

大豆含有成分 (Soyasaponin類, Soyasapogenol類) の
マクロファージ活性化制御作用の検討
—新たな生活習慣病治療への応用を目指して—

藤原章雄*¹・菰原義弘¹・大西紘二¹・池田 剛²・竹屋元裕¹

¹熊本大学大学院生命科学研究部 ²崇城大学薬学部生薬学

Effect of Compounds Contained in Soybean on Macrophage Activation

Yukio FUJIWARA*¹, Yoshihiro KOMOHARA¹, Koji OHNISHI¹,
Tsuyoshi IKEDA² and Motohiro TAKEYA¹

¹Department of Cell Pathology, Graduate School of Medical Sciences,
Kumamoto University, Kumamoto 860-8556

²Department of Natural Medicine, Faculty of Pharmaceutical Sciences of Sojo University,
Kumamoto 860-0082

ABSTRACT

Tumor-associated macrophages (TAMs) polarized to the M2 phenotype promote tumor cell proliferation and are associated with a poor prognosis in patients with high grade glioma. We previously reported that corosolic acid, a triterpenoid compound, inhibits the M2 polarization of human monocyte-derived macrophages (HMDM). In the present study, we examined whether triterpenoid compounds and flavonoid compounds contained in soybeans also show inhibitory effects on M2 polarization in HMDM. Soyasapogenol A and B, triterpenoid compounds, significantly inhibited the expression of CD163, one of the phenotype markers of M2 macrophages, as well as suppressed the secretion of IL-10, one of the anti-inflammatory cytokines preferentially produced by M2 macrophages, thus suggesting that soyasapogenol A and B suppress the M2 polarization of macrophages. Furthermore, soyasapogenol A and B inhibited the proliferation of U373 human glioblastoma cells and SaOS2 human osteosarcoma cells, and the activation of signal transducer and activator of transcription-3 (STAT3) in both human macrophages and tumor cells. These results indicate that soyasapogenol A and B regulate macrophage activation and suppress tumor cell proliferation by inhibiting STAT3 activation. Therefore, soyasapogenol A and B may be a potentially new agent that can be used for the prevention and treatment of various malignant tumors, including glioma and osteosarcoma. *Soy Protein Research, Japan*

*〒860-8556 熊本市本荘1-1-1

Key words : Macrophage, pSTAT3, Soyasapogenol, osteosarcoma, glioma

近年、マクロファージの活性化過程には、従来の古典的活性化経路に加えてオルタナティブ活性化経路が存在することが明らかとなってきた。すなわちTh1タイプのサイトカインで刺激を受けた炎症惹起性の古典的活性化 (M1) マクロファージに加えて、Th2タイプのサイトカインによって刺激され抗炎症性に働くオルタナティブ活性化 (M2) マクロファージが存在し、マクロファージはその活性化経路の違いによって2種類に大別される。M1およびM2マクロファージは、それぞれに表現形質も異なっており、M1マクロファージではTLR2やTLR4に加えFC γ RI, II, III, CCR2の発現が亢進し、M2マクロファージではCD163 (ヘモグロビンスカベンジャー受容体)、CD204 (クラスAスカベンジャー受容体)、CD206 (マンノース受容体)の発現が増強することが知られている¹⁻⁴⁾。また、M2マクロファージは、腫瘍組織において血管新生を誘導し、さらにIL-10、PGE₂等の免疫抑制分子を産生し、抗腫瘍免疫を抑制することが明らかとなってきた。例えば、IL-4、IL-13あるいはSTAT3/6を欠損したマウスでは、腫瘍組織でのM2マクロファージへの分化が抑制され、M1マクロファージの割合が増えるため、結果的にガンの発育・転移が抑制されることが報告されている。つまり、M2マクロファージは抗腫瘍免疫を抑制することで腫瘍増殖に関与しており、一方、M1マクロファージは抗腫瘍免疫を活性化することで、腫瘍の増殖を抑制することがわかってきた。そこで、腫瘍内浸潤マクロファージをM2タイプからM1タイプに変換させることができれば腫瘍の増殖抑制が可能となると考えられる。

そこで近年、我々はマクロファージの活性化制御をターゲットにしたガンの予防・治療に応用可能な新たな分子標的薬を開発する目的で、保有する天然化合物の中から、分子標的薬の候補化合物のスクリーニングを行ったところ、バナバ葉などに含有されているcorosolic acidや、生薬「大棗」などに含有されているoleanolic acidがマクロファージの活性化制御作用を有することを明らかにした^{5, 6)}。そこで、本研究ではcorosolic acidおよびoleanolic acidと同様に天然化合物の中でも代表的なトリテルペノイド化合物である大豆成分由来のsoyasaponinならびにsoyasapogenolのマクロファージ活性化制御作用について検討したので報告する。

