

令和元年6月24日現在

機関番号：84420

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K00902

研究課題名(和文)植物性エストロゲンによる細胞分化と細胞増殖における自食作用の役割

研究課題名(英文)Role of autophagy on cell growth and differentiation by phytoestrogens

研究代表者

石見 佳子 (ISHIMI, YOSHIKO)

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・国立健康・栄養研究所・シニアアドバイザー

研究者番号：50154159

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、植物性エストロゲンの脂質代謝及び骨代謝調節作用のメカニズムを明らかにすることを目的として、オートファジーとの関連を検討した。安全性の評価として、植物性エストロゲンの細胞増殖に対する作用を、分子レベルで明らかにすることを目的とした。本研究により、オートファジーは、脂肪細胞と骨芽細胞の増殖と分化に関連していること、植物性エストロゲンであるイソフラボンは、脂肪細胞のオートファジーには抑制的に、骨芽細胞には促進的に作用する可能性が示唆された。乳がん細胞の増殖については、イソフラボン代謝産物のエクオール存在下、そして、通常血清存在下とも、オートファジーはG1期進行を促進することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において、骨・脂質代謝に対する植物性エストロゲンの作用とそのメカニズムを明らかにすることで、植物性エストロゲンの有効性・安全性評価に貢献する。また、イソフラボン代謝産物エクオールをはじめとする植物性エストロゲンは、エストロゲン様作用を示すことから、生殖関連組織の細胞増殖に対する影響を評価する必要がある。本研究では、標的細胞のDNA合成の促進を細胞周期の進行制御、さらにはオートファジーの役割に注目して検討した。植物性エストロゲンの細胞増殖と分化に対する作用に関して新たな科学的根拠が蓄積されたことから、本研究は、植物性エストロゲンを含む食品の安全確保に貢献するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The relationship between autophagy and differentiation in adipocytes and osteoblasts was examined. The mRNA expression of autophagy-related genes of adipocyte MC3T3-L1 cells increased on day 2 of the culture. These gene expressions in osteoblast MC3T3-E1 cells increased depending on cell growth. Isoflavone decreased the gene expressions in adipocytes but enhanced them in osteoblasts. These results suggest that autophagy may be involved in cell growth and differentiation of both cells.

Effect of inhibitors for autophagy on cell growth cultured in the presence of equol was examined in breast cancer MCF-7 cells. The presence of bafilomycin decreased the proportion of S phase cells and the chromatin-bound MCM2-7 proteins, while the amounts of HIF-1A proteins increased. Interaction between MCM2-7 and HIF-1A was detected by immuno-precipitation. Thus, the cell cycle progression in G1 phase proceeds by autophagic degradation of HIF-1A which may act as a negative regulator of MCM2-7 function.

研究分野：健康科学

キーワード：植物性エストロゲン 大豆イソフラボン 自食作用 細胞周期 骨芽細胞 乳がん細胞 細胞増殖 細胞分化

1. 研究開始当初の背景

高齢化が急速に進む中、我国の保健医療は生活習慣病に対する予防が重要課題となっている。特に、女性は閉経期を迎えるとエストロゲン分泌が低下し、骨粗鬆症や脂質代謝異常症など生活習慣病のリスクが増加する。これらの発症には食事や運動等の生活習慣が関わっていることから、その改善による生活習慣病の予防が期待される。

大豆イソフラボンをはじめとする植物性エストロゲンは、弱いエストロゲン様作用を持つことから、これまでに閉経期の骨および脂質代謝異常に対する有用性が示唆されている。また、大豆イソフラボンのうちダイゼインは、腸内細菌により、より強いエストロゲン様活性を持つエクオールへと代謝される。我々はこれまでの研究で、骨粗鬆症モデルマウスにおいて、エクオールの摂取が大腿骨の骨量減少を有意に抑制し、全身の脂肪量を減少させること (J. Nutr. 134; 2623, 2004)、閉経後女性へのイソフラボンの介入試験において、エクオール産生者は非産生者と比較し、骨量減少が抑えられ、体幹部体脂肪の増加が抑制されることを報告している (Menopause 14; 866, 2007)。また、これまでの基礎研究において、エクオールは脂肪細胞 (MC3T3-L1) 及び血管内皮細胞において、低濃度でその分化を促進することを報告した (Biosci. Biotechnol. Biochem. 77: 201-204, 2013)。しかし、イソフラボンの脂質代謝及び骨代謝調節作用のメカニズムの詳細は不明な点が多い。

