

大豆イソフラボンによる肺がんリスク軽減効果の性差発現機序の解明

遠藤智史*・松永俊之・五十里彰

岐阜薬科大学生命薬学大講座生化学研究室

Elucidation of Mechanisms Underlying Sex Differences in Alleviation Effects of Lung Cancer Risk by Soy Isoflavone

Satoshi ENDO*, Toshiyuki MATSUNAGA and Akira IKARI

Laboratory of Biochemistry, Department of Biopharmaceutical Sciences,
Gifu Pharmaceutical University, Gifu 501-1196

ABSTRACT

A recent study at the Japan National Cancer Center showed that isoflavone intake was inversely associated with lung cancer risk in Japan. In this report, the inverse association was found in non-smoking males, but not in females. As mechanisms such as apoptotic induction and inhibition of angiogenesis by isoflavones cannot explain sex differences in the attenuating effect on lung cancer risk, we focused on differences in plasma concentrations of steroid hormones between males and females. The inhibitory effects of isoflavones and soybean components, soyaflavone HG, on the activity of 17β -hydroxysteroid dehydrogenase type 5 (17β HSD5), which is involved in steroid hormone synthesis, were examined in this study. Among isoflavones, daidzein and genistein inhibited 17β HSD5. These two isoflavones and soyaflavone HG also inhibited androsterone metabolism dependent on 17β HSD5 in lung cancer A549 cells. Next, we tested 17β HSD5 inhibitory activity, of various flavonoids such as monohydroxyflavones, flavanone, D-(+)-catechin and calcones in order to develop flavonoid analogues which have more potent inhibitory activity, and found that 7-hydroxyflavone had a potent inhibitory activity against 17β HSD5. Among 12 derivatives of 7-hydroxyflavone, pratol (7-hydroxy-4'-methoxyflavone) showed the most potent 17β HSD5 inhibitory activity. Molecular docking studies revealed that a hydrogen bond between 7-hydroxy group of pratol and the main chain of Asp224 and hydrophobic interaction of 4'-methoxy group with hydrophobic residues such as Phe306 and Pro318 might be involved in the binding of pratol with the enzyme. These results, it is suggested that we can contribute to the elucidation

*〒501-1196 岐阜市大学西1-25-4

of mechanisms underlying the sex-differentially attenuating effect of soy isoflavones on lung cancer risk and to the development of novel inhibitors of 17 β HSD5. *Soy Protein Research, Japan* **17**, 159-163, 2014.

Key words : lung cancer, steroid hormone, 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 5, isoflavone, structure-activity relationships

肺がんは、部位別がん死亡率の第1位であり、最も致死的ながんである。その原因として、発見時期の遅さによるがん増殖・転移の進行が挙げられる。そのため、初期診断や日常におけるリスク軽減の重要度は増している。最近、国立がんセンターより大豆イソフラボンによる肺がんリスクの軽減効果が報告された¹⁾。この報告では、イソフラボンの効果に性差があり、非喫煙男性では最大57%も肺がんのリスクが軽減される一方で、女性では統計的に有意な差は見られなかった。そのメカニズムとして酸化ストレス、血管新生、転移阻害などが考えられているが²⁾、これら作用機序では、男女間でのイソフラボンの効果の差を説明できない。一方で、がんの進展に関与するステロイドホルモン濃度は男女間で大きく異なる。これまでにステロイドホルモンの合成に関与する17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 5 (17 β HSD5) が肺がんにおいて高発現し、がん細胞増殖に関与することが示唆されている。そこで、『大豆イソフラボンは、肺がんで高発現するステロイドホルモン合成酵素を阻害することにより、男性における肺がんリスクを軽減する』という仮説を実証することとした。

方 法

リコンビナント17 β HSD5の発現および調製

17 β HSD5 cDNAを組み込んだpkk223-3ベクターのプラスミドによって形質転換された大腸菌JM109を1 mM IPTG誘導下、37℃で8時間培養した。遠心操作により集菌し、0.5 mM EDTAと5 mM 2-mercaptoethanolを含む10 mM Tris-HCl (pH8.0) に再懸濁した。この懸濁液を氷冷下超音波処理 (150 W, 5分) した後、遠心分離 (12,000 \times g, 15分) し、その上清を大腸菌粗抽出液とした。リコンビナント17 β HSD5は、Sephadex G-100, Q-Sepharose, Red A-Sepharoseカラムを用いて単一に精製した。

