂取し，乳がんや前立腺がんの発症率および死亡率が低いことが明らかになっている[2), 5, 6]．大豆イソフラボンには，ゲニステイン，ダイゼイン，グリシテインの３種類のアグリコンとそれぞれの配糖体およびそれらのマロニル化配糖体，アセチル化配糖体の12種類がある[7]．大豆イソフラボンは食品中では配糖体として存在しているものが多いが，腸内細菌によってアグリコンに代謝

*〒770-8503　徳島市蔵本町3-18-15

され吸収される[8]．大豆イソフラボンはステロイド骨格を有さないが，立体的に構造がエストロゲンの一種である17β-estradiol（E_2）に類似していることからエストロゲンレセプター（ER）に親和性を示し，その結果エストロゲン様作用もしくは抗エストロゲン作用を示すと考えられ[9]，フィトエストロゲン（植物エストロゲン）とも呼ばれている．

ゲニステインおよびその誘導体は大豆中の含有量が高く，エストロゲン様活性やその他の生理機能も強い．ゲニステインの免疫機能への影響は，細胞性免疫[10～12]および液性免疫[10), 13, 14)]の両者で報告されている．また，抗炎症作用[14]，卵巣摘出マウスにおける胸腺萎縮[13]なども報告されている．しかしながら，エクオールやダイゼインといった他の大豆イソフラボンが免疫機能に及ぼす影響については不明な点が多い．そこで本研究ではエクオールおよびダイゼインが抗原特異的T細胞およびB細胞応答に及ぼす影響およびその機序の検討を行った．

方　　法

実験デザイン

７週齢の雌BALB/cマウスを，０（コントロール），４および20 mg/kg/dayダイゼインまたはエクオール投与群に分け，５日間予備飼育した．その後35日間連続的に，０，４および20 mg/kg/dayとなるように調製したダイゼインまたはエクオール溶液0.2 mLを，ゾンデにて１日１回経口的に強制投与を行った．イソフラボン投与開始日を０日として，７日および21日に卵白アルブミン（OVA）による免疫を施した．

リンパ球増殖反応

OVAを牛胎仔血清入りRPMI-1640培地で400 μg/mLに調整し，96-wellプレートに100 μLずつ加えた．これに１ウェルにつき5×10^6 cells/mLに調整した細胞浮遊液を100 μL加えた．抗マウスCD3刺激の場合は，プレートに抗マウスCD3 mAb（2 μg/mL）を固相化し細胞を加えた．それらを5% CO_2，37℃の条件下で72時間培養し，培養終了の20時間前に[^{3}H]Thymidine deoxyribose（[^{3}H]TdR）（1 μCi/10 μL）を入れた．培養終了後，細胞培養液をセルハーベスター（Packard Instrument Co.Inc.）を用いてガラスフィルター上に吸着させ，DNAに取り込まれた[^{3}H]TdRの放射活性をマトリックスベータカウンター（Packard Instrument Co.Inc.）で測定した．

IFN-γ，IL-4およびIL-13産生

牛胎仔血清入りRPMI-1640培地で400 μg/mLに調整したOVA溶液250 μLに1×10^7 cells/mLに調整した細胞浮遊液250 μLを加え，24-wellプレートにて３日間培養を行った．抗マウスCD3 mAbによる刺激では，まずPBSにて2 μg/mLに調整した抗マウスCD3 mAbを300 μLずつ24-wellプレートに入れ，４℃で一晩インキュベートし固相化を行い，OVA刺激の場合と同様に細胞を加えた．それらを5% CO_2，37℃の条件下で72時間培養を行い，培養終了後，培養上清を回収し，Mouse IFN-γ，IL-4およびIL-13 ELISA kit（eBioscience）を用いてそれぞれのサイトカイン産生量を測定した．

