

大豆中に含まれるイソフラボノイドの発がん抑制作用に関する研究

西野輔翼*

京都府立医科大学大学生化学教室

Anti-carcinogenic Effect of Isoflavonoids in Soybeans

Hoyoku NISHINO

Department of Biochemistry, Kyoto Prefectural University of Medicine, Kyoto 602

ABSTRACT

Cancer preventive activity of soybean constituents has been studied, and isoflavonoids were proposed as possible principle to reduce the risk of mammary and prostate cancer. In the present study, we showed that genistein, an isoflavonoid in soybeans, inhibited the proliferation of human prostate cancer cell line DU145 in a dose-depedent manner, and its IC₅₀ was calculated to be arround 20 μ M. Genistein was also proven to inhibit tumor promoter-enhanced phospholipid synthesis in cultured cells, which may play a role to suppress tumor promotion *in vivo*. Furthermore, genistein showed inhibitory tendency in spontaneous liver tumorigenesis in C3H/He male mice. Confirmation of anti-carcinogenic action of genistein is the important project in future. *Rep. Soy Protein Res. Com., Jpn.* 18, 130-134, 1997.

Key words: isoflavonoids, genistein, anti-tumor promoter activity, anti-liver carcinogenesis

1981年以来、がんはわが国の死亡原因の第一位を占め、今後も増え続けると予測されている。このような背景から、がん対策が社会的な緊急課題となっている。がん対策には色々なアプローチがあるが、その中でがん化学予防は最近特に注目されるようになってきた。がん化学予防の研究は米欧では以前より活発に行われてきたが、日本でもようやく本格的な取り組みが始まり、今後の進展が期待されているのである。

食品中には種々の発がん抑制物質が含まれていることが明らかになってきた。したがって、食品および食品成分を用いてがんを予防するという発想も当然うまれてくる。このような発想に基づいて、最近、がん予防のためのデザイナーフーズ計画が進められているが、

その研究対象として取り上げている食品群の中に大豆が入っている。その理由は、大豆の摂取量が増加すると乳がんや前立腺がんのリスクが低減することが疫学的研究から示唆され、また大豆中には、イソフラボノイド、たん白質分解酵素阻害物質、植物性ステロール、サポニン、フィチン酸などの発がん抑制効果を示す物質が豊富に含まれていることが明らかになってきた¹⁾ため、がん予防のためのデザイナーフーズ計画で検討する価値が高い研究対象であると判断されたことにある。そして、乳がんや前立腺がんのリスクを低減させる因子の中で特に重要な役割を担っているのは、イソフラボノイド（ゲニステインやダイゼイン）であろうと示唆されており、注目が集まっている。ゲニステインについては、以前から色々な作用を示すことが報告されていたが、発がん抑制作用という面から再注目さ

*〒602 京都市上京区河原町通広小路上ル

れることとなったわけである。なお、ゲニステインは乳がんや前立腺がんばかりではなく、大腸がんや皮膚がんを抑制する可能性もあることを示唆するデータが得られている^{2,3)}。また、竹下らはゲニステインを豊富に含有している大豆胚軸の抽出液が TPA によって誘導される Raji 細胞に潜伏感染した Epstein-Barr ウイルスの活性化に対して抑制効果を示すことを証明し、さらに、マウス皮膚発がんプロモーションを抑制することも明らかにした(大豆たん白質研究会誌 18, 125-129, 1997)。

そこで、本研究においては、まずはじめに大豆中に含まれているイソフラボノイドの生物学的活性をさらに詳しく解析し、続いてイソフラボノイドによる発がん抑制効果をより広範に評価するために、動物実験を開始した。

方 法

試薬・実験材料

フラボノイド類 (ゲニステイン, ダイゼイン, ケルセチンおよびルテオリン, Fig. 1) はフナコシ株式会社より購入した。焙煎大豆胚軸は不二製油株式会社より供与された。その他は生化学実験用特級試薬を用いた。細胞培養

ヒト前立腺がん細胞 DU145 は10%牛胎児血清を添加した Dulbecco's modified Eagle's medium, ヒト子宮頸がん細胞 HeLa は10%牛血清を添加した Eagle's medium を用いて、37°Cで炭酸ガス細胞培養装置中で培養した。

肝発がん抑制実験

C3H/He 雄マウスにおける自然発生肝がんに対する焙煎大豆胚軸の効果を検討した。動物(日本クレア)は6週齢で購入し、1週間馴化させた後、実験に用いた。焙煎大豆胚軸粉末は2%の濃度になるように飼料中(日本クレア製精製飼料 No. A 10000)に添加した。コントロール飼料ならびに焙煎大豆胚軸粉末添加飼料の組成を Table 1 に示した。実験開始後40週目に犠牲死させ、肝臓に発生した腫瘍数を計測した後、10%中性ホルマリン液で固定し、病理学的解析を行った。

