

シクロオキシゲナーゼ阻害効果をもつ大豆イソフラボンの がん細胞増殖への影響

川上祐生*・高橋吉孝

岡山県立大学保健福祉学部栄養学科

Antiproliferative Activity of Genistein via Inhibition of Cyclooxygenases

Yuki KAWAKAMI* and Yoshitaka TAKAHASHI

Department of Nutritional Science, Faculty of Health and Welfare Science,
Okayama Prefectural University, Soja 719-1197

ABSTRACT

Cyclooxygenase (COX) is a rate limiting enzyme for the production of prostaglandins (PGs) and thromboxane from arachidonic acid. The enzyme catalyzes both bisdioxygenation of arachidonic acid (cyclooxygenase activity) producing PGG₂ and conversion of PGG₂ to PGH₂ (PG hydroperoxidase activity). There are two isoforms, COX-1 which is constitutively expressed and COX-2 which is inducible. COX-1 plays an essential role in platelet aggregation, whereas COX-2 is necessary for ovulation and implantation. Both isoforms function coordinately in carcinogenesis and inflammation. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs contribute to a reduction in mortality from colorectal cancer in individuals. Isoflavones are major soybean flavonoids showing various pharmacological effects. We previously showed that isoflavones inhibited the enzyme activities of COX isoforms and genistein inhibited COX-1 and COX-2 with IC₅₀ values of 28 μM and 110 μM, respectively. We investigated inhibitory effects of genistein on the proliferation rate of the human colon carcinoma COLO320DM cells overexpressing COX-1 or COX-2. Genistein suppressed the cell growth and the DNA synthesis rate in the COX-expressing cells. *Soy Protein Research, Japan* **18**, 221-225, 2015.

Key words : cyclooxygenase; genistein; antiproliferative activity

脂質代謝酵素の1つであるシクロオキシゲナーゼ (COX) は、アラキドン酸からプロスタグランジン (PG) などの脂質メディエーターの産生に関わる酵素

である。COXはアラキドン酸に2分子の酸素を付加してPGG₂を産生するシクロオキシゲナーゼ反応とPGG₂の15位のヒドロペルオキシドを還元してPGH₂を産生するPGヒドロペルオキシダーゼ反応の2つの反応を触媒する酵素である¹⁾。PGH₂は臓器特異的な酵素により

*〒719-1197 岡山県総社市窪木111

方 法

PGD₂やPGE₂などの種々のPG類へ変換され、様々な生体機能を発揮する。COXにはCOX-1とCOX-2の2つのアイソザイムが知られ、アミノ酸の相同性は約60%である。COX-1はほとんどの細胞に恒常的に発現している構成型酵素であり、血小板凝集や胃酸分泌抑制、腎臓での利尿作用など生体内で必須の役割を果たすPGの合成を行うと考えられている。一方、COX-2は炎症部位やがん組織において発現が誘導され、炎症の亢進やがん細胞の増殖促進に関わっていることが報告されている^{2,3)}。しかしながら、近年、COX-1およびCOX-2を欠損させたマウスやアイソザイム特異的阻害剤を用いた研究より、COX-1とCOX-2の両者が炎症やがんに関わることが明らかになってきた⁴⁾。アスピリンやインドメタシンなどの非ステロイド系抗炎症薬(NSAIDs)は、炎症性のPG産生を抑制し、その抗炎症作用を表すことからCOXの阻害薬として知られている。NSAIDsの長期使用により結腸直腸がんの死亡率が減少することが疫学研究において明らかにされ、その後の数多くの研究でCOXの阻害は大腸がんの進展に抑制的に働くことが示されている^{5,6)}。そのため、これらCOXを制御することで、炎症やがんの増悪化の予防が期待される。

