

内分泌攪乱物質の DMBA 誘導乳がん高誘導に対する 大豆イソフラボンの抑制効果とその機構の解明

梨木邦剛・渡壁美穂・岸田太郎・海老原 清*

愛媛大学農学部

Preventive Effect of Soy Isoflavones on DMBA-induced Mammary Tumor Enhanced by Endocrine-disrupting Chemicals in the Rat

Kunitaka NASHIKI, Miho WATAKABE, Taro KISHIDA and Kiyoshi EBIHARA

Faculty of Agriculture, Ehime University, Matsuyama 790-8566

ABSTRACT

It has been reported that 3, 3', 4, 4'-tetrachlorobiphenyl (TCB), a polychlorinated biphenyl congener, can enhance the development of 7, 12-dimethylbenz (*a*) anthracene (DMBA)-induced mammary tumors in the rats (Nesaretnam *et al.*: *Eur J Cancer*, **34**, 389-393, 1998). In this study, the ability of TCB to enhance the development of DMBA-induced mammary tumors and the possible role of soy isoflavone aglycone, daizein and genistein, in preventing tumor progression were studied in Sprague-Dawley (SD) virgin female rats. Mammary tumors were initiated in 80 rats at 50 days of age by intragastric administration of a single dose of 10 mg of DMBA. Sixty rats were also given 1.6 mg of TCB by intragastric administration at the same time as the DMBA and were subsequently also fed for one week a TCB (100 mg/kg diet) containing high-fat (20% w/w corn oil) diet. Of the 60 rats given TCB, 20 rats were then fed for 9 weeks a high-fat diet, 20 rats were then fed for 9 weeks a daidzein (200 mg/kg diet) containing high-fat diet and 20 rats were then fed for 9 weeks a genistein (200 mg/kg diets) containing high-fat diet. TCB had no effects on the development of DMBA-induced mammary tumors. Daidzein and genistein could not retard the first appearance of palpable tumors and reduce the weight and volume of tumors. *Soy Protein Research, Japan* **4**, 117-122, 2001.

Key words : soy isoflavones, DMBA-induced mammary tumor, TCB, endocrine-disrupting chemicals, rat

近年, PCBs と乳がんとの関連については, 賛否両

論があるが, 乳がんになった女性の胸部脂肪組織を分析したところ PCBs および DDT が平均よりも 50 ~ 60% も高く含まれていたと報告されている¹⁾. また,

*〒790-8566 松山市樽味3-5-7

PCBs の中でも最も毒性の強い 3, 3', 4, 4'-tetrachlorobiphenyl (TCB) はラットにおいて 7, 12-dimethylbenz (a) anthracene (DMBA) によって誘導された乳腫瘍の増殖を促進するとの報告がある²⁾。Lamartiniere らは³⁾DMBA によって誘導された乳がんの増殖をゲニステインが抑制したと報告している。しかし、ダイゼインの乳がんへの影響を検討した実験はない。

そこで本研究では、ゲニステイン、ダイゼインおよびTCBが相互にどのようにDMBA 誘導乳がんの発症および増殖に影響を与えるかを検討することとした。

方 法

実験材料

イソフラボンとしてゲニステイン、ダイゼインを用いた。

動物および飼育条件

実験動物には7週齢Sprague-Dawley 雌ラットを用い、室温 23 ± 1℃, 12 時間の明暗周期の条件下、ステンレス製ケージ内で個別飼育した。体重は1週間に1度、飼料摂取量測定は毎日飼料交換の前に行った。Control 飼料の組成は Table 1 に示す。

実験方法

7 週齢の Sprague-Dawley 系雌ラットを以下のように5群 (n=20) に分けた。①DMBA およびTCB 無投与で実験期間を通じて20% コーン油飼料で飼育した群 (C 群), ②DMBA 10 mg を胃管を用いて胃内に投与し, 20% コーン油飼料で飼育した群 (C + DMBA 群), ③DMBA 10 mg と TCB 1.6 mg をそれぞれ投与し, 初めの1週間20% コーン油飼料にTCB (100 mg/kg 飼料) を含むようにしたそれぞれの飼料を摂取させ, その後はTCB 無添加の同様の飼料で飼育した群 (C + DMBA + TCB 群), ④DMBA 10 mg と TCB 1.6 mg をそれぞれ投与し, 20% コーン油飼料にゲニステイン (200 mg/kg 飼料) を添加した飼料をそれぞれ与え, 初めの1週間はTCB を (100 mg/kg 飼料) 含むようにした飼料を摂取させた群 (C + DMBA + TCB + G 群), ⑤DMBA 10 mg と TCB 1.6 mg をそれぞれ投与し, 20% コーン油飼料にダイゼイン (200 mg/kg diet) を添加した飼料をそれぞれ与え, 初めの1週間はTCB (100 mg/kg 飼料) を含むようにした飼料を摂取させた群 (C + DMBA + TCB + D 群)。飼育期間中, 週に1度触診によって腫瘍の発生の有無とその個体数を調べた。実験開始日の平均体重は, C 群, C + DMBA 群, C + DMBA + TCB 群, C + DMBA + TCB + G 群, C + DMBA + TCB + D 群それぞれ, 159, 159,

