

大豆イソフラボンの骨破壊抑制作用に關与するマイクロRNA

立花宏文*¹・林 宜禱¹・山下修矢²

¹九州大学大学院農学研究院生命機能科学部門食糧化学分野

²農業・食糧産業技術総合研究機構果樹茶業研究部門

Involvement of MicroRNA-Mediated Gene Expression in the Inhibitory Effect of Isoflavone on Bone Destruction

Hirofumi TACHIBANA *¹, I-Chian LIN¹ and Shuya YAMASHITA²

¹Division of Applied Biological Chemistry, Department of Bioscience and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Kyushu University, Fukuoka 819-0395

²Institute of Fruit Tree and Tea Science, National Agriculture and Food Research Organization (NARO), Kagoshima 898-0087

ABSTRACT

MicroRNAs (miRNAs), the small noncoding RNA molecules, regulate gene expressions controlling diverse cell signaling pathways by binding to target mRNAs in order to suppress their translation or promote their degradation. Although miRNAs play a crucial role in many biological processes, including homeostasis and diseases, the relationship between physiological effects of food factors and miRNAs has been mostly unclear. In the present study, we investigated miRNAs taking part in the inhibitory effects of equol, a soy isoflavone metabolite, on rheumatoid arthritis (RA). The collagen-induced arthritis (CIA) mice, a mouse model for RA, were orally administered equol or vehicle, and clinical arthritis scores and bone mineral density were evaluated. The severity of arthritis and the CIA-induced bone destruction were milder in the equol-administered CIA mice than in the control CIA mice. In the inflamed area of CIA mice, equol administration suppressed the gene expressions of interleukin-6 (IL-6) and its receptor IL-6R. Equol also reduced the expression of genes associated with bone destruction, suggesting that equol blocks the IL-6 signaling to suppress the severity of arthritis and inflammatory bone destruction in mice. Equol treatment reduced the gene and protein expression of IL-6R in RAW264.7 cells. We found that the protein level of IL-6R was decreased in miR-320-transfected RAW264.7 cells, indicating that IL-6R is a target of miR-320. Furthermore, miR-320 expression was up-regulated in equol-treated RAW264.7

*〒819-0395 福岡市西区元岡744 ウエスト5号館

cells. These results suggest that equol suppresses the IL-6R expression via the increased expression of miR-320. *Soy Protein Research, Japan* **21**, 104-109, 2018.

Key words : isoflavone, rheumatoid arthritis, bone destruction, microRNA

大豆イソフラボンであるダイゼインならびにその腸内代謝産物であるエクオールは、骨粗鬆症の改善¹⁾やがん予防²⁾、抗炎症作用³⁾など多彩な生理作用が報告されており、機能性食品因子として注目されている。一方、低分子RNAの一種であるマイクロRNAは標的遺伝子の3'末端非翻訳領域に結合し、翻訳阻害またはmRNAの分解誘導により直接的または間接的に生体内のほぼすべての遺伝子発現を制御している。このように、マイクロRNAは生体恒常性の維持や疾病の発症など様々な生命現象において重要な役割を持つ一方で、食品因子の生体調節作用とマイクロRNAの関係にはまだ不明な点が多い。我々はこれまでに、エクオールのがん細胞増殖抑制作用にマイクロRNAが関与することを見出した。本研究では、エクオールの新しい生理作用として関節リウマチに対する抑制効果を検討するとともに、炎症性骨破壊に対するエクオールの骨保護作用におけるマイクロRNAの関与について検討した。

方 法

試薬

エクオールは東京化成工業株式会社より購入し、dimethylsulfoxide (DMSO) に溶解した。Lyophilized chicken type II collagenおよび Freund's complete adjuvant は Chondrex より、Lipopolysaccharides (LPS) (from *Escherichia coli* serotype O26: B6) およびマイクロRNA mimic は Sigma-Aldrich より購入した。抗IL-6R α 抗体は Santa Cruz Biotechnology より、マイクロRNA 特異的プライマーは Exiqon 社より購入した。

コラーゲン誘導性関節炎 (CIA) の誘導および大豆イソフラボンの経口投与

Lyophilized chicken type II collagen/ Freund's complete adjuvant を DBA/1J マウスの CIA 群に投与し一次免疫を行った。一次免疫から26日後、CIA誘導しないコントロール群およびCIA溶媒投与群には1% DMSOを、CIAエクオール投与群には0.4 mg/dayのエクオールを経口投与した。一次免疫から28日目にCIA群にLPSを腹腔内投与し関節炎を発症させた。