大豆および大豆に含まれる種々の成分の生理機能、とくに健康維持あるいは増進に貢献する作用は多岐にわたり、多くの生理活性が明らかにされている。フラボノイドであるイソフラボン類の有効機能に関する研究は多く、骨代謝との関係やエストロゲン様作用などが注目されてきた⁷⁾。細胞増殖に対するイソフラボン類の効果についてもいくつかの報告があり、チロシンキナーゼ阻害をはじめとして種々のメカニズムが明らかになっている⁸⁾。イソフラボン類は、COX-2の発現をmRNAおよびたん白質レベルで抑制し、さらにPGE₂受容体の発現抑制や、PGを不活化する15-ヒドロキシPGデヒドロゲナーゼのmRNA発現誘導により、PGの産生を減少させることが報告されている^{9,10)}。しかしながら、イソフラボン類がCOXの酵素活性に直接的に作用し、細胞増殖に対する影響についてはほとんど研究されていない。我々は、これまでイソフラボン類のCOX阻害効果について検討し、その中でゲニステインが最も強いCOX阻害効果を示すことを見出している。そこで、本研究ではCOX阻害効果をもつイソフラボンについて、COX-1あるいはCOX-2を安定的に発現させたヒト大腸がん由来細胞を用いて、がん細胞の増殖に対する影響を調べた。

細胞培養

安定かつ強力に発現誘導できるエロンゲーション因子1α (EF-1α)のプロモーターをもつpEF-BOSプラスミドのSapIサイトにネオマイシン耐性遺伝子を導入し、XbaIサイトにヒトCOX-1あるいはヒトCOX-2のcDNAを組み込んだ発現プラスミドpBOSNeoCOX1とpBOSNeoCOX2を用いた¹¹⁾。アラキドン酸代謝酵素を持たないヒト大腸がん細胞COLO320DM細胞にこれらの発現プラスミドをリポフェクタミン (Invitrogen社)によりトランスフェクションした。1.5 mg/mLのジェネティシンでCOX発現細胞をセレクションし、COXを過剰に発現した安定形質発現COLO320DM細胞を得た。COLO320DM細胞は、10%のウシ胎仔血清と100 U/mLのペニシリン、100 μg/mLのストレプトマイシンを含むRPMI1640培地を基本培地として、5%CO₂存在下で、37℃、100%水蒸気中で培養した。継代はトリプシン溶液を用いて行った。

MTTアッセイ

生細胞数を測定するために、3-(4,5-ジメチル-2-チアゾリル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムプロミド (MTT) が細胞内の解糖系脱水素酵素により定量的に紫色のフォルマザンに変換されることを利用したMTTアッセイを行った。COXを導入したCOLO320DM細胞を96ウェルプレートで一晩培養した後、種々の濃度のゲニステインと一定時間培養した後、培地を除去し、0.5 mg/mLのMTTを含むRPMI1640培地を各ウェルに添加し、37℃で4時間インキュベートした。その後、0.04 M HClを含むイソプロパノールを各ウェルに添加し、細胞内に析出したフォルマザンを溶解した。測定波長を570 nm、参照波長を630 nmとしてプレートリーダーで測定した。

BrdU取り込み試験

細胞の増殖速度を定量するために、ピリミジンアナログであるプロモデオキシウリジン (BrdU) の細胞内でのDNAへの取り込みをBrdU Cell Proliferation Assay Kit (Exalpha Biological社)を用いて、DNA合成速度を測定した。COXを導入したCOLO320DM細胞を96ウェルプレートで一晩培養した後、種々の濃度のゲニステインと3時間培養した。60 μM BrdUを各ウェルに添加し、37℃で1時間インキュベートした。

その後、70%エタノールで細胞を固定し、抗BrdU抗体とペルオキシダーゼ標識ヤギ抗マウスIgGを添加し、細胞に取り込ませたBrdUを標識した。ペルオキシダーゼの基質としてテトラメチルベンジジンを添加し、発色の強度をBrdUの取り込み量として、測定波長を450 nm、参照波長を570 nmとしてプレートリーダーで測定した。また、MTTアッセイで測定した生細胞数で補正した。

