

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 15 日現在

機関番号：33604

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22700763

研究課題名(和文) ホルモン依存性癌発生に関わるDNA損傷に対するメトキシフラボノイドの予防効果

研究課題名(英文) Inhibitory effects of methoxyflavonoid on DNA damage induced by catechol estrogen

研究代表者

竹村 ひとみ (TAKEMURA HITOMI)

松本大学・人間健康学部・助手

研究者番号：60295558

研究成果の概要(和文)：内因性女性ホルモンのエストロゲンは、代謝中間体カテコールエストロゲンの生成により DNA 損傷を誘発することから乳がんリスク因子の1つとされている。メトキシフラボノイドのクリソエリオールがもつ平面構造とメトキシ基は、エストロゲン代謝酵素の選択的な阻害に重要な役割を果たしていることが示された。クリソエリオールは、ヒト乳癌細胞におけるエストロゲン誘発 DNA 損傷に対し抑制効果を示したことから、乳がん発生の初期段階に予防的に働く可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：A dietary methoxyflavonoid, chrysoeriol, inhibited DNA damage induced by the carcinogenic endogenous estrogen metabolite, 4-OHE₂. In a molecular docking analysis, chrysoeriol was found to fit well into the active site of CYP1B1, but not into the active site of CYP1A2 and 1A1 because of steric collisions between the methoxy substituent of this methoxyflavonoid. This indicates that such methoxyflavonoids may be a chemopreventive modulator involved in carcinogenesis such as in breast cancer.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,600,000	480,000	2,080,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：健康と食生活、ホルモン依存性がん、エストロゲン代謝、がん化学予防、フラボノイド、DNA 損傷、カテコールエストロゲン

1. 研究開始当初の背景

近年、乳癌、子宮内膜症をはじめとするホルモン依存性疾患が増加しており、内因性の女性ホルモンであるエストロゲンはリスク因子の1つであると言われている。エストロゲン(E₂)は、乳腺などのエストロゲン標的臓器において、酸化還元酵素シトクロム P450

1B1 (CYP1B1)により、主にカテコールエストロゲンの 4-OHE₂ に代謝される。この 4-OHE₂ のキノン体が DNA 付加体を形成し、発がん性を示すことが動物実験により明らかにされている。

Cytochrome P450 (CYP) 1 ファミリーは、CYP1A1、1A2、1B1 より構成され、種々の生体

異物および内因性物質の解毒および代謝活性化に関与することが知られている。17 β -estradiol (E₂)は、肝臓以外の臓器では、主に CYP1A1 により 2-OHE₂に代謝され、乳腺や子宮などのエストロゲン標的臓器では、CYP1B1 により発がん性を有する 4-OHE₂に代謝されることが報告されている。

申請者らは、CYP1B1 による 4-OHE₂の生成・解毒に着目し、これらを調節することにより乳癌の発生・進展を抑制できるのではないかとこの視点から検討を行ってきた。その結果、植物性食品成分メトキシフラボノイドに、CYP1B1 酵素活性を特異的に阻害し、4-OHE₂の生成を抑制するものを見出した。

2. 研究の目的

CYP1B1 の選択的阻害は、エストロゲン依存性癌の発癌予防に有効であると考えられることから本研究では、種々のフラボノイドについて、*in vitro* 酵素反応を用いて CYP1B1 に対して選択的に阻害するものの構造活性相関およびモデリング・ドッキング解析による選択的 CYP1 阻害効果について検討した。

また、エストロゲン由来の DNA 損傷に対するメトキシフラボノイドの影響を明らかにし、乳癌発生の抑制因子としてのメトキシフラボノイドの有効性について検証した。

3. 研究の方法

(1) 18 種のフラボノイド (フラボン、フラボノール、フラバノン各 6 種) について、ヒト recombinant CYP1A1、1A2、1B1 ミクロソームおよびエトキシレゾルフィンを用い、37°C、10 分間反応させた後、生成したレゾルフィンの蛍光強度 (Ex. 530 nm, Em. 590 nm) を測定し、GraphPad Prism を用いて IC₅₀ を算出した。CYP1A2 の結晶構造を鋳型とするホモロジーモデリング法により構築した CYP1A1、1B1 の 3 次元構造モデルを用いて、CYP1 モデルとリガンドのドッキング解析を実施した。

(2) エストロゲンおよびエストロゲン代謝物の DNA 損傷に対する影響を明らかにするため、E₂ およびカテコールエストロゲンの脱プリン部位 (AP site) 生成について検討を行った。ヒト乳がん細胞 MCF-7 に E₂、2-OHE₂、4-OHE₂ を添加し一定時間インキュベートした後、細胞を回収した。また、1 時間前に Catechol-*O*-methyltransferase (COMT) 阻害剤 (Ro 41-0960) にて前処理を行った。回収した細胞から DNA を抽出し、DNA 塩基損傷部位検出キットを用いて AP site 生成量を測定した。

