

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：37109

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26750059

研究課題名(和文)大豆イソフラボン構成成分の乳癌予防機序の解析

研究課題名(英文) Mechanistic study of anticancer activities of isoflavone components in breast cancer

研究代表者

小野 美咲 (Misaki, Ono)

中村学園大学・栄養科学部・助教

研究者番号：10441726

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：大豆イソフラボンのゲニステイン(GEN)、ダイゼイン、グリシテイン、エクオール(EQ)の併用による抗癌作用をエストロゲン受容体(ER)あるいはHER2発現の異なる3種の乳癌細胞で検討した。GENとの併用による増殖抑制効果はEQで最も強く、ER陽性のMCF-7でのみ有意な相乗作用を示し、アポトーシス関連蛋白のBax/Bcl-xL比の上昇によるアポトーシス誘導と判明した。この結果は欧米に比べアジア人がダイゼイン EQの転換能が高く、血中のGENに加えEQ濃度が高いということが乳癌リスクが低い一つの理由と考えられる。しかし、この相乗効果は乳癌発症モデルラットでは認められず、さらなる研究が必要である。

研究成果の概要(英文)：We investigated the anticancer activity of soy isoflavones, genistein (GEN), daidzein, glycitein and equol, a metabolite of daidzein, and their interaction in three human breast cancer cell lines that differ in their receptor status. Synergistic interactions between GEN and equol were strongest than those between GEN and other isoflavone components, with significant synergy observed in MCF-7 cells. At the molecular level, synergistic interaction of GEN and equol combination appears to be brought by apoptosis induction through elevation of Bax/Bcl-xL expression ratio, thus providing mechanistic rationale for isoflavones for the prevention of ER-positive human breast cancer for Asian women who are more capable than Western women of converting daidzein to equol. Genistein-containing diet supplemented with equol could not delay the development of mammary carcinoma, showing any preventive activity. Currently, we are continuing animal experiments with modification of isoflavone doses.

研究分野：栄養学

キーワード：大豆イソフラボン 乳癌 抗癌機序 癌予防機序

1. 研究開始当初の背景

- (1) 乳癌は日本人女性の部位別癌罹患率第1位の癌で、現在もなお急増し続けており、医療費の増加および乳癌死亡者数の増加など深刻な状況であるため、本邦において乳癌の対策は喫緊の課題である。乳癌発症は地域差があり、欧米はアジアに比べて格段に罹患率が高いが、欧米に移住したアジア女性の乳癌発症率は欧米レベルに高率になるという特徴をもつ。さらに、本邦での乳癌急増と生活スタイルの欧米化は時刻を同じくしていることから、『食事』を含めた環境因子が乳癌発症の強い要因と考えられる。よって、乳癌発症に關与する食事性因子とそのメカニズムを突き止めることは乳癌予防において極めて重要である。
- (2) 『大豆イソフラボン』はゲニステイン(GEN)、ダイゼイン、グリシチン、イコール(ダイゼインの代謝産物)を構成成分とする大豆に含まれるフィトケミカルである。摂取量に顕著な地域差(アジア>欧米)があることなどから、乳癌予防の可能性を持つ食因子として考えられている。食事調査による疫学研究では乳癌のリスクを下げると報告されているが、血中の大豆イソフラボン濃度を測定した疫学研究や細胞および動物レベルの基礎研究では、一貫した結果は得られていない。
- (3) 以前の基礎研究では大豆イソフラボン構成成分を単独で解析していることが考えられる。我々の乳癌発症モデルラットによる研究でも、GEN 単独では予防効果がないが、GEN を含むすべての大豆イソフラボン構成成分存在下において顕著な乳癌予防効果をもつという結果を得ており(Ono M et al. Nutrition and Cancer. 2012.) 細胞培養実験においても併用添加は、単独添加では見られない強い相乗的な細胞増殖抑制効果を見出している(Ono M et al. Experimental Biology, 2012, San Diego, CA) よって、大豆イソフラボンは複数の成分の併用が乳癌予防の要であることが考えられた。
- (4) さらに、ホルモン受容体発現や癌遺伝子発現は抗癌薬や分子標的薬の薬剤感受性に大きく影響するため、化学療法においては最も考慮される点である。我々の研究においてもフィトケミカルの抗癌作用もホルモン受容体発現や癌遺伝子発現により異なる分子メカニズムを示すことを見出した(Ono M et al. Anticancer Res. 2013.)(Ono M et al. Biochem Biophys Res Commun.2013.) 特に乳癌細胞はエストロゲン受容体(ER)、プロゲステロン受容体(PR)

