

大豆イソフラボンとその代謝産物が母乳分泌  
に与える効果の検証

北海道大学 大学院農学研究院

小林 謙

大豆食品にはダイゼインやゲニステインなどのイソフラボン類が豊富に含まれている。これらの大豆イソフラボンの一部は経口摂取された後に消化管や肝臓で代謝され、エクオールや p-エチルフェノールに変換される (Atkinson, Frankenfeld and Lampe 2005; Lundh 1995)。そのため、大豆食品を摂取した後には複数の大豆イソフラボンとその代謝産物が血液中を流れるようになり、体内の様々な細胞に届けられる。そして、大豆イソフラボンとその代謝産物はそれぞれ異なる様式で多様な細胞内シグナル経路に作用する (Li *et al.* 2011)。また、それらのシグナル経路の多くは乳腺上皮細胞の乳産生にも関与することが報告されている (Kobayashi *et al.* 2016; Pauloin and Chanat 2012)。しかし、大豆イソフラボンとその代謝産物の個々に着目し、乳腺上皮細胞の乳産生に与える効果を調べた例はほとんどない。

そこで私たちはマウスとウシの乳腺上皮細胞を用いて各々の大豆イソフラボンが乳産生への影響を調べる研究に着手した。これまでの結果から、ゲニステインは STAT5 のリン酸化を部分的に阻害して乳産生を抑制するが、ダイゼインやエクオールが乳成分合成に関わる mRNA の発現量を増加させることがわかった (Tsugami *et al.* 2017; Tsugami *et al.* 2020)。また、ゲニステインの代謝産物である p-エチルフェノールは乳産生抑制作用を示さずに乳糖合成経路を上方調節することも示された。すなわち、大豆イソフラボンとその代謝産物は、それぞれ異なる様式で乳腺上皮細胞の乳産生を調節していたのである。しかし、これらの研究成果はマウスとウシの細胞を用いた検証にとどまっている。

大豆に含まれるイソフラボン類として、非配糖体のダイゼイン、ゲニステイン、グリシチン、それらの配糖体 (ダイジン、ゲニスチン、グリシチン)、および配糖体のアセチル化体とマロニル化体の 12 種が知られている。これらの大豆イソフラボンは経口摂取後の消化吸収の過程で非配糖体になったり、あるいはエクオールや p-エチルフェノールなどの代謝物に変換されたりする。本研究ではこれらの中から研究が進んでおり、なおかつ体内に存在する量が多いものとして、ダイゼイン、ゲニステイン、およびエクオールについて着目し、ヒト乳腺上皮細胞に与える効果を *in vitro* で調べた。

## 実験方法

### 供試細胞

本実験には、KURABO より購入した正常ヒト乳腺上皮細胞を使用した。購入した乳腺上皮細胞は後述の増殖培地で 5 日間培養して約 10 倍に増殖させた。続いて、0.2%トリプシン・2 mM EDTA 溶液で剥離し、 $5 \times 10^5$  個ずつ凍結保存した。以降の培養実験ではこの凍結保存した乳腺上皮細胞を適宜解凍し、実験に供試した。

### 乳腺上皮細胞用の培地調製と培養方法

基礎培地として、1%ペニシリン・ストレプトマイシン・グルタミン混合液 (Thermo Fisher) を含む DMEM/F-12 培地 (富士フイルム和光純薬) を使用した。増殖培地として、基礎培地に 5%ウシ胎児血清 (Gibco® Thermo Fisher)、1% ITS-X サプリメント (Gibco® Thermo Fisher)、

10 ng/ml EGF (Sigma-Aldrich)、10 ng/ml FGF-2 (Nacalai)、1  $\mu$ M デキサメタゾン (Sigma-Aldrich) を添加したものを使用した。基礎培地に 1%ウシ胎児血清、1% ITS-X サプリメント、10 ng/ml EGF、10 ng/ml FGF-2、1  $\mu$ M デキサメタゾン、0.1%ウシ脳下垂体抽出物 (KURABO) を含むものを使用した。また、ゲニステイン (ENZO)、ダイズイン (LKT Laboratories)、エクオール (Sigma-Aldrich) は DMSO で溶解した 20 mM ストックを  $-80^{\circ}\text{C}$  で保存し、使用前に解凍して分化培地に添加した。コントロールには DMSO を添加した。