一方、近年、脂質代謝及び骨代謝にオートファジーが関与していることが報告されている。オートファジーは、不要なタンパク質や細胞内器官を分解する大規模な機構であり、加齢に伴って低下する。また、茶カテキンやフラボノイド等のポリフェノールが、細胞のオートファジーを調節することで、脂質代謝及び骨代謝を改善し、抗老化作用を発揮している可能性が示唆されている (J. Biol. Chem. 288:22693-705, 2013, PLoS One. 29;9:e87161, 2014, PLoS One. 1;10:e0128984, 2015)。イソフラボンをはじめとする植物性エストロゲンはポリフェノール構造を持っていること、エストロゲンは骨及び脂質代謝を調節することから、大豆イソフラボンを代表とする植物性エストロゲンの骨・脂質代謝に対する作用もオートファジーが関与している可能性が推察される。そこで本研究では、植物性エストロゲンの骨・脂質代謝調節作用のメカニズムを明らかにすることを目的として、オートファジーとの関連を中心に検討する。

さらに安全性の評価として、植物性エストロゲンの細胞増殖に対する作用を、分子レベルで明らかにする。イソフラボンの細胞増殖作用に対する検討においては、我々はこれまでにヒト乳がん由来 MCF-7 細胞をエクオールの存在下に培養すると、DNA 合成細胞の割合が 2 倍程度増加すること、その促進は、細胞密度が高い条件でより顕著に見られることを見出している (2014 年日本生化学会年会、2015 年日本生化学会関東支部例会)。イソフラボンは細胞周期の進行を促進することで、DNA 合成期細胞の割合を増加させる可能性が考えられるが、その機構は不明である。本研究において我々は、イソフラボン添加時に、様々な細胞周期マーカータンパク質の挙動を調べることにより、細胞周期進行促進の機構を明らかにし、さらにオートファジーの関与について調べる。

2. 研究の目的

1) 植物性エストロゲンによる脂肪細胞と骨系細胞の増殖と分化におけるオートファジーの役割: 植物性エストロゲン (ダイゼイン、ゲニステイン、エクオール) は、これまでに脂肪細胞や骨芽細胞の増殖と分化、破骨細胞の活性抑制に関連することが明らかになっている。そこで本研究では、これらの植物性エストロゲンの脂肪細胞、骨芽細胞、破骨細胞に及ぼす影響とそのメカニズムを明らかにする。特に、これらの細胞の増殖と分化、活性維持等にオートファジーが関与するかどうかについて検討する。

2) 大豆イソフラボンによる細胞周期進行促進機構とオートファジーの役割: イソフラボンは細胞周期の進行を促進することで、DNA 複製細胞の割合を増加させる可能性が考えられるが、その機構は不明である。本研究において我々は、ヒト乳がん細胞の培養系にイソフラボンを添加し、様々な細胞周期マーカータンパク質の挙動を調べることにより、細胞周期進行促進の機構を明らかにする。ここで、近年、G1 から S 期への進行に中心的な役割を担う CDK (サイクリン依存性キナーゼ) が、DNA 複製因子の機能を直接的に阻害する低酸素誘導転写因子 HIF-1 α をオートファジー (シャペロン媒介型) によって分解することが示されている。そこで、特に、イソフラボン添加時の DNA 合成期細胞の増加に、オートファジーが関与するかどうかを検討する。

3. 研究の方法

28 年度: 有効性評価として大豆イソフラボンとその代謝産物エクオールの脂肪細胞のオートファジー関連遺伝子発現に対する作用を、MC3T3-L1 細胞を用いて検討した。安全性評価として、イソフラボン添加が、MCF-7 細胞のサイクリン D1、Myc および MCM2-7 タンパク質に対し、量的、質的影響を与えるかどうかをタンパク質のウエスタン解析により調べた。

29 年度: 有効性評価として、引き続き MC3T3-L1 細胞を用い、Monodansyl cadaverine 蛍光色素を取り込ませることによりオートリソソームを検出し、オートファジーを定量化した。さらに、培養系にイソフラボンを添加して、脂肪細胞の増殖とオートファジーに対する影響を評価した。安全性評価として、イソフラボン添加 MCF-7 細胞に、オートファジー阻害剤や活性化剤を共存させ、DNA 合成や細胞増加に対する影響を調べた。DNA 合成細胞は DNA に取り込まれたプロモドオキシウリジンを蛍光顕微鏡で検出することで検出した。処理細胞における、サイクリン D1、Myc、MCM2-7 タンパク質、および HIF-1A タンパク質の変動をウエスタン解析により調べた。