HER2 発現によりサブタイプが分類され、サブタイプにより治療法が全く異なるため、大豆イソフラボンによる抗癌作用の解析も同様にサブタイプ別の解析が必要である。従来の乳癌発症モデルは乳癌が発症してからの腫瘍増殖速度や腫瘍形成数でしか評価できず、腫瘍が形成されるまでの期間を検討したものでないため、乳癌一次予防効果を評価できていない。

2. 研究の目的

細胞実験により代表的な大豆イソフラボンの乳癌サブタイプあるいは特異的癌遺伝子発現細胞での分子機序を解析するとともに、その予防効果をアルキル化剤である Ethyl Methanesulphonate(EMS)を低濃度、長期間経口投与させ腫瘍形成させる、乳癌発症モデルラット(Ueo H et al. 1981.)による腫瘍未形成期間の評価方法を用いて評価し、大豆イソフラボン構成成分の乳癌予防機序を解析する。

3. 研究の方法

(1) **乳癌細胞に対するゲニステイン(GEN)の細胞増殖抑制機序解析**

乳癌細胞のサブタイプはエストロゲン受容体(ER)、プロゲステロン受容体(PR)、HER2 発現により分類される。MCF-7 (ER/PR/HER2 : +/+/-)、SK-BR-3 (ER/PR/HER2 : -/-/+)、MDA-MB-468 (ER/PR/HER2 : -/-/-)の3種の乳癌細胞を用い、代表的な大豆イソフラボン3種(ゲニステイン(GEN)、ダイゼイン、グリシチン)およびダイゼインの代謝産物であるエクオール(EQ)の細胞増殖抑制効果をWST-1アッセイ、アポトーシス誘導および細胞周期解析をフローサイトメーター、増殖/生存、アポトーシス、細胞周期関連シグナル蛋白の活性をウエスタンブロッティングにより解析する。

(2) **大豆イソフラボン構成成分併用添加による細胞増殖抑制効果および抑制機序の解析**

単独添加実験で最も高い細胞増殖抑制効果がみられたGENと他の大豆イソフラボン構成成分との組み合わせによる併用添加効果を上記3細胞を用いてWST-1アッセイによる細胞増殖抑制効果評価、フローサイトメーターによる細胞周期解析、およびウエスタンブロッティングによるシグナル伝達解析により機序を検討する。

(3) **エチルメタンサルホン酸(EMS)誘発性乳癌モデルラットによる有効性の検証**

(2)の結果、最も強い細胞増殖抑制効果をもつ組み合わせをEMS誘発性の

乳癌発症モデルラットにて検証する。血中のホルモン濃度、大豆イソフラボン濃度の測定、免疫組織染色による受容体状態の評価および、HE染色による組織観察により予防機序を解析する。