酵素活性測定

17 β HSD5の酵素活性は、以下の反応系におけるNADPHの生成速度を蛍光分光学的 (Ex. 340 nm,

Em. 455 nm) に測定した。標準反応系は、0.1 M リン酸カリウム緩衝液 (pH7.4), 0.25 mM NADP⁺, 1 mM S-(+)-1,2,3,4-tetrahydro-1-naphtholおよび酵素を含む全量2.0 mLとし、阻害剤のIC₅₀値は、標準反応系にて、5点の異なる濃度の阻害剤を添加した時の阻害率から算出した。

LC/MSを用いた代謝分析

A549細胞を2 \times 10⁴ cells/mLずつ播種し、80%コンフルエントに達したところで、FBS不含培地に交換して2時間培養した。様々な濃度の阻害剤を培地に添加して2時間培養後、50 μ M androsteroneを加え、24時間培養した。培地中の脂質画分を酢酸エチルにて抽出し、有機溶媒層を蒸発乾固させ、得られた残渣をメタノールに溶解させた。Androsteroneおよび還元体5 α -androstan-3 α , 17 β -diolの定量は、溶媒 (Acetonitrile /0.1% formic acid=80:20) とMightysil RP-18 GP (4.6 \times 250 mm) カラムを用いたLC-ESI/MSにより定量した。

分子モデリング

17 β HSD5-NADP⁺-flufenamic acid結晶の構造座標 (PDB code: 1S2C)³⁾ を基に、ICM (Molsoft LLC) を用いて、pratolおよび7-hydroxyflavoneのドッキングモデルを構築した。その高次構造図はPyMOL (DeLano Scientific) を用いて作成した。

結果と考察

大豆イソフラボンによる17 β HSD5阻害活性

3種のイソフラボンアグリコンの中でdaidzeinとgenisteinが17 β HSD5を有意に阻害した一方で、glyciteinにはほとんど阻害効果がみられなかった (Table 1)。イソフラボンによる細胞レベルでの17 β HSD5阻害活性を評価すべく17 β HSD5を恒常的に高発現しているヒト肺がんA549細胞を用いて、細胞内ステロイド代謝に及ぼすイソフラボンの効果を検証した。まず初めに、LC/MSを用いた細胞内ステロイド量の評価系の確立を行った。Androsteroneとその17 β

-ヒドロキシ体5 α -androstane-3 α , 17 β -diolの検出にはそれぞれのフラグメントイオンm/z 256.5と258.5を用いた。A549細胞において、添加した50 μ M androsteroneの53 \pm 7%が24時間後に5 α -androstane-3 α , 17 β -diolに代謝された (Fig. 1A)。Genisteinおよび大豆イソフラボン抽出物 (Soyaflavone HG) は細胞レベルでもA549細胞におけるandrosterone代謝を有意に阻害した (Fig. 1B)。また, daidzeinは代謝阻害傾向を示したが, glyciteinではほとんど阻害が認められなかった。

17 β HSD5阻害活性を有するフラボノイド類の探索

2種のイソフラボンアグリコンが17 β HSD5阻害活性を示したため、これら構造を基にした誘導体の創製に向け、種々のフラボノイド類の17 β HSD5阻害活性を評価した。フラボンおよびそのモノヒドロキシ誘導体は

比較的強い阻害活性を示し、中でも7-hydroxyflavoneが最も強い阻害活性を示した (Table 2)。また, flavanoneやphloretinの阻害活性は弱く、D-(+)-catechinや2'-hydroxychalconeはほとんど阻害を示さなかった。これらの結果より、17 β HSD5阻害活性にはフラボン骨格の7位水酸基が重要であると考えられたため、7-ヒドロキシフラボン誘導体による17 β HSD5阻害活性の構造活性相関を検討した (Table 3)。12種の7-ヒドロキシフラボン誘導体の中ではpratolが最も強力な17 β HSD5阻害活性を示した。A、C環に水酸基が1つのみであるフラボノイド類と比べて、5位にも水酸基が導入された5,7-dihydroxyflavone誘導体の阻害活性は一樣に低い値を示した。また、3,5,7-trihydroxyflavone誘導体ではさらに阻害活性が低下する傾向が見られたため、A環5位およびC環3位の周辺には疎水性の環境

Table 1. Inhibitory activity against 17 β HSD5 by soy isoflavones

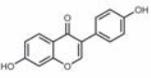
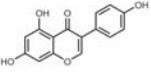
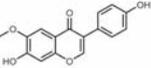
Isoflavones	Structures	IC ₅₀ for 17 β HSD5 (μ M)
Daidzein		16 \pm 1
Genistein		29 \pm 3
Glycitein		>50

Table 2. Inhibitory activity against 17 β HSD5 by various flavonoids

Flavones	IC ₅₀ for 17 β HSD5 (μ M)
7-Hydroxyflavone	1.0 \pm 0.1
Flavone	7.0 \pm 0.3
6-Hydroxyflavone	7.4 \pm 0.5
3-Hydroxyflavone	9.5 \pm 0.3
Flavanone	14 \pm 0.6
Phloretin	22 \pm 1.0
D-(+)-Catechin	>20
2'-Hydroxychalcone	>50

