

ヒト乳がん MCF-7 細胞の増殖に及ぼすイソフラボンの作用

山田耕路^{*1}・韓 達昊¹・宮崎義之¹・菅野道廣²・立花宏文¹

¹九州大学大学院生物資源環境科学府 ²熊本県立大学環境共生学部

Effect of Isoflavons on Proliferation of Human Mammary Cancer MCF-7 Cells

Koji YAMADA¹, Dal-Ho HAN¹, Yoshiyuki MIYAZAKI¹, Michihiro SUGANO²
and Hirofumi TACHIBANA¹

¹Division of Bioresource and Bioenvironmental Sciences, Graduate School of Kyushu University,
Fukuoka 812-8581

²Faculty of Environmental and Symbiotic Sciences, Prefectural University of Kumamoto, Kumamoto 862-0920

ABSTRACT

To establish an assay system for evaluation of estrogenic activity of soybean isoflavones, effects of medium components on proliferation of human mammary cancer MCF-7 cells were examined. Proliferation of the cells was much slower in phenol red (PR)-free DMEM medium than in PR containing normal medium, and the addition of PR to PR-free medium enhanced the proliferation of the cells. In addition, the cells proliferated well in charcoal-treated fetal bovine serum (cFBS), but not in charcoal-treated calf serum. Thus, the cells were cultured in the PR-free DMEM medium supplemented with 5% cFBS to assay estrogenic activity of various environmental estrogens. Among flavonoids, daidzein and genistein exerted weak estrogenic activity at around 10^{-9} M. Among environmental estrogens, tamoxifen and mestranol exerted strong estrogenic activity at around 10^{-9} M, while 17α -ethynylestradiol and bisphenol A at around 10^{-5} M. *Soy Protein Research, Japan* **3**, 54-58, 2000.

Key words : MCF-7 cells, isoflavone, anti-estrogenic activity

食品および環境中には種々の環境ホルモンが存在しており、野生動物のみならずヒトの内分泌系を攪乱する可能性が示されている¹⁾。大豆中のイソフラボンもエストロゲン作用を有することが報告されているが^{2,3)}、他の環境汚染物質と比較すると格段に摂取量が多いことから、大豆イソフラボンの環境ホルモン活性の正確な評価が重要視されている。環境ホルモン活性の検定

系の一つにヒト乳がん由来細胞株 MCF-7 細胞が利用されているが⁴⁾、動物細胞の培養に必要とされる血清は内在性のエストロゲンを含んでおり、その除去に活性炭処理が用いられている。また、pH 指示薬として培地に添加されるフェノールレッド (PR) にも弱いエストロゲン活性が報告されている⁵⁾。大豆イソフラボンのエストロゲン活性はかなり弱いものであり、その活性を正しく評価するためには検定系の最適化が必要と考えられた。そこで、活性炭処理血清が MCF-7 細胞の

*〒 812-8581 福岡市東区箱崎 6-10-1

増殖に及ぼす影響を検討するとともに、PR のエストロゲン活性を検討した。また、最適化した検定系を用いて各種環境ホルモンおよびフラボノイドのエストロゲン活性を比較検討した。

方 法

試薬および血清の活性炭処理

Daidzein, genistein, quercetin および luteolin などのフラボノイドはフジッコ（株）より購入した。環境ホルモンは、 17β -estradiol, tamoxifen, mestranol, clomiphene および 17α -ethynylestradiol を Sigma 社より、bisphenol A, octylphenol, nonylphenol および biphenol を Aldrich 社より購入した。

ウシ胎児血清 (FBS) は Bio Witter 社より購入した。FBS 中に存在するエストロゲンを除去するため、100 mL の FBS に 5 g の活性炭 (Sigma 社製) を加えて 56°C で 30 分保温し、 4°C および $450\times\text{g}$ で 20 分間遠心分離することにより活性炭を除去した。再度 5 g の活性炭を加えてエストロゲン除去操作を行い、得られた上清を孔径 $0.45\ \mu\text{m}$ の酢酸セルロースフィルターを用いて濾過し、活性炭処理 FBS (cFBS) として実験に供した。活性炭処理牛血清 (cCS) およびウシ血清アルブミン (BSA) は Sigma 社より購入した。また、基本合成培地 DMEM および PR 除去 DMEM は Sigma 社より購入した。

