

大豆イソフラボンのエストロゲン活性発現抑制効果

山田耕路*¹・韓 達昊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

Suppressive Effect of Soy Isoflavone on Estrogenic Activity Expression

Koji YAMADA¹, Dal-Ho Han¹, Michihiro SUGANO² and Hirofumi TACHIBANA¹

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

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

ABSTRACT

To compare estrogen receptor-binding activity of environmental estrogens, their 50%-inhibiting concentrations (IC₅₀) on the binding of 17β-estradiol to human recombinant estrogen receptor β were examined. In addition, estrogenic activity of these compounds was examined using human mammary cancer MCF-7 cells. Among soy isoflavones, IC₅₀ of daidzein was 10⁻⁷ M, and its maximal proliferation-enhancing effect was observed at 10⁻⁸ M. On the other hand, IC₅₀ of genistein was 5 × 10⁻⁸ M, and its maximal proliferation-enhancing effect was observed at 10⁻⁶ M, though it exerted strong estrogenic activity at 10⁻⁸ M. In general, there was a positive relationship between IC₅₀ and the concentration giving optimal proliferation-enhancing effect, with some exceptions. In addition, we found that daidzein, genistein and luteolin not only inhibit the expression of proliferation-enhancing activity of environmental estrogens, but also strongly suppressed proliferation of the cells in combinational uses. These results suggest that studies on combinational effect of environmental estrogens are important for the clarification of biological meanings of the compounds. *Soy Protein Research, Japan* 4, 123-128, 2001.

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

エストロゲン活性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。そこで、微弱な環境ホルモン活性を評価するためヒト乳がんMCF-7細胞

*〒812-8581 福岡市東区箱崎6-10-1

胞を用いた環境ホルモン活性検定系の最適化を行い、daidzein および genistein が 10^{-9} M 近辺で弱いエストロゲン活性を発現することを確認した⁴⁾。環境ホルモンのエストロゲン活性は標的細胞に存在するエストロゲン受容体との相互作用を通じて発現するので、本研究では種々の環境ホルモンのヒトエストロゲン受容体への結合性とエストロゲン活性の関係について検討した。また、大豆イソフラボンがエストロゲンとの競合を通じて抗乳がん作用を発現する可能性が報告されているので⁵⁻⁷⁾、フラボノイドと環境ホルモンの相互作用についても検討した。

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、 17β -estradiol, diethylstilbestrol, 17α -ethynylestradiol, tamoxifen, mestranol, clomiphene および methoxychlor を Sigma 社より、4-nonylphenol, 4-tert-octylphenol, 4-ethylphenol, 4-dihydroxybiphenyl, bisphenol A, 2, 2, 2-trichloroethanol, *p*-nitrotoluene, 2,4-dichlorophenol, phloretin, chrysin, biochanin A, apigenin, naringenin および flavone を Aldrich 社より、formononetin, equol, coumestrol および kaempferol は Fluka 社より、benzophenone, *n*-butylbenzene, bis (2-ethylhexyl) adipate, cyanazine および chlordecone は和光純薬より購入した。

エストロゲン受容体への結合能の測定

種々の環境ホルモンのヒトエストロゲン受容体結合能は Garrett *et al.* の方法⁸⁾にしたがい、inhibition ELISA 法を用いて行った。Estrogen-conjugated ウシ

血清アルブミン、ウサギ抗 estrogen IgG およびペルオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG は Sigma 社より購入し、リコンビナントヒトエストロゲン受容体 β は Pan Vera 社より購入した。

エストロゲン活性の測定

ウシ胎児血清(FBS)は Bio Wittaker 社より購入し、山田らの方法⁴⁾により活性炭処理血清を調製した。MCF-7 細胞の培養およびエストロゲン活性の測定は山田らの方法⁴⁾に準じて行ったが、細胞数の測定にかえて sulforhodamin-B 染色法⁹⁾を用いて相対細胞数を評価した。