結 果

ヒト前立腺がん細胞 DU145 の増殖におよぼすフラボノイド類の効果

大豆中に含まれているゲニステインなどのイソフラボノイドがヒトの前立腺がんなどの発生を予防してい

る可能性があることと示唆されていることは上にも述べた通りである。そこで今回、ヒト前立腺がん細胞 DU145 の増殖におよぼす効果を調べた。その結果、Fig. 2 に示したように、ゲニステインが用量依存性に増殖を抑制することが明らかとなり、その IC₅₀ は約20 μM であった。続いて、その他のフラボノイドの効力と比較するための実験を行った。Fig. 3 に示したように、ダイゼインの場合、抑制効果は見られるものの、その効力はかなり弱いことがことが明らかとなった。ケルセチンおよびルテオリンは、共に明らかな抑制効果を示すことが証明された。効力を比較すると、ケルセチンはゲニステインよりもやや弱い効果、また、ルテオリンはゲニステインよりも強い効果を示した。

ゲニステインの抗発がんプロモーション作用の機序解析

これまでにわれわれはフラボノイド類の中に抗発がんプロモーション活性を示すものがあることを報告してきたが、ゲニステインについても皮膚発がんプロモ

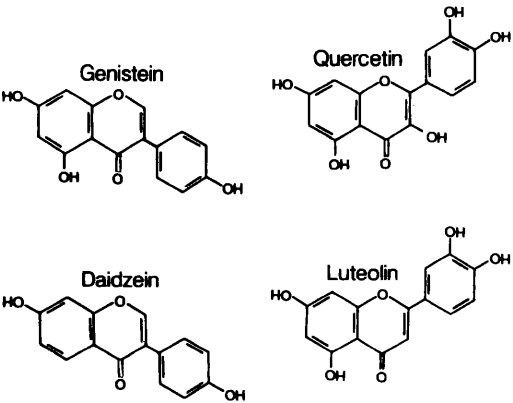


Fig. 1. Structure of flavonoids.

Table 1. Constituents in control and test diet

	Control diet	Test diet
Soybean hypocotyl (roasted, powder)	(-)	2.0
Milk casein	24.5	24.5
Cornstarch	45.5	43.5
Granulated sugar	10.0	10.0
Corn oil	6.0	6.0
Cellulose	5.0	5.0
α-Starch	1.0	1.0
Vitamin mix	1.0	1.0
Mineral mix	7.0	7.0
Total	100%	100%

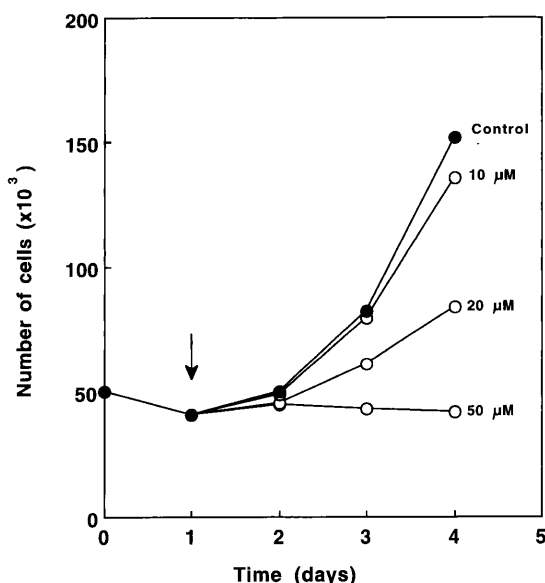


Fig. 2. Effect of genistein on proliferation of DU145 cells. On day 0, $5 \times 10^4/2$ mL of DU145 cells were seeded. On day 1, various concentration of genistein was added into culture medium. On days 2, 3 and 4, viable cell number was determined by trypan blue dye exclusion method. Data are mean values of duplicate experiments.

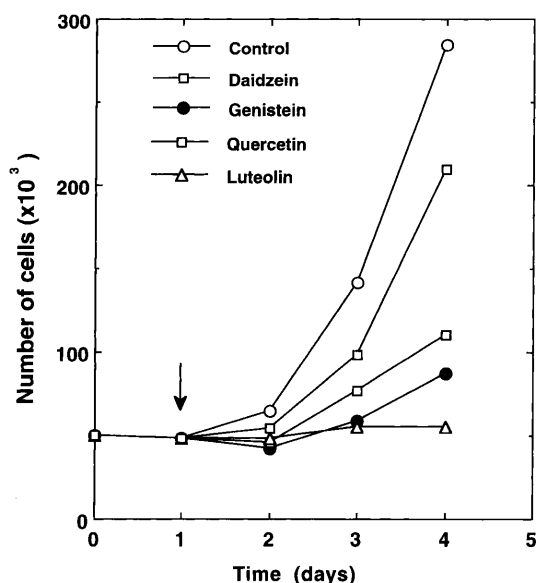


Fig. 3. Effect of flavonoids on proliferation of DU145 cells. On day 0, $5 \times 10^4/2$ mL of DU145 cells were seeded. On day 1, one of flavonoids was added into culture medium. On days 2, 3 and 4, viable cell number was determined by trypan blue dye exclusion method. Data are mean values of duplicate experiments.