抗原特異的抗体産生

OVAをcoating bufferにて10 μg/mLに調整し，ELISAプレートに100 μL/well入れ，４℃で一晩インキュベートした．各ウェルを0.05% Tween 20を含んだPBS溶液（PBS-T）で３回洗浄し，1% BSAを含むPBS-Tを200 μL/well入れ，室温で２時間静置し，ブロッキングを行った．３回洗浄した後，PBS-Tで段階希釈した血清100 μLをそれぞれウェルに入れ，室温で２時間静置した．各ウェルを３回洗浄した後，1% BSAを含むPBS-Tで1,000倍希釈したアルカリフォスファターゼ（AP）標識抗マウスIgG1，IgG2a又はIgGを100 μL/well加え，室温で２時間静置した．IgE測定では，1% BSAを含むPBS-Tで1,000倍希釈したビオチン標識抗マウスIgE（Becton Dickinson Co.）を100 μL/well加え，室温で１時間静置した後，各ウェルを３回洗浄し，1% BSAを含むPBS-Tで3,000倍希釈したストレプトアビジン標識APを100 μL/well加え１時間室温で静置した．各ウェルを５回洗浄し，*p*-nitrophenyl phosphate（SIGMA）を10%ジエタノールアミンバッファーに溶解した溶液（1 mg/mL）を100 μL/well加えて発色させた．その後100 μLの3 N NaOHで反応を止め，405 nmの波長にて吸光度を測定した．

統計処理

データは全て平均値±標準偏差で示した．有意水準の検定は，一元配置分散分析を行い，有意水準5%で有意差が認められたものに対してScheffe testを行った．検定はすべてStatView Version 5.0（SAS Institute Inc.）を用いて行った．

結　　果

脾臓重量対するダイゼインおよびエクオールの影響

ダイゼインおよびエクオール投与マウスにおける臓器重量の測定を行った．体重に関しては，イソフラボン投与群と非投与群との間に有意な差を認めず，また，

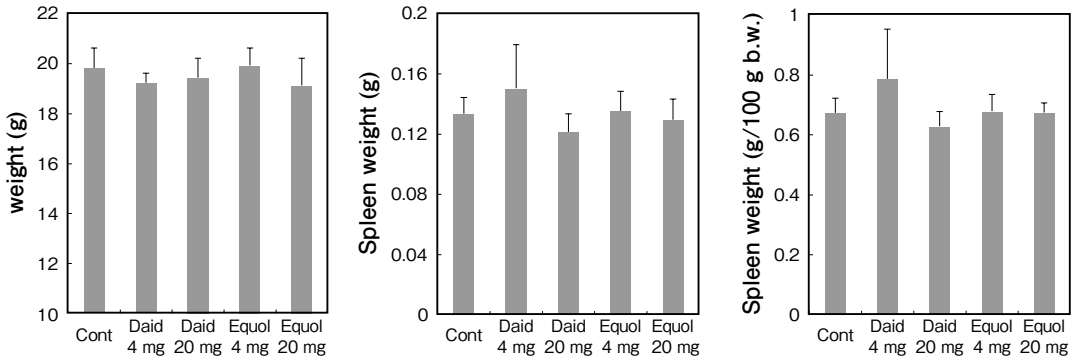

Fig. 1. Body and sleen weight in BALB/c mice administered with daidzein or equol. The values are means ± SD.