Table 1. A 20% corn oil diet (C diet)

Ingredient	C diet g/kg
Dextrose	412
Casein	280
Cellulose	50
Corn oil	200
AIN76-mineral mixture	45
AIN76-vitamin mixture	10
Methionine	3

158, 158 および 157 g であった。実験飼料は C + DMBA + TCB + D 群を自由摂取させ, 他の群はそれぞれに対して pair-fed を行った。飲料水は自由摂取させた。実験終了時頸部動脈から採血し, 採血後直ちに肝を摘出した。血液についてはインスリンを, 肝についてはミクロソームのチトクローム P-450 量を測定した。

腫瘍体積は次式で求めた。

$$\text{腫瘍体積 (mm}^3\text{)} = \{\text{長径 (mm)} \times \text{短径 (mm)} \times \text{奥行き (mm)}\} / 6\pi$$

20% コーン油飼料は Table 1 に示した。

統計処理

腫瘍発生率の統計処理は χ^2 検定にて行った。実験結果は各群の平均値 ± 標準誤差で表した。平均値の差は, 分散分析後, Duncan の多重比較検定法で比較した。2 群間の比較は Student's *t* 検定法により検定した。P < 0.05 の時に有意差ありとした。

結 果

実験終了時の腫瘍発生率は試験群間に差は認められなかった (Table 2)。DMBA 投与後, C + DMBA + TCB + D 群では 28 日目, C + DMBA 群では 42 日目に触診による腫瘍が確認されたが, C + DMBA + TCB 群および C + DMBA + TCB + G 群ではそれぞれ 49 日目に腫瘍が確認された (Fig. 1)。累積腫瘍数はどの時点においても実験群間で有意な差はみられなかったが, C + DMBA + TCB 群で低下する傾向が見られた (Fig. 1)。腫瘍の発生率は, C + DMBA + TCB 群において低下傾向が認められたが有意差は見られなかった (Table 1)。C + DMBA + TCB 群の担がんラットあたりの平均腫瘍重量, 平均腫瘍体積は C + DMBA 群に比べ有意に低下したが, C + DMBA 群と C + DMBA + TCB + G 群および C + DMBA + TCB + D 群の間には有意差は認められなかった。触診で確認されなかった腫瘍重量は 100 mg 以下で, 各群で触診で観察されなかった腫瘍の数は各群ともに同程度であった。

Table 2. Effect of 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl (TCB), genistein and daidzein on body weight gain, tumor incidence, tumor weight, tumor volume, hepatic cytochrome P-450 content and plasma insulin concentration in DMBA treated rats

	C	C+DMBA	C+DMBA+TCB	C+DMBA+TCB+G	C+DMBA+TCB+D
Body weight gain (g/70 d)	105 ± 4 ^{a,1}	98 ± 2 ^{ab}	97 ± 3 ^{ab}	92 ± 3 ^{ab}	89 ± 3 ^{ab}
Tumor incidence	-	15/20	13/20	16/20	16/20
Tumor/tumor-bearing rat	-	4.3 ± 0.9	4.3 ± 0.7	3.6 ± 1.1	4.4 ± 0.9
Tumor weight (g)	-	0.45 ± 0.07	0.24 ± 0.04 ^{*,2}	0.57 ± 0.13	0.58 ± 0.14
Tumor volume (mm ³)	-	31.2 ± 5.4	13.8 ± 2.9 [*]	38.3 ± 12.4	38.5 ± 10.0
Cytochrome P-450 (nmol/mg protein)	0.83 ± 0.04	0.85 ± 0.06	0.83 ± 0.04	0.78 ± 0.03	0.83 ± 0.03
Plasma insulin (μmol/L)	5.23 ± 0.64 ^a	5.03 ± 0.65 ^a	4.35 ± 0.49 ^a	3.97 ± 0.50 ^a	11.07 ± 1.69 ^b

¹ Values are expressed as means ± SEM, n=20. Values in the same row with different superscript letters are significantly different, *P*<0.05.

² Significant difference (*P*<0.05) compared with C+DMBA+TCB+G and C+DMBA+TCB+D.