関節炎および炎症性骨破壊における大豆イソフラボンの経口投与の影響の検討

関節炎評価では、二次免疫からの33日間、以下の関節炎点数によりマウスの四肢の関節炎を評価した (Chondrex)。0点：腫脹なし、1点：軽度の腫脹および発赤、2点：明瞭な腫脹および発赤、3点：高度の腫脹および発赤、4点：嚴重な腫脹および発赤。

骨密度測定では、一次免疫から61日目にマウスを安楽死させ、大腿骨および四肢の摘出骨の骨密度を測定した。

骨破壊関連遺伝子の発現測定では、マウスの前肢組織よりトータルRNAを単離し、PrimeScript RT reagent kit (タカラバイオ) を用いてcDNAを合成後、骨破壊関連遺伝子 (*Il6*, *Il6r*, *Ctsk*, *Fos*, *Mmp13*, *Adamts5*, *Sost*, *Mepe*, *Spp1*, *Ibsp*) の特異的なプライマーを用いたりアルタイムPCRに供した。内部標準として*Gapdh*を測定した。

miR-320のIL-6Rに対する抑制効果の検討

マウスマクロファージ様細胞株RAW264.7は5%牛胎児血清 (FBS) を含むDMEM培地により、37°C、5%炭酸ガス加湿下で継代・維持した。RAW264.7細胞を播種し24時間前培養した後、20 nMのコントロールマイクロRNAおよびmiR-320 mimicを細胞に導入した。72時間培養した後、細胞よりたん白質を回収し、ウエスタンブロット解析によりIL-6Rのたん白質レベルを測定した。内部標準として β -actinを測定した。

miR-320発現量およびその標的候補遺伝子のたん白質レベルに及ぼす大豆イソフラボンの影響の検討

RAW264.7細胞をエクオール (10, 20 μ M) で処理し、24時間培養した後、細胞からトータルRNAを単離し、mRNA測定用ならびにマイクロRNA測定用のcDNAを合成した。その後、*Il6r*またはmiR-320特異的なプライマーを用いたりアルタイムPCRに供した。mRNA測定では内部標準として*Gapdh*を測定し、マイクロRNA測定では内部標準としてU6を測定した。

また、48時間培養した後、細胞よりたん白質を回収し、ウエスタンブロット解析によりIL-6Rのたん白質レベルを測定した。内部標準として β -actinを測定した。

結果と考察

関節リウマチ症状に及ぼす大豆イソフラボンの影響

DBA/1Jマウスにおいて、異種のII型コラーゲンにより誘導された関節炎および骨密度の低下といったヒト関節リウマチ様症状に及ぼす大豆イソフラボンの代謝産物であるエクオールの経口投与の影響を評価した。その結果、CIA溶媒群の炎症が最大値に達した際に、CIAエクオール投与群の関節炎点数が有意な低値を示した (Fig. 1)。また、一次免疫から61日目に飼育を終了し、マウスの大腿骨および四肢を摘出し骨密度を測定したところ、CIAの誘導によりCIA溶媒群の骨密度がCIA誘導しないコントロール群に比べて顕著に低下した。一方、CIAエクオール投与群の骨密度は、いずれの骨組織においてもCIAを誘導していないコントロール群と同じ程度であり、CIA誘導性の骨密度低下が認められなかった (Table 1)。これらの結果から、マウスの関節リウマチ様症状に対するエクオールの経口投与の抑制効果が示された。

骨破壊関連遺伝子の発現に及ぼす大豆イソフラボンの影響

過剰な炎症性サイトカインが破骨細胞の活性化や軟骨の分解を促進することが報告されていることから⁴⁾、関節リウマチ合併する骨粗鬆症の誘因の一つとして炎症の持続が関与することが強く示唆されている。また、成熟した骨芽細胞の減少と未熟な骨芽細胞の増加は骨量の低下に関与している⁵⁾。骨密度の変動が最も大きかったCIAマウスの前肢組織を用いて、エクオールの経口投与が骨破壊関連遺伝子の発現量に及ぼす影響を検討した。関節リウマチに重要な炎症性サイトカインであるIL-6およびその受容体であるIL-6Rの遺伝子発現量はCIAエクオール投与群で有意に低下したことから、エクオールの関節炎抑制作用にはIL-6シグナル阻害が関与することが示唆された (Fig. 2)。また、破骨細胞に発現するCtsk、Fosおよび軟骨分解酵素を