エストロゲン活性の測定

環境ホルモンのエストロゲン活性の評価にはヒト乳

がん由来の MCF-7 細胞を用いた。5% FBS 含有 DMEM 培地を用いて増殖させた細胞を生理リン酸緩衝液 (pH 7.4, PBS) で 2 回洗浄した後、トリプシン処理により遊離させ、DMEM 培地もしくは PR 除去 DMEM 培地に懸濁し、 $150\times\text{g}$ で 3 分間遠心分離して細胞を集めた。得られた細胞は同じ培地で 2 回洗浄後、血清添加培地に懸濁して $0.8\sim 1.0\times 10^6$ 細胞/mL の細胞密度で 24 穴培養プレート (Nunc 社製) にまきこみ、1 日後に環境ホルモンを添加してさらに培養した。細胞はトリプシン処理により回収し、細胞数の測定にはコールター社製の粒子測定器 model Z を用いた。

結果と考察

MCF-7 細胞の増殖に及ぼす培地成分の影響

PR を $15\ \mu\text{M}$ 含む通常の DMEM 培地に cFBS を添加して培養すると、4 日後に 5.5 倍に細胞数が増加した後、細胞数が減少した (Fig. 1)。PR 除去培地では、4 日後に 2.2 倍に細胞数が増加した後、細胞数が減少した。PR 除去培地に PR を $15\ \mu\text{M}$ 添加した培地では、4 日後に 4.5 倍に細胞数が増加した後、細胞数が減少した。

次に、FBS の活性炭処理によりエストロゲン活性が完全に除去されたか否かを確認するため、MCF-7 細胞の増殖に及ぼす cFBS 濃度の影響を検討した。通常の DMEM 培地では、添加濃度 1% で最も高い細胞数が得られ、血清濃度の上昇に伴い増殖の抑制が観察された。この傾向は PR 除去培地で最も顕著に認められ、PR 存在下では増殖抑制効果が緩和された。また、PR の MCF-7 細胞増殖促進活性の濃度依存性について検討した結

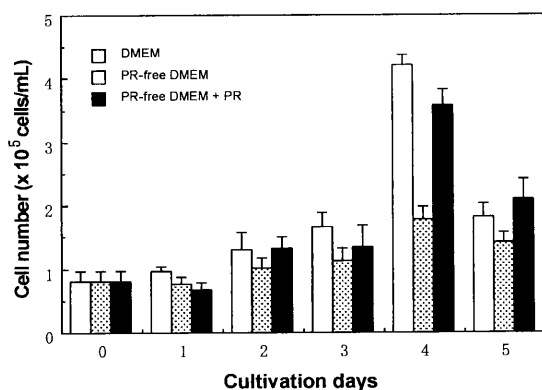


Fig. 1. Effect of phenol red on proliferation of human mammary cancer MCF-7 cells. Cells were grown in 24-well plates in the presence of regular DMEM, PR-free DMEM, or PR-free DMEM containing $15\ \mu\text{M}$ PR. Each medium was supplemented with 5% cFBS. Data are means $\pm$ SD (n=4).

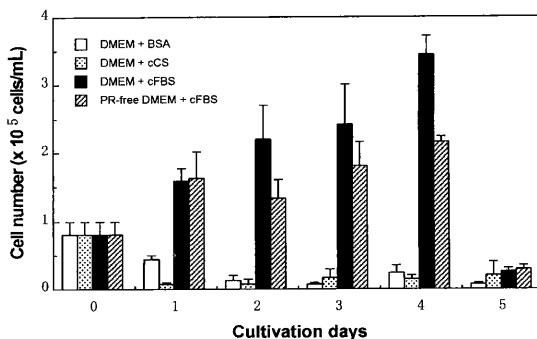


Fig. 2. Effect of phenol red and charcoal-treated sera on proliferation of human mammary cancer MCF-7 cells. Cells were grown in 24-well plates in regular DMEM or PR-free DMEM containing BSA, cFBS, or cCS at the 5% level. Data are means $\pm$ SD (n=4).