結果と考察

種々の環境ホルモンのエストロゲン受容体への結合能とエストロゲン活性

17β -Estradiol のヒトエストロゲン受容体への結合に及ぼすフラボノイド共存の影響を Table 1 に示した。大豆中に見いだされる 2 種のイソフラボン、daidzein および genistein はいずれも 10^{-9} M 以上の濃度で 17β -estradiol のエストロゲン受容体への結合を濃度依存的に阻害し、 10^{-7} M 付近の濃度領域で結合量を 50% に低下させた。フラボノールの一種である quercetin はイソフラボンと同様に 10^{-9} M 以上の濃度で 17β -estradiol のエストロゲン受容体への結合を濃度依存的に阻害し、 10^{-7} M 付近の濃度領域で結合量を 50% に低下させた。一方、フラボンの一種である luteolin は 10^{-8} M 以上の濃度で結合阻害活性を示し、50% 阻害濃度 (IC_{50}) は 10^{-6} M 前後であった。この結果は、quercetin もイソフラボンと同等のエストロゲン受容体結合能と有するが、luteolin の結合能は 3 種のフラボノイドの 10 分の 1 程度であることを示唆している。

Table 1. Estrogen receptor-binding activity of flavonoids

Conc. (M)	Relative amount of ES bound to hER β			
	Daidzein	Genistein	Quercetin	Luteolin
10^{-11}	100 \pm 0	100 \pm 0	100 \pm 2	100 \pm 2
10^{-10}	100 \pm 0	99 \pm 11	98 \pm 3	100 \pm 2
10^{-9}	93 \pm 0	90 \pm 1	88 \pm 0	100 \pm 3
10^{-8}	70 \pm 2	65 \pm 5	76 \pm 2	86 \pm 0
10^{-7}	52 \pm 5	40 \pm 2	57 \pm 3	80 \pm 2
10^{-6}	35 \pm 2	32 \pm 1	43 \pm 4	67 \pm 9
10^{-5}	25 \pm 1	22 \pm 0	30 \pm 0	50 \pm 3
10^{-4}	18 \pm 1	14 \pm 0	24 \pm 2	32 \pm 2
10^{-3}	9 \pm 3	9 \pm 2	19 \pm 5	25 \pm 6

ES, 17β -estradiol; hER β , human recombinant estrogen receptor β .

Table 2. Estrogenic activity of flavonoids

Conc. (M)	Relative amount of SRB bound to MCF-7 cells			
	Daidzein	Genistein	Quercetin	Luteolin
10 ⁻¹²	1.0 ± 0.3	1.0 ± 0.3	1.0 ± 0.2	1.1 ± 0.2
10 ⁻¹¹	1.0 ± 0.2	1.1 ± 0.3	1.2 ± 0.3	1.2 ± 0.3
10 ⁻¹⁰	1.2 ± 0.1	1.2 ± 0.2	1.7 ± 0.1	1.5 ± 0.2
10 ⁻⁹	1.5 ± 0.2	1.4 ± 0.4	2.0 ± 0.2	2.2 ± 0.2
10 ⁻⁸	2.0 ± 0.1	1.6 ± 0.1	0.5 ± 0.3	1.8 ± 0.1
10 ⁻⁷	1.5 ± 0.2	1.7 ± 0.2	0.4 ± 0.2	0.5 ± 0.2
10 ⁻⁶	1.2 ± 0.1	1.9 ± 0.2	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.1
10 ⁻⁵	0.5 ± 0.1	1.1 ± 0.1	0.0 ± 0.0	0.2 ± 0.1
10 ⁻⁴	0.3 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
10 ⁻³	0.2 ± 0.2	0.2 ± 0.1	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0

SRB, sulforhodamin-B.

Table 2 にこれら 4 種のフラボノイドのエストロゲン活性を示した。Daidzein は 10⁻¹⁰ から 10⁻⁶ M の濃度領域で MCF-7 細胞の増殖を促進し、10⁻⁸ M で最も高い増殖促進活性を示したが、10⁻⁵ M 以上では細胞毒性を示した。Genistein の増殖促進効果は同様に 10⁻¹⁰ M 以上で、最高の増殖促進効果は 10⁻⁶ M で認められた。また、細胞毒性は 10⁻⁴ M 以上で認められた。Quercetin および luteolin は 10⁻⁹ M で最も高い増殖促進活性を示したが、細胞毒性がイソフラボンより低濃度から認められ、quercetin は 10⁻⁸ M 以上で、luteolin は 10⁻⁷ M 以上で MCF-7 細胞に対して増殖抑制もしくは致死作用を示した。以上の結果は、quercetin および luteolin が大豆イソフラボンより低濃度でエストロゲン活性を発現するが、MCF-7 細胞毒性もより低濃度から発現することを示している。