ーションを抑制することが報告されている³⁾。

発がんプロモーターを細胞に作用させると多彩な生物学的反応が起こるが、リン脂質代謝の亢進もその一つである。また、発がん過程においてリン脂質代謝の亢進が見られることも明らかになっている。したがって、発がんプロモーターによる細胞リン脂質代謝の亢進は、発がんに関連した現象の一つと考えることができる。事実、発がんプロモーターによる細胞リン脂質代謝の亢進を抑制する化合物の多くのものが発がんを抑制することも明らかになっており、この仮説を支持している。そこで、ゲニステインの作用機序解析の一つのアプローチとして、この点に関する検討を行うことにした。その結果、発がんプロモーター 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) による HeLa 細胞のリン脂質合成促進に対して、ゲニステインが抑制効果を示し、その IC_{50} は約 $50 \mu M$ であることが明らかとなった (Fig. 4)。

焙煎大豆胚軸経口投与による肝発がん抑制

ゲニステインは、種々の臓器における発がんを抑制することが明らかになってきた。そこで、ゲニステイ

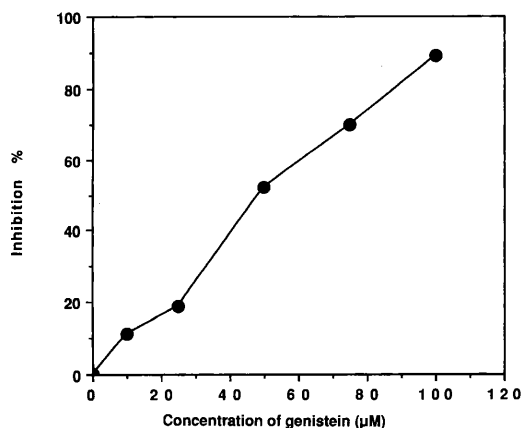


Fig. 4. Effect of genistein on TPA-enhanced phospholipid synthesis in cultured cells. HeLa cells were treated with various concentration of genistein, and after 1 h, ^{32}P i ($20 \mu Ci/culture$) was added with or without TPA ($50 nM$). Incubation was continued for 4 h, and then the radioactivity incorporated into phospholipid fraction was measured. Data, expressed as percentage of inhibition on TPA-enhanced ^{32}P i incorporation, are mean values of duplicate experiments.

Table 2. Effect of roasted soybean hypocotyl powder on spontaneous liver carcinogenesis in C3H/He male mice

Group	(n)	Incidence (%)	Tumors/mouse
Control	(14)	71.4	1.21
+ Soybean hypocotyl (2% in diet)	(15)	53.3	0.67

ンを豊富に含有している焙煎大豆胚軸を用いて、動物における発がん抑制効果を色々な臓器を対象として調べていくことにした。その一環として、今回実験系として用いたのは、C3H/He 雄マウスにおける自然発生肝がんモデルである。このモデルを用いて46週齢（試験食は7週齢から46週齢までの40週間投与した）で実験を終了した場合、肉眼的に観察可能な腫瘍性病変（白色小結節として観察される病変）を病理学的に観察すると、肝臓表層に局限した adenoma あるいは altered hepatic foci であることが明らかとなったが、それらの病変すべての合計を計測し、比較した。その結果は以下の通りである。対照群においては、14匹中10匹に腫瘍の発生（発生率71.4%）が見られ、マウス一匹当たりの平均腫瘍数は1.21であった。一方、焙煎大豆胚軸投与群においては、15匹中8匹に腫瘍が発生（発生率53.3%）したのにとどまり、マウス一匹当たりの平均腫瘍数は0.67に減少した（Table 2）。ただし、統計学的な有意差は認められなかった。

以上、焙煎大豆胚軸は肝腫瘍の発生を抑制する傾向が認められた。

考 察

これまでわれわれは、フラボノイドの持つ生物学的活性に関する研究を行ってきた。そのきっかけとなったのは、ケルセチンが発がんプロモーションを抑制することを見出したことであった⁹⁾。その後、ケルセチンのみならず、種々のフラボノイドも含めて、色々な視点から研究を継続してきた。現在までにわれわれが明らかにしたフラボノイドの生物学的活性としては、発がんプロモーターによる細胞リン脂質代謝の亢進に対する抑制効果、発がんプロモーターによる細胞膜糖輸送能の亢進に対する抑制効果、発がんプロモーターによる RNA 合成の亢進に対する抑制効果、発がんプロモーターによる血小板凝集に対する抑制効果、Ca²⁺-カルモジュリン複合体への結合、熱ショックたん白質の誘導阻害、細胞周期の進行に対する修飾、酸素ラジ