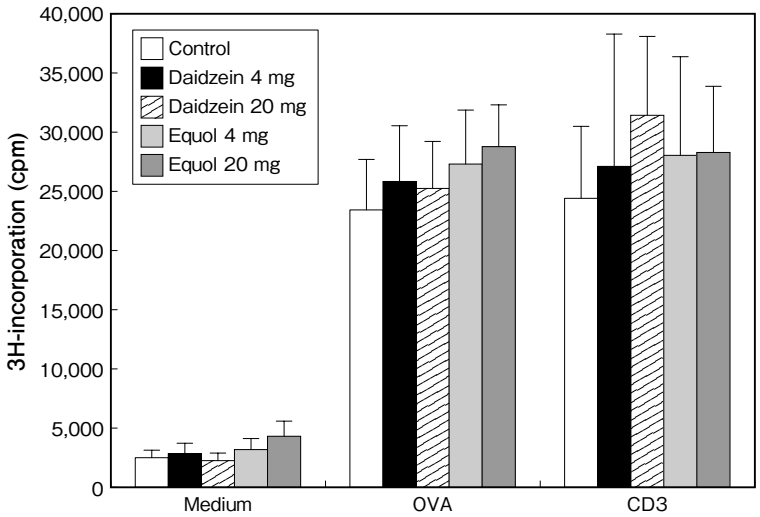

Fig. 2. Proliferation responses of splenocytes upon stimulation with OVA in BALB/c mice administered with daidzein or equol. Spleen cells were stimulated with OVA or plate-bound anti-CD3 mAb. After 72 hr incubation, DNA synthesis was determined by measuring incorporated ^{3}H-TdR. The values are means ± SD.

脾臓重量および体重100 g当たりの脾臓重量についても統計的に有意な差を認めなかった（Fig. 1）.

抗原特異的T細胞応答に対するダイゼインおよびエクオールの影響

OVA特異的なT細胞応答を観察すると，統計的な有意差は認められないものの，エクオール投与群で量依存的にリンパ球増殖反応が高くなる傾向が認められた．一方，抗CD3 mAbで刺激を行い，T細胞応答を観察した場合，エクオールの投与による増殖反応の増強は認められなかった（Fig. 2）．OVA特異的なT細胞によるサイトカイン産生を測定したところ，１型ヘルパー T細胞が産生するIFN-γ，２型ヘルパー T細胞が産生するIL-4の両者において，大豆イソフラボン投与群と非投与群との間に差を認められなかった（Fig. 3）.

抗原特異的抗体産生に対するダイゼインおよびエクオールの影響

抗原特異的B細胞応答に対する影響を検討するために，OVA特異的IgG，IgG1，IgG2aおよびIgE抗体を測定した．OVA特異的IgG，IgG1，IgG2aに関しては，コントロール群，ダイゼイン投与群およびエクオール投与群の間で有意な差を認めなかった．しかしながら，OVA特異的IgE抗体は，20 mg/kgエクオール投与マウスで有意に高値を示した（Fig. 4）.

IL-13産生に対するダイゼインおよびエクオールの影響

20 mg/kgのエクオール投与を行ったマウスでは，抗原特異的IgE抗体レベルの上昇が認められた（Fig. 4）.

