

大豆中に含まれる発がん抑制物質に関する基礎的研究

西野輔翼*

京都府立医科大学

Study on Cancer Preventive Substances in Soybeans

Hoyoku NISHINO

Kyoto Prefectural University of Medicine, Kyoto 602-8566

ABSTRACT

In the previous study, we showed that genistein, one of the isoflavonoids found in soybean, inhibited the proliferation of prostate cancer DU145 cells. In addition to prostate cancer cells, various tumor cell lines were also proven to be sensitive to genistein. In the present study, we confirmed that genistein has anti-proliferative activity on human tumor cells, including gastric cancer cell line and lung cancer cell lines. Thus, genistein seems to be useful for the cancer control in a wide range spectrum. Further analysis of action mechanism of genistein is important before starting new clinical intervention trials, because of the development of novel methods, such as DNA array technology and proteomics technology, has recently been achieved. In this context, we evaluated the potency of genistein on expression of wide variety of genes using DNA macroarray, and found that the treatment of DU145 cells with genistein resulted in early induction of cell cycle related genes, such as p53, p53-dependent cell growth regulator CGR19, MDM2-like p53-binding protein, RBQ-3 and so on. We are now extending this kind of study by means of DNA microarray. And introduction of proteomics is now in planning. Since various substances co-exist with isoflavonoids in soybean, studies on these soybean constituents seem to be also valuable. Thus, we have started to assess biological activities of these substances, including soyasaponins, tocotrienol, and phytic acid. In the present study, we confirmed anti-tumor promoter activity of soyasaponin I and II. *Soy Protein Research, Japan* **3**, 59-62, 2000.

Key words : anti-carcinogenic activity, anti-tumor promoter activity, genistein, soyasaponins, DNA array

大豆に含まれている種々の化合物が発がんを抑制する可能性のあることが示唆されている。そこでわれわれは、ゲニステインなどのイソフラボノイドを取り上

げて、その生物学的活性に関して検討を加えてきた。まずはじめに、ゲニステインが培養前立腺がん細胞の増殖を抑制することを明らかにしたが、その後、ゲニステインは前立腺がん細胞のみならず、その他の腫瘍細胞の増殖も抑制することを明らかにした。さらに、

*〒 602-8566 京都市上京区河原町通広小路上ル

また、ラット神経芽細胞腫である B104 細胞の増殖を抑制するのみならず、形態学的に分化を誘導することも見出した。このような結果から予測されることは、ゲニステインなどのイソフラボノイドが多彩な作用点を持っているであろうということである。このような場合、それらの作用機序を解明するためには解析範囲が広くなり、研究の展開には多くの時間が必要になる。この問題を解決するために、DNA アレー技術が役に立つであろうと考え、今回この技術を導入して研究を進めた。

今回、COX 1 および 2 の活性に対するゲニステインの効果も調べた。

ところで、イソフラボノイドを豊富に含有する大豆胚軸が C3H/He 雄マウスにおける自然発生肝がんを抑制することを以前に報告したが、大豆胚軸にはイソフラボノイド以外にも種々の発がん抑制効果を示す化合物が含まれていることは確実と考えられる。たとえば、食物繊維、イノシトール 6P (フィチン酸)、トコフェロール およびその関連化合物、プロテアーゼインヒビターなどが、その候補としてあげられている。候補物質は、それら以外にも多くのものがあると予測されており、その探索は重要な課題である。この課題へのアプローチの一環として、今回、soyasaponins に関して、抗発がんプロモーター活性を調べた。

方 法

実験材料

ゲニステインはフナコシより購入した。細胞は、DU 145 (ヒト前立腺がん細胞) を用いた。DNA マクロアレーはクロンテック社の Atlas human cell cycle array を用いた。

DNA マクロアレーを用いた遺伝子発現の解析

Fig. 1 のようなプロトコールで、遺伝子発現の解析を行った。

Cells : DU 145 (prostate cancer cell line, human)

Flavonoids : Genistein ($14 \mu\text{M} = \text{ID}_{50}$)

RNA was prepared after 24 h of incubation with the flavonoid.