(4) 癌遺伝子導入ヒト癌細胞による大豆イソフラボンの癌遺伝子特異性解析

Src あるいは Ras 導入腺癌細胞を用いて、大豆イソフラボンの細胞増殖抑制機序を細胞増殖抑制、細胞周期、シグナル伝達により解析する。

4. 研究成果

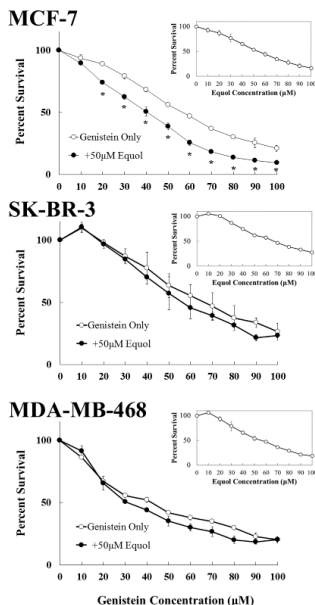
(1) 乳癌細胞に対する大豆イソフラボンのサブタイプ別細胞増殖抑制効果

MCF-7、SK-BR-3、MDA-MB-468 の3種の乳癌細胞を用い、大豆イソフラボンである、ゲニステイン、ダイゼイン、グリシチンとダイゼインの代謝産物のエクオール の4成分の単成分添加による WST-1 アッセイの結果、サブタイプに関係なく、全ての細胞でゲニステインが最も細胞増殖を抑制した。さらに細胞周期解析では、G2M 期での停止と、アポトーシス分画の増加が認められた。

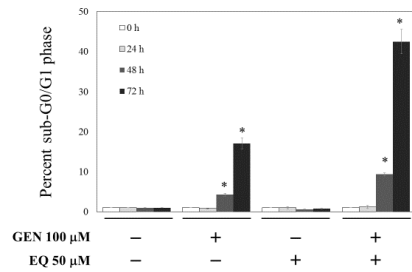
(2) 大豆イソフラボン構成成分併用添加効果

単成分添加によりいずれのサブタイプにおいても GEN が最も強い細胞増殖抑制効果を示すことが確認できたため、GEN に他の3種の大豆イソフラボンを併用添加し、増殖抑制効果を評価した。

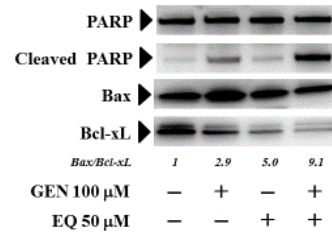
3種の細胞のうち、併用添加はエストロゲン受容体陽性細胞の MCF-7 にのみ、GEN とエクオール (EQ) の併用添加による相乗的な増殖抑制効果が認められた。その他の細胞、成分の組合せにおいても相乗効果は認められなかった。



MCF-7 細胞に対する GEN と EQ の相乗的な増殖抑制作用は主にアポトーシス誘導が特異的であり、細胞周期に対する顕著な変化は起こさなかった。



MCF-7 細胞に起こる GEN と EQ 併用時のアポトーシス誘導は抗アポトーシス蛋白の Bcl-xL の減少とアポトーシス誘導蛋白である Bax および Bax/Bcl-xL 比の上昇によるシグナル分子変化が主因であることが確



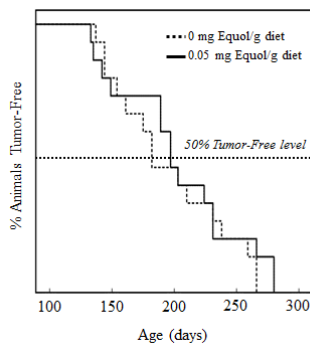
大豆イソフラボン構成成分の併用添加においては、GEN と EQ の併用添加がエストロゲン受容体陽性細胞である MCF-7 細胞に対して特異的に相乗的な増殖抑制を示し、増殖抑制の主因は Bax/Bcl-xL 比の上昇による強力なアポトーシス誘導であることが本研究により明らかとなった。

(3) エチルメタンスルホン酸 (EMS) 誘発性乳癌モデルラットによるゲニステインおよびエクオールの相乗的がん予防効果の検証

(2) による細胞実験の結果、GEN と EQ が最も強い細胞増殖抑制効果をもつ組み合わせであることが明らかになったため、EMS 誘発性のエストロゲン依存性乳癌発症モデルラットにて予防効果を検証した。エストロゲン依存性乳癌発症モデルラットは、 $10^{-3}M$ の EMS を、WKA メスラットに生後 4 週齢から 12 週間投与することにより作成した。ラットは、4 週齢に無作為に 15 匹ずつ 2 群にわけ、それぞれ大豆含有飼料 (CE-2) 1g にエクオールを 0mg (コントロール群: C 群) あるいは 0.05mg (EQ 添加群: EQ 群) 添加し 4 週齢から腫瘍形成まで投与した。生後 16 週齢に血中 GEN、EQ 濃度を測定した。腫瘍形成までの期間を比較した。