結果と考察

イソフラボン類のCOX-1およびCOX-2阻害効果を検討した結果、イソフラボン配糖体では阻害が見られなかったが、イソフラボンアグリコンでは濃度依存的な阻害効果が見られた。イソフラボンアグリコンの中では、とくにゲニステインの阻害効果が強く、COX-1に対する IC_{50} は28 μ M、COX-2に対しては110 μ Mであることを見出している。そこで、本研究ではイソフラボンの中でもとくにCOX阻害効果の高かったゲニステインに焦点を当てて、細胞増殖への影響を検討した。まず、ゲニステインを1~100 μ M含む培地中で48時間まで培養したCOX-1あるいはCOX-2を発現したCOLO320DM細胞の細胞増殖についてMTTアッセイで調べた。COX-1ならびCOX-2発現細胞は10 μ Mのゲニステインと48時間培養すると、その細胞増殖は非添加よりもわずかに低下した。一方、100 μ Mのゲニステインでは48時間の培養までほとんど増殖が認められなかった (Fig. 1)。次に、ゲニステインを20 μ M

と100 μ M含む培地中で3時間培養したCOX-1あるいはCOX-2を発現したCOLO320DM細胞のDNA合成速度をBrdUの取り込み量にて定量した。100 μ Mのゲニステイン存在下ではCOX-1発現細胞のDNA合成は、非添加の細胞と比べて50%抑制された。一方、COX-2発現細胞におけるDNA合成は20%抑制されたが、有意な差は認められなかった (Fig. 2)。

COXは細胞増殖に関わる重要な分子の1つであり、COX-1とCOX-2はいずれもがん細胞の増殖転移に促進的に働いているという数多くの報告がある^{5,6)}。実際、COX阻害剤であるインドメタシンがCOX発現細胞の増殖を抑制することが報告されている¹¹⁾。WntはFrizzled受容体に作用して、細胞内の β カテニン分解を行うApc/Axin/GSK3 β 複合体の形成を抑制することにより β カテニンは核内へ移行し、TCF/LEFファミリーの転写因子を活性化してサイクリンD1などの細胞増殖に関わる遺伝子を活性化する。PGE₂はEP2/EP4に結合すると、Gsを介してアデニル酸シクラーゼを活性化し、cAMP産生を増加させ、プロテインキナーゼA (PKA) が活性化する。活性化されたPKAはグリコーゲン合成酵素キナーゼ3 β (GSK3 β) のリン酸化を促進することで、Apc/Axin/GSK3 β 複合体形成を阻害するか、PKAが β カテニンを直接リン酸化することでユビキチン化を阻害することで、 β カテニンの安定化を向上させ、細胞増殖に寄与している可能性が示唆されている¹²⁾。