方 法

Cell-ELISA

96 wellプレートに播種したHMDM (5×10^4 cells/well)に、IL-10もしくはU373細胞の培養上清 (TCS) 存在下で試験化合物 ($30 \mu\text{M}$) を添加し、24時間培養後、4%パラホルムアルデヒド ($100 \mu\text{L}/\text{well}$) にて固定した。その後、ブロッキングバッファー ($100 \mu\text{L}/\text{well}$) にて20分間ブロッキングを行った後、1次抗体としてanti-human CD163 antibody (AM-3K)を $100 \mu\text{L}/\text{well}$ 添加し、90分反応させた。次に、2次抗体であるHRP-goat anti-mouse IgG antibodyで30分反応させた後、ULTRASENSITIVE TMBにて発色させ、micro-ELISA plate readerにて450 nmの波長にて測定を行った。

サイトカインの測定

96 wellプレートに播種したHMDM (5×10^4 cells/well)に、TCS存在下で試験化合物 ($30 \mu\text{M}$) を添加し、24時間培養後、LPS ($100 \text{ ng}/\text{mL}$) 含有培地 ($100 \mu\text{L}/\text{well}$) に置換した。24時間培養後、培養上清を回収し、培養上清中のIL-10、IL-12の濃度をELISA kit (Human IL-10, IL-12 ELISA Development Kit: PEPROTECH, Rocky Hill, NJ, USA. READY-SET-GO)にて測定した。

ウェスタンブロット法

細胞 (HMDM, U373, SaOS2) に試験化合物を添加し、24時間培養後に調製した各細胞溶解液にサンプリングバッファーを添加し、 95°C で5分間加温した後、SDS-PAGEにて分離後、PVDF膜に転写した。転写したPVDF膜を1%スキムミルクにてブロッキングを行った後、1次抗体 (anti-phospho-Stat3 antibody (ab30646), anti-Stat3 antibody (sc-8019), anti- β -actin antibody (sc-47778)) および、2次抗体 (HRP-goat anti-rabbit IgG antibody, HRP-goat anti-mouse IgG antibody) で反応させた。最後に、化学発光基質であるECL試薬にて発色させLAS-4000 Miniにて検出した。

WST-8 assay

96 well plateに播種したガン細胞 (U373, SaOS2) に試験化合物を添加し、24時間後の細胞毒性をWST-8 assay kit (Dojin Chemical, Kumamoto, Japan) を用いて測定した。

統計学的解析

グラフに示した数値は、すべて平均値±誤差で表記した。有意差検定はMann-Whitney U-testおよびNon-repeated measures ANOVAを行い、各群のデータが等分散であるとみなした場合、危険率が5%であるとき、統計学的に有意差ありと評価した。

結果と考察

前述したように、マクロファージの活性化はガン細胞の細胞増殖にも関わっていることから、大豆含有成分のマクロファージの活性化制御に基づくガン予防・治療効果の可能性を明らかにする目的で、まず、大豆に含まれる代表的なトリテルペノイド化合物であるsoyasaponin I, soyasaponin A, soyasapogenol A, soyasapogenol B (Fig. 1) ならびにフラボノイド化合物であるdaidzin, daidzein, genistein (Fig. 1) のマクロファージのM2活性化抑制作用 (M2からM1へシフトさせる作用) について検討した。方法としては、ヒト単球由来マクロファージ (HMDM) をIL-10で刺激し、M2マーカーであるCD163の発現を誘導する条件下に、上記のトリテルペノイド化合物ならびにフラボノイド化合物を添加することで、CD163を指標としたM2活性化に対する化合物の抑制効果を検討した。その結果、フラボノイド化合物ならびにトリテルペノイド配糖体であるsoyasaponin Iおよびsoyasaponin Aは、コントロールと比較してCD163の発現に影響を与えなかったが、soyasapogenol Aならびにsoyasapogenol BはCD163の発現を有意に抑制した (Fig. 2A)。また、soyasapogenol Aならびにsoyasapogenol Bは、グリオーマ細胞の培養上清 (TCS) によるCD163の発現誘導に対しても有意な抑制効果を示した (Fig. 2B)。ゆえに、大豆由来トリテルペノイド化合物は、配糖体型 (soyasaponin Iおよびsoyasaponin A) よりもアグリコン型 (soyasapogenol Aならびにsoyasapogenol B) にCD163の発現抑制が認められたことからアグリコン型が活性本体である可能性が示唆された。