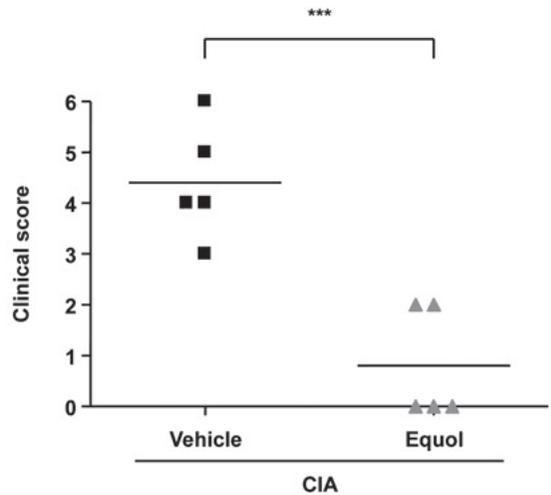


Fig. 1. Oral equol administration suppressed the pathogenesis of CIA in mice. The DBA/1J mice of CIA group were injected type II collagen, and the equol-administered CIA mice were orally administered equol after the immunization of type II collagen. After the immunization of type II collagen, the onset of arthritis induced by LPS, then the severity of arthritis was assessed daily in the paws of mice following the arthritis scoring system. *** $p < 0.001$ using Student's t test ($n = 5$ mice).

コードする遺伝子であるMmp13、Adamts5の発現量はCIAエクオール投与群で有意な低値を示した (Fig. 3a)。さらに、骨形成阻害因子であるSost、Mepeおよび未熟な骨芽細胞のマーカーであるSpp1、Ibspの発現低下もCIAエクオール投与群において見られた (Fig. 3b)。以上のCIAマウスの前肢組織を用いた遺伝子解析の結果より、エクオールがIL-6シグナルを阻害することで抗炎症作用を発揮するとともに、骨破壊および骨形成阻害に関与する遺伝子の発現量を抑制することで関節リウマチにおける骨密度の低下を改善する可能性が示された。

Table 1. Oral equol administration protected bones from CIA-induced degradation (mg/cm^3)

Tissue BMD and group	Control	CIA + Vehicle	CIA + Equol
Femur	633.00 ± 6.418	602.72 ± 9.433***	620.04 ± 9.416 [#]
Forepaw	662.94 ± 3.439	619.09 ± 16.934***	677.54 ± 1.489 ^{###}
Hind paw	755.06 ± 7.909	725.12 ± 11.669***	741.40 ± 8.566 [#]

Data are presented as means ± SD ($n = 5$). *** $p < 0.001$ vs control, and [#] $p < 0.05$, ^{###} $p < 0.001$ vs CIA+Vehicle using Tukey's test. BMD: bone mineral density.

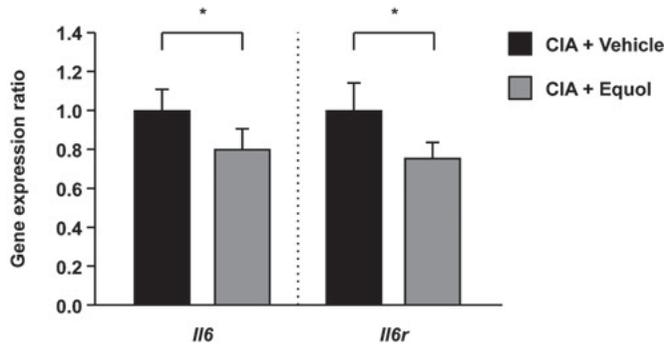


Fig. 2. Oral equol administration suppressed the gene expressions of IL-6 and IL-6R in the inflamed area of CIA mice. Real-time quantitative PCR analysis of IL-6 and IL-6R gene expressions in the inflamed forepaws of CIA mice. Data are presented as means \pm SD ($n = 5$). * $p < 0.05$ using Student's t test.