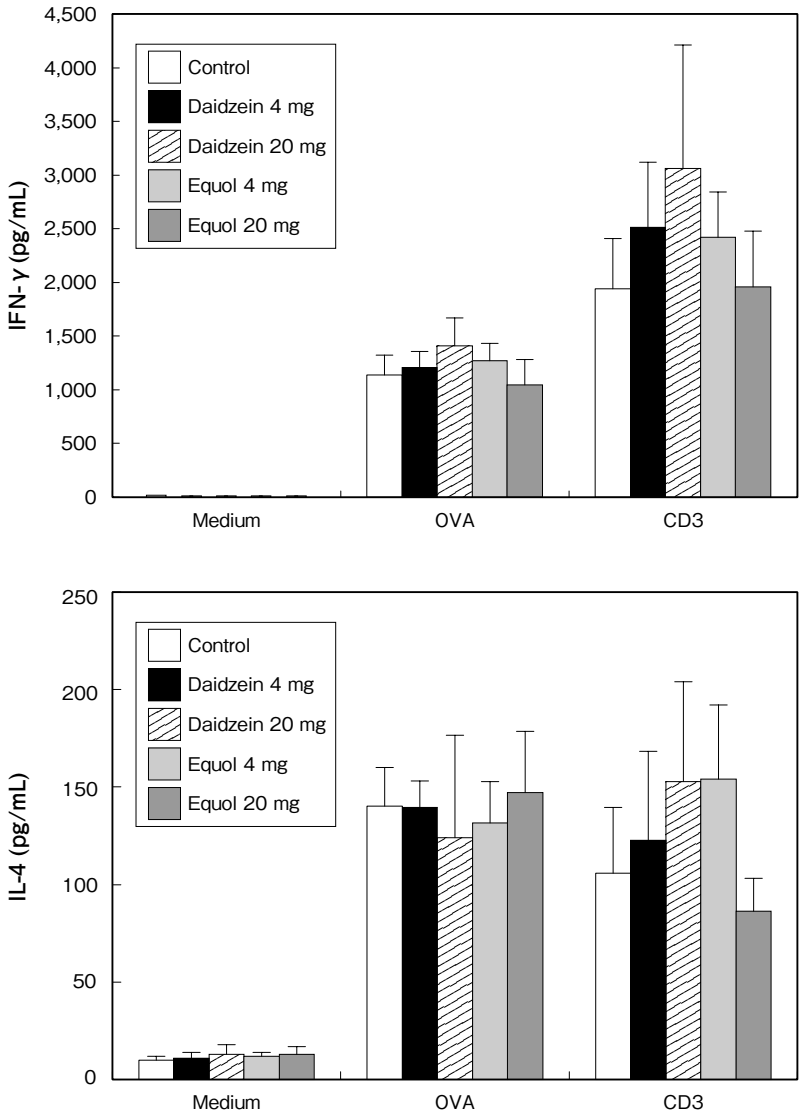

Fig. 3. Cytokine productions from splenocytes in BALB/c mice administered with daidzein or equol. Spleen cells were stimulated with OVA or plate-bound anti-CD3 mAb. After 72 hr, supernatants were collected and contents of IFN-γ and IL-4 were determined by ELISA as described in the Materials and Methods. The values are means ± SD.

IL-4は，IgE産生を誘導するサイトカインであるが，OVA特異的IL-4産生量は，20 mg/kgのエクオール投与群とコントロール群で差を認めなかった（Fig. 3）．そのため，IL-4以外にIgEのクラススイッチに関わるサイトカインであるIL-13についてELISA法を用いて測定を行った．20 mg/kgのエクオール投与を行ったマウスでは，OVA特異的IL-13産生がコントロールマウスに比べ統計的に有意に上昇していた（Fig. 5）．

考　　察

大豆イソフラボンと免疫機能に関する研究は，これまでゲニステインを中心として行われてきている．Yellayiらは，ゲニステインの皮下投与を行ったスカシガイヘモシアニン（KLH）免疫マウスにおいて，KLH特異的IgG産生が低下したことを報告している[13]．

