

食品内分泌かく乱物質等の発がん修飾作用に関する実験的研究  
分担研究報告書

食品中内分泌かく乱物質による細胞増殖制御機構解明に関する研究

分担研究者 酒井敏行 京都府立医科大学 公衆衛生学 教授

研究要旨 豆類等から日常的に摂取されているフラボノイドであるゲニステインが内分泌かく乱物質であることに着目し、それらによる発癌修飾を細胞増殖制御機構の観点から明らかにしようと考えた。我々が採用した *in vitro* の実験系に於いて、ゲニステイン投与は、癌細胞の増殖に対して抑制的に働くことが判明した。更にその細胞増殖の停止は、MG63 細胞においては G2/M 期において、MCF-7 細胞においては G1 期及び G2/M 期で認められたことから、ゲニステインの作用は G2/M 期の制御機構に何らかの影響を与えたと考えられた。

A. 研究目的

豆類等から日常的に摂取されているフラボノイドであるゲニステインが内分泌かく乱物質であることに着目し、それらによる発癌修飾を細胞増殖制御機構の観点から明らかにしようと考えた。フラボノイドに関しては、日常的に摂取しているにもかかわらず、その発癌性について促進的に働くのか抑制的に働くのかすら不明な点が多い。今回、細胞周期レベルで癌細胞に対してその増殖にどのような影響を及ぼすか検討し、その作用は如何なる遺伝子発現の調節に関与するかを明らかにすることにより、内分泌かく乱物質による発癌修飾を理解する一助にしたいと考えた。

B. 研究方法

ヒト骨肉腫由来の細胞株 MG63 及びヒト乳癌由来の細胞株 MCF-7 を用いてゲニステイン処理にともなう変化を検討した。[ゲニステイン処理による細胞増殖への影響] MG63 細胞では  $3 \times 10^4$  個の細胞を播種し、その 24 時間後に終濃度 10、20、50、100  $\mu\text{M}$  のゲニステインあるいはゲニステインの溶媒として用いた DMSO 0.1%を加えた培地、あるいは薬物無添加の培地に交換した。そしてその後 24 時間毎に 120 時間後までの細胞数を計測した。MCF-7 細胞では  $3 \times 10^4$  個の細胞を播種し、その 24 時間後に終濃度 25、50、75、100  $\mu\text{M}$  のゲニステインあるいは DMSO 0.2%を加えた培地、あるいは薬物無添加の培地に交換した。そして 24 時間毎に 120 時間後までの細胞数を計測した。[ゲニステイン処理による細胞周期への影響]  $3 \times 10^5$  個の細胞を播種し、その 24 時間後に MG63 細胞で

は終濃度 50  $\mu\text{M}$  のゲニステインを加えた培地あるいは薬物無添加の培地に交換した。MCF-7 細胞では終濃度 100  $\mu\text{M}$  のゲニステインを加えた培地あるいは薬物無添加の培地に交換した。そしてゲニステイン処理 24 時間後に、その細胞に対してエタノール固定を実施した。エタノール固定された細胞は RNase 処理した後 propidium iodide で染色し、FACSCalibur (BECTON DICKINSON)及び ModFit を用いて細胞周期の解析を行った。[ゲニステイン処理による細胞周期制御タンパク質発現への影響] ゲニステインの cyclin B1 発現への濃度依存的影響を調べた実験では、MG63 細胞の場合、 $3 \times 10^5$  個の細胞を播種し、その 24 時間後に終濃度 10、50  $\mu\text{M}$  のゲニステインあるいは DMSO 0.1%を加えた培地、あるいは薬物無添加の培地に交換した。そして 24 時間後に RIPA buffer を用いて細胞から蛋白を抽出し、30  $\mu\text{g}$  等量の蛋白をゲル上で電気泳動した。MCF-7 細胞の場合、 $5 \times 10^5$  個の細胞を播種し、その 24 時間後に終濃度 25、50、75、100  $\mu\text{M}$  のゲニステインあるいは DMSO 0.2%を加えた培地、あるいは薬物無添加の培地に交換した。そして MG63 細胞の場合と同様に、24 時間後に RIPA buffer を用いて細胞から蛋白を抽出し、10  $\mu\text{g}$  等量の蛋白をゲル上で電気泳動した。またゲニステインの時間依存的影響を調べた実験では、MG63 細胞の場合、 $3 \times 10^5$  個の細胞を播種し、その 24 時間後に終濃度 50  $\mu\text{M}$  のゲニステインを加えた培地に交換した。MCF-7 細胞の場合、 $5 \times 10^5$  個の細胞を播種し、その 24 時間後に終濃度 100  $\mu\text{M}$  のゲニステインを加えた培地に交換した。そして両細胞とも 12 時間後、24 時間後、48 時間後、72 時

間後に RIPA buffer を用いて細胞から蛋白を抽出し、MG63 細胞の場合は 30  $\mu$ g 等量、MCF-7 細胞の場合は 10  $\mu$ g 等量の蛋白をゲル上で電気泳動した。ゲニステインの cdc2 発現への濃度依存的影響を調べた実験では、MG63 細胞の場合、 $3 \times 10^5$  個の細胞を播種し、その 24 時間後に終濃度 10、50  $\mu$ M のゲニステインあるいは DMSO 0.1% を加えた培地、あるいは薬物無添加の培地に交換した。そして 24 時間後に RIPA buffer を用いて細胞から蛋白を抽出し、30  $\mu$ g 等量の蛋白をゲル上で電気泳動した。MCF-7 細胞の場合は、 $5 \times 10^5$  個の細胞を播種し、その 24 時間後に終濃度 25、50、75、100  $\mu$ M のゲニステインあるいは DMSO 0.2% を加えた培地、あるいは薬物無添加の培地に交換した。そして MG63 細胞での場合と同様に、24 時間後に RIPA buffer を用いて細胞から蛋白を抽出し、10  $\mu$ g 等量の蛋白をゲル上で電気泳動した。PVDF メンブレン上にプロットした蛋白は、cyclin B1 発現への検討では抗ヒト cyclin B1 (Santa Cruz 社) を用い、cdc2 発現への検討では抗ヒト cdc2 (Santa Cruz 社) を用いた。検出は、蛍光発光法 (ECL ウェスタンブロットング検出システム: Amersham Pharmacia Biotech 社) を用いて実施した。

