

# エストロゲン受容体を標的とした食品成分による ATL 予防

山崎 正夫  
宮崎大学農学部 助教

## 緒 言

宮崎県を含む南九州地区はヒト T 細胞白血病ウイルス type I (HTLV-I) の感染者の割合の高い地域として知られている。HTLV-I は、同地域において高頻度に発症が認められる成人 T 細胞性白血病 (ATL) の発症原因ウイルスであり、ATL は南九州の風土病ともなっている。局地的には HTLV-I 抗体の陽性者は 10%程度に達する地域がある事に加え、南九州地域以外にも HTLV-I 感染率の高い地域が日本全国に点在しており、HTLV-I 感染者は日本の全人口の 1%程度にも達すると考えられている。通常、HTLV-I 感染後、ATL 発症に至るには約 50 年もの日がかかるとされ、ATL の生涯発症率も感染者の 5%程度である。一方で、臨床的に ATL のほとんどは治療抵抗性を示し、初回治療に効果を認めた場合でも再発の危険性が高く、1 年前後で半数が死に至る。このため、HTLV-I 感染者においては、その生涯にわたり ATL 発症の脅威にさらされており、日常的な ATL 発症予防法の開発が期待されている。

一方で日本においては HTLV-I 感染者が ATL 発症に至るまでの期間は、他の HTLV-I 高浸淫地区に比べ長い傾向があり、日本でのライフスタイルが ATL の発症を遅らせている要因となっている可能性が考えられる。われわれはこれまでに食を通じた ATL 発症予防を目的とし、様々な食品成分の ATL 発症予防、進展予防効果について検討を行ってきた。その結果、日本では世界的に高い消費レベルを誇る大豆に含まれるイソフラボンが、ATL 細胞の増殖を *in vitro*、*in vivo* において抑制することを見いだした。イソフラボンはエストロゲン様活性を有することから、乳がんなどのホルモン感受性のがんの発症や進展に少なからず影響することが知られているが、大変興味深いことに ATL の発症率にも性差があり、男性の発症率は女性の 3 倍にも達する。これらの背景をまとめると、女性ホルモンが ATL 細胞に作用した場合 ATL の発症や細胞の増殖を負に制御する効果を有するこ

とが期待される。本研究ではイソフラボンが女性ホルモンの 1 つであるエストロゲン様活性を発揮することで、ATL 発症の予防に貢献できる可能性を示すとともにその作用機構の端緒を明らかとした。

## 実験方法

### 細胞培養

ED40515 細胞、Su9T01 細胞、Molt-4 細胞はそれぞれ京都大学前田道之先生、鹿児島大学有馬直道先生、宮崎大学森下和広先生より分与いただいた。細胞は 10% FBS 含有 RPMI1640 培地で継代を行ったが、実験時には培地および血清中のエストロゲンおよびエストロゲン様活性成分を除去するために、10%活性炭処理 FBS 含有フェノールレッドフリー RPMI1640 培地にて培養を行った。実験時にはフェノールレッドフリー培地に細胞を  $1 \times 10^5$  cells/ml の密度で播種し、 $17\beta$ -Estradiol (E2) もしくはイソフラボンを終濃度  $10^{-12} \sim 10^{-7}$  M となるように添加し 24 時間培養した。生存率の判定においてはトリパンブルー染色法により生細胞数をカウントし、死細胞率を測定した。

エストロゲンとして  $17\beta$ -エストラジオール (E2)、エストロゲン受容体阻害剤として、ICI182,780、G-タンパク共役型エストロゲン受容体作動剤として G-1 を用いた。

### 細胞周期解析

培養終了後、細胞を回収し洗浄後、70%メタノールおよび 50%エタノールで固定した。その後、 $10\mu\text{g}/\text{mL}$  RNase で  $37^\circ\text{C}$  で 1 時間処理した後、PI 染色を行いサンプルとした。細胞染色後、Flow Cyto Meter Epics XL で細胞周期の解析を行った。

### 活性型 Caspase の検出

培養終了後、細胞を回収し細胞溶解した。細胞溶解液を  $15,000 \times g$  で 30 分間遠心し、その上清を回収し上清の一部は、タンパク質定量のためのサンプルとした。