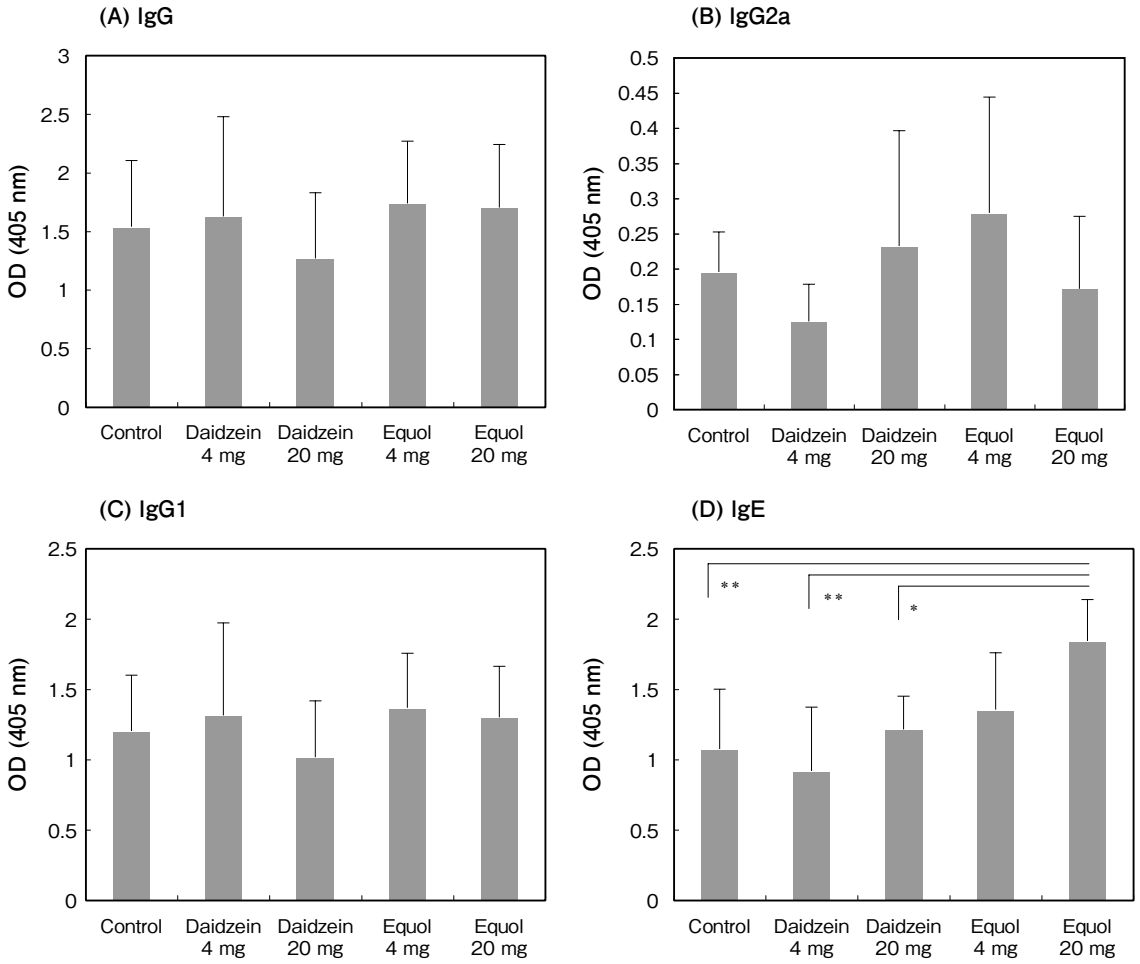

Fig. 4. OVA-specific antibody productions in BALB/c mice administered with daidzein or equol. Serum were obtained from each mouse and levels of OVA-specific IgG (A), IgG2a (B), IgG1 (C) and IgE (D) were determined by ELISA as described in the Materials and Methods. The values are means ± SD. $^{*}p<0.05$ and $^{**}p<0.01$ compared with the control.

また，２型コラーゲンを免疫し関節炎を誘導したマウスにゲニステインを投与すると，誘導される関節炎の軽減および２型コラーゲンに対する自己抗体レベルが低下する[14]という報告もある．我々も，ゲニステインの免疫調節作用について検討を行い，抗原特異的T細胞の誘導抑制[15]，T細胞からのサイトカイン産生の増強[16]，抗炎症作用[17]があることを明らかにしてきた．一方，ゲニステイン以外の大豆イソフラボンが免疫機能に及ぼす影響に関する研究は数が少なく，またそのメカニズムについての報告は皆無である．そのため，本研究では，ダイゼインおよびエクオールが抗原特異的免疫誘導に与える影響について検討を行った．

OVA免疫BALB/cマウスに，ダイゼインおよびエクオールの投与を行い，OVA特異的T細胞機能を解析した結果，OVA特異的リンパ球増殖反応およびIFN-γ/IL-4産生に対しては，これら大豆イソフラボンは影響しないことが明らかとなった（Fig. 2およびFig. 3）．20 mg/kgゲニステイン投与マウスでは，OVA特異的リンパ球増殖反応やサイトカイン産生が著しく低下することから[15]，これらイソフラボンは構造的に類似しているものの免疫細胞に対する作用は異なることが示された．ゲニステインは，チロシンキナーゼやトポイソメラーゼII阻害活性を有することが知られており，免疫誘導抑制はこれら酵素阻害作用が関与しているものと思われる．

抗原特異的B細胞応答に対する影響を検討するために，OVA特異的IgG，IgG1，IgG2aおよびIgE抗体を測定した．するとOVA特異的IgE抗体が，20 mg/kg

