

内分泌障害抑制作用（抗環境ホルモン作用）を持つ 機能性食品の開発

横 田 一 成（島根大学生物資源科学部教授）

1. はじめに

様々な形で環境中に放出される種々の合成化合物が、人間を含む多様な生物に対して極めて重大な内分泌障害（環境ホルモン作用）を引き起こしつつあることが近年指摘されてきており、この障害の防止は、その発生機構の解明と共に、緊急の最重要課題の一つとなっている^{1,2)}。一方、このような合成化合物以外に、天然の化合物、さらには日常の食材に本来含まれる化合物の中にも、内分泌障害作用を持つものが発見されてきている³⁾。

しかしながら、外来の内分泌障害性物質により引き起こされるとされる障害の多くは、近年になって顕在化してきたものであり、これは、伝統的食材は、内分泌障害性物質に加えてその作用を阻止する成分、いわば内分泌障害抑制性物質をも含むが、その効果が近年激増した合成化合物により凌駕されつつあるためとも考えられる。従って、食品に含まれる内分泌障害性及び障害抑制性の両物質に関する詳細な情報を活用すれば、現実的には避け難い合成化合物への暴露による内分泌障害を、日常の食生活の中で安全かつ安価に制御・防止できるような機能をもつ食品を創製しうることが期待される。

このような新規食品機能の開拓をねらい、本研究では、内分泌障害性及び障害抑制性の両作用を簡便で短期に検出できる短期検出系の構築と、それによる食品由来の活性因子の解析を試みた。

2. 実験方法

2.1 細胞系及び培養

MCF-7細胞：転移性乳癌患者の胸水浸出細胞から樹立されたヒトの乳腺上皮由来の癌細胞株で、エストロゲン受容体の発現レベルが高く、エストロゲン投与により、プロゲステロン受容体、プラスミノゲンアクチベーター、52 kDaの分泌蛋白質等を発現する。

フェノールレッドを含むダルベコの変法Eagle培地(DMEM)に、最終濃度10%の仔ウシ胎児血清(FCS)、3 mg/500 mlのインシュリン、100 units/mlのペニシリン/ストレプトマイシン、1% (v/v)の非必須アミノ酸を添加し、5% CO₂、95%空気及び湿度100%の条件下で、37°Cで培養した。実験を行う前に、このフェノールレッドを含む継代培地を除き、カルシウム/マグネシウムを含まないリン酸緩衝生理食塩水(PBS)で細胞を洗浄し、0.1%トリプシンと0.2% EDTAを含む混合液で処理して細胞を懸濁した後、細胞の濃度を測定した。フェノールレッドを含まず、かつ活性炭処理した血清を添加した培地に、2~3×10⁵/mlの濃度となるように細胞を懸濁し、48時間培養して、附着させた。被検物質を添加し、6日間培養した後、種々の分析を行った。

2.2 MCF-7細胞の全RNAの調製とcDNAの合成

60-mm ディッシュに培養したMCF-7細胞をエストラジオールまたはゲニステイン単独、ある

いは両者を合わせて処理した後、グアニジンイソチオシアネートと β -メルカプトエタノールを含む破碎用緩衝液を用いる RNeasy Mini Kit (QIAGEN) により、全 RNA を高い効率及び純度で精製した。1枚のディッシュから、15~60 μ g の全 RNA が得られた。1.2 μ g の全 RNA を鋳型とし、Oligo (dT)₁₂₋₁₈プライマー及び SuperScript II 逆転写酵素 (GIBCO BRL) を用いて cDNA を調製した。

2.3 各種 mRNA の検出

各種の薬剤処理において発現の変動が少ないハウスキーピング遺伝子として、グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素 (GAPDH) を内部標準遺伝子として用いた。この GAPDH に加え、マトリックスメタロプロテアーゼ-9 (MMP-9)、ペロキシソーム増殖因子応答性レセプター (PPAR γ 1 及び PPAR γ 2) に特異的なプライマー (表 1) を使い、MCF-7 細胞の全 RNA より調製した 1 本鎖 cDNA を鋳型としてポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を行った。Taq DNA ポリメラーゼには、通常の Taq DNA ポリメラーゼ (TaKaRa), または、Taq DNA ポリメラーゼに Pyrococcus species GB-D 耐熱性 DNA ポリメラーゼを加えることでヌクレオチドの取込みミスを校正する機能を持たせた ELONGase 酵素ミックス (GIBCO BRL) を用いた。

3. 結果と考察

3.1 内分泌障害性・障害抑制性因子の検出系の構築

MCF-7 細胞は、血清等に含まれる微量のエストロゲン関連物質の影響を敏感に受けるため、血清を活性炭で処理した後に培養に供した⁴⁾。しかしながら、この処理条件は極めてデリケートで、活性炭の多寡が細胞の増殖効率に大きく影響した。度数にわたる試行錯誤の結果、ほぼ適切な培養条