種々の環境ホルモンのエストロゲン受容体結合能とエストロゲン活性

次に、種々の環境ホルモンのエストロゲン受容体結合能およびエストロゲン活性を比較した (Table 3)。エストロゲン受容体への結合能は IC₅₀ で、エストロゲン活性は最高の増殖促進活性が認められた濃度とその濃度における増殖促進活性で示した。内在性エストロゲンである 17β-estradiol は 10⁻¹⁰ M で MCF-7 細胞の増殖を 2.2 倍に促進したが、diethylstilbestrol は 10⁻⁹ M の 17β-estradiol の受容体への結合を 4 × 10⁻¹⁰ M で 50% 阻害し、17β-estradiol と同等もしくは若干強い結合活性を示した。また、エストロゲン活性も 10⁻⁸ M で 3.5 倍に MCF-7 細胞の増殖を促進した。17α-Ethinylestradiol, tamoxifen, mestranol および clomiphene も 10⁻⁷ M 以下の IC₅₀ を与え、かなり強い結合活性を有することが示唆された。しかし、エストロゲン活性は 17α-ethinylestradiol が 10⁻⁸ M で 2.6 倍

とかなり強い活性を示したのに対し、他の 3 種のエストロゲン活性はより高濃度で発現し、増殖促進倍率も 1.4 倍以下の弱いものであった。

イソフラボンでは daidzein および genistein は 10⁻⁷ M 前後の IC₅₀ を与えたが、formononetin および biochanin A は 10⁻⁵ M 前後の値を与え、かなり結合能が低いことが示唆された。Formononetin のエストロゲン活性は genistein より若干弱い程度であったが、biochanin A は 10⁻⁴ M 前後で 1.3 倍程度の増殖促進活性しか示さず、エストロゲン活性は非常に弱いものであった。イソフラボンの生体内代謝により生じる equol のエストロゲン受容体への結合能は biochanin A より高い傾向が認められたが、エストロゲン活性は biochanin A より弱いものであった。

フラボン類では chrysin が最も低い IC₅₀ 値を与え、apigenin が最も高い IC₅₀ 値を与えたが、これらの化合物のエストロゲン活性とは必ずしも一致せず、luteolin が最も低濃度で MCF-7 細胞の増殖を促進した。Apigenin のエストロゲン活性は 10⁻⁶ M 前後の高濃度領域においてのみ認められたが、促進倍率は 2.6 倍とかなり高い促進活性が得られた。フラボノールの IC₅₀ は 5 × 10⁻⁵ M のかなり高い濃度領域に認められたが、エストロゲン活性が認められたのは quercetin の 10⁻⁹ M に対し、kaempferol では 10⁻⁵ M と大きな違いが認められた。しかしながら、促進倍率は quercetin で 2.0 倍、kaempferol で 2.3 倍であり、同等のエストロゲン活性を与えた。

その他の環境ホルモンでは、4-dihydroxyphenol が 10⁻⁹ M、4-nonylphenol および bisphenol A が 10⁻⁸ M の低濃度でエストロゲン活性を発現した。細胞増殖促進活性が 2 倍以上の化合物は naringenin (2.6 倍)、cyanazine (2.6 倍)、4-tert-octylphenol (2.6 倍)、bis

Table 3. Estrogen receptor binding and estrogenic activities of environmental estrogens