果、終濃度 300 μ M までは添加濃度の上昇に伴い増殖促進活性が強くなることが明らかとなった。

次に、MCF-7 細胞の増殖に及ぼす BSA および活性炭処理血清の効果について検討した (Fig. 2)。PR の有無にかかわらず、MCF-7 細胞は BSA 存在下では全く増殖できなかった。5% cFBS 添加培地では 4 日目まで細胞の増殖が認められたが、5% cCS 添加培地では細胞の増殖が全く認められなかった。上述したように、cFBS も高濃度では MCF-7 細胞の増殖を抑制することから血清中には増殖抑制因子が存在するものと思われるが、PR 存在下では血清の増殖抑制効果は発現が抑制された。市販の cCS は当教室で調製した cFBS と同様に動物細胞の増殖を促進する因子を含んでいると思われるが、PR の有無にかかわらず MCF-7 細胞の増殖を誘導することができず、BSA 添加培地より速やかに細胞数の減少を誘導した。この結果は、cCS 中には MCF-7 細胞に対して致死活性を有する因子が存在することを示唆しており、以後の実験では 5% cFBS 含有 PR 除去 DMEM 培地を用いることとした。

MCF-7 細胞の増殖に及ぼすフラボノイドおよび環境ホルモンの影響

次に、本実験系を用いて種々の化合物の環境ホルモン活性を比較検討した。まず、 10^{-8} M の 17β -estradiol もしくはフラボノイドが MCF-7 細胞の増殖に及ぼす

効果を検討した (Fig. 3)。いずれの場合もまきこみ後 4 日目に最も高い細胞数が得られ、 17β -estradiol 添加区では無添加区の 1.93 倍、daidzein 添加区では無添加区の 1.00 倍、genistein 添加区では無添加区の 1.19 倍、quercetin 添加区では無添加区の 1.12 倍、luteolin 添加区では無添加区の 0.86 倍の細胞数が得られた。そこで、次の実験ではまきこみ後 4 日目、環境ホルモン添加後 3 日目に細胞数を測定することとした。

Fig. 4 に、種々の内分泌攪乱因子について MCF-7 細胞増殖促進効果の濃度依存性について検討した結果を示した。エストロゲン活性は無添加区の細胞数に対する添加区の細胞数を百分率で表わすことにより示した。ポジティブコントロールとして用いた 10^{-8} M の 17β -estradiol のエストロゲン活性は実験ごとに若干変動し、無添加区の 1.96 倍から 3.01 倍の間の細胞数が得られた。Daidzein は 10^{-9} M で弱い増殖促進効果を示したが、 10^{-6} M 以上では明らかに増殖抑制効果を示した。Genistein および quercetin は 10^{-8} M 以下で弱い増殖促進効果を示したが、 10^{-6} M 以上では増殖抑制効果を示した。Luteolin には増殖促進効果は認められず、フラボノイドのなかでは最も強い増殖抑制効果を示した。Tamoxifen, mestranol および clomiphene は 10^{-9} M では増殖促進活性を示したが、それ以上の濃度では増殖抑制効果を示した。その他の内分泌攪乱因子ではより高濃度で増殖促