サンプルは SDS-PAGE に供したのち、ウエスタンブロットを行ったのち Cleaved Caspase-3 の検出を行った。検出には ECL-Plus を用い、得られた画像のバンドの強度を Image J ソフトウェアを用いて解析した。発現量の定量解析は caspase-3/ $\beta$ -actin の比率により計算を行った。

**ER 受容体の発現 (RT-PCR)**

フェノールレッドフリー RPMI1640 培地に細胞を  $2 \times 10^5$  cells/ml の密度で播種し、37°C、48 時間培養した後、RT-PCR 法を用いて、ER  $\alpha$  および ER  $\beta$  の mRNA 発現解析を行った。

**結 果**

活性炭処理血清含有フェノールレッドフリー RPMI1640 での ATL 細胞を試みたところ、いくつかの細胞株においては生育不能であり、血清の活性炭処理によってこれらの細胞株の生存に必須の成分が除去されたと考えられた。一方で、ATL 細胞株である ED40515

細胞および Su9T01 細胞と急性リンパ性白血病細胞株である Molt-4 細胞は培養が可能であった。これらの細胞を E2 で培養したところ、いずれの細胞株に対しても生細胞数を減少させることが明らかとなった。さらに genistein も 1-100 nM という非常に低い濃度で生細胞数を減少させることが明らかとなった (図 1)。

そこで、E2 や genistein が細胞周期の進行に及ぼす影響を検討したところ、これらのサンプルは各細胞周期における細胞集団の比率に影響を与えていないことが明らかとなった。このことから E2 や genistein が細胞死を誘導していることが推察された。

そこで、apoptosis による細胞死が起こっている可能性を考え、apoptosis の実行分子である caspase-3 の活性化に及ぼす E2、genistein の効果を検討した。その結果、genistein 添加によって、caspase-3 の活性断片の顕著な発現を見いだすことができ、apoptosis による細胞死が起こっていることが推察された (図 2)。

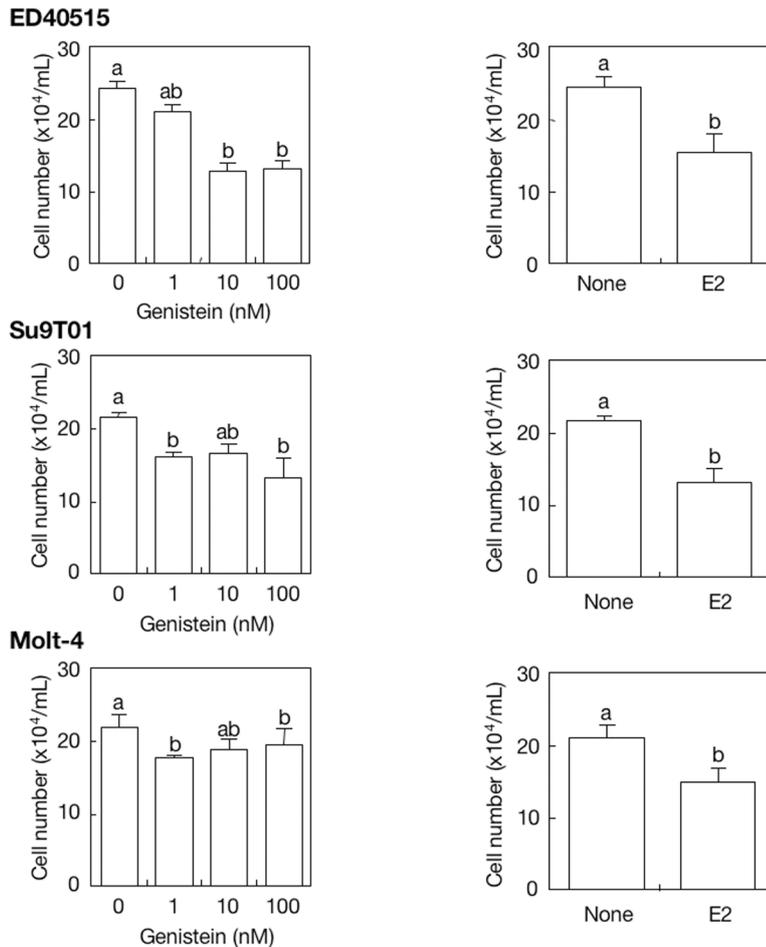


図 1 ゲニステインおよび 17 $\beta$ -エストラジオールが ATL 細胞の増殖におよぼす影響  
異なる文字間に有意差あり (P < 0.05)

