

大豆イソフラボンが I 型および II 型ヘルパー T 細胞への分化に及ぼす影響

戸塚 護*

東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命化学専攻食糧化学研究室

Effect of Soybean Isoflavones on Type I and Type II Helper T-Cell Differentiation

Mamoru TOTSUKA*

Laboratory of Food Chemistry, Department of Applied Biological Chemistry,
Graduate School of Agricultural and Life Sciences,
The University of Tokyo, Tokyo 113-8657

ABSTRACT

Naive CD4⁺ T cells differentiate into type I and type II helper T cells (Th1 and Th2) during their activation after antigen recognition. Th1 cells produce mainly interferon γ (IFN- γ) and play an important role in fighting intracellular pathogens. On the other hand, Th2 cells, producing mainly interleukin 4 (IL-4), promote B cells to secrete antibodies. Impairment of Th1/Th2 balance leads to onset or deterioration of immune-related diseases such as autoimmune diseases and allergies. Therefore, Th1/Th2 balance is critical to immune regulation. In the present study, we examined the effect of isoflavones—daidzein, genistein, and glycitein—on Th1/Th2 differentiation of naive CD4⁺ T cells derived from DO11.10 and BALB/c mice. CD4⁺ T cells activated in the presence of daidzein demonstrated significantly increased IFN- γ secretion and decreased IL-4 secretion. Glycitein did not affect the helper T-cell differentiation and genistein decreased the responses of the primed T cells. In the T cells primed in the presence of daidzein, mRNA expression of Th1-specific transcription factor T-bet and phosphorylation of STAT1 were up-regulated. The effect of daidzein was preserved in the absence of antigen-presenting cells and the presence of an estrogen receptor (ER) antagonist. These results indicate that daidzein directly affects naive CD4⁺ T cells to enhance Th1 differentiation, and suggest the involvement of the up-regulation of STAT1 phosphorylation but not ER-mediated signaling for the effect of daidzein. *Soy Protein Research, Japan* **14**, 68-72, 2011.

*〒113-8657 東京都文京区弥生1-1-1

Key words : isoflavone, daidzein, helper T cell, functional differentiation, cytokine

ヘルパー T細胞は、獲得免疫反応と炎症性疾患の制御を担うリンパ球である。ヘルパー T細胞は、それぞれインターフェロン γ (IFN- γ)、インターロイキン 4 (IL-4)、およびIL-17を主に産生する、I型ヘルパー T細胞 (Th1)、II型ヘルパー T細胞 (Th2)、およびTh17細胞に分類される¹⁾。Th1は主に細胞性免疫や細胞内寄生体の排除、Th2は液性免疫や細胞外病原体の排除に関与し、近年その存在が明らかにされた第3のエフェクターヘルパー T細胞サブセットであるTh17は炎症反応、粘膜上皮の感染防御、細胞外増殖細菌に対する感染防御を担っている。まだ抗原に感作されていないナイーブCD4⁺T細胞が抗原刺激を受けて増殖する過程でTh1、Th2またはTh17のいずれに機能分化するかは、免疫調節において重要な意義をもつ。

大豆、葛などのマメ科の植物に多く含まれているイソフラボンは、抗酸化作用、抗がん作用を有し、細胞シグナリング・分化・増殖などを調節することが知られている²⁾。しかしながら、イソフラボンがヘルパー T細胞の機能分化に与える影響については十分に明らかにされていない。そこで、本研究ではマウス脾臓由来のナイーブCD4⁺T細胞のTh1、Th2への機能分化に及ぼすイソフラボンの作用およびその作用機作について解析を行った。

方 法

大豆イソフラボン

ダイゼイン (Extrasynthese, Genay, France)、ゲニステインおよびグリシテイン (Sigma, St. Louis, MO)を用いた。それぞれDMSOに溶解し、100 mM溶液として保存した。

マウス

BALB/cマウス (8-10週齢、メス：日本クレア (東京)) およびDO11.10マウス (8-10週齢、メス)を用いた。DO11.10マウスは、卵白アルブミン (OVA) の323残基から339残基領域をI-A^d分子拘束的に認識するマウスCD4⁺T細胞クローンDO11.10由来のT細胞レセプター遺伝子が導入されたマウスである³⁾。