生後 16 週齢の血中 GEN 濃度は 650 ng/dl 程度であり、2 群間で有意な差はなかった。EQ 濃度は C 群: 177.9 ± 33.8 ng/dl, EQ 群: 995.3 ± 123.7

ng/dl であり、有意に EQ 群が高かった。
 腫瘍無形成期間の中央値は C 群：182.0 (95%CI: 146.7-217.3)日、EQ 群：197.0 (95%CI: 1179.4-214.7)日であり、EQ 群がやや延長したが log-rank 検定の結果、2 群間に有意な差はなかった。



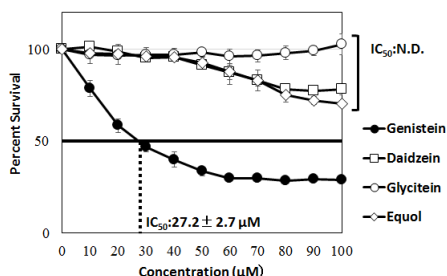
摘出腫瘍の組織学的な差もなく、全て組織学的に乳癌と判定され、免疫組織染色によりエストロゲン受容体陽性の腺癌であった。

EQ 群は C 群と比較し有意に血中 EQ が高かったが、2 群の腫瘍未形成期間には有意差はなかった。ラットにはダイゼイン EQ の変換能があり、血中に一定濃度の EQ が存在する場合には、EQ をさらに負荷することによる有益な効果は腫瘍形成抑制に対しては期待できないのかもしれない。今後、大豆イソフラボンの含まない食餌条件下での検証が必要になる。

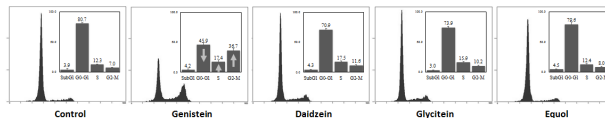
(4) 癌遺伝子導入ヒト癌細胞による大豆イソフラボンの癌遺伝子特異性解析

Src あるいは Ras 導入腺癌細胞を用いて、大豆イソフラボンの細胞増殖抑制機序を細胞増殖抑制、細胞周期、シグナル伝達により解析した。

大豆イソフラボンは、細胞増殖抑制活性測定のために、0~100 μM の濃度で添加した。細胞を WST-1 アッセイにより測定した。Src 遺伝子導入細胞は大豆イソフラボンに対して、非導入細胞と異なる感受性を示したものの、Ras 遺伝子導入細胞は、非導入細胞と同様の反応を示すという興味深い結果が得られた。Src 遺伝子導入細胞は、GEN にのみ感受性があり、他の成分に対しては耐性であった。



Src 遺伝子導入細胞に対する大豆イソフラボンの増殖抑制効果の特異性について、細胞周期解析およびアポトーシス誘導解析を行った結果、GEN 添加により、有意に G0-G1 分画が低値し、G2-M 分画が上昇した。一方で、アポトーシス誘導に対しては他の成分と有意な差がなかった。



GEN 特異的な細胞周期停止作用をさまざまな細胞周期関連蛋白を標的として解析した結果、p21Waf1/Cip1 の蛋白レベルが他の3種のイソフラボン処理およびコントロールと比較し顕著に高値であることが確認されたが、上流の p53 の蛋白レベルには変化がなかった。

癌遺伝子 Src が活性化した細胞に対して、イソフラボンは構造の違いにより抗癌活性が異なることが明らかになり、今回使用した 4 種では、GEN のみが抗癌活性が示された。さらに、GEN の HAG/src に対する主な抗癌作用は G2-M 期での細胞周期停止であり、p21 の増加が関与している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Misaki Ono, Kaoru Ejima, Takako Higuchi, Mikako Takeshima, Rei Wakimoto, Shuji Nakano. Equol Enhances Apoptosis-inducing Activity of Genistein by Increasing Bax/Bcl-xL Expression Ratio in MCF-7 Human Breast Cancer Cells. Nutrition and Cancer. 2017 in press.