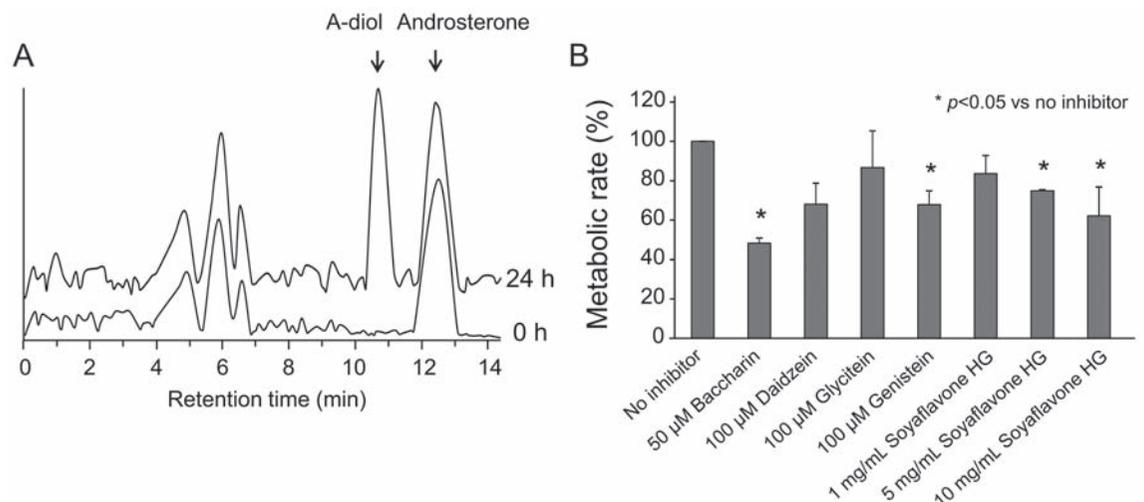


Fig. 1. Inhibitory effects of soy isoflavones and soyaflavone HG on cellular metabolism of androsterone by 17 β HSD5. (A) LC/MS chromatograms of the metabolism of androsterone into 5 α -androstane-3 α , 17 β -diol (A-diol) in A549 cells. (B) Effects of soy isoflavones and soyaflavone HG on the inhibition of androsterone metabolism by the A549 cells.

が存在することが推測された。一方で、B環については4'位への置換基の導入により阻害活性が強くなり、4'-OH基よりも4'-OMe基を有するフラボノイド類のほうが強い阻害活性を示した。

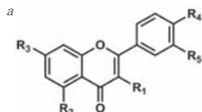
7-ヒドロキシフラボン誘導体の分子モデリング

17 β HSD5-NADP⁺-flufenamic acid結晶構造に、pratolと7-hydroxyflavoneをドッキングさせたところ、両

阻害剤は17 β HSD5の活性部位に配向した。Pratolの7位水酸基と17 β HSD5のAsp224との間で水素結合(3.0 Å)が確認された一方で、7-hydroxyflavoneの場合はAsp224との距離が3.8 Åであり、pratolのほうが活性部位ポケットに深く入り込んでいた (Fig. 2)。また、pratolのB環はPhe306の側鎖と π - π スタッキング相互作用が可能な位置に存在していた。

Table 3. Inhibitory activity against 17 β HSD5 by 7-hydroxyflavonoids

Compound	R1 ^a	R2 ^a	R3 ^a	R4 ^a	R5 ^a	IC ₅₀ (μ M) for 17 β HSD5
Pratol	H	H	OH	OMe	H	0.10 \pm 0.01
Acacetin	H	OH	OH	OMe	H	0.42 \pm 0.04
Kaempferide	OH	OH	OH	OMe	H	0.59 \pm 0.06
Apigenin	H	OH	OH	OH	H	0.82 \pm 0.03
Kaempferol	OH	OH	OH	OH	H	0.87 \pm 0.16
4',7-Dihydroxyflavone	H	H	OH	OH	H	0.87 \pm 0.01
7-Hydroxyflavone	H	H	OH	H	H	1.0 \pm 0.1
Luteolin	H	OH	OH	OH	OH	1.7 \pm 0.1
Chrysin	H	OH	OH	H	H	3.1 \pm 0.1
Galandin	OH	OH	OH	H	H	6.1 \pm 0.3
Quercetin	OH	OH	OH	OH	OH	8.0 \pm 0.3
Quercitrin	ORha ^b	OH	OH	OH	OH	8.3 \pm 0.5