30年度：有効性評価として、骨芽細胞様株細胞 MC3T3-E1 の増殖と分化におけるオートファジーの関連と大豆イソフラボン処理の影響について検討した。安全性評価として、エクオール添加 MCF-7 細胞に、バフィロマイシン(BAF)を添加して培養し、その影響を調べた。

4. 研究成果

28年度：有効性評価：MC3T3-L1 細胞の培養 2 日目に Beclin-1、LC3a、LC3b、ATG5 等のオートファジー関連遺伝子の発現が上昇し、3 日目から低下し、7 日目まで継続することが判明した(図 1)。ゲニステインは、オートファジー初期に小胞体膜の IP3 キナーゼと結合する Beclin-1 の遺伝子発現を抑制した。

安全性評価：乳がん由来の MCF-7 細胞を 1 μ M ダイゼイン存在下に一日培養した時に、S 期細胞の割合が約 2 倍に増加した(図 2)。この時に、クロマチン結合性 MCM7 タンパク質の量は 1.5 倍に増加した。一方で、サイクリン D1 の核局在化は変わらなかった。植物性エストロゲン非存在下で、MCF-7 に、オートファジー阻害剤のバフィロマイシンを添加すると、S 期細胞の割合が低下し、一方で、多くの細胞が S 期中途中で停滞することが示唆された。

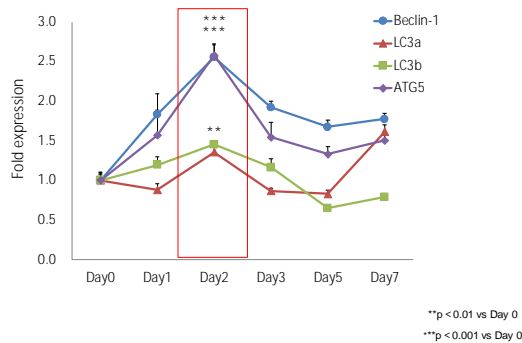


図 1. 脂肪細胞のオートファジー関連遺伝子の発現 (時間経過)

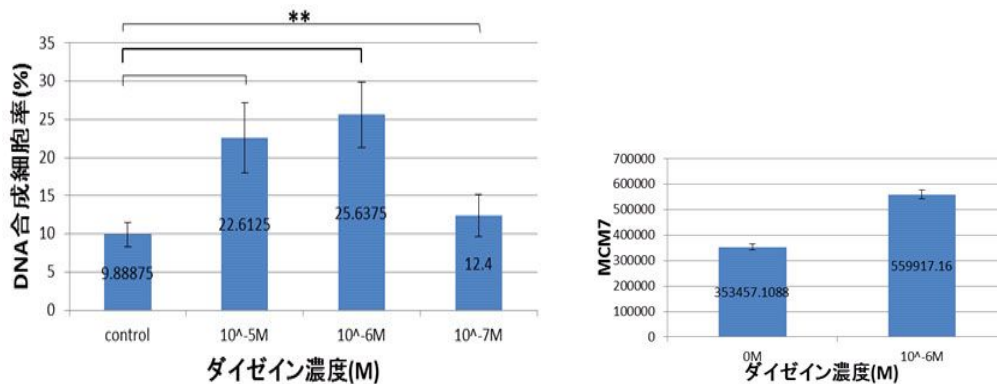
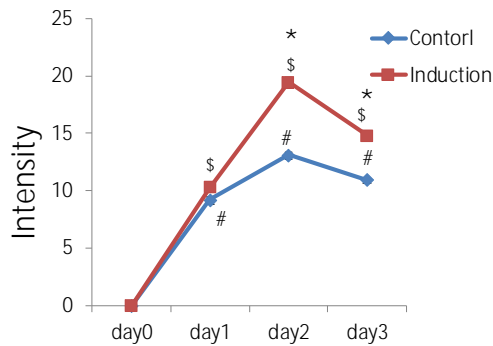


図 2 ダイゼインの細胞増殖への影響：MCF-7 細胞をダイゼインを含む培養液中で 2 日間培養し、DNA 合成中の細胞の割合を求め(上)、クロマチン結合性の MCM7 タンパク質の量を求めた(下)。

29年度：有効性の評価では MC3T3-L1 細胞を用い、脂肪細胞の増殖と分化に伴い発現するオートファジーについて、オートリソソームを蛍光染色することで評価した。MC3T3-L1 細胞をデキサメサゾン、IBMX 及びインスリンで分化誘導した結果、培養 1 日目にオートファジーに関連するオートリソソームが誘導され、2 日目にピークに達した。分化誘導によるオートリソソームの発現は、1 - 3 日目全てにおいて、対照に比べて有意に高値を示した。本結果は、昨年度に解析したオートファジー関連遺伝子の発現の時間経過結果と一致するものである。ゲニステイン及びダイゼインの添加により、オートファジーは抑制された。