件を確立することができた。

本系で、培地にエストラジオール (1 nM) を添加すると、何も添加しない場合及び溶媒であるエタノールを添加した場合に比し、有意に細胞の増殖が引き起こされ、これは既に報告されている MCF-7 の挙動と一致するものであった^{4,5)}。

3.2 内分泌障害性・障害抑制性因子による遺伝子変動の解析

エストラジオール及び大豆に含まれる植物エストロゲンであるゲニステインを、それぞれ単独あるいは組み合わせて MCF-7 細胞に投与して培養した後、各ディッシュから全 RNA を精製し、その一定量を用いて cDNA を調製した。

まず、ハウスキーピング遺伝子として、GAPDH の検出を試みた。表 1 に示したプライマー及び TaKaRa Taq DNA ポリメラーゼを用い、94°C/2 分 (1 サイクル): 94°C/1 分、

表 1 各種 PCR 検出反応に用いたプライマーの塩基配列

目的遺伝子	プライマー
GAPDH	5'-GTCTTCACCCACCATGGAGAAG-3' 5'-GCTGCTTCACACCTTCTTGATGT-3'
MMP-9	5'-ACCATGAGCCTCTGGCAG-3' 5'-CCTTCCCGTCGAAGGAT-3'
PPAR γ 1	5'-GCCCGCTGGCCGACAGAA-3' 5'-CTGCTAGTACAAGTCCTTGTAGATCTCCT-3'
PPAR γ 2	5'-GCTGTTATGGGTGAACCTCTGGGAGA-3' 5'-CTGCTAGTACAAGTCCTTGTAGATCTCCT-3'

60°C/1 分, 72°C/1 分 (35 サイクル): 72°C/10 分 (1 サイクル) の温度制御条件で PCR を行った。その結果、いずれの処理を受けた細胞においても、明確に特異的な増幅産物が検出された (図 1)。伸長反応のサイクル数を種々変化させ、GAPDH cDNA の増幅を精査したところ、その発現量は、今回の各処理においてほぼ一定であることが確認された。

次に、MMP-9 の検出を試みた。MMP-9 は、IV 型コラゲナーゼまたはゼラチナーゼ B とも呼ばれ、癌細胞の転移性と密接に関わっている⁶⁾。

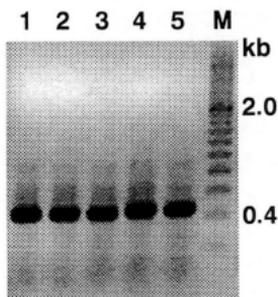


図1 PCRによるGAPDHの検出

内分泌調節因子で処理したMCF-7細胞全RNAから調製したcDNAを鋳型として、GAPDH遺伝子の発現をPCRにて検出した。

- 1: 薬剤及び溶媒処理
 - 2: エタノール (1.6 μ l/ml)
 - 3: エストラジオール (1 nM)
 - 4: ゲニステイン (20 μ g/ml)
 - 5: エストラジオール+ゲニステイン
- M: 200-b ラダー

内分泌の攪乱と癌転移との関係は未だ不明なところも多いが、本研究で構築したMCF-7細胞を用いた試験系は、そのような観点からの解析も可能である。MMP-9の検出には、Taq DNAポリメラーゼを用い、94°C/2分(1サイクル):94°C/1分, 55°C/1分, 72°C/1分(25~35サイクル):72°C/10分(1サイクル)の温度制御条件でPCRを行った。図2に示すように、約550 bpの特異的生成物を検出することができた。

このMMP-9遺伝子の発現量を詳細に検討した結果、エストラジオール処理によりMMP-9遺伝

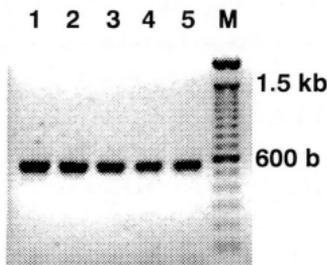


図2 PCRによるMMP9の検出
レーン1~5は図1と同様。
M: 100-b ラダー

子の発現量はやや増大する一方、ゲニステイン処理は逆に減少させ、またこれはエストラジオールの効果を打ち消すようにも思われた。ゲニステインは、大豆の主要なイソフラボンで、代表的な植物エストロゲン的一种であるが、この位置づけは、主に、エストロゲンレセプターに対する結合能に基づいたものである⁷⁾。ゲニステインがMMP-9遺伝子の発現を抑制するとの作用は、エストラジオールとは全く異なり、本イソフラボンを含む食用植物、あるいはそれをを用いた種々の伝統的食品が、未だ解明されていない未知の多様な有益効果を有することを強く示唆する。