次に、soyasapogenol Aならびにsoyasapogenol BのIL-10 (M2マーカーサイトカイン)、IL-12 (M1マーカーサイトカイン) の分泌に対する作用を検討したところ、soyasapogenol Aならびにsoyasapogenol Bは、M2マーカーであるIL-10の分泌を抑制するとともに、M1マーカーであるIL-12の分泌を促進した (Fig. 3)。したがって、soyasapogenol Aおよびsoyasapogenol Bはマクロファージの活性化をM2からM1にシフトすることが示唆された。

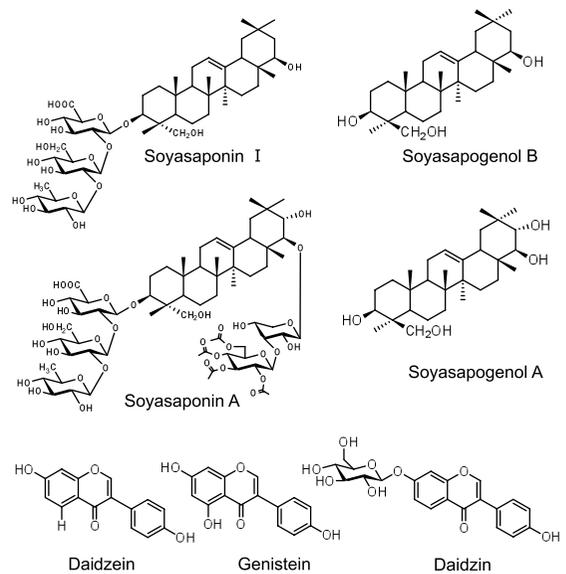


Fig. 1. Chemical structure of test compounds in this study.

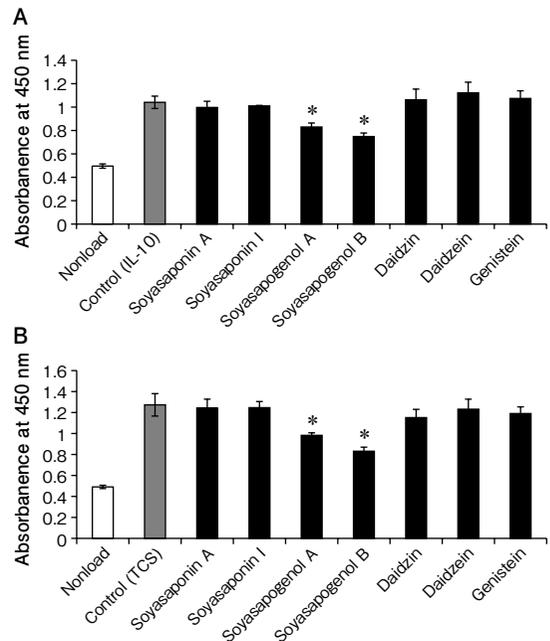


Fig. 2. Effect of test compounds on CD163 expression in HMDM. HMDM (5×10^4 cells per well of a 96-well plate) were incubated with test compounds ($30 \mu\text{M}$) for 24 h after treatment with 20 nM IL-10 (A) or TCS (B) for 2 days, followed by the determination of CD163 expression by Cell-ELISA, as described in the Materials and Methods. The data are presented as mean \pm SD. * $p < 0.01$ vs control.