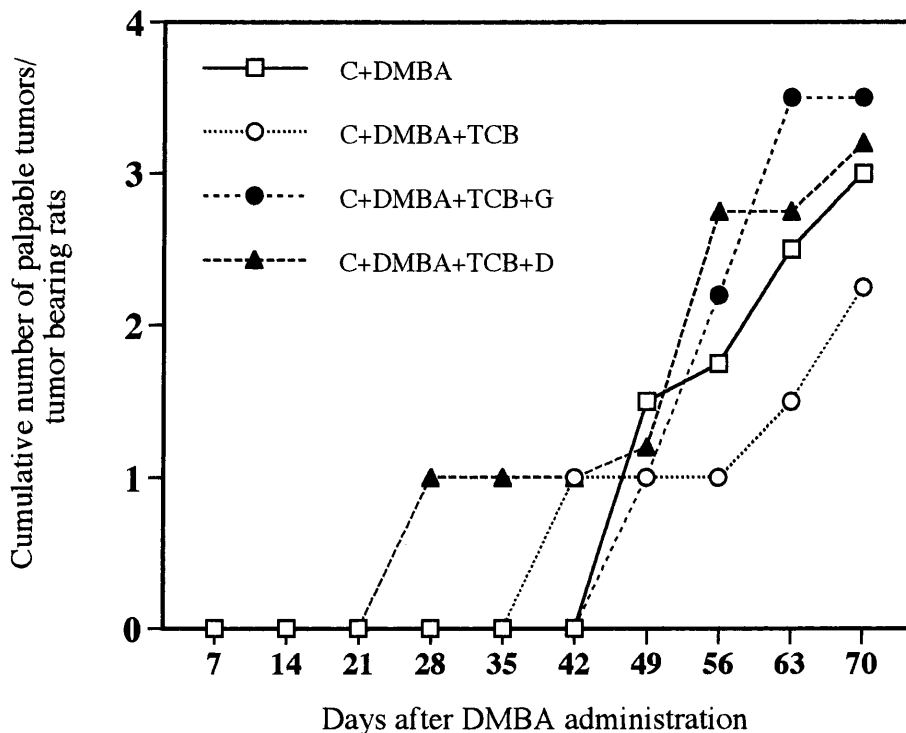


Fig. 1. Influence of 3, 3', 4, 4'-tetrachlorobiphenyl (TCB) and soy isoflavone aglycones, genistein and daidzein, on cumulative number of palpable tumors per tumor-bearing rats by 7, 12-dimethylbenz [α] anthracene (DMBA).

肝チトクローム P-450 量は各群間において有意な影響は観察されなかった (Table 2)。また、インスリンは乳がんを促進する因子の一つであるが、C + DMBA + TCB + D 群の血清インスリン濃度は他群に比べ有意に高かった (Table 2)。

考 察

Krishnan ら⁴⁾は TCB がエストロゲンレセプター (ER) に結合し、MCF-7 細胞におけるエストロゲン性応答および未成熟メスマウスの子宮活性を誘導するこ

とを報告している。また、Nesaretnam ら²⁾は低脂肪食および高脂肪食で飼育し、DMBA によって乳がんを誘導したラットの乳腫瘍増殖を TCB が促進することを報告している。TCB を DMBA 投与と同時に経口投与を行うことによって増加した乳腫瘍の形成はおそらく TCB が薬物代謝酵素、I 相、II 相反応を誘導し DMBA の発がん作用体への代謝活性を増大させるか、PCB がエポキシ化され発がん作用体に変換されイニシエーションを高めたためだと考えられる。しかし、本実験では Nesaretnam ら²⁾の実験条件と全く同じにしたにも関わらず、TCB は乳腫瘍増殖を促すというよりもむしろ抑制し、Nesaretnam ら²⁾の結果とは全く逆の結果になった。Ramamoorthy ら⁵⁾も DMBA 誘導乳がんラットにおいて TCB が必ずしも乳腫瘍増殖を促進するとは限らないことを確認している。

