

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K17967

研究課題名（和文）大豆イソフラボンの免疫調節作用によるメタボリックシンドローム予防とその機構解明

研究課題名（英文）Prevention of metabolic syndrome by immunomodulatory action of soy isoflavone and elucidation of mechanism

研究代表者

中本 晶子（NAKAMOTO, Akiko）

徳島大学・大学院医歯薬学研究部（医学域）・助教

研究者番号：90803536

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：大豆イソフラボンによる免疫抑制を介した抗メタボリックシンドローム予防法の探索を目指した。メタボリックシンドロームは全身の慢性炎症から惹起される病態である。この炎症状態に対する大豆イソフラボンの作用および炎症制御に関連するリンパ球への作用として、大豆イソフラボンの1つであるエクオールは、食餌誘発性肥満マウスにおいて糖代謝改善作用を示した。さらにこの糖代謝改善作用にはT細胞およびB細胞が関与する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

リンパ球の機能制御によるメタボリックシンドロームに対する新たな予防法の探索として、大豆イソフラボンに着目した。大豆イソフラボンの1つであるエクオールは、食餌誘発性肥満マウスにおいて糖代謝改善作用を示した。さらにこの糖代謝改善作用にはT細胞およびB細胞が関与する可能性が示唆された。食品成分である大豆イソフラボンが、これまで病態制御の標的とされてきた炎症性マクロファージの上流にあるリンパ球を制御してメタボリックシンドロームの病態形成に関わる糖代謝を制御する可能性を見出した。

研究成果の概要（英文）：We aimed to find a new treatment for metabolic syndrome through immunosuppression by soy isoflavones. Metabolic syndrome is a condition caused by systemic chronic inflammation. We examined effect of soybean isoflavones on anti-inflammatory action lymphocytes. Equol, one of the soybean isoflavones, improves glucose metabolism in diet-induced obese mice. Furthermore, T cells and B cells may be related to the glucose regulation in diet-induced obese mice.

研究分野：栄養学

キーワード：大豆イソフラボン エクオール メタボリックシンドローム エストロゲン エストロゲンレセプター
マクロファージ T細胞

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

メタボリックシンドロームは、内臓脂肪、糖脂質異常症、高血圧を基盤とした代謝性疾患であり、潜在的な者を含めると男性で2人に1人、女性で5人に1人が該当するとされている。メタボリックシンドロームは、内臓脂肪の蓄積による炎症が引き金となり、肝臓や筋肉といった糖脂質代謝に関わる臓器の機能に変調をきたし、インスリン抵抗性の亢進や脂質代謝異常を引き起こすものである。近年、メタボリックシンドロームの病態制御に免疫細胞が深く関与しているという興味深い知見が報告された。従来、メタボリックシンドロームの病態には肥満に伴い蓄積した内臓脂肪に浸潤した炎症性マクロファージが炎症性サイトカインを放出し、その炎症物質が脂肪細胞に作用して脂肪細胞の炎症を助長し全身の慢性炎症を引き起こす。脂肪組織に浸潤するマクロファージを炎症性マクロファージあるいは抗炎症性マクロファージに分化させるかは免疫細胞であるT細胞が決定することが次々報告され(Nature Medicine, 15:914, 930, 927, 2009) その後、脂肪組織における好酸球やリンパ球であるB細胞の重要性が報告され(Nature Medicine, 17:610, 2011, Science, 332:243, 2011) 免疫細胞がメタボリックシンドロームを制御する知見が積み重ねられてきた。

これまで所属研究室では、核酸や乳酸菌、プロポリス等の機能的栄養素と免疫機能に関する研究を行ってきており、さらに大豆成分の一種であるイソフラボンと免疫機能に関する研究を行い、以下の事を見出している。大豆イソフラボンの一種であるゲニステインが抗原特異的免疫応答を抑制すること(Nutrition, 22:802, 2006) アトピー性皮膚炎自然発症モデル動物を用いた解析より皮膚炎に対して症状改善効果が認められること(J Nutr Sci Vitaminol, 54:293, 2006) およびT細胞レセプタートランスジェニックマウスを用いた解析より抗原特異的サイトカイン産生を増強させること(J Nutr Sci Vitaminol, 54:327, 2006) を明らかにしてきた。また、ゲニステイン以外のイソフラボンの機能性について検証し、エクオールはIL-13産生を増強し、IgE産生制御に関わることを(J Nutr Sci Vitaminol, 56:72, 2010) また実験的大腸炎の炎症を抑制することを明らかにした(Biotech Biosci Biochem, 75:593, 2011) 。さらに、大豆製品の摂取量はアレルギー疾患のリスクやインスリン抵抗性と関係していることを疫学研究で検証を行った(J Rehabil Health Sci, 8:15, 2010, Public Health Nutr 18:2031, 2015) 。このように、大豆イソフラボンがリンパ球機能に多様に作用することを明らかにしてきており、食品により脂肪組織における免疫細胞機能が制御できればユニークな抗メタボリックシンドローム症候群予防法を提案することが可能となる。