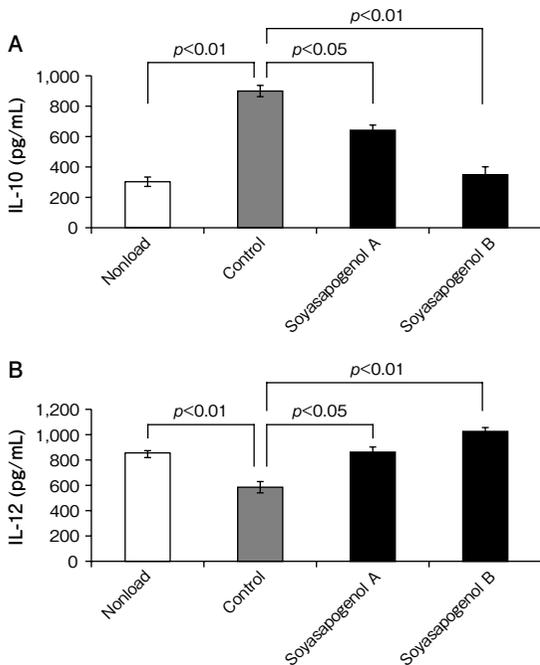


Fig. 3. Effect of soyasapogenol on IL-10 and IL-12 secretion in HMDM. The HMDM were stimulated with LPS (100 ng/mL) for 24 h after incubation with soyasapogenol (30 μ M) for 24 h in the presence of TCS, followed by the determination of IL-10 (A) and IL-12 (B) secretion by ELISA, as described in the Materials and Methods.

次に、そのマクロファージ活性化制御メカニズムを明らかにする目的で、soyasapogenol Aならびに soyasapogenol BのSTAT3の活性化に対する作用を検討した。近年、転写因子であるSTAT3の活性化は、マクロファージのM2活性化に深く関与していることが知られているため、STAT3の活性化を抑制することでマクロファージの活性化を制御することが可能となる。Fig. 4に示す通り、soyasapogenol Aおよびsoyasapogenol Bは、IL-10ならびに、TCSによるマクロファージのSTAT3活性化を顕著に抑制した。ゆえに、soyasapogenol Aおよびsoyasapogenol Bは、STAT3の活性化抑制を介してマクロファージのM2分化を抑制することが示唆された。

また、マクロファージのM2活性化に関わるSTAT3は、ガン細胞においては細胞の生存や増殖に関わっており、近年、STAT3阻害剤が新たな抗ガン剤のターゲット分子としても注目されていることから、ガン細胞のSTAT3活性化に対するsoyasapogenol Aおよ

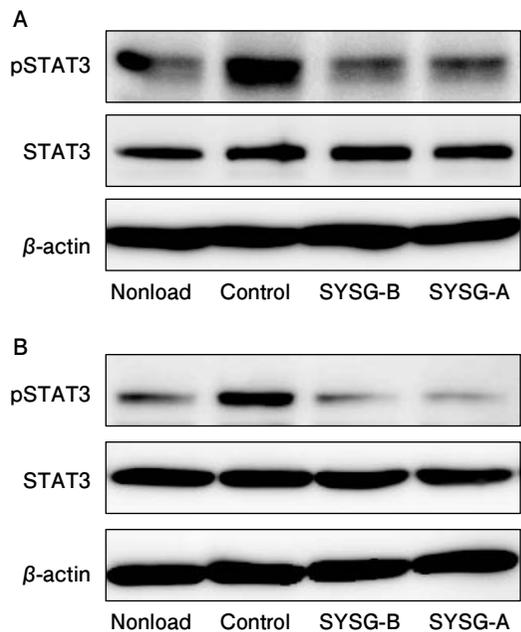


Fig. 4. Effect of soyasapogenol on STAT3 activation in HMDM. The HMDM were incubated with 30 μ M soyasapogenol A (SYSG-A) and 30 μ M soyasapogenol B (SYSG-B) for 12 h after treatment with 20 nM IL-10 (A) or TCS (B) for 24 h, followed by the determination of phosphorylated STAT3, STAT3 and β -actin expression by western blot analysis, as described in the Materials and Methods.

びsoyasapogenol Bの作用を検討した。本研究では、STAT3の顕著な活性化が認められているヒト由来ガン細胞株 (U373ヒトグリオーマ細胞株, SaOS2ヒト骨肉腫細胞株) を用いて検討を行った。その結果、soyasapogenol Bは、両方のガン細胞におけるSTAT3の活性化を顕著に抑制し、soyasapogenol AもSaOS2におけるSTAT3の活性化を顕著に抑制した (Fig. 5)。ゆえに、soyasapogenol Aならびにsoyasapogenol Bは、マクロファージだけではなくガン細胞におけるSTAT3の活性化も抑制することが示唆された。

前述した結果より、soyasapogenol Aならびに soyasapogenol Bは、ガン細胞の生存や増殖に関わる転写因子であるSTAT3の活性化を抑制することが明らかとなったため、次に、soyasapogenol Aならびにsoyasapogenol Bのガン細胞の細胞増殖に対する作用を検討した。方法としては、ガン細胞 (U373ヒトグリオーマ細胞株, SaOS2ヒト骨肉腫細胞株) にsoyasapogenol Aおよびsoyasapogenol Bを添加