Group	Compound	Receptor-binding activity (IC ₅₀ , M)	Estrogenic activity	
			Optimal conc. (M)	Relative cell number (fold)
Pharmaceuticals	17β-Estradiol		10 ⁻¹⁰	2.2
	Diethylstilbestrol	4 × 10 ⁻¹⁰	10 ⁻⁸	3.5
	17α-Ethinylestradiol	5 × 10 ⁻⁸	10 ⁻⁸	2.6
	Tamoxifen	3 × 10 ⁻⁸	10 ⁻⁷	1.4
	Mestranol	4 × 10 ⁻⁸	10 ⁻⁶	1.4
	Clomiphene	1 × 10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	1.2
Coumestan	Coumestrol	4 × 10 ⁻⁸	10 ⁻⁷	2.0
Isoflavones	Daidzein	1 × 10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	2.0
	Genistein	5 × 10 ⁻⁸	10 ⁻⁶	1.9
	Formononetin	1 × 10 ⁻⁵	10 ⁻⁵	1.9
	Biochanin A	1 × 10 ⁻⁵	10 ⁻⁴	1.3
Isoflavan	Equol	1 × 10 ⁻⁶	10 ⁻³	1.4
Flavones	Luteolin	5 × 10 ⁻⁷	10 ⁻⁹	2.2
	Cheysin	5 × 10 ⁻⁸	10 ⁻⁴	1.5
	Apigenin	1 × 10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	2.6
	Flavone	3 × 10 ⁻⁷	10 ⁻⁶	1.7
Flavanone	Naringenin	3 × 10 ⁻⁷	10 ⁻⁵	2.6
Chalcone	Phloretin	7 × 10 ⁻⁶	10 ⁻³	1.4
Flavonols	Kaempferol	5 × 10 ⁻⁵	10 ⁻⁵	2.3
	Quercetin	5 × 10 ⁻⁵	10 ⁻⁹	2.0
Pesticides	Chlordecone	9 × 10 ⁻⁶	10 ⁻⁶	1.5
	Methoxychlor	2 × 10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	1.2
Herbicides	Cyanazine	9 × 10 ⁻⁶	10 ⁻⁶	2.6
	2, 4-Dichlorophenol	3 × 10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	1.6
Alkylphenols	4-Nonylphenol	9 × 10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	2.1
	4- <i>tert</i> -Octylphenol	9 × 10 ⁻⁶	10 ⁻⁶	2.6
	4-Ethylphenol	8 × 10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	1.1
Polymerizers	n-Butylbenzene	9 × 10 ⁻⁶	10 ⁻⁶	1.8
	Benzophenone	5 × 10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	1.3
	<i>p</i> -Nitrotoluene	2 × 10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	1.4
Plasticizers	Bisphenol A	5 × 10 ⁻⁵	10 ⁻⁸	2.1
	Bis(2-ethylhexyl)adipate	8 × 10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	2.3
Others	4-Dihydroxybiphenol	5 × 10 ⁻⁶	10 ⁻⁶	2.3
	2, 2, 2-Trichloroethanol	3 × 10 ⁻⁴	ND	ND

ND, not detected.

Table 4. Combinational effect of environmental estrogens and flavonoids on proliferation of MCF-7 cells

Environmental estrogen	Relative cell number (fold)				
	None	Daidzein (10 ⁻⁸ M)	Genistein (10 ⁻⁸ M)	Quercetin (10 ⁻⁹ M)	Luteolin (10 ⁻⁹ M)
DES (10 ⁻⁸ M)	3.50 ± 0.23	3.40 ± 0.10	3.38 ± 0.08	3.38 ± 0.11	3.40 ± 0.10
EE (10 ⁻⁸ M)	2.60 ± 0.10	2.00 ± 0.07	1.75 ± 0.06	2.55 ± 0.10	2.20 ± 0.10
Tam (10 ⁻⁷ M)	1.40 ± 0.10	1.38 ± 0.04	1.20 ± 0.11	1.40 ± 0.09	1.37 ± 0.12
Mes (10 ⁻⁶ M)	1.40 ± 0.09	1.25 ± 0.07	0.95 ± 0.07	1.10 ± 0.09	1.00 ± 0.05
Clo (10 ⁻⁸ M)	1.20 ± 0.09	0.85 ± 0.07	0.64 ± 0.07	1.10 ± 0.09	1.00 ± 0.05
NP (10 ⁻⁸ M)	2.10 ± 0.10	0.56 ± 0.10	0.48 ± 0.03	1.50 ± 0.11	0.63 ± 0.08
OP (10 ⁻⁶ M)	2.60 ± 0.10	0.67 ± 0.06	0.55 ± 0.09	1.20 ± 0.13	0.63 ± 0.08
DHBP (10 ⁻⁹ M)	2.30 ± 0.09	0.63 ± 0.08	0.40 ± 0.07	1.95 ± 0.08	0.85 ± 0.05
Bis A (10 ⁻⁸ M)	2.10 ± 0.08	0.60 ± 0.05	0.55 ± 0.08	2.00 ± 0.10	0.70 ± 0.10

DES, diethylstilbestrol; EE, 17 α -ethynylestradiol; Tam, tamoxifen; Mes, mestranol; Clo, clomiphene; NP, 4-nonylphenol; OP, 4-*tert*-octylphenol; DHBP, 4-dihydroxybiphenol; Bis A, bisphenol A.