エクオール投与マウスで有意に高値を示した（Fig. 4）．IgE抗体は，Th2細胞から産生されるサイトカインにより産生が増強することが知られている．まずTh/Th2分化誘導を観察する目的で，IFN-γ/IL-4産生を測定したが，エクオール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）．*In vitro*においてエクオールがIL-4産生を増強させる報告があり，そのメカニズムは転写因子であるAP-1のDNA結合能の上昇であった[18]．我々は，OVA特異的T細胞レセプター遺伝子導入マウスであるDO11.10マウスの脾細胞を*in vitro*においてOVAで刺激を行い，そこにエクオールを添加しIL-4の産生を測定したが，IL-4産生の増加は認められなかった（data not shown）．エクオールのIL-4産生増強作用を示した研究では，T細胞株であるEL-4細胞をPMAで刺激した非生理的実験系で行っており，これらの差異がIL-4産生に及ぼす結果が異なったことと関連していると思われる．IL-4産生において，エクオール投与で差を認めなかったため，IgEクラススイッチに関するサイトカインであるIL-13について検討を行ったところ，20 mg/kgエクオール投与群はコントロール群に比べ有意に高い産生が認められた（Fig. 5）．IgG1抗体は，IgE抗体と同様，Th2細胞により産生が高まる抗体サブクラスである．今回の我々の結果では，エクオールは，抗原特異的IgE抗体産生は高めるが，抗原特異的IgG1抗体の産生は高めなかった．IL-13遺伝子欠損マウスでは，抗原特異的IgE抗体レベルの著しい低下が認められるが，IgG1抗体には影響が認められないことが報告されている[19]．そのため，エクオール投与で抗原特異的IgE抗体レベルの上昇が認められたのは，IL-13依存性のメカニズムであることが示唆された．

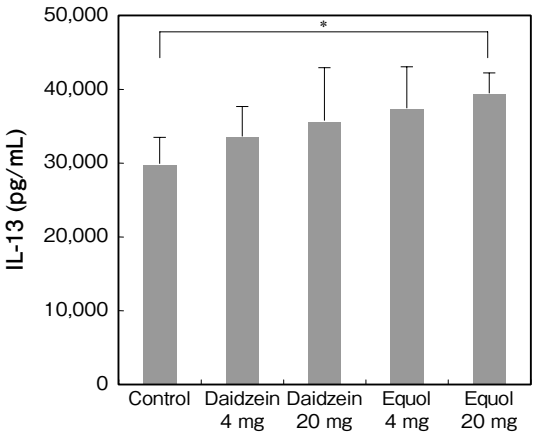

Fig. 5. IL-13 productions from splenocytes in BALB/c mice administered with daidzein or equol. Spleen cells were stimulated with OVA or plate-bound anti-CD3 mAb. After 72 hr, supernatants were collected and contents of IL-13 were determined by ELISA as described in the Materials and Methods. The values are means ± SD. $^{*}p<0.05$ compared with the control.

要　　約

大豆イソフラボンはこれまでの研究で，骨粗鬆症，心血管疾患および悪性腫瘍の発症を抑制する作用があることが明らかになっている．また，免疫系に対する大豆イソフラボンの作用としては主としてゲニステインで解析が進められており，腫瘍増殖抑制，抗原特異的免疫応答の抑制，さらに抗アレルギー作用があることが動物モデルで証明されている．今回は，免疫に対する影響が解析されていないエクオールおよびダイゼインが免疫機能にどのように影響を及ぼすのか，卵白アルブミン（OVA）免疫マウスモデルを用い検討を行った．OVA特異的IgE抗体に関しては，エクオール投与群はコントロール群に比べ高値を示し，統計的にも有意な差が観察された．また，IgE産生を司るサイトカインであるIL-13産生もエクオール投与群で高値を示した．これまでの報告で，ゲニステインは抗原特異的抗体産生および増殖反応を抑制することが報告されている．今回の結果よりエクオールは抗原特異的IgE抗体産生を上昇させる作用を有することが明らかとなり，ゲニステインとは異なる免疫調節作用があることが示された．

文　　献

1）山内文男，大久保一良（1992）大豆の科学．朝倉書店，東京．

2）Barnes S (1998): Evolution of the health benefits of soy isoflavones. *Proc Soc Exp Biol Med*, **217**, 386-392.