2. 研究の目的

大豆の栄養成分に着目し、メタボリックシンドロームの発症抑制に関する基盤的研究である。肥満に伴い、内臓脂肪が蓄積し、内臓脂肪に浸潤したマクロファージが炎症性サイトカインを産生し、その炎症物質が脂肪細胞に作用して脂肪細胞の炎症を助長し全身の慢性炎症を引き起こす。従来、メタボリックシンドロームの病態には内臓脂肪に浸潤した炎症性マクロファージが放出する炎症性サイトカインが糖脂質代謝異常を引き起こし病態制御の標的とされていた。しかしながら、炎症性マクロファージを制御するのはその上流のリンパ球であることが報告され、リンパ球の制御がメタボリックシンドローム病態制御で重要であることが判明した。

主たる研究は、(1)大豆イソフラボンが免疫調節作用を発揮し、その結果としてメタボリックシンドロームを軽減するという新規のアプローチ法に基づき検証を行うこと、(2)抗メタボリックシンドローム作用が、どのような細胞群によってどのようなメカニズムで起こるのかを追求し、どのような代謝系を変化させ、抗メタボリックシンドローム作用を発揮するのかについて解明することとした。大豆イソフラボンの免疫調節作用による抗メタボリックシンドローム療法に関しては、その分子機構を内臓脂肪におけるサイトカイン産生および免疫細胞群の解析から明らかにする。また、リンパ球が欠損した遺伝子欠損マウスやリンパ球欠損マウスを用い、大豆イソフラボンの作用を発揮する標的細胞を明らかにする。さらに、大豆イソフラボンは女性ホルモン的一种である17-エストラジオールに構造が類似していることが知られており、生体への大豆イソフラボンの作用はエストロゲン様作用と抗エストロゲン作用のどちらもが報告されている。一方で、大豆イソフラボンの生理作用とエストロゲンレセプターとの関連をin vivoで直接証明した研究は皆無である。そこで本研究では、T細胞特異的にエストロゲンレセプターが欠損したマウスを作製し、大豆イソフラボンによるリンパ球機能制御によりメタボリックシンドロームに対する新たな予防・治療法の確立を目指した。

3. 研究の方法

8週齢雌 C57BL/6J マウス (WT マウス) および T 細胞および B 細胞が欠損した C57BL/6J マウスの遺伝子背景を有する recombination activation gene (RAG)-1 遺伝子欠損マウス (RAGKO マウス) に対して高脂肪食 (脂肪エネルギー比 45%) を長期間摂取させ、全身の慢性炎症を引き起こし、高血糖およびインスリン抵抗を惹起させたマウスをヒトの肥満・糖尿病モデルとして用いた。大豆イソフラボン的一种であるエクオールを dimethyl sulfoxide (DMSO) に溶解させ、マウス体重 1 kg あたり 20 mg となるように 25 mM Na₂CO₃ で調整して毎日経口投与を行った。8 週間経口投与を行い、投与開始 6 週目にグルコースおよびインスリン負荷試験を行い、インスリン抵抗性について観察を行った。大豆イソフラボンの投与 8 週目に解剖を行い、内臓脂肪、皮下脂肪、肝臓、脾臓、血液を採取した。脂肪組織におけるマクロファージ関連遺伝子発現をリアルタイム PCR 法にて測定を行うとともに、全身性の炎症像を解析するため、血清中のトリグリセリド、総コレステロール、遊離脂肪酸および総コレステロールの測定を行った。内臓脂肪における炎症の程度 (M1/M2 マクロファージ比率、炎症性サイトカインの mRNA 発現レベル) を比較することで炎症性マクロファージの分化誘導に対する T 細胞および B 細胞の関与を検討した。