カル捕捉作用などがある。また、他の研究グループからもフラボノイドが持っている色々な生物学的活性が報告され、その機能が極めて多彩であることが明らかとなってきた。

このような状況の中で、胃がん HGC-27 細胞の細胞周期の進行に対する作用に関して検討していた経過中に、フラボノイドの種類によって修飾作用に差異が認められることを見出した。すなわち、多くのフラボノイドが G1 期停止を引き起こすのに対して、ゲニステインは G2/M 期停止を引き起こすことが明らかになったのである⁴⁾。その後、ゲニステインによる G2/M 期停止は、T細胞白血病 Jurkat 細胞や白血病 K-562 細胞などでも見られることが明らかとなった。すなわち、ゲニステインはフラボノイドの中でも特異的な作用を示すものであることが明らかとなってきたのである。

一方、上述したようにゲニステインにがん予防効果があることが示唆され、さらに動物実験によっても発がん抑制効果が確認されるようになったことから、われわれの研究グループにおいても、ゲニステインによる発がん抑制に関する研究を進めることとなった。

今回、ゲニステインに前立腺がん細胞の増殖抑制効果があることが確認されたが、このような作用が前立腺がんのリスク低減に寄与している可能性は十分にあり、さらに詳細な検討を加える必要がある。すなわち、まずはじめに、前立腺がん細胞においても G2/M 期停止を引き起こすのか否かを確認した後、その作用機序を解明することが必要である。また、ゲニステインが G2/M 期停止を引き起こすことが確認された場合には、G1 期停止を誘導する他の化合物（たとえばルテオリンなどの他のフラボノイド、あるいは α -カロテンなど構造ならびに作用機序が異なる化合物など）との併用により相乗効果が得られるか否かについての検討を行うことも意義のある課題であろう。

次に、ゲニステインが TPA による細胞リン脂質代謝の亢進を抑制する効果を示すことが明らかとなり、ゲニステインの抗プロモーション作用の発現機序の一

つとして重要な役割をはたしている可能性があると考えられた。

また、われわれは、ゲニステインを豊富に含有している焙煎大豆胚軸を混餌して経口投与することによって、C3H/He 雄マウスにおける自然発生肝がんを抑制する可能性があることを示唆する結果を得た。今回は

46週齢で実験を終了したため、対照群における腫瘍の発生数が少なく、また発生した腫瘍性病変もすべて adenoma あるいは altered hepatic foci であった。したがって、さらに実験期間を延長して追加実験を行い、肝がん抑制効果を確認することが今後の重要な課題である。

要 約

大豆成分に発がん抑制作用があることを示唆するデータが集積している。その中で、大豆中に含まれているイソフラボノイドは、乳がんや前立腺がんのリスクを低減させる要因として重要な役割を果たしているのではないかと考えられており、注目されている。イソフラボノイドのうち、ゲニステインについては、すでに色々な生物学的活性があることが明らかにされているが、今回、前立腺がん細胞 (DU145) の増殖に対して用量依存性に抑制作用を示し、 IC_{50} は約 $20 \mu M$ であることが明らかとなった。また、発がんプロモーターによって引き起こされる細胞のリン脂質合成の亢進に対して抑制効果を示すことが明らかとなり、このような作用が *in vivo* における抗プロモーション作用の発現に重要な役割を果たしていることが示唆された。また、大豆胚軸が C3H/He 雄マウスにおける自然発生肝がんを抑制する可能性のあることを示唆する結果も得られた。これらの可能性を確認することが今後の課題である。

文 献

- 1) Messina M and Barnes S (1991) : The role of soy products in reducing risk of certain cancer. *J Natl Cancer Inst*, **83**, 541-546.
- 2) Pereira MA, Barnes LH, Rassman VL, Kelloff GJ and Steele VE (1994) : Use of azoxymethane-induced foci of aberrant crypts in rat colon to identify potential cancer chemopreventive agents. *Carcinogenesis*, **15**, 1049-1054.
- 3) Nishino H, Iwashima A, Fujiki H and Sugimura T (1984) : Inhibition by quercetin of the promoting effect of teleocidin on skin papilloma formation in mice initiated with 7,12-dimethylbenz-(a)anthracene. *Gann*, **75**, 113-116.
- 4) Matsukawa Y, Marui N, Sakai T, Satomi Y, Yoshida M, Matsumoto K, Nishino H and Aoike A (1993) : Genistein arrests cell cycle progression at G_2 -M. *Cancer Res*, **53**, 1328-1331.