Analysis by Atlas human cell cycle array

Fig. 1. Analysis of gene expression by Atlas human cell cycle.

Soyasaponins の抗発がんプロモーター活性

既報の方法¹⁾に従って、soyasaponins (Fig. 2) の抗発がんプロモーター活性を測定した。

結 果

ゲニステインによる遺伝子発現の修飾

まず、実験に用いるヒト前立腺がん細胞 DU 145 のゲニステインへの反応性を調べるために、細胞増殖および細胞周期における変化を解析した。その結果、細胞増殖抑制効果における ID_{50} は $14 \mu\text{M}$ であり、G2/M 期での停止を引き起こすことが確認された。

そこで、続いてクロンテック社の Atlas human cell cycle array を用いて、遺伝子発現に対する効果を解析したところ、ゲニステインが、広い範囲にわたって変化を引き起こすことが明かになった。その一部を Table 1 に示した。

COX 1 および 2 の活性に対するゲニステインの効果

Table 2 に示したように、ゲニステインが COX 1 および 2 の活性を阻害する作用を持っていることが明かになった。

Soyasaponins の抗発がんプロモーター活性

Soyasaponins の抗発がんプロモーター活性を測定した結果を Table 3 に示した。

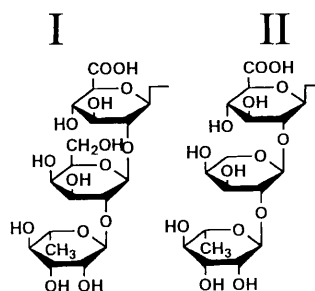
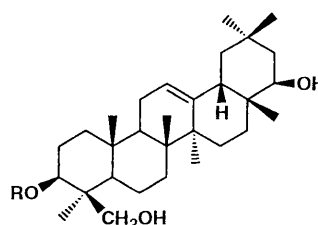


Fig. 2. Soyasaponins I and II.

考 察

ゲニステインが、広い範囲にわたって遺伝子発現の変化を引き起こすことが明かになった。たとえば, p53, p21/WAF1 や GADD45 のように予測可能な遺伝子発現増強がみられるだけにとどまらず, 30 を超える遺伝子

群の発現増強がみられた。一方, 発現が抑制される遺伝子群も多数あり (データ未発表), 結局ゲニステインの遺伝子発現への修飾作用は多彩であることが明らかになった。

さらに, ゲニステインが COX 1 および 2 の活性を両方とも阻害する作用を持っていることが明かになった。このように, これまで知られている作用以外にも今後

Table 1. Induced genes by the treatment with genistein

Name of genes	4 h	8 h	24 h
Cyclin A			1.7(1.5-1.9)
CDK5 activator P391	3.1(1.6-5.0)		
Activator 1 36 kDa subunit			1.9(1.6-2.3)
GADD45			2.3(1.7-3.1)
FRAP			2.4(1.4-3.0)
Cyclin C G1/S-specific			1.7(1.5-2.1)
HHR 6A			2.6(2.2-3.2)
p21/WAF1			1.9(1.8-1.9)
RB2/p130			2.0(1.5-3.0)
C-Jun N-terminal kinase 2			2.1(1.9-2.2)
C-Jun N-terminal kinase 3			2.7(2.5-2.8)
p21-RAC 1			3.7(2.1-7.1)
RP-A			4.0(2.0-8.0)
Cyclin D3			2.1(1.4-2.8)
CDK1			2.9(1.5-5.5)
Serine/threonine protein kinase kinase		1.7(1.6-1.7)	
ERK5		2.2(1.4-3.9)	
Akt1			1.8(1.7-1.8)
Superoxide dismutase			1.9(1.7-2.1)
RBP2		3.0(2.3-3.7)	
GRB-IR/GRB10			3.2(1.6-5.9)
Glycogen synthase kinase 3			1.9(1.7-2.5)
CDC10 protein homolog	2.7(1.7-3.6)		2.4(1.4-4.2)
MEK kinase 3			1.9(1.5-2.4)
RAF oncogene			3.4(1.8-6.0)
RBQ-3	2.4(2.3-2.6)	1.7(1.5-2.0)	
Serine/threonine protein kinase PLK			2.1(1.5-2.4)
p53		2.5(2.1-2.7)	
p53-dependent cell growth regulator CGR19	1.8(1.4-2.1)		2.6(1.6-4.0)
Cell division protein kinase 7			2.2(2.0-2.3)
MDM2-like p53-binding protein	2.9(2.7-3.2)	1.7(1.6-1.7)	