上記の凍結保存した乳腺上皮細胞を増殖培地で懸濁し、 $5 \times 10^4$  cells/inset となるように cell culture insert (24 well plate 用、Falcon® Corning) に 播種した。下層に 600  $\mu$ L、上層に 200  $\mu$ L の増殖培地を入れて 3 日間培養後、分化培地で 3 日間して乳分泌を誘導した。続いて、ゲニステイン、イソフラボン、エクオールを含む分化培地に交換し、さらに 1 日間培養した後、細胞層を免疫染色とウエスタンブロッティングに供試した。

### 免疫染色

cell culture insert 上で培養した乳腺上皮細胞を  $-20^{\circ}\text{C}$  に冷却したメタノールに 10 分間、続いて 1%ホルムアルデヒドを含む PBS に  $4^{\circ}\text{C}$  で 10 分間浸漬し、固定した。T-PBS で洗浄後、0.2% TritonX-100 を含む PBS に 10 分間浸漬した。牛血清アルブミンを 5%含む T-PBS でブロッッキング処理を施した後、一次抗体溶液に浸漬し、 $4^{\circ}\text{C}$  で 2 日間静置した。T-PBS で洗浄した後、蛍光標識した二次抗体溶液と室温で 45 分間反応させた。染色した細胞は共焦点レーザー顕微鏡 (TCS SF5, LEICA) を用いて観察および撮影を行った。なお、免疫染色の一次抗体と二次抗体は、先行研究と同じものを用いた (Kobayashi *et al.* 2021)。

### ウエスタンブロッティング

培養終了後、細胞層を SDS-PAGE 用にサンプル処理した。SDS-PAGE とブロッティングを行い、PVDF 膜を 2%BSA を含む PBS に浸して室温で 1 時間、ブロッッキング処理した。続いて、一次抗体に  $4^{\circ}\text{C}$  で二晩反応させた後、T-PBS で洗浄し、HRP 標識の二次抗体に室温で 45 分間反応させた。T-PBS による洗浄を行った後、Luminate Forte Western HRP Substrate (Millipore) を用いてバンドを検出した。バンドの定量解析には Image Lab (Bio-Rad) を使用した。なお、一次抗体と二次抗体は、先行研究と同じものを用いた (Kobayashi 2021)。

### 細胞増殖性試験および細胞生存性試験

細胞増殖性および細胞生存性は、96 well 細胞培養用プレートで培養した乳腺上皮細胞の培地に細胞増殖測定用 WST8 試薬 (キシダ化学) を添加して 1 時間培養した後、マイクロプレートリーダー (Bio-Rad) で 450 nm の吸光度を測定することで評価した。なお、細胞増殖性の場合には  $2 \times 10^3$  /well の乳腺上皮細胞、細胞生存性の場合には  $2.5 \times 10^4$  /well の乳腺上皮細胞を播種して 2 日間培養後、さらに大豆イソフラボン存在下で 2 日間培養した。



## 2-7. 統計解析

数値データは  $n=4$  以上の平均値、エラーバーは標準誤差を示す。統計分析はダネット検定を用いて行い、 $p<0.05$  を有意とした。また、免疫染色とウエスタンブロッティングに用いるサンプルは、独立した3回の培養実験から回収した。