3.3 MCF-7細胞におけるPPAR γ の発現

ペルオキシソーム増殖因子応答性レセプター(PPAR)は、種々の脂溶性化合物と結合して、多様な遺伝子の発現を調節する核内レセプターである。 α 、 δ 、及び γ の各サブタイプが、さらに、PPAR γ にはPPAR γ_1 及びPPAR γ_2 の2種のアイソマーが、それぞれ同定されており、各PPARサブタイプ及びアイソマーはそれぞれ異なる組織分布を示す。MCF-7細胞では、PPAR γ サブタイプが検出されているが⁸⁾、それが、1及び2のいずれのアイソマーであるかの明確な報告はない。今回、先ず、MCF-7細胞におけるPPAR γ_1 及び γ_2 の特異的な検出を試みた。PPAR γ_1 は、N末端側28アミノ酸領域が欠失したものであるが、組織分布は両者で異なっている^{9,10)}。表1に示すように、両アイソマーにそれぞれ特異的な上流側プライマー、及び、両者に共通の下流側プライマーを用い、また、通常のTaq DNAポリメラーゼにPyrococcus species GB-D 耐熱性 DNAポリメラーゼを加えることにより、スクレオチドの取込みミスを校正する機能を持たせたELONGase 酵素ミックスを用いて、94°C/30秒(1サイクル):94°C/30秒, 58°C/30秒, 68°C/2分(35サイクル):68°C/10分(1

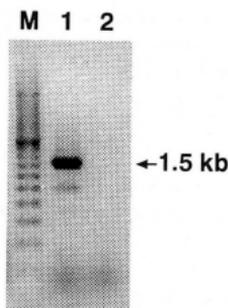


図3 PCRによるPPAR γ の検出
 1: PPAR γ 特異的反応
 2: PPAR γ 特異的反応
 M: 100-b ラダー

サイクル)の温度制御条件でPCRを行った。その結果、PPAR γ に特異的な上流側プライマーを用いた場合のみ適切なサイズの生成物が得られ(図3)、このものをクローニングして塩基配列を調べてみると、間違いなくPPAR γ であることが確認された。一方、PPAR α に特異的な反応では、PCR生成物は得られなかった(図3)。この結果は、通常状態におけるMCF-7細胞は、PPAR α ではなく、PPAR γ を発現していることを示唆している。PPAR α は白色及び褐色脂肪細胞で主に発現される一方、PPAR γ は免疫系臓器、大腸、小腸、副腎及び脂肪細胞と、多様な組織における複雑な生理調節に関わっている。エストラジオールとPPAR γ との相互作用に関する知見は未だ限られているため^{11,12}、今回検出されたPPAR γ のMCF-7細胞内での役割、あるいは本細胞のエストロゲン応答性への関与等、興味深い検討課題が開かれた。

4. おわりに

内因性ホルモンであるエストラジオールに対する応答性の高いヒト乳癌細胞株MCF-9細胞を用い、内分泌障害性及び障害抑制作用を持つ食品因子の解析を行うための試験系を先ず構築した。本

系は、エストロゲンの作用をよく反映し、その作用を増強あるいは抑制する食品由来因子を速やかに解析するに極めて有効である。エストラジオール及び代表的な植物エストロゲンの1種であるゲニステインは、GAPDHの発現には影響しなかったが、MMP-9の発現はゲニステインにより抑制され、大豆関連伝統食品の有用性を改めて示唆できた。一方、細胞分化に関わるPPAR γ の検出系の構築をも合わせて進める中で、MCF-9細胞がPPAR α ではなくPPAR γ を発現していることが明かとなり、本核内レセプターとマトリックスメタプロテアーゼ-9の発現動向、及びこれらとMCF-9細胞の乳癌細胞としての挙動との関連を解析する手掛りを得ることができた。本試験系を用いた今後のより幅広い展開が期待される。

この一連の研究を進めるにあたり、(財)浦上食品・食文化振興財団より極めて貴重なご援助を賜りましたことに心より感謝いたしますとともに、貴財団の益々のご発展をお祈り申し上げます。

文 献

- 1) L. H. Keith (1997) "Environmental Endocrine Disruptors-A Handbook of Property Data" p.1232, Wiley-Interscience.
- 2) T. Colborn, C. Clement (1992) "Chemically-induced Alterations in Sexual and Functional Development-The Wildlife/Human Connection" p.403, Princeton Scientific Publishing Co.
- 3) M. S. Kurzer, and X. Xu (1997) Dietary phytoestrogens, *Annu. Rev. Nutr.* 17: 353-381.
- 4) P. A. Jones, V. A. Baker, A. Irwin, and L. K. Earl (1997) Modulation of MCF-7 cell proliferative response by manipulation of assay conditions, *Toxicol.* 11: 769-773.
- 5) M. M. Montano, and B. S. Katzenellenbogen (1997) The quinone reductase gene: A unique estrogen receptor-regulated gene that is activated by antiestrogens, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 2581-2586.
- 6) 今井一志 (1997) がん細胞の浸潤・転移とマトリックス