小野美咲、竹嶋美夏子、中野修治. 果実・果汁飲料と機能性成分 野菜および果物の乳癌抑制効果. 食品と容器 2014 年 10 月 55(10) 598-605.

〔学会発表〕(計 11 件)

Misaki Ono, Takako Higuchi, Mikako Takeshima, Rei Wakimoto, Shuji Nakano. Differential anti-proliferative activity of isoflavones against Src- and Ras-activated human adenocarcinoma cells. EACR-AACR-SIC 2017 Special Conference. 2017 年 6 月 24 日. Florence Italy.

小野美咲、樋口貴子、竹嶋美夏子、脇本麗、中野修治. Src 活性型ヒト腺癌細胞に対する大豆イソフラボンの抗増殖活性. 第 24 回日本がん予防学会総会.

2017年6月17日. 大阪国際がんセンター(大阪).

Misaki Ono, Takako Higuchi, Mikako Takeshima, Rei Wakimoto, Shuji Nakano. Differential anti-proliferative activity of isoflavones against Src-activated human adenocarcinoma cells. Experimental Biology 2017. 2017年4月24日. Chicago Illinois USA.

Misaki Ono, Takako Higuchi, Mikako Takeshima, Shuji Nakano. Mechanistic study for interaction of soy isoflavones in vitro and in vivo animal model. International Congress of Dietetics; ICD2016. 2016年9月7日. GRANADA SPAIN.

小野美咲, 竹嶋美夏子, 樋口貴子, 中野修治. EMS誘発性乳癌モデルラットに対するエクオール腫瘍抑制効果の検討. 第23回日本がん予防学会総会. 2016年7月2日. 名古屋大学(名古屋).

Misaki Ono, Mikako Takeshima, Takako Higuchi, Takaomi Koga, Shuji Nakano. Effect of Equol on Hormone-dependent Rat Mammary Carcinoma Induced by Ethyl Methanesulphonate (EMS). AACR Annual Meeting 2016. 2016年4月17日. New Orleans Louisiana USA.

Misaki Ono, Shuji Nakano. Combination of genistein and equol has a great synergy in inducing apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells. 第74回日本癌学会学術総会. 2015年10月9日. 名古屋国際会議場(名古屋).

小野美咲. Mechanism of the anticancer effects of soyisoflavones on breast cancer. 遼寧腫瘍病院海外研究交流会議. 2015年7月8日. 中国遼寧省.

小野美咲, 中野修治. ゲニステインおよびエクオールの併用添加はそれぞれの大豆イソフラボン単独添加と比較しヒト乳癌細胞に対しアポトーシスを相乗的に誘導する. 第22回日本がん予防学会総会. 2015年6月6日. ラブレ埼玉(さいたま).

Misaki Ono, Kaoru Ejima, Mikako Takeshima, Shuji Nakano. Mechanistic study of synergistic interaction between genistein and equol in MCF-7 human breast cancer cells in vitro. 2015 American Association for Cancer Research. 2015年4月19日. Philadelphia PA USA.

小野美咲, 中野修治. Genistein とその他の大豆イソフラボン成分の併用添加によるヒト乳癌細胞増殖抑制効果の検討. がん予防学術大会 2014. 2014年6月13日. 国立がん研究センター(東京).

〔図書〕(計2件)

小野美咲, 中野修治. 最新 臨床栄養学 (第2版): 新ガイドライン対応. 井上修二, 上原 誉志夫, 岡 純, 田中 弥生 編 第22章 癌 p311-324 光生館 2015年3月 ISBN:4332020936

小野美咲, 中野修治. 認定 NST ガイドブック 2014 Chapter 21 がん患者の栄養管理 メディカルレビュー社 2014年7月 ISBN:4779213029

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小野 美咲 (ONO, Misaki)

中村学園大学・栄養科学部・栄養科学科
研究者番号: 10441726

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

(4) 研究協力者

()