(3) ヒト乳がん細胞 MCF-7 に E₂ を添加して一定時間インキュベートした後、細胞を回収した。一方でクリソエリオールにて 15 分前処

理を行った後、同様の処理を行った。回収した細胞をスライドガラスの上でアガロースの薄層に封入し、溶解液に 60 分間、次いでアルカリ性溶液に 20 分間浸漬し DNA の一本鎖化処理を行った後、アルカリ性条件下 (pH >13) で電気泳動 (25V、300mA、30 分間) し、中和・脱水を行った。DNA 染色を行った後、細胞を蛍光顕微鏡によって観察し、画像解析ソフト (Comet Analyzer) により核外への DNA 断片の流出割合を指標に DNA 損傷の程度を評価した。

4. 研究成果

(1) フラボノイド骨格の C 環 2, 3 位の二重結合を有するフラボン類およびフラボノール類は、二重結合を持たないフラバノン類と比較し、CYP1B1 に対して非常に強い阻害活性を示した。B 環の置換基による阻害活性は、メトキシ基 > 水素 > 水酸基の順であった。中でも B 環の 3' 位にメトキシ基を有するクリソエリオールおよびイソラムネチンは、CYP1B1 に対し、より低濃度で選択的な阻害活性を示した。モデリング解析により、CYP1 全ての活性部位はフラットなポケット構造を保持し、ポケット側面の特定のアミノ酸残基がポケット構造の形態に大きく影響を与えることが示された。ドッキング解析により、これらの化合物は CYP1B1 の活性中心ポケットによく結合する一方、CYP1A1 の Ser-122 あるいは CYP1A2 の Thr-124 の側鎖と立体的に衝突することから CYP1A1 および CYP1A2 との結合には不利であることを明らかにした。

表 1. CYP1 に対する各種フラボノイドの抑制効果

Class	Compound	R ₁	R ₂	IC ₅₀ (nM)		
				CYP1A1	CYP1A2	CYP1B1
Flavone	Chrysin	H	H	153±22	84±18	24±6
	Apigenin	H	OH	427±46	795±95	25±3
	Luteolin	OH	OH	1249±37	3370±144	79±18
	Chrysoeriol	OCH ₃	OH	95±6	1118±131	20±2
	Diosmetin	OH	OCH ₃	140±5	2437±169	29±2
	Acacetin	H	OCH ₃	86±10	251±23	12±1
Flavonol	Galangin	H	H	77±10	40±4	25±1
	Kaempferol	H	OH	632±19	716±173	47±8
	Quercetin	OH	OH	1191±169	4097±409	77±7
	Isorhamnetin	OCH ₃	OH	56±3	1261±65	17±3
	Tamarixetin	OH	OCH ₃	120±5	1215±239	20±4
	Kaempferide	H	OCH ₃	88±7	509±18	25±6
Flavanone	Pinocembrin	H	H	7906±1278	1491±191	1679±478
	Naringenin	H	OH	15167±1795	26339±1034	3656±459
	Eriodictyol	OH	OH	10973±1757	53214±4570	1284±235
	Homoeriodictyol	OCH ₃	OH	19109±3671	37768±18128	1716±478
	Hesperetin	OH	OCH ₃	2786±267	34647±3326	511±115
	Isosakuranetin	H	OCH ₃	2196±69	3147±300	1024±140

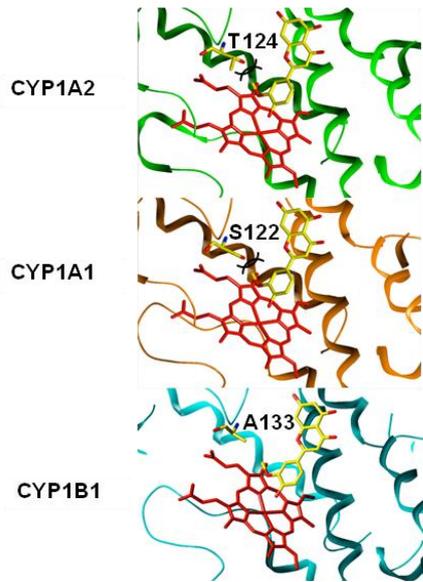


図1. CYP1 モデルとクリソエリオールのドッキング

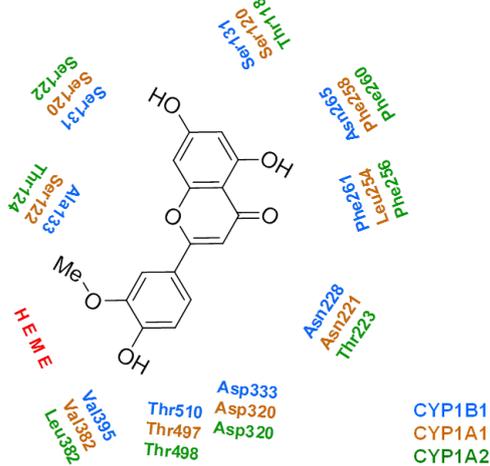


図2. CYP1 とクリソエリオールのドッキング (活性中心付近のアミノ酸残基の配置)

