

大豆イソフラボンの機能性発現を担う生体内標的分子に関する研究

立花宏文^{*1,2}・蒲池祥子¹・山下修矢¹・山田耕路¹

¹九州大学大学院農学研究院生命機能科学部門食糧化学分野

²九州大学バイオアーキテクチャーセンター食品機能デザイン分野

Identification of A Gene Mediating the Inhibitory Effects of Equol on Cancer Cell Growth

Hirofumi TACHIBANA^{*1,2}, Shoko KAMACHI¹, Shuya YAMASHITA¹ and Koji YAMADA¹

¹Faculty of Agriculture, Kyushu University, Fukuoka 812-8581

²Bio-Architecture Center, Kyushu University, Fukuoka 812-8581

ABSTRACT

Daidzein and genistein are polyphenolic isoflavones contained in soy protein; intestinal bacteria metabolize daidzein to equol. In numerous instances, the mechanisms of the physiological effects of isoflavones have been considered to be involved in estrogen receptors (ERs) because they have been reported to have avidity for ERs and exhibit estrogen-like or anti-estrogenic effects. On the other hands, some reports indicate the existence of ER-independent effects of isoflavones. We also previously reported that the suppressive effects of isoflavones on the expression of high-affinity IgE receptor FcεRI in human basophilic cells are independent of ERs. In the present study, we attempted to identify a gene involved in the ER-independent effects of equol on cancer cell growth. By the method of genetic screening, we identified four candidate genes correlating the inhibitory effects of equol on the growth of B16 cells, mouse melanoma. The gene silencing of Pap-associated domain containing 5 (Papd5) inhibited the effects of equol on the growth of B16 cells. Furthermore, equol inhibited the tumorigenesis of B16 cells and the silencing of Papd5 expression reduced that antitumor effect of equol, suggesting that Papd5 is a key mediator of ER-independent effects of equol. *Soy Protein Research, Japan* **14**, 73-76, 2011.

Key words : isoflavones, equol, anticancer effect, Papd5, ERs

*〒812-8581 福岡市東区箱崎6-10-1

大豆イソフラボンは、生体内でエストロゲン受容体 (ERs, ER α およびER β) に結合し、生理機能を発揮することが知られている^{1,2)}。大豆イソフラボンの生体調節作用は、主にERsを介するものと想定されているが、我々はこれまでに大豆イソフラボンの高親和性IgE受容体発現抑制作用や³⁾、大豆イソフラボンに対する感受性はがん細胞ごとに大きく異なるが、ERsの発現量とは相関しないことを見出してきた。また、Genisteinは胸腺を委縮させるが、その作用はERsアンタゴニストによって部分的にしか阻害されないことが報告されている⁴⁾。こうした結果は、大豆イソフラボンの機能性発現に関与する生体内分子がERs以外にも存在することを示唆している。そこで本研究では、我々がこれまでに緑茶カテキンepigallocatechin-3-gallate (EGCG) のシグナル伝達分子の同定に成功しているgenetic suppressor elements (GSE) 法を用い⁵⁾、ERs非依存性のがんに対するイソフラボン、とりわけDaidzeinの代謝産物であるEquolの細胞増殖抑制作用を担う遺伝子 (Equol感知遺伝子) の同定を試みた。

方 法

細胞培養と試薬

マウスメラノーマ細胞株B16は5%ウシ胎児血清 (FBS) を含むDMEM培地により、EcoPack-293およびAmphoPack-293パッケージング細胞は10%FBSを含むDMEM培地により、37℃、5%炭酸ガス加湿下で継代・維持した。EquolはLC Laboratoriesより購入し、dimethylsulfoxide (DMSO) に溶解した。ICI182,780はTocrisより購入しDMSOに溶解した。

B16細胞の増殖に及ぼすEquolの影響およびERsの関与の検討

B16細胞を 2×10^4 cells/mLにて24 well plateに播種し、24時間培養した。終濃度1 μ MのICI182,780を含む2% FBS-DMEMで30分間処理し、ICI182,780存在下あるいは非存在下において各濃度 (5, 10および20 μ M) のEquolを含む2% FBS-DMEMにて72時間培養した後、コールターカウンターにより細胞数を計測した。

Genetic suppressor elements (GSE) 法によるEquol感知分子の探索

EcoPack-293, AmphoPack-293パッケージング細胞に、GSEライブラリー (田辺三菱製薬株式会社) およびpVSV-G vector (Clontech) FuGENE6 Transfection Reagent (Roche) により導入した。24時間後、細胞培養上清をフィルター滅菌し、ポリブレン (SIGMA-ALDRICH) を終濃度8 μ g/mLとなるように添加した。