3）Hoffman R (1995): Potent inhibition of breast cancer cell lines by the isoflavonoid kievitone: comparison with genistein. *Biochem Biophys Res Commun*, **211**, 600-606.

4）Suthar AC, Banavalikar MM and Biyani MK (2001): Pharmacological activities of Genistein, an isoflavone from soy (Glycine max): part II-anti-cholesterol activity, effects on osteoporosis & menopausal symptoms. *Indian J Exp Biol*, **39**, 520-525.

5）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.

6）Adlercreutz H (1990): Western diet and Western diseases: some hormonal and biochemical mechanisms and associations. *Scand J Clin Lab Invest Suppl*, **201**, 3-23.

7）家森幸男，太田静行，渡邊　昌（2001）：大豆イソフラボン．幸書房，東京．

8）Davenport H (1982): Physiology of the digestive tract. Year Book Medical Publishers, Chicage.

9）Miksicek RJ (1994): Interaction of naturally occurring nonsteroidal estrogens with expressed recombinant human estrogen receptor. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **49**, 153-160.

10）Guo TL, White KL Jr, Brown RD, Delclos KB, Newbold RR, Weis C, Germolec DR and McCay JA (2002): Genistein modulates splenic natural killer cell activity, antibody-forming cell response, and phenotypic marker expression in F(0) and F(1) generations of Sprague-Dawley rats. *Toxicol Appl Pharmacol*, **181**, 219-27.

11）Yellayi S, Zakroczymski MA, Selvaraj V, Valli VE, V Ghanta, Helferich WG and Cooke PS (2003): The phytoestrogen genistein suppresses cell-mediated immunity in mice. *J Endocrinol*, **176**, 267-274.

12）Guo TL, McCay JA, Zhang LX, Brown RD, You L, Karrow NA, Germolec DR and White KL Jr (2001): Genistein modulates immune responses and increases host resistance to B16F10 tumor in adult female B6C3F1 mice. *J Nutr*, **131**, 3251-3258.

13）Yellayi S, Naaz A, Szewczykowski MA, Sato T, Woods JA, Chang J, Segre M, Allred CD, Helferich WG and Cooke PS (2002): The phytoestrogen genistein induces thymic and immune changes: a human health concern? *Proc Natl Acad Sci USA*, **99**, 7616-7621.

14）Verdrengh M, Jonsson IM, Holmdahl R and Tarkowski A (2003): Genistein as an anti-inflammatory agent. *Inflamm Res*, **52**, 341-346.

15）Kogiso M, Sakai T, Mitsuya K, Komatsu T and Yamamoto S (2006): Genistein suppresses antigen-specific immunue responses through competition with 17 β-estradiol for estrogen receptors in ovalbumin-immunized BALB/c mice. *Nutrition*, **22**, 802-809.

16）Sakai T, Kogiso M, Mitsuya K, Komatsu T and Yamamoto S (2006): Genistein enhances antigen-specific cytokine production in female DO11.10 transgenic mice. *J. Nutr Sci Vitaminol*, **52**, 327-332.

17）Sakai T, Kogiso M, Mitsuya K, Komatsu T and Yamamoto S (2006): Genistein suppresses development of spontaneous atopic-like dermatitis in NC/Nga mice. *J Nutr Sci Vitaminol*, **52**, 293-296.

18）Park J, Kim SH, Cho D and Kim TS (2005): Formononetin, a phyto-oestrogen, and its metabolites up-regulate interleukin-4 production in activated T cells via increased AP-1 DNA. *Immunology*, **116**, 71-81.

19）McKenzie GJ, Emson CL, Bell SE, Anderson S, Fallon P, Zurawski G, Murray R, Grencis R and McKenzie ANJ (1998): Impaired development of Th2 cells in IL-13-deficient mice. *Immunity*, **9**, 423-432.