CD4⁺T細胞の機能分化誘導の解析

DO11.10マウスの脾臓CD4⁺T細胞を磁気ビーズ法 (MACS法) により精製し、各種大豆イソフラボンの存在下、抗原ペプチドと抗原提示細胞 (APC) として用いたBALB/cマウス由来脾臓細胞による抗原刺激を加えて7日間培養した。T細胞を回収し、再度抗原刺

激した後の培養上清中のサイトカイン量と増殖応答を測定した⁴⁾。またBALB/cマウス由来脾臓CD4⁺T細胞の機能分化を解析する実験では、抗原ペプチドとAPCによる抗原刺激の代わりに、固相化抗CD3抗体および抗CD28抗体による刺激でT細胞の活性化を行った。

培養72時間後に培養上清を回収し、IFN- γ およびIL-4産生量をELISA法にて測定した。また、24時間後、あるいは72時間後にRNAを回収し逆転写反応によりcDNAを調製した後、Light Cycler (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) を用いたリアルタイムPCR法により、各遺伝子のmRNA量を測定した。

ダイゼインの経口投与の効果の解析

DO11.10マウスをコントロール群、vehicle (0.25 mM Na₂CO₃) 群、ダイゼイン群の三群に分け、各群にvehicleまたはダイゼインを胃内強制投与した。3週間後、マウス脾臓からメモリー CD4⁺T細胞としてCD4⁺CD62L-T細胞を精製し、抗原ペプチドとAPCとともに72時間培養し、培養上清中のサイトカイン量を測定した。

結果と考察

ダイゼイン存在下で分化誘導したT細胞は、抗原再刺激後のIL-4産生の低下およびIFN- γ 産生の増強が観察された (Fig. 1)。グリシテイン存在下で分化誘導した場合には、試料無添加時と比較して有意な差は認められなかった。また、ゲニステイン存在下で分化誘導した場合には、抗原再刺激の際に増殖応答の顕著な低下が認められ (データ非掲載)、IFN- γ 産生のわずかな増加とIL-4産生の低下が観察された。

ダイゼイン存在下で分化誘導後のIFN- γ 産生増強、IL-4産生低下は、ダイゼインの用量依存的に認められた (Fig. 2A and B)。ダイゼインは植物エストロゲンとしての作用を示し、エストロゲン受容体 (ER) のアゴニストとして作用することが知られている⁵⁾。上記の現象はERアゴニストであるICI 182780の存在下においても同様に認められた (Fig. 2C and D)。この時、IFN- γ およびTh1特異的転写因子であるT-betのmRNA発現の増強、IL-4およびTh2特異的転写因子であるGATA-3のmRNA発現の減少も観察された (Fig. 3)。

これらの結果より、ダイゼインは、マウス脾臓ナイーブCD4⁺T細胞の抗原感作によるエフェクター T細胞への機能分化段階に作用し、Th1への分化を増強し、Th2分化を抑制する活性を有することが明らかとなっ

た。また、この活性にはERからのシグナルは関与しないことが示唆された。

次に、ダイゼインのTh1増強活性は、どの細胞に作用したことによる結果なのかを調べるため、APCの非存在下、CD4⁺T細胞のみを抗CD3抗体および抗CD28

抗体で刺激し、ダイゼイン存在下で7日間培養し分化誘導したところ、この実験条件でもダイゼイン濃度依存的にIL-4産生の低下およびIFN- γ 産生の増強が観察された (Fig. 4)。一方、APCのみをダイゼインとともに3日間培養した場合には、Th1誘導活性を有するサイ