COX-1とCOX-2の酵素活性に対するゲニステインの阻害効果は、COX-1に選択的な傾向が見られ、今回の

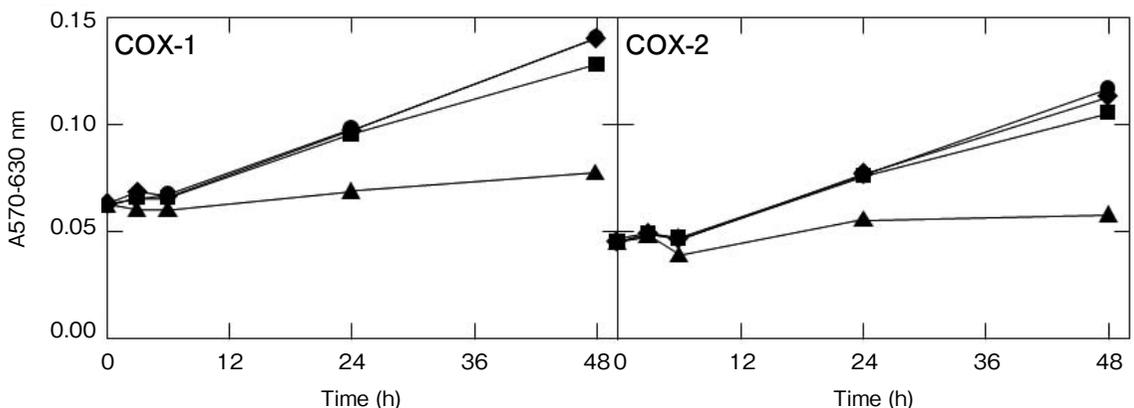


Fig. 1. Genistein inhibits cell growth of COLO320DM cells overexpressing COX-1 and COX-2. COX-1 and COX-2 cells were cultured in a 96-well plate at an initial density of 5×10^3 cells/well in the medium with 2% fetal bovine serum, and subjected to MTT assay. The cells were cultured in the absence (circles) or presence of genistein (lozenges at 1 μ M, squares at 10 μ M and triangles at 100 μ M). Data represent mean \pm SEM (n=6).

BrdU取り込み試験によるDNA合成速度もCOX-1発現細胞でDNA合成が低下した。COX-2選択的阻害薬により心血管疾患のリスクが高まることが知られており、主にCOX-2から産生される血小板凝集抑制作用と血管拡張作用を持つPGI₂とCOX-1から産生される血小板凝集作用と血管収縮作用もつロンボキサンA₂のバランスが崩れることによって生じることが一因と考えられている^{13,14}。COX-2への選択性が高くないことは、生体にとって安全性と薬理作用の両方に寄与できるかもしれない。

以上のことから、イソフラボン類の中で、比較的強いCOX阻害効果を持つゲニステインについて、COX発現細胞の増殖を抑制することを見出した。ゲニステインによる細胞増殖抑制は、その一部でCOX阻害を介して発揮されることが示唆された。

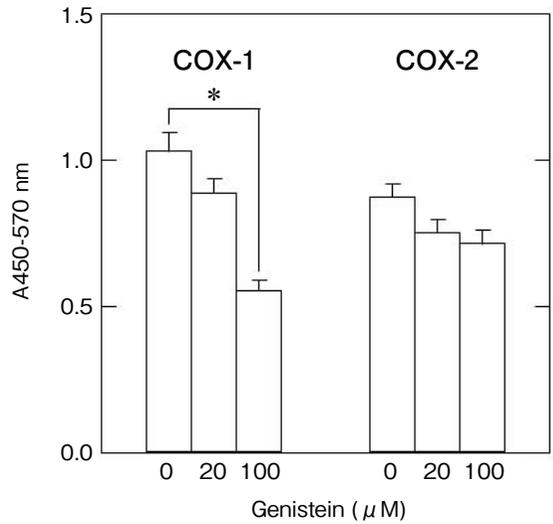


Fig. 2. BrdU incorporation of COLO320DM cells overexpressing COX-1 and COX-2. Five × 10³ cells in each well were incubated in a 96-well plate with BrdU at 37°C for 1 h. Results were normalized based on the numbers of viable cells which were simultaneously determined by the MTT assay. Data represent mean ± SEM (n=3). **p*<0.05 from the cells without genistein using one-way analysis of variance with Dunnet's post hoc test.

要 約

シクロオキシゲナーゼ (COX) は、アラキドン酸からプロスタグランジンE₂をはじめとした種々の脂質メディエーターを産生する酵素である。COXにはCOX-1とCOX-2の2つのアイソザイムが知られ、COX-1は生理機能維持に関わり、COX-2は炎症部位やがん組織で誘導され、これらの病態の増悪化に関係していると考えられている。近年、COX-1あるいはCOX-2を欠損させたマウスやアイソザイム特異的阻害剤を用いた研究より、COX-1とCOX-2の両者が炎症やがんの増悪化に関わるということが明らかになってきた。これまでに我々は、イソフラボン類がCOXの酵素活性を阻害することを見出し、その中でゲニステインが強いCOX阻害効果を持つことを明らかにしている。本研究では、COX-1あるいはCOX-2を安定的に発現させたヒト大腸がん由来COLO320DM細胞を用いて、COX阻害効果をもつゲニステインについてがん細胞増殖に対する影響を調べた。その結果、ゲニステインはCOX発現細胞の増殖を濃度依存的に阻害するとともに、COX-1発現細胞のDNA合成を抑制した。