平均値 ± SEM
 * Control群とInduction群の間に有意差あり (p<0.05)
 # Control群において、day0と比較し有意差あり (p<0.05)
 \$ Induction群において、day0と比較し有意差あり (p<0.05)

図3. 脂肪細胞のオートリソソームの検出 (時間経過)

安全性の評価では、増殖を刺激する低分子物質を含む通常血清下で培養した MCF-7 細胞を、リソソーム阻害剤のバフィロマイシン存在下に 24 時間、あるいはシャペロン介在オートファジー阻害剤の 3-MA 存在下に 18 時間培養した。両者で、DNA 複製細胞の割合は有意に低下し、クロマチン結合性 MCM4 タンパク質の割合も低下した(図4)。よって、本培養条件下で、オートファジーはクロマチン結合性 MCM2-7 レベルを高めることで DNA 複製に対し正に働くと考えられる。この時に低酸素誘導転写因子 HIF-1A は MCM4 と同様にクロマチンから解離する変化を示した。一方で、MCM2-7 と HIF-1A の直接的な相互作用を、昆虫細胞内発現と引き続き pull-down 実験で調べたところ、HIF-1A と MCM2,3,4 との結合性が示された。

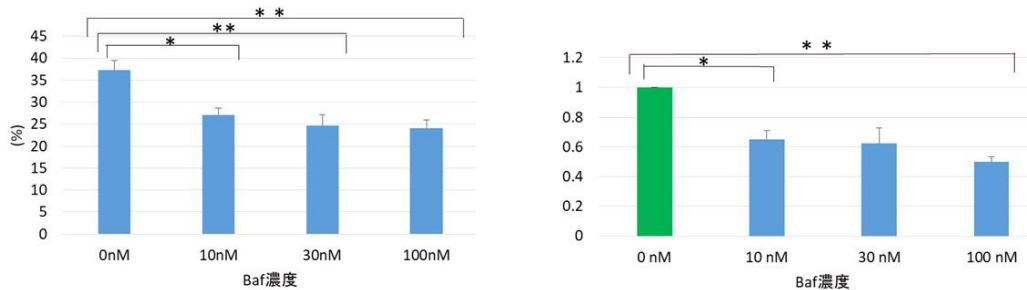


図4 エクオール添加 MCF-7 細胞増殖に対するバフィロマイシンの影響：MCF-7 細胞に 1 μM のエクオールを加え 1 日間培養する時、BAF を共存させた。免疫細胞染色の結果から、DNA 合成中の細胞の割合 (上) とクロマチン結合性の MCM4 の量 (下) を求めた。MCM4 について相対値として示す。

30 年度：有効性評価では、MC3T3-E1 は、培養 3 日目よりオートオートファジーに関連する遺伝子の mRNA 発現が上昇し、10 日目まで上昇傾向を示した。さらに大豆イソフラボンであるダイゼイン及びゲニステイン (0.1-10 μM) の 10 日間の処理により、分化マーカーであるアルカリフォスファターゼ活性が上昇するとともに、オートファジーに関連する遺伝子発現が増加した。これらの結果は、骨芽細胞の増殖と分化にオートファジーが関連していること、大豆イソフラボンはオートファジーを促進して細胞分化を促進する可能性が示唆された。安全性評価では、エクオール添加 MCF-7 細胞に、バフィロマイシン (BAF) を添加して培養し、その影響を調べた。BAF 添加により DNA 合成細胞の割合は減少したことから、オートファジーが細胞周期 G1 期の進行に関わると考えられる。同じ条件でクロマチン結合性 MCM2-7 タンパク質の量は減少した (図5)。MCM2-7 は DNA 複製ヘリカーゼとして機能するので、この変化が DNA 合成細胞減少の原因と考えられる。3-MA 添加によってもほぼ同様の変化が認められた。オートファジーにより分解制御を受ける低酸素誘導転写因子 HIF-1A は、BAF の存在下で、その存在量は増加した。一方で、分解抵抗性変異 HIF-1A の 293T 細胞での強制発現により、クロマチン結合性 MCM2-7 量は減少した。よって、エクオール添加 MCF-7 細胞において、MCM 機能を負に制御する HIF-1a がオートファジーにより分解されることで、G1 期の進行が促進される可能性が考えられる。