## 結果

### 細胞生存性と細胞増殖性への影響

コンフルエントの正常ヒト乳腺上皮細胞を  $20\ \mu\text{M}$  のダイズイン、ゲニステイン、エクオール存在下で2日間培養した。溶媒のDMSOを添加したコントロールにおいて、乳腺上皮細胞は隙間のない敷石状の上皮層を形成した (図 1A)。同様の上皮層はいずれの処理区においても観察され、ダイズイン、ゲニステイン、エクオールが乳腺上皮細胞の形態へ及ぼす影響は位相差顕微鏡レベルでは認められなかった。この培養条件で乳腺上皮細胞の生存性を調べた結果、コントロールと各処理群の細胞生存性は同レベルであった (図 1B)。一方、コンフルエントに到達していない乳腺上皮細胞を用いて行った細胞増殖性の実験では、ゲニステイン処理によって乳腺上皮細胞の細胞増殖性が有意に低下した (図 1C)。ダイズインやエクオールで処理した乳腺上皮細胞では細胞増殖性に影響は認められなかった。

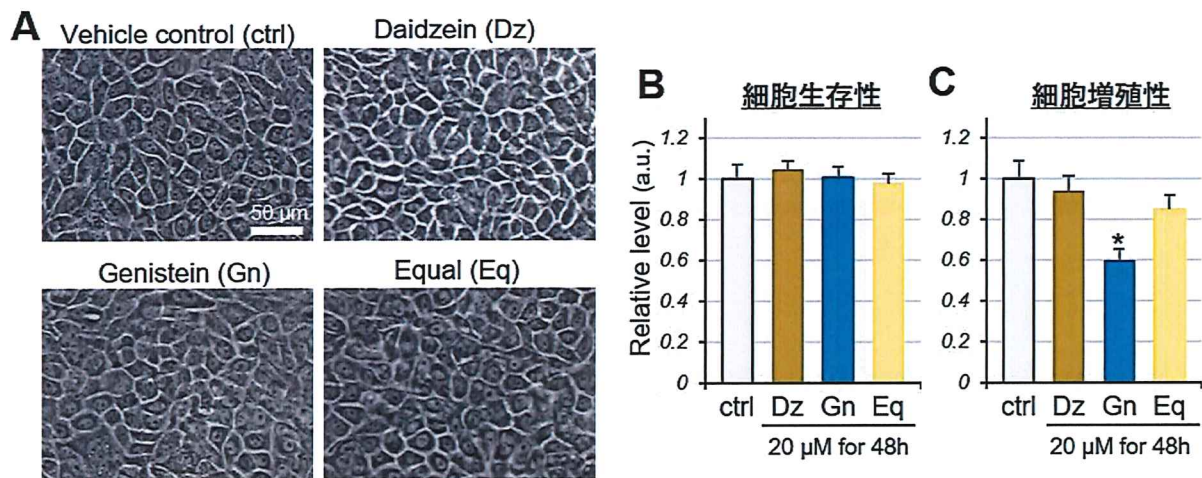


図1 イソフラボンがヒト乳腺上皮細胞の生存性と増殖性に与える作用

コンフルエントの乳腺上皮細胞を  $20\ \mu\text{M}$  のダイズイン、ゲニステイン、エクオール存在下で2日間培養した後の位相差顕微鏡像 (A) と WST-8 法で測定した細胞生存性のグラフ (B) を示す。

(C) 低密度の乳腺上皮細胞を各イソフラボン存在下で2日間培養した後の細胞増殖活性を WST-8 法で測定したグラフを示す。  $n=8$ , \*:  $p<0.05$  (vs ctrl, Dunnett's test)

### 乳成分産生能への影響

プロラクチンとデキサメタゾン存在下で4日間培養して乳腺上皮細胞の乳成分産生能を誘導した後、 $20\ \mu\text{M}$  のダイズイン、ゲニステイン、エクオール存在下でさらに1日間培養した。代表的な乳タンパク質である  $\alpha$ -カゼインと  $\beta$ -カゼインの細胞内局在を免疫染色で調