大豆イソフラボンのIL-6R抑制作用におけるマイクロRNAの関与

炎症性サイトカイン産生細胞として炎症に関与するマクロファージを用いて、エクオールのIL-6R発現制御作用を検討するとともに、その作用に関与するマイクロRNAの探索を行った。マウスマクロファージ様細胞株RAW264.7において、エクオールの処理がIL-6Rの遺伝子およびたん白質発現量を減少させることを見出した、たん白質に対する抑制作用がより強いことが示された (Fig. 4)。我々は、これまでに大豆イソ

フラボンのがん細胞増殖抑制作用に関与するマイクロRNAとしてmicroRNA-320 (miR-320)を明らかにした。配列に基づく標的解析により、マウスIL-6R遺伝子のmRNA 3'末端非翻訳領域にはmiR-320が結合しうる配列が存在し、合成miR-320を導入したRAW264.7細胞においてIL-6Rのたん白質発現量が顕著に低下したことから、miR-320はIL-6Rを標的とすることが示唆された (Fig. 5)。MiR-320に及ぼすエクオールの影響について検証したところ、エクオール処理によりRAW264.7細胞のmiR-320発現上昇が認められた (Fig. 6)。

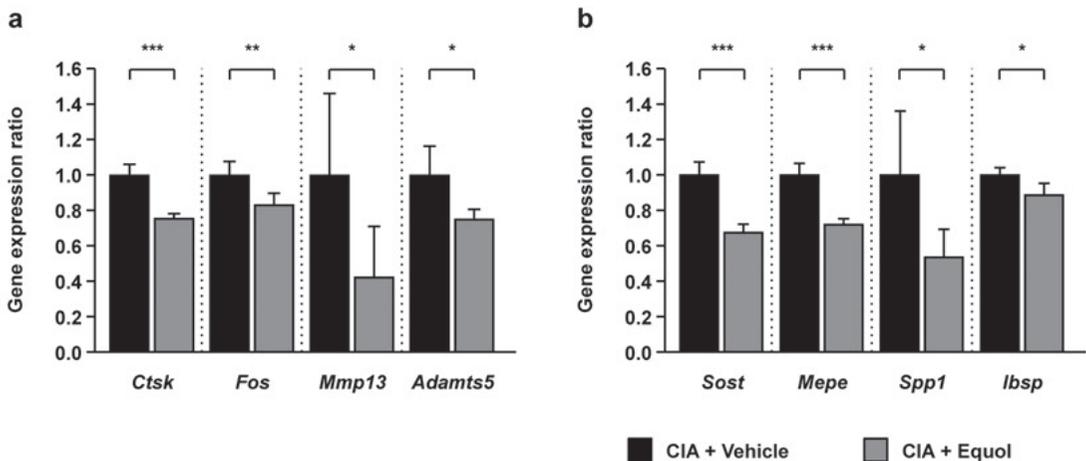


Fig. 3. Oral equol administration suppressed the expressions of genes associated with bone erosion in the inflamed area of CIA mice. Real-time quantitative PCR analysis of mRNA expression of (a) bone destruction- and (b) bone formation inhibition-related factors in the inflamed forepaws of CIA mice. Data are presented as means \pm SD ($n = 5$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ using Student's t test.

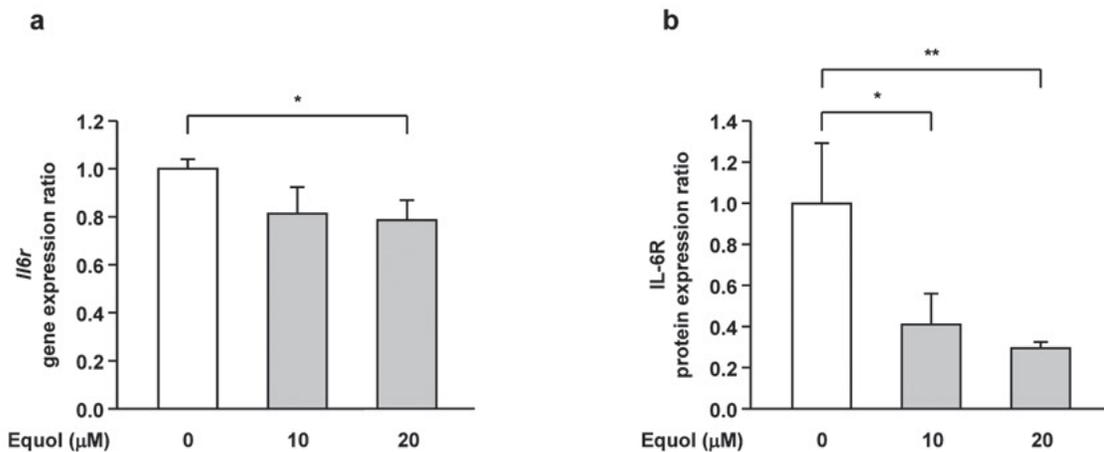


Fig. 4. Equol decreased IL-6R expression in RAW264.7 cells. (a) RAW264.7 cells were treated with equol, and IL-6R gene expressions were assessed by real-time quantitative PCR analysis. (b) IL-6R protein levels were assessed by western blotting analysis. Data are presented as means \pm SD, $n = 3$. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ using Dunnett's test.