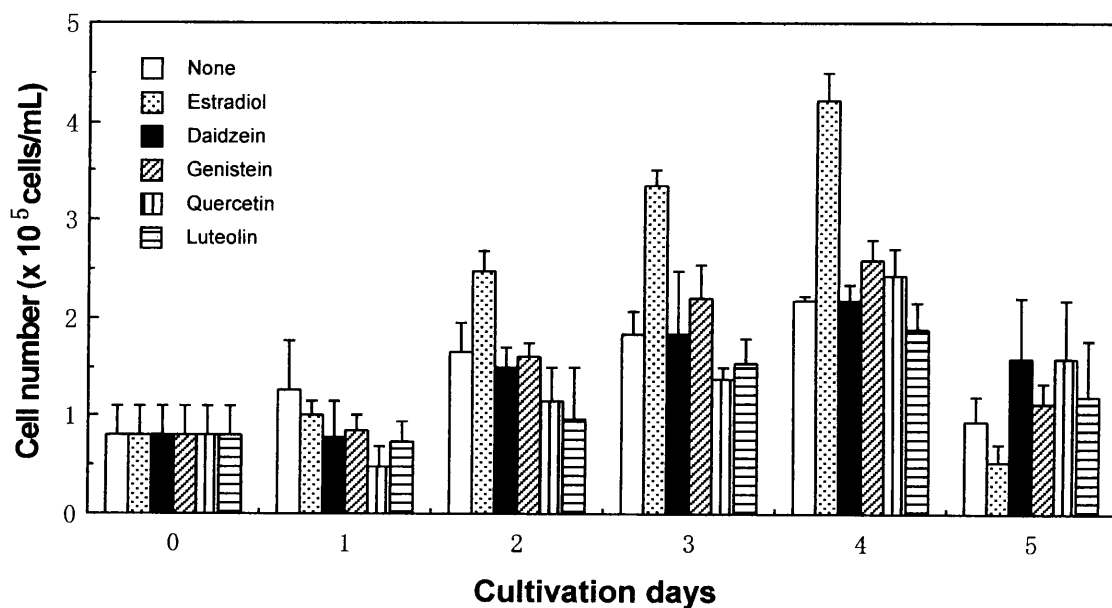


Fig. 3. Effect of flavonoids on proliferation of human mammary cancer MCF-7 cells. Cells were grown in 24-well plates in the presence of PR-free DMEM containing 5% cFBS for 1 day and then cultured in the presence of 10^{-8} M 17β -estradiol, daidzein, genistein, quercetin, or luteolin. Data are means $\pm$ SD (n=4).

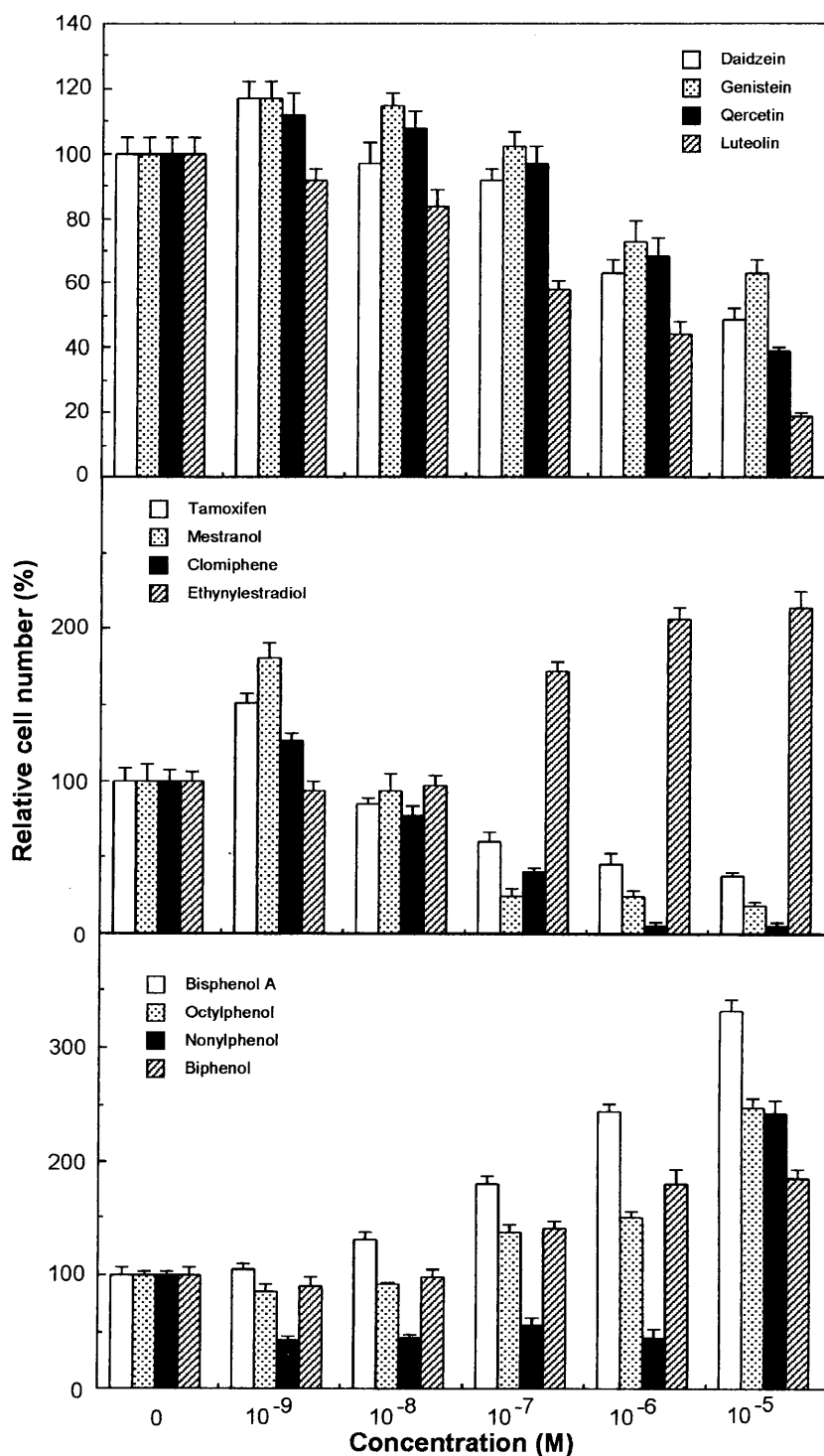


Fig. 4. Dose-dependent effect of flavonoids and environmental estrogens on proliferation of human mammary cancer MCF-7 cells. Cells were grown in 24-well plates in the presence of PR-free DMEM containing 5% cFBS for 1 day and then cultured in the presence of various concentrations of flavonoids and environmental estrogens. Data are means $\pm$ SD (n=4).