- スメタロプロテアーゼ, 蛋白質 核酸 酵素, **42** : 1694-1700.
- 7) Z.-M. Shao, J. Wu, Z.-Z. Shen, and S. H. Barsky (1998) Genistein exerts multiple suppressive effects on human breast carcinoma cells, *Cancer Res.* **58** : 4851-4857.
- 8) M. W. Kilgore, P. L. Tate, S. Rai, E. Sengokum, and T. M. Price (1997) MCF-7 and T47D human breast cancer cells contain a functional peroxisome response, *Mol. Cell. Endocrinol.* **129** : 229-235.
- 9) L. Fajas, D. Auboeuf, E. Raspe, K. Schoonjans, A.-M. Lefebvre, R. Saladin, J. Najib, M. Laville, J.-C. Fruchart, S. Deeb, A. Vical-Puig, J. Flier, M. R. Briggs, B. Staels, H. Vidal, and J. Auwerx (1997) The organization, promoter analysis, and expression of the human PPAR γ gene, *J. Biol. Chem.* **272** : 18779-18789.
- 10) R. Mukherjee, L. Jow, G. E. Croston, and J. R. Paterniti, Jr (1997) identification, characterization, and tissue distribution of human peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) isoforms PPAR α versus PPAR β and activation with retinoid X receptor agonists and antagonists, *J. Biol. Chem.* **272** : 8071-8076.
- 11) H. Ma, H. W. Sprecher, and P. E. Kolattukudy (1998) Estrogen-induced production of a peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) ligand in a PPAR γ -expressing tissue, *J. Biol. Chem.* **273** : 30131-30138.
- 12) E. Elstner, C. Muller, K. Koshizuka, E. A. Williamson, D. Park, H. Asou, P. Shintaku, J. W. Said, D. Heber, and H. P. Koeffler (1998) Ligands for peroxisome proliferator-activated receptor γ and retinoic acid receptor inhibit growth and induce apoptosis of human breast cancer cells *in vitro* and in BXN mice, *Proc. Natl. Acad. sci. USA* **95** : 8806-8811.

Development Trial of Functional Foods Protecting Against Endocrine-Disruption

Kazushige Yokota (Faculty of Life and Environmental Science, Shimane University)

Various modern chemical compounds artificially released into natural environment have been shown to significantly affect endocrine homeostasis of living organisms as if they are some extra hormonal agents from environment. On the other hand, such hormonal activity has also been detected in many natural compounds including components of traditional foods. However, few problem of significant endocrine disruption have ever been noticed traditionally, suggesting the presence of compounds protecting against endocrine-disrupting effect of food components. The recent significant problem of external hormonal compounds could be due to the overexposure to modern chemical compounds, overwhelming the protective effects of traditional food. The purpose of this study is to establish an convenient assay method to detect the endocrine-disrupting effects of various compounds, and to find endocrine-protecting agents as well as new disrupting agents from food components.

We used an estrogen-responding breast cancer cells line, MCF-7 cells, to establish the assay method. Estradiol was used as an standard hormonal compounds. As a typical external natural hormonal compound, we used genistein which is the predominant isoflavone in soybean and also known to act as an phytoestrogen. The expression of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase was not affected either by estradiol, genistein, or both of them, indicating that the expression level of this enzyme can be used as an internal standard to evaluate the expression of other proteins. Next, we tried to detect the change in the transcript level of matrix-metaro-proteinase-9 (MMP-9), which is one of the key proteases involved in metastasis of cancer cells. The expression of MMP-9 was lowered by genistein, suggesting that many foods containing this phytoestrogen could have further unknown beneficial effects expressed via estrogen receptor pathway. Another target in MCF-7 cells are peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in this cells. There are 3 subtypes (α , β , γ), and PPAR γ contains 3 iroforms (1, 2, 3). PPAR γ is detected in MCF-7 cells, although its isoform has not been identified clearly. In this study, we designed PCR primers specific to PPAR isoforms γ_1 and γ_2 respectively, and tried to detect them separately by PCR using the specific primers. Only the PPAR γ_1 -specific, but not the PPAR γ_2 -specific, primer yielded specific product of an expected size. This product was confirmed by DNA sequencing to be a real product encoding PPAR γ_1 , suggesting that the MCF-7 cells express PPAR γ_1 , but not PPAR γ_2 , under usual condition. The PPAR γ -isoforms are distributed differently and so expected to function differently. The presence of PPAR γ_1 in MCF-7 cells would suggest that PPAR γ_1 might be involved in the estrogen-signaling in this cells,

providing new system to analyze the still unclear interaction between estrogen and PPAR γ -signaling.