1×10^4 cells/mLにて5 mL dishに播種し、24時間培養しておいたB16細胞の培地を得られたウイルス培養上清と置換した。パッケージング細胞には新しい培地を添加し、培養を継続した。本操作を12時間ごとに計4回行った。感染の終了したB16細胞を 1×10^4 cells/mLに調整し96穴プレートに播種し24時間後、100 μ M Equol含有培地に置換し、約1ヶ月間セクションを行った。Equol耐性細胞よりトータルRNAを回収し、MMLV-reverse transcriptase (Promega) によりcDNAを合成し、GSE (pLPCX vector) に特異的なプライマーを用いたPCRによりGSE断片を増幅した。本断片をpTargetTM Mammalian Expression Vector System (Promega) にライゲーションし、TA クローニング後、DNAシーケンス解析 (九州大学大学院医学研究院教育・支援センター) に供し塩基配列の由来遺伝子を特定した。

B16細胞の腫瘍成長に及ぼすEquolの影響およびPapd5の関与

実験動物は6週齢、オスのC57BL/6Jマウス (九動株式会社) を用いた。Control vectorを導入したB16細胞 (Scramble-B16) もしくはPapd5の発現を低下させたB16細胞 (Papd5ノックダウンB16) を 5×10^6 cells/mLになるようにPBSに懸濁し、マウスの背部に100 μ L皮下注射した。飼料はAIN-93G準拠食 (オリエンタル酵母) の大豆油をコーン油に置換したものを自由摂食させた。EquolはDMSOに溶解したものをNa₂CO₃水溶液に1%溶解し、一日あたりEquol 0.6 mgとなるように強制経口投与した。コントロール群には1% DMSO含有Na₂CO₃水溶液与えた。腫瘍体積は腫瘍の長径および短径をノギスにより測定し算出した。群は、Scramble-B16移植-溶媒投与群、Scramble-B16移植-Equol投与群、Papd5ノックダウンB16移植-溶媒投与群およびPapd5ノックダウンB16移植-Equol投与群の4群とした。

結果と考察

B16細胞の増殖に及ぼすEquolの影響およびERsの関与

マウスメラノーマ細胞株B16においてEquolは濃度依存的に細胞増殖を抑制した。また、その作用はERsのアンタゴニストであるICI182,780によって阻害されなかったことから、B16細胞におけるEquolの細胞増殖抑制作用はER非依存的である可能性が示された (Fig. 1)。

Genetic suppressor elements (GSE) 法によるEquol感知分子の同定

マウスメラノーマ細胞株B16にGSE断片を導入した後、100 μ MのEquolにより約1ヶ月間セクションを行い、Equol耐性B16細胞を獲得した。それらの細胞に導入されたGSE断片を解析した結果、4種のEquol感知分子の候補を特定した。そのうち、Pap associated domain containing 5 (Papd5) に着目し、B16細胞においてRNA干渉法によりPapd5を定常的にノックダウンすることにより、Equolの細胞増殖抑制作用における関与について検討した。その結果、Papd5をノックダウンしたB16細胞においてはEquolによる細胞増殖抑制作用がほぼ完全にキャンセルされた (Fig. 2B)。In vitroにおいてEquolがER非依存的にB16細胞に対し増殖抑制作用を発揮し、その作用にPapd5が関与する可能性が示された。

B16細胞の腫瘍成長に及ぼすEquolの影響およびPapd5の関与

マウスにマウスメラノーマ細胞株B16 (Scramble-B16細胞もしくはPapd5ノックダウンB16細胞) をC57BL/6Jマウスに皮下注射し腫瘍を形成させ、Equolを強制経口投与することで腫瘍成長に及ぼすEquolの影響およびPapd5の関与について検討を行った。B16細胞移植後20日目においてコントロールB16細胞を移植した群では、溶媒投与群に対してEquol投

与群の腫瘍体積は有意に低値を示した (Fig. 3)。一方、Papd5発現を低下させたB16細胞を移植した群においては、溶媒投与群とEquol投与群の間には腫瘍体積に有意な差は見られなかった (Fig. 3)。以上より、in vivoにおいてもEquolはB16細胞の腫瘍成長を抑制し、その作用にPapd5が関与している可能性が示された。

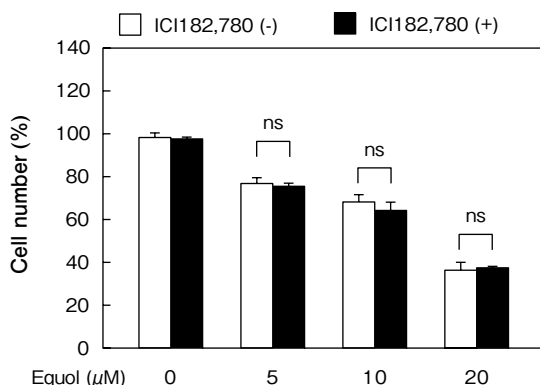


Fig. 1. ER-independent inhibitory effects of equol on the growth of B16. After incubation with or without ICI182,780 for 30 min, B16 cells were treated with 5, 10 or 20 μ M equol in the presence or absence of ICI182,780 for 72 h and total cell number was counted. Data are means $\pm$ SD (n=3). ns: not significant.

