

# がん細胞の増殖と浸潤に及ぼす大豆イソフラボンの作用解析

矢ヶ崎一三\*・高畠満喜・三浦 豊

東京農工大学農学部

## Effects of Soybean Isoflavones on the Proliferation and Invasion of Hepatoma Cells

Kazumi YAGASAKI, Maki TAKABATAKE and Yutaka MIURA

Department of Applied Biological Science, Tokyo Noko University, Tokyo 183-8509

### ABSTRACT

Effects of soybean isoflavones, genistein and daidzein, on the proliferation and invasion of a rat ascites hepatoma cell line of AH109A were studied *in vitro* and *ex vivo*. Genistein and daidzein dose-dependently suppressed the proliferation and invasion of AH109A in culture, although the suppressive effect of genistein was more prominent than that of daidzein. Sera from rats orally given genistein (5 mg/100 g body weight) 2-3 hours before blood collection most strongly suppressed the proliferation and invasion of hepatoma cells. Genistein resulted in cell cycle arrest at the G<sub>2</sub>/M phase in AH109A cells, suggesting cell cycle arrest may be one mechanism for the inhibition of AH109A proliferation by genistein. Hepatoma cells pre-cultured with hypoxanthine (HX) and xanthine oxidase (XO) showed a highly invasive capacity. Genistein suppressed the reactive oxygen species (ROS)-potentiated invasive capacity by simultaneously treating AH109A cells with HX, XO and genistein, suggesting that the antioxidative property of genistein may be involved in its anti-invasive action. *Soy Protein Research, Japan* **6**, 122-127, 2003.

Key words : soybean isoflavones, genistein, hepatoma, proliferation, invasion

大豆イソフラボンとくにゲニステイン (genistein) は発がん抑制, がん細胞増殖抑制, 血管新生抑制など, 抗がん的に作用することが報告されている。がん細胞の特性として, 無限増殖性と転移性があげられるが, 浸潤はがん転移の重要かつ特徴的段階である。我々は,

腹水肝がん細胞AH109Aを用いてその増殖能と浸潤能の検定系を作製し, いくつかの食品成分ががん細胞の増殖ないし浸潤を抑制することを見いだした<sup>1)</sup>。また, 活性酸素種 (ROS) が肝がん細胞の浸潤能を亢進させること<sup>2)</sup>, 抗酸化機能を有する食品成分はこの亢進を抑制すること<sup>2~4)</sup>を見いだした。さらに, ROSは細胞運動因子の一つである肝細胞成長因子 (HGF) の産生を

\*〒183-8509 東京都府中市幸町3-5-8

亢進して肝がん細胞の浸潤を亢進することを明らかにした<sup>5)</sup>。ゲニステインやダイゼイン (daidzein) は抗酸化作用を有すること<sup>6)</sup>が知られているので、これらのイソフラボンはAH109A細胞の浸潤を抑制することが期待される。そこで本研究では上記機能検定系を用い、肝がん細胞の浸潤に対するゲニステインとダイゼインの作用を増殖に対する作用も含めて解析し、さらにその作用機構も解明することを目的とする。

## 方 法

### がん細胞の培養

モデルがん細胞としてラット腹水肝がん細胞AH109Aを用いた。このがん細胞を10%子牛血清 (CS) を含むイーグル最少必須培地 (10% CS/MEM) 中で維持培養した。増殖能は [<sup>3</sup>H] チミジンのDNA画分への取り込みを測定することにより評価した<sup>4)</sup>。浸潤能は、ラット腸間膜より初代培養した中皮細胞層上にAH109A細胞を重層後共培養し、中皮細胞層下に潜り込んだ肝がん細胞の数を計測することにより評価した<sup>4)</sup>。ゲニステイン、ダイゼインはジメチルスルフォキシド (DMSO) に溶解し、DMSOの最終濃度が0.3%となるよう培地に添加した。対照培地には、同濃度のDMSOのみ添加した。

### ゲニステイン経口投与後ラット血清の調製

0.3%カルボキシメチルセルロース (CMC) 溶液に

懸濁したゲニステインを、あらかじめ20%カゼイン (20C) 食で5日間飼育したのち16時間絶食させたラットに経口投与し、採血した。得られた血清 (RS) を、上記の増殖能および浸潤能検定系のCSの代わりに10%となるように培地へ添加し、増殖能と浸潤能に対する影響を検討した。