これらの細胞株におけるエストロゲン受容体 (ER) の mRNA 発現を RT-PCR で確認したところ、これらの ATL 細胞株は ER $\alpha$ 、ER $\beta$ とも発現していた。そこで、ERの阻害剤である ICI182,780 と E2 および genistein の共存効果を検討したところ、E2 および genistein の細胞致死効果は ICI182,780 によってキャンセルされた (図3)。

近年、E2 の non-genomic な作用として G-タンパク共役型 ER (GPER) を介した経路が注目されている。そこで、GPER のアゴニストである G-1 の効果を検討したところ、G-1 は 1 $\mu$ M において有意に生細胞数を減少させることが明らかとなった (図4)。

また、genistein とともに大豆イソフラボン中の主要成分である (大豆中には配糖体の形で含まれる) ダイゼインの効果を検討したところ、ダイゼインも細胞増殖抑

制効果を有することが明らかとなった。

### 考 察

われわれは以前の研究で、大豆イソフラボンが ATL 細胞の増殖を抑制することを *in vitro*、*in vivo* の両面から明らかとしてきた<sup>1)</sup>。しかしながらこの研究で用いたイソフラボンの濃度は 3~30  $\mu$ M であり、生理的濃度に比べると高いレベルにあり、日常の食生活で現実的に到達しうる濃度ではないように思われた。日本人における血中 genistein の濃度は 320 nM 程度であるとの報告もあり、 $\mu$ M オーダーでの作用発現は起こりにくいと推察される<sup>2)</sup>。一方、genistein は nM オーダーでもエストロゲン様活性を発揮し、*in vitro* でエストロゲン感受性の乳がん細胞の増殖を亢進させ、このような効果は *in vivo* でも確認される。今回得られた genistein の ATL 細胞致死効果は nM オーダーで認められる結果であり、*in vivo* での実現性が高いものと思われる。

Genistein 処理によって Caspase の活性化が認められた点、ICI182,780 によって細胞毒性が消失した点を考慮すると、genistein は ER を基点としたシグナル伝達経路を介し、apoptosis を誘導していることが示唆される。Genistein は一般に ER $\alpha$  より ER $\beta$  に対して特異性が高いことが知られており、ATL 細胞においてもこれらの ER の発現が確認できたことから、ER $\beta$  を介した経路が重要であることが推察される。ER を介していくつかのガン細胞株に対して apoptosis が誘導されるとの報告がされている<sup>3)</sup>。われわれは今回の研究で genistein が NF- $\kappa$ B の活性抑制効果も見だしており、ER 経路と NF- $\kappa$ B 経路のクロストークを介して genistein の効果が発揮されている可能性も考えられる。

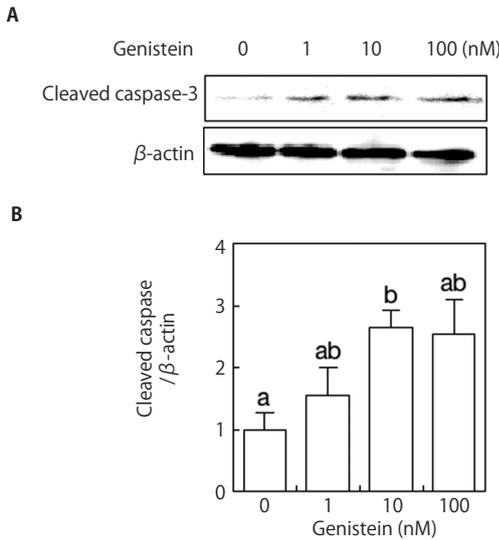


図2 ゲニステインが ATL 細胞の caspase-3 活性化におよぼす影響  
A: ウェスタンブロット像、B: バンド強度を定量化しグラフ化  
異なる文字間に有意差あり (P < 0.05)