し、24時間後のガン細胞の生存および細胞増殖に対する作用をWST-8 assayにて評価した。その結果、soyasapogenol Aならびにsoyasapogenol Bは、ガン細胞の細胞増殖を濃度依存的に抑制した (Fig. 6)。つまり、soyasapogenol Aおよびsoyasapogenol Bは、STAT3の活性化を抑制することで、ガン細胞の生存および増殖を阻害することが示唆された。ゆえに、これらsoyasapogenol類は、マクロファージの活性化状態をM2からM1にシフトさせる作用ならびに、ガン細胞の生存・増殖を阻害する作用により効率的に*in vivo*におけるガンの増殖や転移を抑制する可能性が示唆された。これまでに、これらsoyasapogenol類によるガン細胞に対する直接的な抗ガン作用は報告されているが^{7, 8)}、マクロファージの活性化制御を介したガン増殖抑制作用に関する報告は本研究が初めてである。今後、当研究室で既に確立しているマウス骨肉腫移植モデルにおける効果を検討することで、*in vivo*におけるsoyasapogenolの効果を検証する予定である。

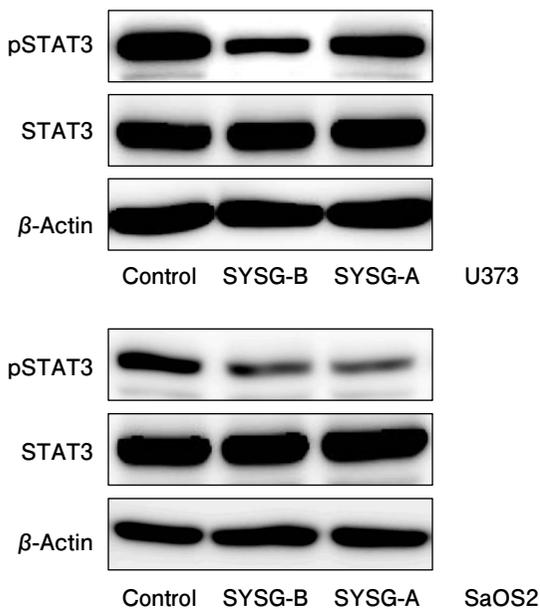


Fig. 5. Effect of soyasapogenol on STAT3 and NF- κ B activation in tumor cells. U373 cells (A) and SaOS2 cells (B) were incubated with 30 μ M soyasapogenol A (SYSG-A) and 30 μ M soyasapogenol B (SYSG-B) for 12 h, followed by the determination of phosphorylated STAT3, STAT3 and β -actin expression by western blot analysis, as described in the Materials and Methods.