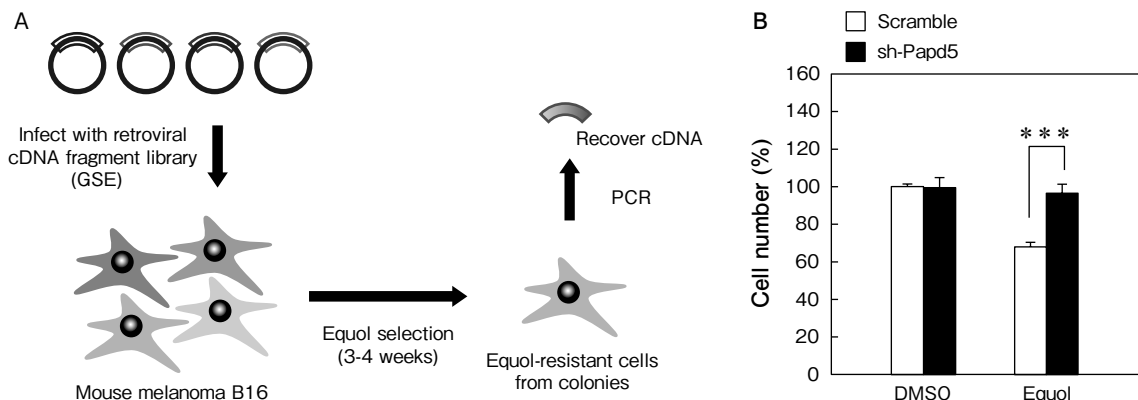


Fig. 2. Identification of Papd5 as a key mediator for anticancer effects of equol. A flow chart describing a genetic screen for regulators of equol-induced cell growth inhibition (A). Papd5 knockdown B16 cells were treated with 10 μ M equol for 72 h and total cell number was counted (B). Data are means $\pm$ SD (n=3). *** p <0.001 vs scramble.

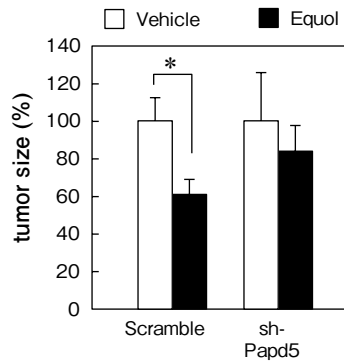


Fig. 3. Involvement of Papd5 in the inhibitory effect of equol on the tumor growth of B16 *in vivo*. C57BL/6J mice were subcutaneously inoculated with B16 cells stably transfected with scramble-shRNA or Papd5-shRNA expression vectors. Peroral administration of 0.6 mg/day equol was started 1 day before the cell inoculation. Tumor sizes were measured at day 20. Data are means $\pm$ SE for five to eight mice. * $p < 0.05$ vs vehicle.

要 約

本研究では、大豆イソフラボンのエストロゲン受容体 (ERs, ER α およびER β) 非依存的ながん細胞増殖抑制作用を担う遺伝子の探索を目的とした。マウスメラノーマ細胞株B16においてEquolは細胞増殖をER非依存的に抑制することを明らかにした。Equolのがん細胞増殖抑制作用を担う遺伝子をgenetic suppressor elements(GSE)法により網羅的に探索しところ、4種の遺伝子を特定した。そのうち、B16細胞においてPapd5をノックダウンするとEquolの細胞増殖抑制作用はキャンセルされた。さらに、B16細胞の腫瘍成長におけるEquolの影響およびPapd5の関与について動物試験により検討したところ、Papd5の発現を低下させた腫瘍に対し、Equolの腫瘍成長抑制作用は観察されなかった。以上の結果より、Equolのがん細胞増殖抑制作用においてPapd5が重要な役割を果たしていることが示された。

文 献

- 1) Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag PT, van der Burg B and Gustafsson JA (1998): Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor β . *Endocrinology*, **139**, 4252-4263.
- 2) Tham DM, Gardner CD and Haskell WL (1998): Clinical review 97: Potential health benefits of dietary phytoestrogens: a review of the clinical, epidemiological, and mechanistic evidence. *J Clin Endocrinol Metab*, **83**, 2223-2235.
- 3) 立花宏文, 矢野知美, 山田耕路 (2007): 大豆成分の抗アレルギー性発現に関与する標的分子に関する研究. 大豆たん白質研究, **10**, 128-133.
- 4) Yellayi S, Naaz A, Szewczykowski MA, Sato T, Woods JA, Chang J, Segre M, Allred CD, Helferich WG and Cooke PS. (2002): The phytoestrogen genistein induces thymic and immune changes: A human health concern? *Proc Natl Acad Sci USA*, **99**, 7616-7621.
- 5) Umeda D, Yano S, Yamada K and Tachibana H. (2008): Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate signaling pathway through 67-kDa laminin receptor. *J Biol Chem*, **283**, 3050-3058.