### C. 研究結果

[ゲニステイン処理による細胞増殖への影響] MG63 細胞では 20、50、100  $\mu$ M のゲニステイン濃度で著明な増殖抑制が認められた。MCF-7 細胞では 25  $\mu$ M のゲニステイン濃度で中程度の増殖抑制が認められ、50、75、100  $\mu$ M のゲニステイン濃度で著明な増殖抑制が認められた。[ゲニステイン処理による細胞周期への影響] 上記実験においてゲニステイン処理により細胞増殖の顕著な抑制が認められたことから、ゲニステインの細胞増殖抑制作用が、細胞周期のどの位置に於いて働いているかを検討した。MG63 細胞では、50  $\mu$ M ゲニステイン処理後 24 時間で 顕著な G2/M 期に於ける細胞周期の停止が認められた。MCF-7 細胞では、100  $\mu$ M ゲニステイン処理後 24 時間で G1 期及び G2/M 期に於ける細胞周期の停止が認められた。[ゲニステイン処理による細胞周期制御タンパク質発現への影響] 細胞周期解析の結果、ゲニステイン処理が G2/M 期に於ける細胞周期の停止を誘導すると考えられたので、G2/M 期に参与する因子である cyclin B1 及び cdc2 に着目し、その発現へのゲニステイン処理の影響を検討した。cyclin B1 蛋白量はゲニステイン処理 24 時間後

では MG63 細胞、MCF-7 細胞ともにゲニステイン濃度依存性に増加を認めた。ところが時間依存的検討を行ったところ、ゲニステイン 50  $\mu$ M で処理した MG63 細胞では 12 時間後より発現の増加が認められ、24 時間で更に増加し、48 時間、72 時間でもその増加の持続が認められた。しかしながらゲニステイン 100  $\mu$ M で処理した MCF-7 細胞では cyclin B1 蛋白量はゲニステイン処理後 12 時間で発現の増加が認められ、24 時間後でもその増加は認められたが、48 時間および 72 時間では著明に減少し、その発現はほとんど認められなかった。一方、cdc2 蛋白は MG63 細胞、MCF-7 細胞ともにゲニステイン 処理 24 時間後においてゲニステイン処理による量的変化は認められなかった。

### D. 考察

豆類に多く含まれ日常的に摂取されているフラボノイドの一種であるゲニステインは、我々が採用した *in vitro* の実験系に於いて、その投与によって癌細胞の増殖に対して抑制的に働くことが判明した。更にその細胞増殖の停止は、MG63 細胞においては G2/M 期において、MCF-7 細胞においては G1 期及び G2/M 期で認められたことから、ゲニステインの作用は G2/M 期の制御機構に何らかの影響を与えると考えられた。哺乳類細胞の G2/M 期の細胞周期の制御においては、cdc2 と cyclin B1 が重要な働きをすることが知られている。そこで cdc2 と cyclin B1 蛋白量へのゲニステインの作用を検討したところ、cdc2 蛋白量は影響を受けなかったが、cyclin B1 蛋白量は増加することが判明した。しかしながらゲニステイン処理による cyclin B1 蛋白量の増加は、MG63 細胞では持続的なものであったのに対し、MCF-7 細胞では一時的な増加と消失という異なる動向を示した。ゲニステイン処理した MG63 細胞及び MCF-7 細胞において同様に G2/M 期での細胞周期の停止が認められながらも、cyclin B1 蛋白量においては経時的変化に違いが認められたことは、ゲニステインによる G2/M 期停止においては cyclin B1 蛋白量よりもむしろ cdc2 キナーゼ活性の変化にゲニステインが何らかの影響を与えている可能性を示唆している。また MG63 での G2/M 期のみでの細胞周期の停止と cyclin B1 の継続的な発現増加、及び MCF-7 細胞で見られた G1 期と G2/M 期での細胞周期の停止と cyclin B1 発現量の一時的な増加とそれに引き続く消失との差は、G2/M 期での cyclin B1 発現量の変化が M 期終了において重要な役割を果た

していることを示唆している。来年度は、MG63 細胞及び MCF-7 細胞におけるゲニステイン処理時の cdc2 キナーゼ活性への影響の検討や、両細胞間で認められたゲニステイン処理時の cyclin B1 蛋白量の変化の差と細胞周期停止位置の相関性を検討予定である。それらの結果から、ゲニステインの作用標的因子の同定とゲニステインによる細胞増殖抑制機構の解明を実施する予定である。

#### E. 結論

豆類等から日常的に摂取されているフラボノイドであるゲニステインが内分泌かく乱物質であることに着目し、それらによる発癌修飾を細胞増殖制御機構の観点から検討した。我々が採用した *in vitro* の実験系に於いて、ゲニステイン投与は、癌細胞の増殖に対して濃度依存性に抑制的に働くことが判明した。更にその細胞増殖の停止は、MG63 細胞では G2/M 期、MCF-7 細胞においては G1 期及び G2/M 期で認められたことから、ゲニステインの作用は G2/M 期の制御機構に何らかの影響を与えることで、癌細胞の増殖を抑制すると考えられた。