進活性が認められ、最高の活性が得られた 10^{-5} M では 17α -ethynylestradiol は 2.1 倍, bisphenol A は 3.3 倍, octylphenol は 2.5 倍, nonylphenol は 2.4 倍, biphenol は 1.9 倍の細胞数を与えた。

これらの結果は、環境ホルモンには 10^{-9} M 付近の低濃度領域でエストロゲン活性を発現するものと 10^{-5} M 付近の高濃度領域で活性を発現するものが存在することを示している。大豆イソフラボンは 10^{-9} M 付近の低濃度領域でエストロゲン活性を示したが、その活性は非常に弱いものであり、環境ホルモンとしての作用は大きなものではないことが示唆された。エストロゲン

は乳がん促進作用があること、大豆イソフラボンはエストロゲンと競合することにより抗乳がん作用を発現する可能性があることが報告されている⁶⁻⁸⁾。われわれも、イソフラボン共存下における各種環境ホルモンの作用について現在検討を行っているが、大豆イソフラボンがある種の環境ホルモンのエストロゲン活性発現を強く抑制するという結果が得られている（未発表結果）。これらの結果は、大豆イソフラボンのエストロゲン活性は非常に弱いものであり、他の環境ホルモン共存下では抗環境ホルモン因子として作用し、抗癌活性を発現する可能性を示すものである。

要 約

大豆イソフラボンのエストロゲン活性の測定を目的として、ヒト乳がん由来の MCF-7 細胞の増殖に及ぼす培地成分の影響について検討した。フェノールレッド (PR) 除去 DMEM 培地中では、PR 含有培地と比べ MCF-7 細胞の増殖が悪く、PR 除去培地に PR を添加することにより増殖が促進された。また、MCF-7 細胞は活性炭処理ウシ胎児血清 (cFBS) 添加培地中では増殖することができたが、活性炭処理ウシ血清添加培地中では増殖できなかった。以上の結果より、5% cFBS 含有 PR 除去 DMEM 培地を用いて種々の環境ホルモンのエストロゲン活性を測定することとした。フラボノイドにおいては、daidzein および genistein に微弱なエストロゲン活性が 10^{-9} M 付近で認められた。環境ホルモンにおいては、tamoxifen および mestranol は 10^{-9} M 付近で強いエストロゲン活性を示したが、 17α -ethylestradiol および bisphenol A は 10^{-5} M 付近でエストロゲン活性を発現することが明らかとなった。

文 献

- 1) Giulette L (1995): Endocrine disrupting environmental contaminants and developmental abnormalities in embryos. *Human Ecol Risk Asses*, **1**, 25-36.
- 2) Cheng E, Yoder L, Story CD and Burrough W (1954): Estrogenic activity of some isoflavone derivatives. *Science*, **120**, 575-576.
- 3) Setchell KDR (1998): Phytoestrogens: the biochemistry, physiology, and implications for human health of soy isoflavones. *Am J Clin Nutr*, **68**, 1333S-1346S.
- 4) Barkly BW, William HK and Nicoleno G (1981): Effect of serum and insulin on the sensitivity of the human breast cancer cell line MCF-7 to estrogens and antiestrogens. *Cancer Res*, **41**, 82-88.
- 5) Yolande B, John AK and Benita SK (1983): Phenol red in tissue culture media is a weak estrogen: implication concerning the study of estrogen-responsive cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, **83**, 2496-2500.
- 6) Barnes S, Grubbs C, Setchell KDR and Carlson J (1990): Soybean inhibits mammary tumors in models of breast cancer. *Prog Clin Biol Res*, **347**, 239-253.
- 7) Messina M and Barnes S (1991): The role of soy products in reducing risk of cancer. *J Natl Cancer Inst*, **83**, 541-546.
- 8) Hawrylewicz EJ, Zapata JJ and Blair WH (1995): Soy and experimental cancer: animal studies. *J Nutr*, **125**, 698S-708S.