### 細胞周期分析

AH109A細胞をヨウ化プロピジウムで処理した後、セルソーターにて細胞周期分析を行なった<sup>7)</sup>。

### 肝がん細胞の活性酸素種 (ROS) 処理

ゲニステインの存在下または非存在下で、AH109A細胞をROS発生系 (ヒポキサンチン-キサンチンオキシダーゼ系, HX-XO系) を含む培地中で4時間培養し洗浄した後、上記浸潤能検定系に供し、浸潤能に対するROSおよびゲニステインの作用を検討した<sup>2)</sup>。

### 統計処理

結果は平均値±標準誤差で示した。有意差の検定はTukey-Kramer multiple comparisons testまたはStudent's *t*-test で行い、*P* < 0.05のとき有意差があるとした。

## 結果と考察

まず、がん細胞の増殖と浸潤に対するゲニステインの用量-作用反応を検討した (Fig. 1)。肝がん細胞の増殖能、浸潤能はともに、25  $\mu$ Mから有意に抑制され、

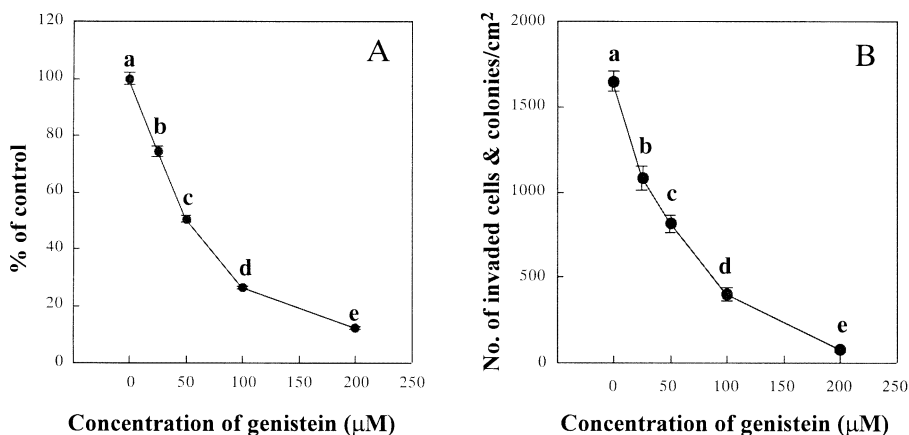


Fig. 1. Effect of genistein on the proliferation (A) and invasion (B) of AH109A cells. Genistein was dissolved in DMSO. The genistein solution was added to the medium at a final DMSO concentration of 0.3%. (A) The proliferation of AH109A cells was evaluated by measuring the incorporation of [methyl-<sup>3</sup>H] thymidine into the DNA fraction. Data are the means  $\pm$  SEM of six wells. (B) The invasive activity of AH109A cells was determined by invasion assay as described previously<sup>2)</sup>. Data are the means  $\pm$  SEM of ten areas. Values not sharing a common letter are significantly different at *P* < 0.05 by Tukey-Kramer multiple comparisons test.