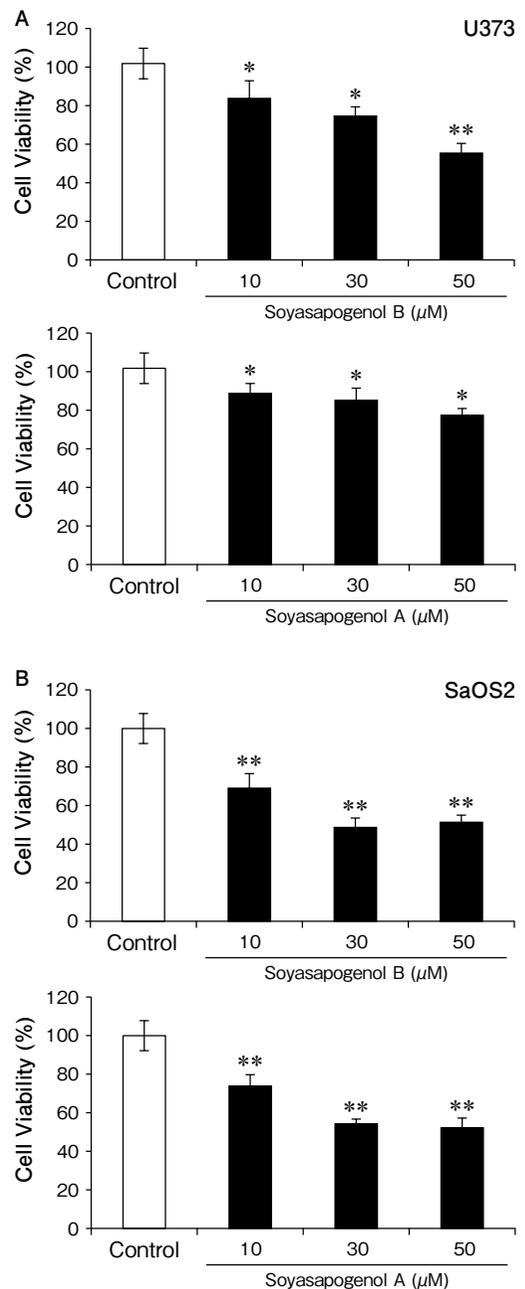


Fig. 6. Effect of soyasapogenol on cell proliferation in U373 glioblastoma cells and SaOS2 osteosarcoma cell. U373 cells (A) and SaOS2 cells (B) were incubated with the indicated concentrations of soyasapogenol for 24 h, followed by the determination of cell proliferation by both WST-8 assay, as described in the Materials and Methods. The data are presented as mean \pm SD. * p < 0.05, ** p < 0.01 vs control.

要 約

近年、マクロファージの活性化機構には、古典的活性化 (M1) 経路とオルタナティブ活性化 (M2) 経路が存在することが明らかとなり、活性化の違いが病態に大きな影響を与えることが明らかとなってきた。腫瘍組織においても、両方の活性化マクロファージの存在が示唆されており、M2マクロファージは、腫瘍組織での腫瘍血管の形成促進に関与すると共に、IL-10, HLA-G等の免疫抑制分子を産生し、抗腫瘍免疫を抑制することで、結果的に腫瘍増殖に関与し、一方、M1マクロファージはIL-12などのTh1タイプのサイトカインを産生することで腫瘍増殖を抑制することが知られている。ゆえに、腫瘍組織内のマクロファージをM2からM1シフトさせることで腫瘍の増殖を抑制できると考えられている。そこで、本研究では、大豆含有成分 (Soyasaponin, Soyasapogenol) の新たな機能性を明らかにする目的で、それらのマクロファージ活性化制御作用を評価した。その結果、Soyasapogenolは、ヒト単球由来マクロファージにおいて、M2活性化マーカーであるCD163の発現やIL-10の分泌を抑制し、M1活性化マーカーであるIL-12分泌を促進した。つまり、本研究にてSoyasapogenolは、マクロファージの活性化をM2からM1にシフトすることが示唆された。また、Soyasapogenolのガン細胞 (U373ヒトグリオーマ細胞株, SaOS2ヒト骨肉腫細胞株) に対する直接的な作用も検討したところ、Soyasapogenolは、ガン細胞のSTAT3活性化を抑制することでガン細胞の細胞増殖を抑制することが明らかとなった。ゆえに、Soyasapogenolは、マクロファージの活性化制御ならびにガン細胞への直接的な作用を介したガン予防・治療への応用に有効である可能性が示唆された。

文 献

- 1) Gordon S (2003): Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol*, **3**, 23-35.
- 2) Mosser DM (2003): The many faces of macrophage activation. *J Leukoc Biol*, **73**, 209-212.
- 3) Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A and Locati M (2004): The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol*, **25**, 677-286.
- 4) Goerdts S and Orfanos CE (1999): Other functions, other genes: alternative activation of antigen-presenting cells. *Immunity*, **10**, 137-142.
- 5) Fujiwara Y, Komohara Y, Ikeda T and Takeya M (2011): Corosolic acid Inhibits Glioblastoma Cell Proliferation by Suppressing the Activation of STAT3 and NF- κ B in Tumor Cells and Tumor-associated Macrophages., *Cancer Sci*. **102**, 206-211.
- 6) Fujiwara Y, Komohara Y, Kudo R, Tsurushima K, Ohnishi K, Ikeda T and Takeya M (2011): Oleanolic acid inhibits macrophage differentiation into the M2 phenotype and glioblastoma cell proliferation by suppressing the activation of STAT3. *Oncol Rep*, **26**, 1533-1537
- 7) Rowlands JC, Berhow MA and Badger TM (2002): Estrogenic and antiproliferative properties of soy sapogenols in human breast cancer cells *in vitro*. *Food Chem Toxicol*, **40**, 1767-1774.
- 8) Yanamandra N, Berhow MA, Konduri S, Dinh DH, Olivero WC, Nicolson GL and Rao JS (2003): Triterpenoids from Glycine max decrease invasiveness and induce caspase-mediated cell death in human SNB19 glioma cells. *Clin Exp Metastasis*, **20**, 375-383.