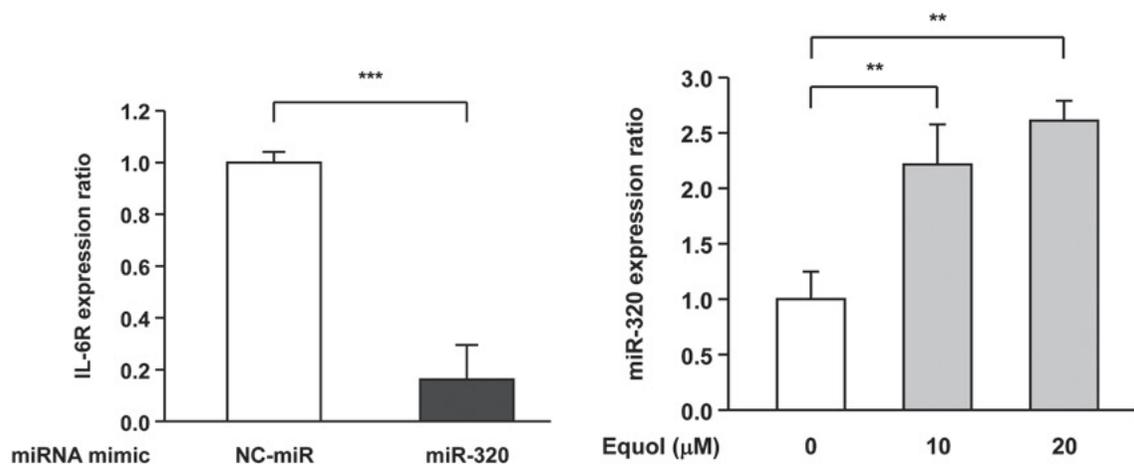


Fig. 5. IL-6R is a target of miR-320. RAW264.7 cells were transfected with miR-320 or negative control miRNA (NC-miR) mimics, and IL-6R protein levels were assessed by western blotting analysis. Data are presented as means \pm SD, $n = 3$. *** $p < 0.001$ using Student's t test.

Fig. 6. Equol increased miR-320 expression in RAW264.7 cells. RAW264.7 cells were treated with equol, and miR-320 expressions were assessed by real-time quantitative PCR analysis. Data are presented as means \pm SD, $n = 3$. ** $p < 0.01$ using Dunnett's test.

要 約

大豆イソフラボンの代謝産物であるエクオールの新しい生理作用として関節リウマチに対する抑制効果を明らかにすることを目的とし、関節リウマチモデルであるコラーゲン誘導性関節炎 (CIA) マウスおよびマウスマクロファージ様細胞株RAW264.7を用いて検討を行った。エクオールを経口投与したCIA誘導マウスにおいて、ヒト関節リウマチの主な病状である関節炎および炎症による骨破壊が顕著に抑制された。また、エクオール投与群において関節リウマチ発症に関与するIL-6とその受容体であるIL-6R、ならびに骨破壊関連遺伝子の各発現量が低下した。IL-6Rの発現を抑制するマイクロRNAとしてmiR-320を見出し、マクロファージにおいてエクオールがmiR-320の発現量を上昇させるとともにIL-6Rの発現量を低下させることを明らかにした。

文 献

- 1) Alekel DL, Germain AS, Peterson CT, Hanson KB, Stewart JW and Toda T (2000): Isoflavone-rich soy protein isolate attenuates bone loss in the lumbar spine of perimenopausal women. *Am J Clin Nutr*, **72**, 844-852.
- 2) Yamamoto S, Sobue T, Kobayashi M, Sasaki S and Tsugane S (2003): Soy, isoflavones, and breast cancer risk in Japan. *J Natl Cancer Inst*, **95**, 906-913.
- 3) Masilamani M, Wei J and Sampson HA (2012): Regulation of the immune response by soybean isoflavones. *Immunol Res*, **54**, 95-110.
- 4) McInnes IB and Schett G (2011): The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N Engl J Med*, **365**, 2205-2219.
- 5) Liu W, Toyosawa S, Furuichi T, Kanatani N, Yoshida C, Liu Y, Himeno M, Narai S, Yamaguchi A and Komori T (2001): Overexpression of Cbfa1 in osteoblasts inhibits osteoblast maturation and causes osteopenia with multiple fractures. *J Cell Biol*, **155**, 157-166.