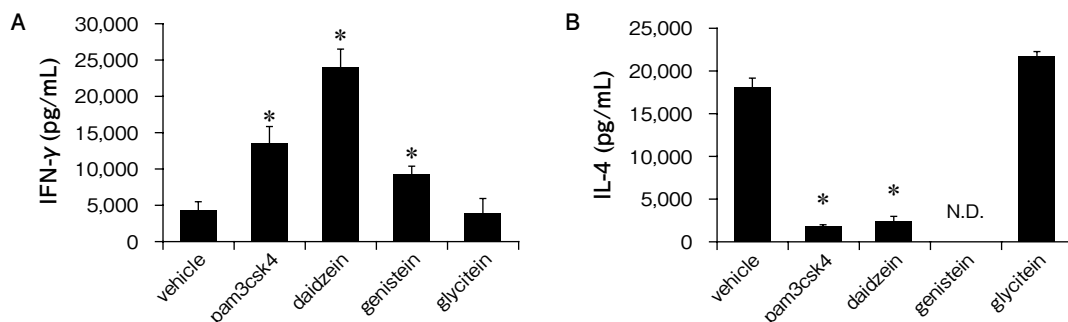


Fig. 1. Cytokine production of CD4⁺ T cells primed and functionally differentiated in the presence of isoflavones. Splenic DO11.10 CD4⁺ T cells were cultured with 0.5 μ M OVA₃₂₃₋₃₃₉ and BALB/c splenic antigen presenting cells in the presence of genistein, daidzein or glycitein at 50 μ M or Pam3CSK4 (0.5 μ g/mL) as positive control for Th1 induction. Secreted IFN- γ (A) and IL-4 (B) were quantified by ELISA after 72-h reculture of the T cells with 0.5 μ M OVA₃₂₃₋₃₃₉ and APC. Data are means \pm S.D. of triplicate cultures, * p <0.05 vs. vehicle by Dunnett's test. N.D.; Not detected.

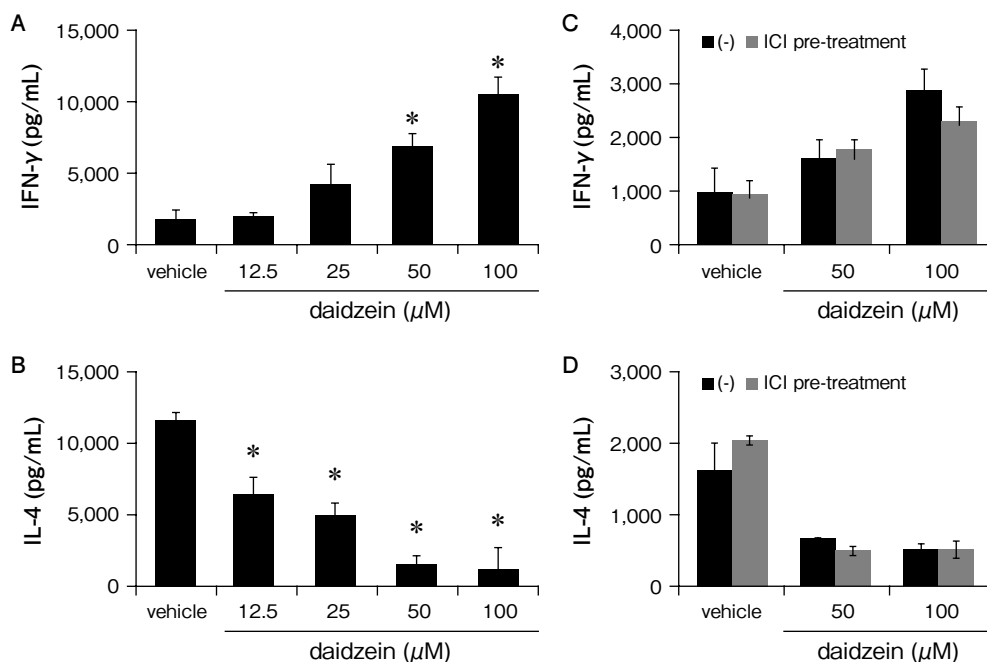


Fig. 2. Increased IFN- γ and decreased IL-4 secretion by CD4⁺ T cells primed and differentiated in the presence of daidzein without estrogen receptor signaling. Secreted IFN- γ (A, C) and IL-4 (B, D) were quantified with ELISA after 72-h reculture of cells treated with OVA₃₂₃₋₃₃₉ and antigen presenting cells in the presence of 12.5-100 μ M daidzein without (A, B) or with (C, D) ICI 182780, an estrogen receptor antagonist. Data are means \pm S.D. of triplicate cultures, * p <0.05 vs. vehicle by Dunnett's test.