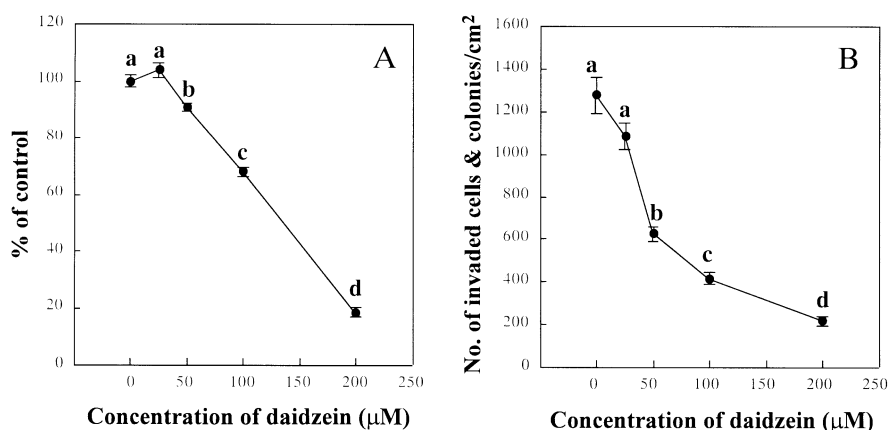


Fig. 2. Effect of daidzein on the proliferation (A) and invasion (B) of AH109A cells. Daidzein was dissolved in DMSO. The daidzein solution was added to the medium at a final DMSO concentration of 0.3%. (A) The proliferation of AH109A cells was evaluated by measuring the incorporation of [methyl-<sup>3</sup>H] thymidine into the DNA fraction. Data are the means  $\pm$  SEM of six wells. (B) The invasive activity of AH109A cells was determined by invasion assay as described previously<sup>2)</sup>. Data are the means  $\pm$  SEM of ten areas. Values not sharing a common letter are significantly different at  $P < 0.05$  by Tukey-Kramer multiple comparisons test.

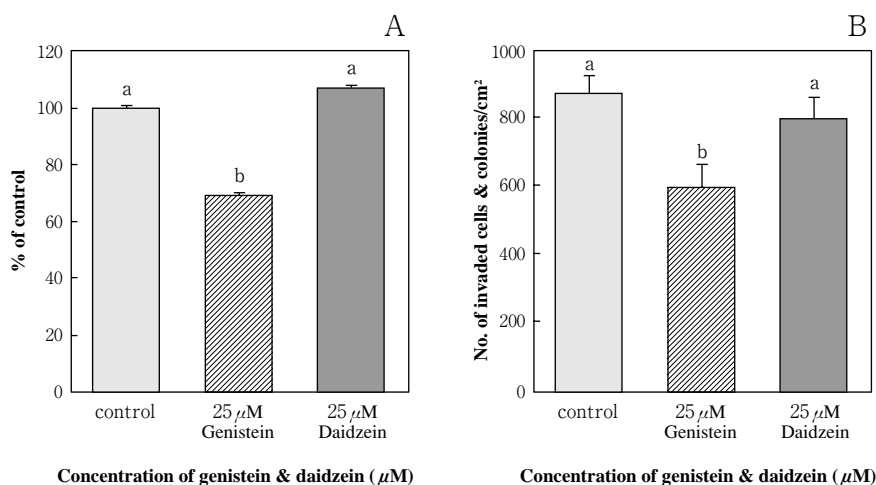


Fig. 3. Effect of genistein or daidzein on the proliferation (A) and invasion (B) of AH109A cells. Genistein and daidzein were dissolved in DMSO. The genistein or daidzein solution was added to the medium at 25 μM with a final DMSO concentration of 0.3%. (A) The proliferation of AH109A cells was evaluated by measuring the incorporation of [methyl-<sup>3</sup>H] thymidine into the DNA fraction. Data are the means  $\pm$  SEM of six wells. (B) The invasive activity of AH109A cells was determined by invasion assay as described previously<sup>2)</sup>. Data are the means  $\pm$  SEM of ten areas. Values not sharing a common letter are significantly different at  $P < 0.05$  by Tukey-Kramer multiple comparisons test.

200 μMまで用量依存的に抑制された。同様にダイゼインの作用を検討したところ、増殖能、浸潤能とも25 μMでは有意な抑制は認められなかったが、50～200 μMでは用量に依存して有意に抑制された (Fig. 2)。これらの結果は、ダイゼインよりもゲニステインのほうが作用の強いことを示唆した。そこで、培地添加濃度を

一定 (25 μM) にして、ゲニステインとダイゼインの作用を同時に比較検討したところ、ゲニステインのほうが増殖能、浸潤能ともに強く抑制することが確認された (Fig. 3) ので、以降の実験ではゲニステインについて検討することとした。