文 献

- 1) Smith WL and Marnett LJ (1991): Prostaglandin endoperoxide synthase: structure and catalysis, *Biochim Biophys Acta*, **1083**, 1-17.
- 2) Smith WL, Garavito RM and DeWitt DL (1996): Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2, *J Biol Chem*, **271**, 33157-33160.
- 3) Vane JR, Bakhle YS and Botting RM (1998): Cyclooxygenases 1 and 2, *Annu. Rev. Pharmacol Toxicol*, **38**, 97-120.
- 4) Smith WL and Langenbach R (2001): Why there are two cyclooxygenase isozymes, *J Clin Invest*, **107**, 1491-1495.
- 5) Eberhart CE, Coffey RJ, Radhika A, Giardiello FM, Ferrenbach S and DuBois RN (1994): Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas, *Gastroenterol*, **107**, 1183-1188.
- 6) Sano H, Kawahito Y, Wilder RL, Hashiramoto A, Mukai S, Asai K, Kimura S, Kato H, Kondo M and Hla T (1995): Expression of cyclooxygenase-1 and -2 in human colorectal cancer, *Cancer Res*, **55**, 3785-3789.
- 7) Setchell KD and Lydeking-Olsen E (2003): Dietary phytoestrogens and their effect on bone: evidence from *in vitro* and *in vivo*, human observational, and dietary intervention studies, *Am J Clin Nutr*, **78**, 593S-609S.
- 8) Mahmoud AM, Yang W and Bosland MC (2014): Soy isoflavones and prostate cancer: a review of molecular mechanisms, *J Steroid Biochem Mol Biol*, **140**, 116-132.
- 9) Lau TY and Leung LK (2006): Soya isoflavones suppress phorbol 12-myristate 13-acetate-induced COX-2 expression in MCF-7 cells, *Br J Nutr*, **96**, 169-176.
- 10) Swami S, Krishnan AV, Moreno J, Bhattacharyya RS, Gardner C, Brooks JD, Peehl DM and Feldman D (2009): Inhibition of prostaglandin synthesis and actions by genistein in human prostate cancer cells and by soy isoflavones in prostate cancer patients, *Int J Cancer*, **124**, 2050-2059.
- 11) Kinoshita T, Takahashi Y, Sakashita T, Inoue H, Tanabe T and Yoshimoto T (1999): Growth stimulation and induction of epidermal growth factor receptor by overexpression of cyclooxygenases 1 and 2 in human colon carcinoma cells, *Biochim Biophys Acta*, **1438**, 120-130.
- 12) Goessling W, North TE, Loewer S, Lord AM, Lee S, Stoick-Cooper CL, Weidinger G, Puder M, Daley GQ, Moon RT and Zon LI (2009): Genetic interaction of PGE2 and Wnt signaling regulates developmental specification of stem cells and regeneration, *Cell*, **136**, 1136-1147.
- 13) McGettigan P and Henry D (2006): Cardiovascular risk and inhibition of cyclooxygenase: a systematic review of the observational studies of selective and nonselective inhibitors of cyclooxygenase 2, *JAMA*, **296**, 1633-1644.
- 14) Zhang J, Ding EL and Song Y (2006): Adverse effects of cyclooxygenase 2 inhibitors on renal and arrhythmia events: meta-analysis of randomized trials, *JAMA*, **296**, 1619-1632.