トカインであるIL-12のp35およびp40、IL-18のmRNA発現には変化が認められなかった（データ非掲載）。また、CD4⁺T細胞をダイゼイン存在下で抗CD3/抗CD28抗体で刺激し3日間培養したところ、Th1誘導に重要な、IFN- γ 受容体からのシグナリングに関与するSTAT1のリン酸化がダイゼイン濃度依存的に増加した（Fig. 5）。これらのことから、ダイゼインはCD4⁺T細胞に直接作用することによりTh1分化促進活性を示すことが明らかとなり、その作用機作にはSTAT1のリン酸化促進を介した機構の関与が示唆された。

DO11.10マウスを用いてダイゼイン経口投与の影響を調べたところ、ダイゼイン投与群由来の脾臓メモリーT細胞では、無処理群と比較して、抗原再刺激後のIFN- γ 産生の有意な増強が観察された（データ非掲載）。

以上の結果より、大豆イソフラボンがマウス脾臓由来ナイーブCD4⁺T細胞の機能分化に及ぼす影響を明らかにすることができた。そのうちダイゼインは、T細胞に直接作用しTh1分化を促進する機能が見いだされた。また、この作用にはERを介したシグナル伝達系は関与せず、STAT1のリン酸化促進を介した機構によるものであることが示唆された。ダイゼインがヒト免疫系においても同様の効果を示すかどうかについては、今後検討する必要があるが、同様の効果を示せば、Th1/Th2バランスの改善を介してアレルギー疾患の予防・治療に寄与する可能性が期待される。

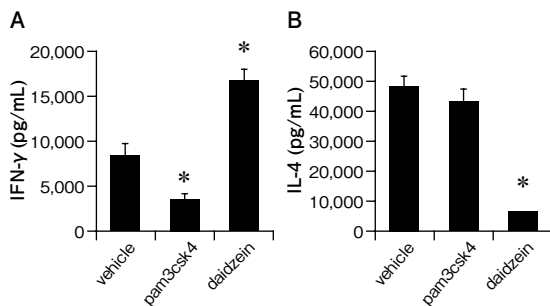


Fig. 4. Daidzein affects naïve CD4⁺T cells directly to induce Th1-skewed differentiation. Secreted IFN- γ (A) and IL-4 (B) were quantified by ELISA after 72-h reculture in splenic DO11.10 CD4⁺T cells treated with anti-CD3 and anti-CD28 mAbs. Data are means \pm S.D. of triplicate cultures, * p < 0.05 vs. vehicle by Dunnett's test.

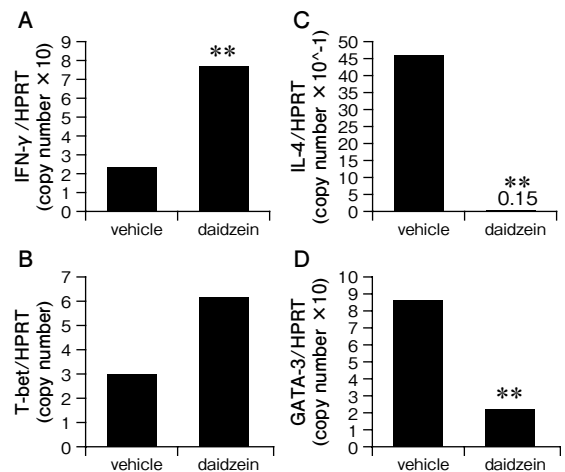


Fig. 3. mRNA expression of Th1/Th2 cytokines and transcription factors in CD4⁺T cells primed and differentiated in the presence of daidzein. The mRNA expression of IFN- γ (A), T-bet (B), IL-4 (C), and GATA-3 (D) was determined by quantitative RT-PCR after 24-h (A, C) or 72-h (B, D) reculture in splenic CD4⁺T cells treated as described with OVA₃₂₃₋₃₃₉ and antigen presenting cells in the presence of 100 μ M daidzein. Results are representative of ≥ 3 experiments, ** p < 0.01 vs. vehicle by Student's t -test.