TCB は親和性は低いがアрилハイドロカーボンレセプター (AhR) に結合する AhR アゴニスト活性を示すコプラナ PCB の一つである⁶⁾。2,3,7,8-tetrachlorodibenzodioxin (TCDD) は最も強力な AhR アゴニストであり、齧歯動物の子宮、乳組織および乳がん細胞においてエストロゲン誘導による応答を抑制することが報告されている^{7,8)}。例えば、a) 齧歯動物の子宮においてエストロゲンで誘導した子宮重量の増加を抑制する⁹⁾、b) 雌 SD 系ラットにおいて先天的な週齢依存的な乳腫瘍および子宮腫瘍を抑制する¹⁰⁾、c) 雌 SD 系ラットにおいて発がん物質による乳腫瘍の形成および増殖を抑制する¹¹⁾、d) MCF-7 乳がん細胞を移植した B6C3F1 マウスにおいて乳腫瘍の増殖を抑制する¹²⁾などである。TCDD の間接的な抗エストロゲン活性は、AhR-ER のクロストークの結果によって現れたものと考えられている¹³⁾。TCB も同様に、AhR のアゴニストであり、ER に結合しないこと、MCF-7 および T47D 細胞の増殖の誘導を抑制することが報告されている¹⁴⁾。PCB や DDE のエストロゲン活性が女性において乳がん増殖に寄与するファクターである

との報告があるが、乳癌患者において必ずしも PCB や DDE の濃度は上昇しておらず、通常より相対的に高い PCB や DDE の濃度に長期間さらされた女性が乳がんの増大傾向を示すとは限らないとの報告もある¹⁵⁾。

C + DMBA + TCB + G 群および C + DMBA + TCB + D 群は、C + DMBA + TCB 群に比べ、腫瘍重量および腫瘍体積に増加傾向が認められた。イソフラボンによる乳がん抑制の機構として現在、a) イソフラボン類はエストロゲンに対してアゴニスト、アンタゴニスト両面の作用を持っているため、エストロゲンレセプターをもつがん細胞の増殖を抑制する¹⁾、b) ゲニステインはチロシンキナーゼ活性を阻害する¹⁴⁾、c) イソフラボンが性ホルモン結合グロブリンの合成促進¹⁶⁾およびアロマトラーゼ活性阻害により、遊離のエストロゲンレベルを低下させる^{17,18)}のような可能性が考えられている。Lamartiniere ら³⁾は、DMBA 乳がん誘導ラットにおいて、イソフラボンの一種であるゲニステイン投与による発がん感受性のある乳組織の減少、性周期の変動によって乳がん発症が低下したことを報告している。また近年、イソフラボンによってエストロゲン代謝に関与するチトクローム P-450 が誘導され、活性エストロゲン生成を抑制し、エストロゲン依存性がんを抑制するのではないかと考えられている^{19,20)}。こうしたことから、今回の結果は、大きく矛盾するものである。しかしながら、数多くのフラボノイドがリガンドとなることが報告²¹⁾されていることから、ゲニステイン、ダイゼインはエストロゲンと拮抗するだけではなく、AhR において、TCB とも拮抗した結果、抗エストロゲン性が緩和されたのかもしれない。今回の実験において、肝チトクローム P-450 量に有意な影響は認められなかったが、分子種がゲニステイン、ダイゼインと TCB の相互作用によって質が変動し、乳がん増殖促進効果が観察されたのかもしれない。今後は肝チトクローム P-450 の質の変動とエストロゲン代謝の関係を調べる必要があるであろう。

要 約

3,3',4,4'-Tetrachlorobiphenyl (TCB) が 7,12-dimethylbenz (*a*) anthracene (DMBA) によって誘導される乳がんの発生および増殖を促進することが報告されている (Nesaretnam et al.: *Eur J Cancer*, **34**, 389-393, 1998)。本研究では DMBA 誘導乳がんの発生および増殖に対する TCB の効果、乳がんの発生および増殖に対する大豆イソフラボンアグリコンであるダイゼインとゲニステインの阻止効果について検討した。50 日齢の SD 系ラット 80 匹が DMBA を 10 mg 胃管によって 1 回投与された。そのうちの 60 匹は同時に TCB を 1.6 mg を胃管によって投与するとともに、その後 TCB (100 mg/kg) を含む 20% コーン油飼料を 1 週間与えた。その後、TCB を与えられた 60

匹のラットのうち、20匹はダイゼイン (200 mg/kg) を含む20% コーン油飼料を、20匹にはゲニステイン (200 mg/kg) を含む20% コーン油飼料を、20匹には20% コーン油飼料を9週間与えた。TCBはDMBA誘導乳がんの発生および増殖をもたらさなかった。ダイゼインおよびゲニステインは触診で確認される乳がんの最初の発現を遅らせたり、乳がんの重量および大きさを減らしたりしなかった。