次に、ゲニステインが体内へ移行して、増殖と浸潤

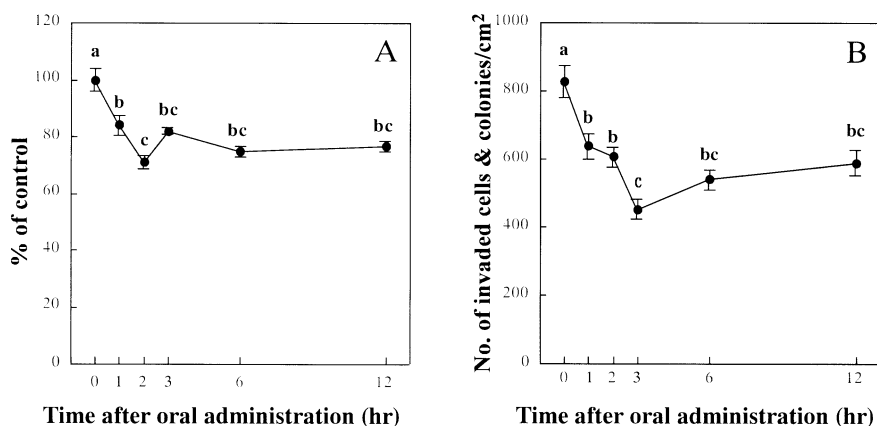


Fig. 4. Time-dependent effects of genistein-loaded rat sera on the proliferation (A) and invasion (B) of AH109A cells. Genistein was suspended in 0.3% CMC aqueous solution. Genistein (5 mg/100 g body weight)-loaded rat sera were obtained at the indicated times after oral intubation. With the medium containing 10% each rat serum instead of calf serum, the proliferation and invasion assays were conducted. Data are the means  $\pm$  SEM of six wells (A) or ten areas (B). Values not sharing a common letter are significantly different at  $P < 0.05$  by Tukey-Kramer multiple comparisons test.

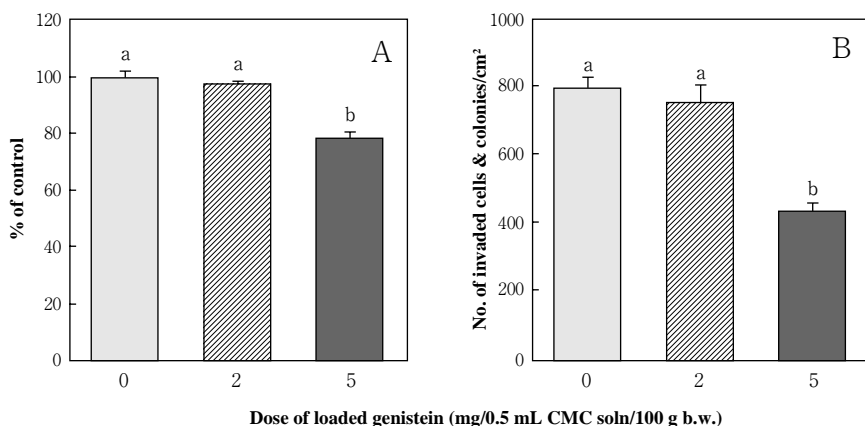


Fig. 5. Dose-dependent effects of genistein-loaded rat sera on the proliferation (A) and invasion (B) of AH109A cells. Genistein was suspended in 0.3% CMC aqueous solution. Genistein suspensions were intubated at the indicated doses (2 or 5 mg/100 g body weight) to rats, and blood was collected at 3 hr after oral intubation. With the medium containing 10% each rat serum instead of calf serum, the proliferation and invasion assays were carried out. Data are the means  $\pm$  SEM of six wells (A) or ten areas (B). Values not sharing a common letter are significantly different at  $P < 0.05$  by Tukey-Kramer multiple comparisons test.