さらに新しい作用の発見が今後も続くものと予測される。

大豆中には発がん抑制効果を示す化合物が多数含まれていることは確実と考えられている。たとえば、食物繊維、フィチン酸、トコフェロール およびその関連化合物、プロテアーゼインヒビターなどが、その候補としてあげられているが、それら以外にも多くのもの

があると予測されており、その探索は重要な課題である。この課題へのアプローチの一環として、今回、soyasaponins に関して調べたところ、抗発がんプロモーター活性を示すことが明らかとなった。今後も、大豆中の発がん抑制物質のスクリーニングを継続し、新しいものを見い出していく計画である。

Table 2. Effect on COX activity

Sample(100 μ M)	Inhibition %		Ratio
	COX-1	COX-2	
Genistein	56.7	21.1	2.7
Indomethacin	84.2	70.6	1.2

Table 3. Anti-tumor promoter activity of soyasaponins

Sample	Inhibition %		
	Concentration (mol ratio to TPA)		
	500	100	10
Soyasaponin I	56.4	26.4	0
Soyasaponin II	49.0	13.6	7.2

要 約

大豆に含まれている発がんを抑制する物質の候補の中でわれわれは、ゲニステインなどのイソフラボノイドを取り上げて、その生物学的活性に関して検討を加えてきた。今回、ゲニステインが、広い範囲にわたって遺伝子発現の変化を引き起こすことを明かにした。たとえば、p53, p21/WAF1 や GADD45 のように予測可能な遺伝子発現増強がみられるだけにとどまらず、30 を超える遺伝子群の発現増強がみられた。一方、発現が抑制される遺伝子群も多数あり、結局ゲニステインの遺伝子発現への修飾作用は多彩であることが明らかになった。さらに、ゲニステインが COX 1 および 2 の活性を両方とも阻害する作用を持っていることが明らかになった。このように、これまで知られている作用以外にも今後さらに新しい作用の発見が今後も続くものと予測される。ところで、イソフラボノイドを豊富に含有する大豆胚軸が C3H/He 雄マウスにおける自然発生肝がんを抑制することを以前に報告したが、大豆胚軸にはイソフラボノイド以外にも種々の発がん抑制効果を示す化合物が含まれていることは確実と考えられる。たとえば、食物繊維、イノシトール 6P (フィチン酸)、トコフェロール およびその関連化合物、プロテアーゼインヒビターなどが、その候補としてあげられている。候補物質は、それら以外にも多くのものがあると予測されており、その探索は重要な課題である。この課題へのアプローチの一環として、今回、soyasaponins に関して調べたところ、有意な抗発がんプロモーター活性を示すことが明らかとなった。今後も、大豆中の発がん抑制物質のスクリーニングを継続し、新しいものを見い出していく計画である。

文 献

- 1) Tsushima M, Maoka T, Katsuyama M, Kozuka M, Matsuno T, Tokuda H, Nishino H and Iwashima A (1995): Inhibitory effect of natural carotenoids on

Epstein-Barr virus activation activity of tumor promoter in Raji cells. A screening study for anti-tumor promoters. *Biol Pharm Bull*, **18**, 227-233.