(2) E_2 、2-OHE₂ 処理では COMT 阻害剤添加の有無にかかわらず AP site の生成は見られなかった。一方、4-OHE₂ 処理では COMT 阻害剤存在下、非存在下共に AP site 生成量は有意に増加し、その後経時的に減少した。エストロゲン代謝物のうち 4-OHE₂ は、解毒代謝に重要な COMT の阻害により、脱プリン反応に伴う DNA 損傷をより高めることが示唆された。しかしながら、この系における AP site の生成が低値であることから、フラボノイド化合物の効果を検討するには、不適であると判断された。

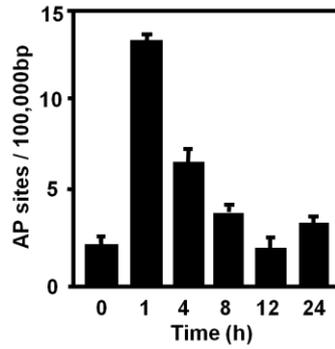


図2. 4-OHE₂による AP sites の生成

(3) E_2 1 μ M 単独処理は、無処理と比較し DNA 損傷(Tail Distance、Tail Moment)の増加を認めた。一方、クリソエリオール 1 μ M 単独処理では、DNA 損傷の増加は認められなかったが、クリソエリオール 1 μ M および E_2 1 μ M の複合処理により、DNA 損傷は大幅に減少した。エストロゲンによる DNA 損傷に対し、クリソエリオールをはじめとするメトキシフラボノイドが予防的に働く可能性が示唆された。

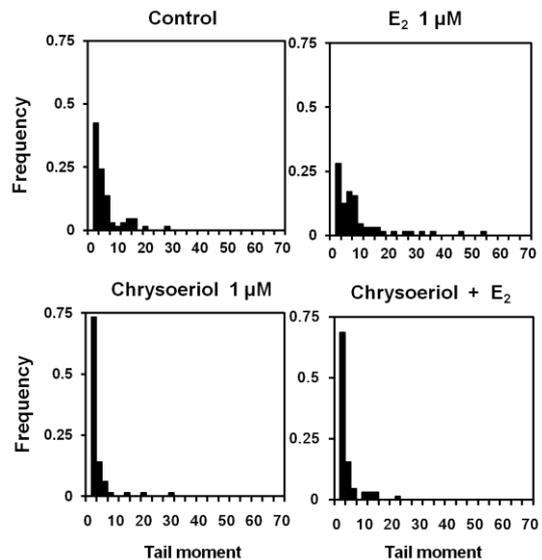


図2. コメットアッセイによる E_2 の DNA 損傷およびクリソエリオールの抑制効果

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)

- ① Takemura H, Itoh T, Yamamoto K, Sakakibara H, Shimoi K. Selective inhibition of methoxyflavonoids on human CYP1B1 activity. *Bioorg. Med. Chem.*, 18, 6310-6315 (2010) 査読有
DOI: 10.1016/j.bmc.2010.07.020
- ② Itoh T, Takemura H, Shimoi K, Yamamoto K. A 3D model of CYP1B1 explains the dominant 4-hydroxylation of estradiol. *J. Chem. Inf. Model.*, 50, 1173-1178 (2010) 査読有
DOI: 10.1021/ci1000554

[学会発表] (計4件)

- ① Takemura H, Sakakibara H, Nagayoshi H, Ohura T, Matsuda T, Morita M, Matsui A, and Shimoi K. A methoxyflavonoid, chrysoeriol, is responsible for inhibition of DNA adduct formation by benzo[*a*]pyrene in MCF-7 breast cancer cells. 5th International Conference on Polyphenols and Health. 2011年10月19日 (Barcelona, Spain)
- ② Shimoi K, Takemura H, Sakakibara H, Itoh T, and Yamamoto K. Effects of methoxyflavonoids on estrogen metabolism? —selective inhibition of CYP1B1 activity— International Conference and Exhibition on Nutraceuticals and Functional Foods 2011. 2011年11月17日 (Sapporo)
- ③ 竹村ひとみ、永吉晴奈、松田知成、榊原啓之、森田真紀、松井朝子、大浦健、下位香代子. Chrysoeriolの benzo[*a*]pyrene-DNA付加体形成に対する抑制効果. 第15回日本フードファクター学会学術集会. 2010年10月4日 (仙台市)
- ④ Takemura H, Sakakibara H, Ohura T, Itoh T, Yamamoto K, Shimoi K. Chrysoeriol prevents formation of a carcinogenic estrogen metabolite 4-hydroxy estradiol, through the selective inhibition of CYP1B1. 6th International Symposium on Hormonal Oncogenesis. 2010年9月14日 (Tokyo)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

竹村 ひとみ (TAKEMURA HITOMI)

松本大学・人間健康学部・助手

研究者番号: 60295558

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

下位 香代子 (SHIMOI KAYOKO)

静岡県立大学・大学院生活健康科学研究科・教授

研究者番号: 10162728