を抑制しうるかどうかを検討した。体重100g当たり5mgのゲニステインを経口投与すると、1時間後に得られた血清から有意に増殖と浸潤を抑制しはじめ、投与2時間後（増殖）または3時間後（浸潤）に最も強い抑制を示し、以後12時間後まで有意な抑制効果を維持した（Fig. 4）。そこで、経口投与3時間後に採血することとし、投与量変化の影響を検討した。その結果、2 mg/100 g体重では効果なく、5 mg/100 g体重で増殖、浸潤ともに有意に抑制されることが明らかとなっ

た（Fig. 5）。この値は、今後の*in vivo*における有効性を検討する際の投与量決定の参考となる。

Fig. 6に、細胞周期に及ぼすゲニステインの影響を示した。ゲニステインを作用させて0, 12, 24, 48時間後に細胞周期分析を行なうと、 $G_2/M$ 期の細胞の割合が29%, 31%, 32%, 44%と次第に増加してくるのが認められた。すなわち、ゲニステインの肝がん細胞増殖抑制機構の一つとして、細胞周期の $G_2/M$ 期アレストが考えられた。今後、アポトーシス誘導性の有無

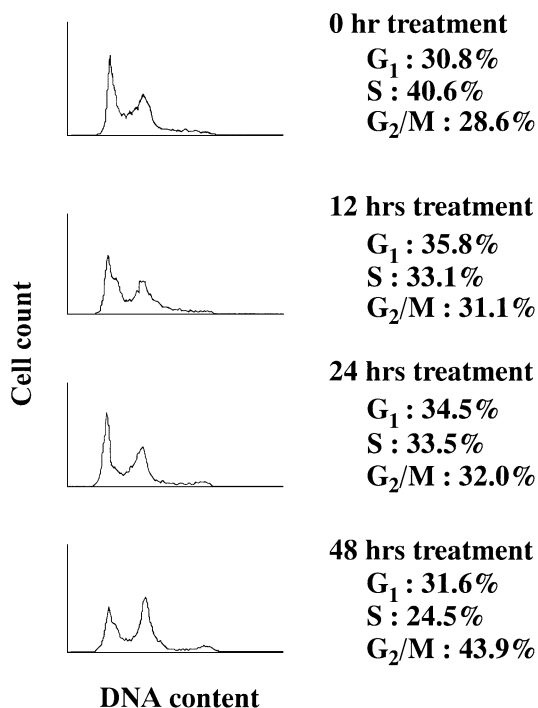


Fig. 6. Effect of genistein on the cell cycle of AH109A cells. AH109A cells were treated with genistein (50  $\mu$ M) for 0, 12, 24 and 48 hr.

についても検討する必要がある。

Fig. 7に示したように、HX-XO系により発生させたROSに肝がん細胞を4時間曝すことによりその浸潤能が亢進するが、このときゲニステイン (12.5  $\mu$ M) が共存するとこの亢進が完全に阻止された (Fig. 7B). この濃度のゲニステインを4時間AH109Aに作用させてから増殖能を測定しても、何ら影響を受けなかった (Fig. 7A). すなわち、増殖が抑制されて細胞数が増えなかったから浸潤が抑制されたのではないことが確認された。また、ゲニステインは12.5  $\mu$ MでXO活性をまったく抑制していない (対照群 $3.0 \pm 0.3$  vs. ゲニステイン群 $2.9 \pm 0.3$  U/mL, 平均値 $\pm$ 標準誤差,  $n=3$ ) ので、ゲニステインはXO活性を抑制してROS産生を抑えたのではなく、HX-XO系により発生したROSをその抗酸化機能によって補足したことにより、ROS誘導性の浸潤亢進を抑制したことがひとつの可能性として考えられる。

AH109A細胞のROS処理により、細胞運動因子の一つであるHGFの発現が高まることが認められている<sup>5)</sup>. すなわち、ROSによりAH109A細胞からのHGF分泌が高まって細胞運動性が増し、その結果浸潤能が亢進するが、ゲニステインが共存するとこのループが遮断され浸潤能亢進が弱まるものと考えられる。今後、肝がん細胞内HGFmRNAレベルと培地中へのHGF分泌量の測定が必要と考えられる。