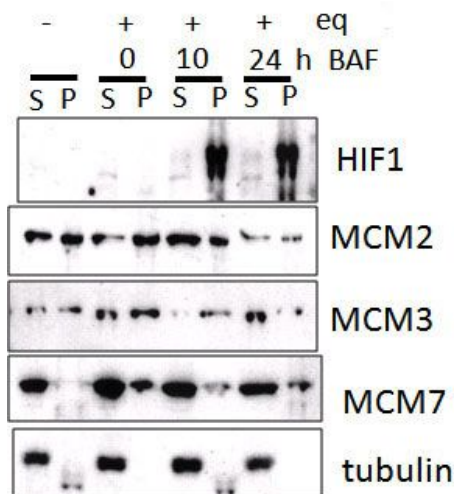


図5 エクオール添加 MCF-7 細胞に対するバフィロマイシンの影響: MCF-7 細胞培養液に 1 μM のエクオール(eq)を加え、24 時間培養した。その際 100 μM の BAF を各時間共存させた。トリトン可溶性(S)と不溶性(P)画分中の各タンパク質をウエスタン解析で同定した。

3 年間の本研究により、オートファジーは、脂肪細胞及び骨芽細胞の増殖と分化に関連していること、大豆イソフラボンは脂肪細胞のオートファジーには抑制的に、骨芽細胞には促進的に作用することが判明した。乳がん細胞の増殖については、イソフラボン代謝産物のエクオール存在下、そして、通常血清存在下とも、オートファジーは G1 期進行を促進することが示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 8 件) 主なもの 4 件

1. Tousen Y, Matsumoto Y, Matsumoto C, Nishide Y, Nagahata Y, Kobayashi I, Ishimi Y. The combined effects of soy isoflavones and resistant starch on equol production and trabecular bone loss in ovariectomised mice. *British J Nutr* 査読有 116:247-257, 2016 DOI:10.1017/S0007114516001537
2. Matsumoto Y, Tousen Y, Nishide Y, Tadaishi M, Kato K, Ishimi Y. Combined effects of soy isoflavones and milk basic protein on bone mineral density in hind-limb unloaded mice. *J Clin Biochem Nutr* 査読有 58,141-145,2016 DOI: 10.3164/jcbs.14-137
3. Tsuji M, Tanaka T, Nagashima R, Sagisaka Y, Tousen Y, Nishide Y, Ishimi Y, Ishimi Y. Effect of daidzein and equol on DNA replication in MCF-7 cells. *J Biochem* 査読有 163:371-380, 2018 DOI: 10.1093/jb/mvy006
4. Kruger MC, Middlemiss C, Katsumata S, Tousen Y, Ishimi Y. Isoflavones and green kiwifruit: A pilot study assessing the effects on equol production, bone turnover and gut microflora in healthy postmenopausal New Zealand women. *Asia Pacific J Clin Nutr* 査読有 27:347-358, 2018 DOI: 10.6133/apjcn.062017.06.

[学会発表](計 7 件) 主なもの 4 件

1. 石見幸男、匂坂有花、田中智紀、石見佳子 大豆イソフラボンによる乳がん由来 MCF-7 細胞 DNA 複製の促進、平成 28 年度日本生化学会関東支部例会、2016. 自治医科大
2. 東泉裕子、西出依子、竹林純、梅垣敬三、淵野裕之、河野徳昭、乾貴幸、吉松嘉代、川原信夫、石見佳子 閉経後モデルマウスにおける葛の花由来イソフラボン抽出物の安全性・有効性評価 - 大豆イソフラボンとの比較 - 第 72 回日本栄養・食糧学会、2018.岡山市
3. 宮本優真、山崎美穂、石見幸男 HIF-1 と MCM-7 との相互作用 - オートファジーとの関係 日本生化学会関東支部例会、2018.さいたま市
4. Ishimi Y, Tousen Y. Assessment of safety and efficacy of phytoestrogen, isoflavone, on bone metabolism in animal models. 8th Annual World Congress of Molecular & Cell Biology (国際学会招待講演) 2018, 福岡市

[図書] (計 3 件) 主なもの1件

1. 石見佳子. イソフラボンの吸収、代謝、作用機序 食品機能性成分の吸収・代謝・作用機序, シーエムシー出版, pp293-301, 2018

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

なし

6．研究組織

(1)研究代表者

石見佳子 (Yoshiko ISHIMI)

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所 国立健康・栄養研究所・シニアアドバイザー

研究者番号：50154159

(2)研究分担者

石見幸男 (Yukio ISHIMI)

茨城大学・理学部・教授

研究者番号：80159772

(3)連携研究者

東泉裕子 (Yuko TOUSEN)

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所 国立健康・栄養研究所・食品保健機能研究部

食品安全・機能研究室長

研究者番号：20360092