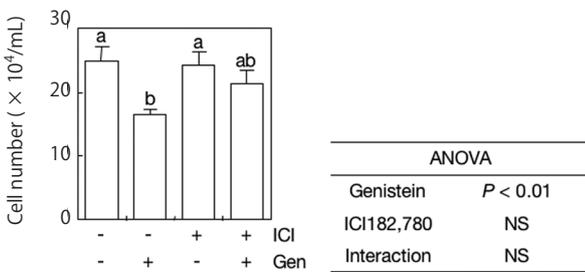


図3 ゲニステインの ATL 細胞致死効果は ER 受容体阻害剤によりキャンセルされる  
異なる文字間に有意差あり (P < 0.05)

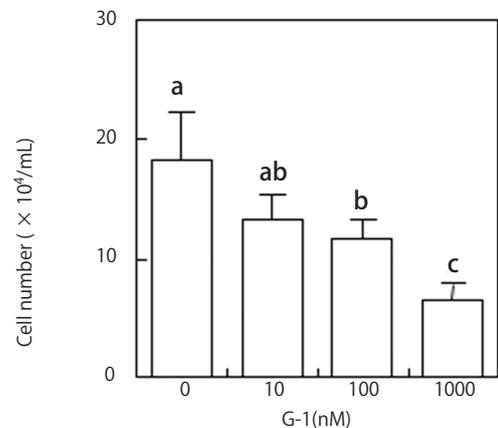


図4 GPER アゴニストはの ATL 細胞致死効果を有する  
異なる文字間に有意差あり (P < 0.05)

また、エストロゲンの non-genomic な作用として GPER の関与を示すデータが蓄積されつつある。今回の結果からも GPER アゴニストである G-1 が E2 や genistein と同様に ATL 細胞致死活性を有することが明らかとなった。Genistein は GPER を介して甲状腺がん細胞の増殖を亢進するとの報告があり、genistein が GPER のリガンドとなりうる可能性が示されている<sup>4)</sup>。また、われわれの結果のように 2 つの受容体がいずれも apoptosis シグナルにつながるという報告もあり<sup>5)</sup>、これらを総合すると ER、GPER の両者が E2 や genistein の標的になっている可能性があり、更なる分子機構の解明が必要である。

## 要 約

本研究により、大豆イソフラボンである genistein がエストロゲン受容体を介して、ATL 細胞にアポトーシスを誘導することが明らかになった。Genistein の標的として核内 ER と GPER の両者が関与している可能性があり、さらなる作用機構解明を目指すことで、ER や GPER を分子標的とした ATL 治療剤の開発につながることを期待される。

## 謝 辞

本研究の遂行にあたり、研究助成を賜りました財団法人三島海雲記念財団に深く感謝申し上げます。

## 文 献

- 1) Yamasaki M, Fujita S, Ishiyama E, et al. : Soy-derived isoflavones inhibit the growth of adult T-cell leukemia cells in vitro and in vivo. *Cancer Sci* 2007;**98**:1740-6.
- 2) Kurahashi N, Iwasaki M, Inoue M, et al. : Plasma isoflavones and subsequent risk of prostate cancer in a nested case-control study: *The Japan Public Health Center. J Clin Oncol* 2008;**26**:5923-9.
- 3) McPherson SJ, Hussain S, Balanathan P, et al. : Estrogen receptor-beta activated apoptosis in benign hyperplasia and cancer of the prostate is androgen independent and TNFalpha mediated. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;**107**:3123-8.
- 4) Vivacqua A, Bonfiglio D, Recchia AG, et al. : 17beta-estradiol, genistein, and 4-hydroxytamoxifen induce the proliferation of thyroid cancer cells through the g protein-coupled receptor GPR30. *Mol Pharmacol* 2006; **70**:1414-1423.
- 5) Chimento A, Sirianni R, Delalande C, et al. : 17beta-Estradiol activates rapid signaling pathways involved in rat pachytene spermatocytes apoptosis through GPR30 and ERalpha. *Endocrinol.* 2010 [Epub ahead of print]