(2-ethylhexyl)adipate (2.3 倍), 4-dihydroxybiphenol (2.3 倍), 4-nonylphenol (2.1 倍), bisphenol A (2.1 倍) などであった。多くの環境ホルモンでは、IC₅₀ で評価したエストロゲン受容体結合能とエストロゲン活性発現濃度との間に相関関係が認められたが、かならずしも一致しない場合もあり、これらの化合物における MCF-7 細胞増殖促進効果の発現にはエストロゲン受容体への結合以外の因子も関与していることが示唆された。

フラボノイドと環境ホルモンの相互作用

大豆イソフラボンなどのフラボノイドが抗環境ホルモン活性を発現するか否かについて検討するため、フラボノイドと環境ホルモンの複合作用について検討を行った (Table 4)。フラボノイドは daidzein および genistein は最高もしくはそれに準じる増殖促進効果が得られた 10⁻⁸ M を、quercetin および luteolin は最高の増殖促進効果が得られた 10⁻⁹ M を添加した。他の環境ホルモン類も同様に最高もしくはそれに準じる増

殖促進効果が得られた濃度で添加した。Diethylstilbestrol は 10⁻⁸ M で MCF-7 細胞の細胞の増殖を 3.5 倍に促進したが、フラボノイド共存下においても同等の増殖促進効果を発現した。一方、17 α -ethynylestradiol の増殖促進効果は genistein, daidzein および luteolin の存在下で低下する傾向が認められた。また、これら 3 種のフラボノイドは 4-nonylphenol, 4-*tert*-octylphenol, 4-dihydroxybiphenol および bisphenol A の細胞増殖促進効果の発現を完全に抑制しただけでなく、かえって細胞数を減少させた。しかしながら、quercetin の添加はこれらの環境ホルモンの活性発現に大きな効果は与えなかった。これらの結果は、環境ホルモン活性を有する複数の化合物が同時に作用した場合、互いに抑制的に作用するだけでなく、逆の作用を発現する可能性があることを示唆している。したがって、環境ホルモンの生体調節機能の評価およびその生理的意義の検討を行う場合、環境ホルモンの相互作用に関する検討が不可欠であると思われる。

要 約

各種環境ホルモンが 17 β -estradiol とヒトエストロゲン β 受容体の結合を 50% 阻害する濃度 (IC₅₀) を求めることにより、環境ホルモンのエストロゲン受容体との結合能を比較検討した。また、ヒト乳がん由来 MCF-7 細胞を用いてエストロゲン活性の評価を行った。その結果、大豆イソフラボンである daidzein は 10⁻⁸ M 前後で最高のエストロゲン活性を示し、IC₅₀ は 10⁻⁷ M 前後であることが明らかとなった。一方、genistein は 10⁻⁸ M でも強い活性を示すが最高のエストロゲン活性は 10⁻⁶ M で得られ、その IC₅₀ は 5 × 10⁻⁸ M であった。その他の環境ホルモンでは、エストロゲン活性を示す最高濃度と IC₅₀ 濃度との間にはほぼ正の相関が認められたが、若干の例外も認められた。また、daidzein, genistein あるいは luteolin の添加により 4-nonylphenol, 4-*tert*-octylphenol, 4-

dihydroxybiphenol および bisphenol A の MCF-7 細胞増殖促進活性の発現が完全に抑制されるだけでなく、細胞増殖がかえって抑制されることが明らかとなった。これらの結果は環境ホルモン活性を有する化合物においてはその複合作用の解明が重要な意味を有することを示唆している。

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) 山田耕路, 韓 達昊, 宮崎義之, 菅野道廣, 立花宏文 (2000): 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. 大豆たん白質研究, **3**, 54-58.
- 5) 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.
- 6) Messina M and Barnes S (1991): The role of soy products in reducing risk of cancer. *J Natl Cancer Inst*, **83**, 541-546.
- 7) Hawrylewicz EJ, Zapata JJ and Blair WH (1995): Soy and experimental cancer: animal studies. *J Nutr*, **125**, 698S-708S.
- 8) Garret SD, Lea HA and Morgan MRA (1999): A nonisotopic estrogen receptor-based assay to detect estrogenic compounds. *Nature Biotech*, **17**, 1219-1222.
- 9) Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, Warren JT, Bokesch H, Kenney S and Boyd MR (1990): New colorimetric cytotoxicity assay for anti-cancer-drug screening. *J Natl Cancer Inst*, **82**, 1107-1112.