さらに、大豆イソフラボンは女性ホルモン的一种である 17 β -エストラジオールに構造が類似していることが知られており、生体への大豆イソフラボンの作用はエストロゲン様作用と抗エストロゲン作用のどちらもが報告されている。一方で、大豆イソフラボンの生理作用とエストロゲンレセプターとの関連を *in vivo* で直接証明した研究は皆無である。そこで本研究では、全身性ではなくリンパ球特異的にエストロゲンレセプターを欠損させたマウスを作製し実験に供した。T 細胞特異的にエストロゲンレセプターを欠損するマウスを作製するために遺伝子コンディショナルノックアウト方法の 1 つである Cre-loxP システムを用いた。CD4 プロモーター領域下流において Cre 酵素を発現する遺伝子導入マウスとエストロゲンレセプター遺伝子が loxp 配列で挟まれている遺伝子導入マウスを交配させた。この T 細胞特異的エストロゲンレセプター欠損 (T cell-specific estrogen receptor knockout mice : T-ERKO) マウスを用い、T 細胞機能に対するエストロゲンの作用について検討を行った。野生型 (WT マウス) および T 細胞特異的エストロゲンレセプター欠損マウス (T-ERKO マウス) に対して卵巣摘出手術 (OVX) を行い、対照群として偽手術 (sham) を行った。卵巣摘出手術後 4 週目から実験終了時までコントロール食を摂取させた。アジュバンドとして水酸化アルミニウムを用いて卵白アルブミンで免疫を施し、さらに 2 週間後に再度卵白アルブミンで免疫を施した。1 度目の免疫から 3 週間目に解剖を行い、脾臓および血液を採取した。各マウスの脾細胞中のリンパ球サブセットについてフローサイトメトリー法を用いて解析した。また各マウスの脾細胞を抗原である卵白アルブミンで再刺激をした際のサイトカイン産生量の測定および細胞増殖反応について検討した。さらに血清中に含まれる抗原特異的抗体産生について ELISA 法を用いて解析した。群間の統計解析は二元配置分散分析後、多重比較検定を用いて解析した。

4. 研究成果

雌性 WT マウスおよび RAGKO マウスに対して高脂肪食を摂取させ、食餌誘導性肥満マウスに対してエクオールを経口投与した。WT 群および RAGKO 群どちらもがエクオール投与により体重増加が抑制されており、その程度は WT マウスと比較して RAGKO マウスの方がより強く抑制されていた。各マウスの内臓脂肪、皮下脂肪、肝臓重量を測定したところ、肝臓重量はどの群も差が見られなかったものの、内臓脂肪および皮下脂肪は WT マウスと比べて RAGKO マウスで減少したことが確認された。次に、全身性の慢性炎症により惹起されるメタボリックシンドロームでは糖代謝異常が引き起こされるため、エクオールが糖代謝異常に与える影響とその作用に対するリンパ球の関与について検討した。WT マウスおよび RAGKO マウスの対照群と投与群でグルコース負荷試験とインスリン負荷試験を行った。グルコース負荷試験では、WT マウスと RAGKO マウス間で有意な差は認められなかった。一方インスリン負荷試験において、エクオール投与群で糖代謝が有意に改善され、WT 群と RAGKO 群のどちらもエクオール投与群で糖代謝の改善が見られた。脂質代謝において、血清中の遊離脂肪酸濃度が WT 群に比べて RAGKO マウスで有意に低くなった。エクオール投与によって糖代謝および脂質代謝に変動が見られたことより、内臓脂肪における遺伝子発現について検討した。その結果、マクロファージの指標である Emr-1 と炎症性マクロファージのマーカーである Arg-1 の発現レベルに対して、遺伝子的背景およびエクオールの投与の有無による有意な差は認められなかったが、RAGKO マウスに対してエクオールを投与すると Emr-1 発現が高まる傾向を示した。さらに、炎症性サイトカインである TNF- α および IL-6 の遺伝子発現レベルをみたところ、WT 群に比べて RAGKO 群で発現が高まる傾向にあった。また RAGKO 群での発現はエクオール投与によって弱まる傾向を示した。炎症性サイトカインである IL-10 を産生する調節性 T 細胞の転写因子である Foxp3 遺伝子の発現レベルは、WT マウスに比べて RAGKO マウスで上昇するが、エクオール投与群でその発現が抑制される傾向を示した。このことから、エクオールの糖代謝改善作用に対して T 細胞および B 細胞が関与する可能性がある。