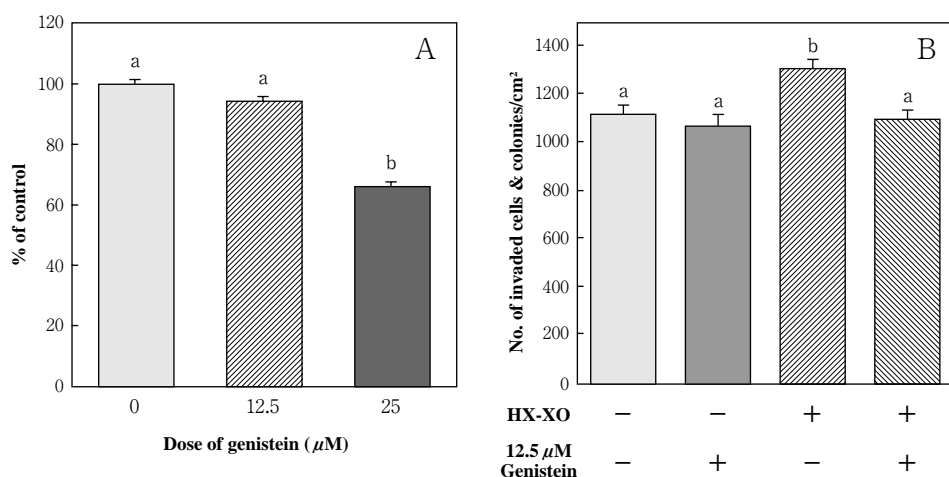


Fig. 7. Effect of genistein on the proliferation (A) and invasion (B) of AH109A cells pretreated with hypoxanthine (HX) and xanthine oxidase (XO). AH109A cells were cultured for 4 hr in the absence or presence of 12.5  $\mu$ M of genistein and/or HX with XO. After the treatment, the cells were washed and subjected to the proliferation (A) and invasion (B) assays as described in the legend of Fig. 1. Data are the means  $\pm$  SEM of six wells (A) or ten areas (B). Values not sharing a common letter are significantly different at  $P < 0.05$  by Tukey-Kramer multiple comparisons test.

## 要 約

がん細胞の持つ生物学的特性として無限増殖性と転移性があげられる。多段階にわたるがん転移過程の中で、浸潤は重要かつ特徴的な段階である。本研究は、腹水肝がん細胞AH109Aの増殖と浸潤に対する大豆イソフラボンの作用とその機構の解明を目的とした。ゲニステインとダイゼインはAH109Aの増殖と浸潤の両者を用量依存的に抑制したが、その作用はゲニステインのほうが強かった。ゲニステインをラットに経口投与（5 mg/100 g体重）すると、AH109Aの増殖と浸潤の両者は投与2～3時間後に得られた血清で最も強く抑制された。細胞周期分析により、ゲニステインはAH109AをG<sub>2</sub>/M期にアレストすることが認められた。AH109Aを活性酸素種の中で培養すると浸潤能が亢進するが、ゲニステインが共存するとこの亢進は抑制された。

## 文 献

- 1) Yagasaki K and Miura Y (1999): Food factors with potential to suppress proliferation and invasion of cancer cells and cancerous hyperlipidemia. *Recent Research Developments in Agricultural & Biological Chemistry*, **3**, 91-96.
- 2) Kozuki Y, Miura Y and Yagasaki K (2000): Inhibitory effects of carotenoids on the invasion of rat ascites hepatoma cells in culture. *Cancer Lett*, **151**, 111-115.
- 3) Zhang GY, Miura Y and Yagasaki K (2000): Suppression of adhesion and invasion of hepatoma cells in culture by tea compounds through antioxidative activity. *Cancer Lett*, **159**, 169-173.
- 4) Kozuki Y, Miura Y and Yagasaki K (2001): Resveratrol suppresses hepatoma cell invasion independently of its anti-proliferative activity. *Cancer Lett*, **167**, 151-156.
- 5) Miura Y, Kozuki Y and Yagasaki K (2003): Potentiation of invasive activity of hepatoma cells by reactive oxygen species is mediated by autocrine/paracrine loop of hepatocyte growth factor. *Biochem Biophys Res Commun*, **305**, 160-165.
- 6) Wei H, Bowen R, Cai Q, Barnes S and Wang Y (1995): Antioxidant and antipromotional effects of the soybean isoflavone genistein. *Proc Soc Exp Biol Med*, **208**, 124-130.
- 7) Zhang GY, Miura Y and Yagasaki K (2000): Induction of apoptosis and cell cycle arrest in hepatoma cells by *in vivo* metabolites of teas. *Nutr Cancer*, **38**, 265-273.