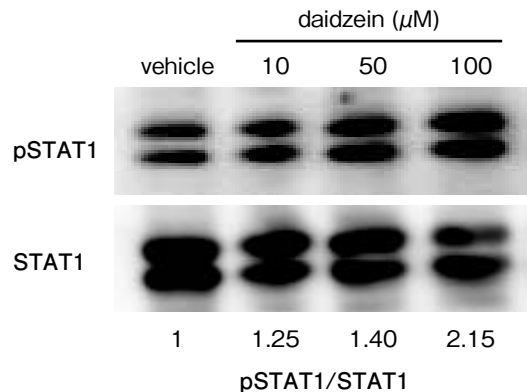


Fig. 5. Daidzein enhanced phosphorylation of STAT1 in naïve CD4⁺T cells upon activation in a dose-dependent manner. Whole-cell lysates from splenic DO11.10 CD4⁺T cells stimulated with anti-CD3 and anti-CD28 mAbs for 72 h in the presence of 0-100 μ M daidzein were subjected to Western blot analysis for STAT1 and phosphorylated STAT1. The image shown is representative of two independent experiments.

要 約

抗原未感作のナイーブCD4⁺T細胞は、活性化される過程でI型およびII型ヘルパーT細胞(Th1およびTh2)に分化する。Th1は主にインターフェロン γ (IFN- γ)を産生し細胞内病原体に対する防御を担う。Th2は主にインターロイキン4(IL-4)を産生し、B細胞に抗体産生を促すことにより、細胞外病原体の排除に重要な役割を果たしている。Th1/Th2バランスの破綻が免疫疾患の発症・増悪につながることから、その制御は重要な意義を持つ。本研究では、大豆イソフラボンによるTh1/Th2バランス制御の可能性を検討した。卵白アルブミン特異的T細胞レセプター遺伝子を導入したトランスジェニックマウスであるDO11.10マウスの脾臓CD4⁺T細胞を精製し、各種大豆イソフラボンの存在下、抗原ペプチドとAPCで刺激を加えて7日間培養した。細胞を回収し、再度抗原刺激した後の培養上清中のサイトカイン量と増殖応答を測定した。ダイゼイン(DZ)添加群では顕著なIFN- γ 産生の増加およびIL-4産生の低下が観察された。グリシテイン添加群では対照群との違いは認められず、ゲニステイン添加群では増殖応答の低下が観察された。DZ添加群では、Th1特異的転写因子であるT-betのmRNA発現、Th1分化に重要な役割を果たすSTAT1のリン酸化が上昇した。DZを強制経口投与したDO11.10マウス由来の脾臓CD4⁺T細胞は抗原刺激に対して無処理群と比較して有意に高いIFN- γ 産生を示した。DZの効果は、APCの非存在下で脾臓ナイーブCD4⁺T細胞を刺激した場合にも観察され、またエストロゲンレセプター(ER)アンタゴニストの存在下でも同様の活性が認められた。これらの結果から、DZはT細胞に直接作用してTh1分化を誘導することが明らかとなり、その作用にはERシグナルは関与せず、STAT1リン酸化の促進の関与が示唆された。

文 献

- 1) Zhu J, Yamane H and Paul WE (2010): Differentiation of effector CD4 T cell populations. *Annu Rev Immunol*, 28, 445-489.
- 2) Cornwell T, Cohick W and Raskin I (2004): Dietary phytoestrogens and health. *Phytochemistry*, **65**, 995-1016.
- 3) Murphy KM, Heimberger AB and Loh DY (1990): Induction by antigen of intrathymic apoptosis of CD4⁺CD8⁺TCR $\alpha\beta$ thymocytes in vivo. *Science*, **250**, 1720-1723.
- 4) Ise W, Totsuka M, Sogawa Y, Ametani A, Hachimura S, Sato T, Kumagai Y, Habu S and Kaminogawa S (2002): Naive CD4⁺T cells exhibit distinct expression patterns of cytokines and cell surface molecules on their primary responses to varying doses of antigen. *J Immunol*, **168**, 3242-3250.