さらに、大豆イソフラボン¹⁷は女性ホルモン¹⁷の一種である17-エストラジオールに構造が類似しており、生体への大豆イソフラボンの作用は、エストロゲン様作用および抗エストロゲン様作用の相反する作用が知られている。そこで、T細胞特異的エストロゲンレセプター欠損マウスを作製し、T細胞機能に対するエストロゲンの作用を検討した。雌性WTマウスおよびT-ERKOマウスに対して卵巣摘出手術(OVX)を行い、対照群として偽手術(sham)を行った。卵白アルブミンで免疫を施したときの抗原特異的免疫応答について検討した。まず、解剖時における各群(WT-sham, WT-OVX, T-ERKO-sham, T-ERKO-OVX)のマウスの脾細胞中のリンパ球サブセットについてフローサイトメトリー法を用いて解析したところ、脾細胞中におけるCD4陽性T細胞の割合は4群間で有意な差は認められなかった一方、CD8陽性T細胞は、sham群においてWT群に比べてT-ERKO群で有意に割合が増加した。しかしながら、卵巣摘出により割合の上昇は消失した。またCD4陽性T細胞中のナイーブまたはメモリーT細胞の割合では、ナイーブT細胞の割合は4群間に差は認められなかったものの、メモリーT細胞集団では、sham1群においてWT群と比較するとT-ERKO群で有意に減少した。このことから、**T細胞特異的なエストロゲンレセプターはCD4陽性またはCD8陽性T細胞への分化、さらにはCD4陽性T細胞サブセットに関連している可能性がある。**

次に、抗原特異的な免疫誘導におけるサイトカイン産生に対するT細胞特異的なエストロゲンレセプターの関与について検討するため、各マウスの脾細胞に対して卵白アルブミンで再刺激をし、その時の培養上清に含まれるサイトカイン産生量を測定した。Th1細胞系サイトカインのIFN- γ 産生はWT群において卵巣摘出を行わなかったWT-sham群に比べ、摘出を行ったWT-OVX群で有意に減少した。さらに、T-ERKO群ではWT群に比べて産生量が有意に減少したが、T細胞特異的にエストロゲンレセプターが欠損しているとOVXによる内在性エストロゲンが枯渇したことによる差は認められなくなった。一方で、Th2系サイトカインのIL-4産生はWT群では卵巣摘出により産生量が増加する傾向にあるが、T細胞特異的にERが欠損すると産生量が抑制され、shamとOVXの両群で差は認められなかった。このことから、T細胞に対してエストロゲンはTh1を促進し、Th2を抑制することが示された。さらに、抗原特異的な細胞増殖反応および血清中に含まれる抗原特異的な抗体(IgG, IgG1, IgG2aおよびIgE)産生について検討した。その結果、細胞増殖反応およびいずれの抗体産生においても4群間で有意な差は認められなかった。

メタボリックシンドローム病態には慢性炎症が関与しているが、抗炎症に関わるM2マクロファージはT細胞から産生されるサイトカインのIL-4によって分化する。今回、**抗炎症性マクロファージへの分極に関わるIL-4の産生調節にエストロゲンもしくはT細胞特異的なエストロゲンレセプターが関与している可能性がわかった。**

以上のことより、大豆イソフラボン¹⁷の一種であるエクオールによる糖代謝制御には免疫細胞を介する機構が存在する可能性があり、さらにT細胞特異的なエストロゲンレセプターは抗炎症性マクロファージの分極に関与するIL-4の産生に関わっていることが示唆された。今回、食品中の栄養機能性成分によりリンパ球が炎症細胞の機能制御に関わり糖代謝制御を行うという新たな機構を提唱している。しかしながら、糖代謝異常は筋肉や肝臓といった臓器も関与しているため、内臓脂肪だけでなく様々な臓器におけるマクロファージやリンパ球の浸潤・機能について検討を行う必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中本晶子、中本真理子、首藤恵泉、酒井徹
2. 発表標題 ポリメトキシフラボンの免疫細胞における機能評価-マクロファージおよび肥満細胞での解析-
3. 学会等名 日本栄養改善学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------