文 献

- 1) 立花 隆 (1999): 環境ホルモン入門, pp. 99-105, 新潮社.
- 2) Nesaretnam K, Hales E, Sohail M, Krausz T and Darbre P (1998): 3, 3', 4, 4'-Tetrachlorobiphenyl (TCB) can enhance DMBA-induced mammary carcinogenesis in the rat. *Eur J Cancer*, **34**, 389-393.
- 3) Lamartiniere CA, Murrill WB, Manzolillo PA, Zhang J-X, Barnes S, Zhang X, Wei H and Brown NM (1998): Genistein alters the ontogeny of mammary gland development and protects against chemically-induced mammary cancer in rats. *Proc Soc Exp Biol Med*, **217**, 358-364.
- 4) Krishnan V and Safe S (1993): Polychlorinated biphenyls (PCBs), dibenzo-p-dioxins (PCDDs), and dibenzofurans (PCDFs) as antiestrogens in MCF-7 human breast cancer cells: quantitative structure-activity relationships. *Toxicol Appl Pharmacol*, **120**, 55-61.
- 5) Ramamoorthy K, Gupta MS, Sun G, McDougal A and Safe SH (1999): 3, 3', 4, 4'-Tetrachlorobiphenyl exhibits antiestrogenic and antitumorigenic activity in the rodent uterus and mammary cells and in human breast cancer cells. *Carcinogenesis*, **20**, 115-123.
- 6) Safe SH (1994): Polychlorinated biphenyls (PCBs): environmental impact, biochemical and toxic responses, and implications for risk assessment. *Crit Rev Toxicol*, **24**, 87-149.
- 7) Safe SH (1995): Modulation of gene expression and endocrine response pathways by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related compounds. *Pharmacol Ther*, **67**, 247-281.
- 8) Zacharewski T and Safe S (1998): Antiestrogenic activity of TCDD and related compounds. In: *Reproductive and Developmental Toxicology*, Korach KS, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 431-448.
- 9) Kociba RJ, Keyes DG, Beyer JE, Carreon RM, Wade CE, Dittenber DA, Kalnins RP, Frauson LE, Park CN, Barnard SD, Hummel RA and Humiston CG (1978): Results of a two-year chronic toxicity and oncogenicity study of 2, 3, 7, 8-tetrachloro-dibenzo-p-dioxin in rats. *Toxicol Appl Pharmacol*, **46**, 279-303.
- 10) Holcomb M and Safe S (1994): Inhibition of 7, 12-dimethylbenzanthracene-induced rat mammary tumor growth by 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Cancer Lett*, **82**, 43-47.
- 11) Tritscher AM, Clark GC, Sewall C, Sills RC, Maronpot R and Lucier GW (1995): Persistence of TCDD-induced hepatic cell proliferation and growth of enzyme altered foci after chronic exposure followed by cessation of treatment in DEN initiated female rats. *Carcinogenesis*, **16**, 2807-2811.
- 12) Gierthy JF, Bennett JA, Bradley LM and Cutler DS (1993): Correlation of *in vitro* and *in vivo* growth suppression of MCF-7 human breast cancer by 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Cancer Res*, **53**, 3149-3153.
- 13) Krishnan V, Porter W, Santostefano M, Wang X and Safe S (1995): Molecular mechanism of inhibition of estrogen-induced cathepsin D gene expression by 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in MCF-7 cells. *Mol Cell Biol*, **15**, 6710-6719.
- 14) Peterson G (1995): Evaluation of the biochemical targets of genistein in tumor cells. *J Nutr*, **125**, 784S-789S.
- 15) Key T and Reeves G (1994): Organochlorines in the environment and breast cancer. *Brit Med J*, **308**, 1520-1521.

- 16) Adlercreutz H (1995): Phytoestrogens: epidemiology and a possible role in cancer protection. *Environ Health Perspect*, **103**(Suppl 7), 103-112.
- 17) Adlercreutz H, Bannwart C, Wahala K, Makela T, Brunow G, Hase T, Arosemena PJ, Kellis JT Jr and Vickery LE (1993): Inhibition of human aromatase by mammalian lignans and isoflavonoid phytoestrogens. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **44**, 147-153.
- 18) Campbell DR and Kurzer MS (1993): Flavonoid inhibition of aromatase enzyme activity in human preadipocytes. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **46**, 381-388.
- 19) Bradlow HL, Michnovicz J, Telang NT and Osborne MP (1991): Effects of dietary indole-3-carbinol on estradiol metabolism and spontaneous mammary tumors in mice. *Carcinogenesis*, **12**, 1571-1574.
- 20) Xu X, Duncan AM, Merz BE and Kurzer MS (1998): Effects of soy isoflavones on estrogen and phytoestrogen metabolism in premenopausal women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **7**, 1101-1108.
- 21) Reiners JJ, Clift R and Mathieu P (1999): Suppression of cell cycle progression by flavonoids: dependence on the aryl hydrocarbon receptor. *Carcinogenesis*, **20**, 1561-1566.