^bRha; rhamnose

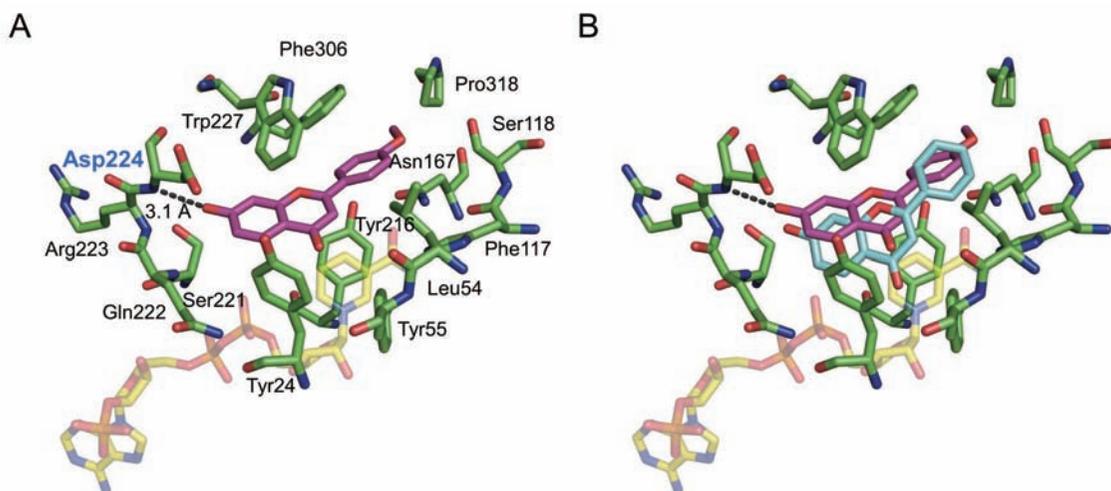


Fig. 2. (A) 17 β HSD5 models docked pratol in the enzyme-NADP⁺ complex. (B) Superimposed figure of the models of pratol and 7-hydroxyflavone. The portion of NADP⁺ (yellow) and residues (green) within 4.0 Å from the inhibitors are depicted with possible hydrogen bond interactions, which are shown in dotted lines.

以上、大豆イソフラボンによる17 β HSD5阻害を初めて明らかにした。今後、雌雄マウスを用いてステロイドホルモン量や代謝酵素発現分布などを評価することによって、イソフラボンによる17 β HSD5阻害と肺がんリスク軽減効果の性差発現との関係について言及していきたいと考える。また7-ヒドロキシフラボン誘導体

が、17 β HSD5を強力に阻害することを明らかにし、その中でも最も強力な阻害剤pratolを見出した。本研究で見出された17 β HSD5阻害における構造活性相関およびフラボノイド結合様式は、未だ見出されていない17 β HSD5の有効な阻害剤の創製に寄与するものと期待される。

要 約

最近報告された、大豆のイソフラボンによる肺がんリスクの軽減効果に関する疫学調査において、イソフラボンの効果に性差があることが示された。がんの進展に關与するステロイドホルモン濃度が男女間で大きく異なることから、イソフラボンがこれらステロイドホルモンの代謝酵素の活性を調節している可能性が考えられた。大豆イソフラボンの中でもdaidzeinとgenisteinは17 β HSD5阻害活性を示し、大豆イソフラボンを主成分とするソヤフラボンHGも細胞レベルでステロイドホルモンの代謝を有意に抑制した。また、7-ヒドロキシフラボン誘導体であるpratolが最も強力な17 β HSD5阻害を示すことを見出し、7-ヒドロキシフラボン誘導体の構造活性相関により17 β HSD5阻害の構造的要因を明らかにした。これら知見は、大豆イソフラボンによる肺がん軽減効果における性差発現の原因の解明および17 β HSD5の有効な阻害剤の創製に貢献するものと期待される。

文 献

- 1) Shimazu T, Inoue M, Sasazuki S, Iwasaki M, Sawada N, Yamaji T and Tsugane S (2010): Isoflavone intake and risk of lung cancer: a prospective cohort study in Japan. *Am J Clin Nutr*, **91**, 722-728.
- 2) Sarkar FH and Li Y (2004): The role of isoflavones in cancer chemoprevention. *Front Biosci*, **9**, 2714-2724.
- 3) Lovering AL, Ride JP, Bunce CM, Desmond JC, Cummings SM and White SA (2004): Crystal structures of prostaglandin D₂ 11-ketoreductase (AKR1C3) in complex with the nonsteroidal anti-inflammatory drugs flufenamic acid and indomethacin. *Cancer Res*, **64**, 1802-1810.