べた結果、コントロールの乳腺上皮細胞のゴルジ体領域に  $\alpha$ -および  $\beta$ -カゼインが局在し、細胞質にも分泌小胞と推定されるドット状の陽性反応が観察された (図 2A)。同様の局在パターンはダイズインやエクオールで処理した乳腺上皮細胞でも観察された。一方、ゲニステインで処理した乳腺上皮細胞ではゴルジ体領域における  $\alpha$ -および  $\beta$ -カゼインの陽性反応が弱い様子で観察された。

ウエスタンブロッティングによって検出した  $\beta$ -カゼインのバンドを定量解析したところ、ゲニステインで処理した乳腺上皮細胞ではコントロールよりも  $\beta$ -カゼイン量が少ないことが確認された (図 2B, C)。また、ゲニステインは  $\alpha$ -ラクトアルブミン量も有意に減少させたが、ラクトフェリン量はコントロールと同レベルであった。一方、ダイズインとエクオールで処理した乳腺上皮細胞では、これらの乳タンパク質量はいずれもコントロールとの間に有意な差は認められなかった。

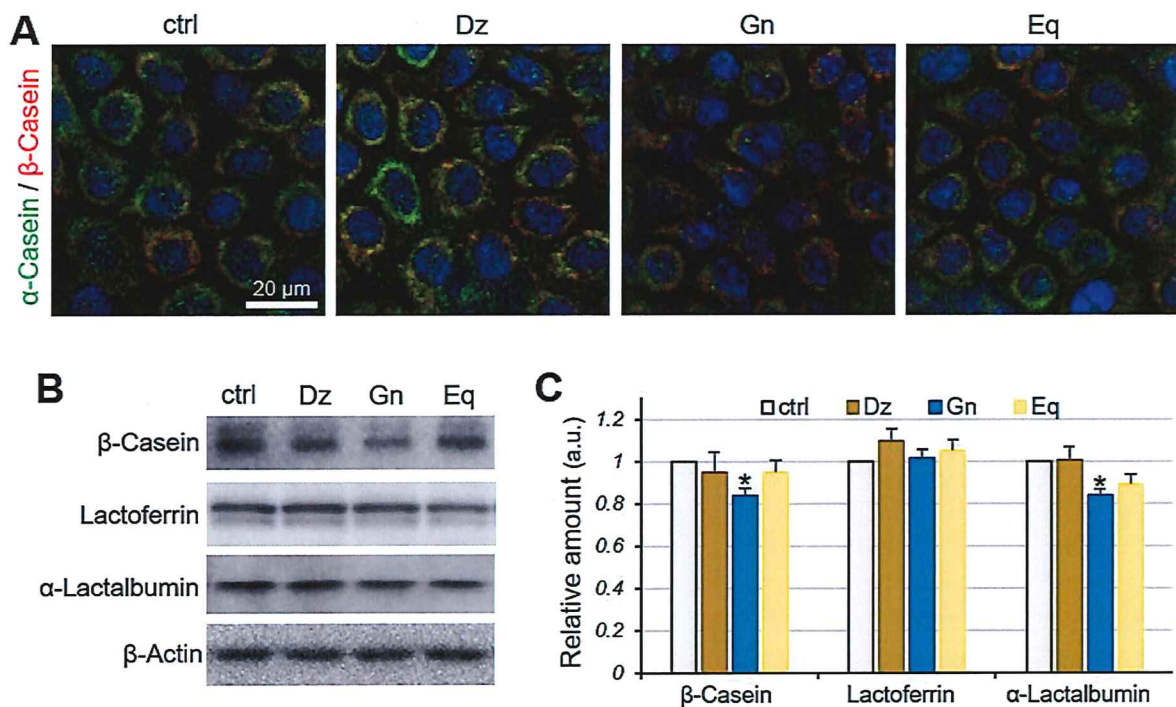


図2 イソフラボンがヒト乳腺上皮細胞の乳成分産生能力に与える作用

ダイズイン、ゲニステイン、エクオール各 20  $\mu$ M 存在下で 1 日間培養した乳腺上皮細胞における  $\alpha$ -、 $\beta$ -Casein の免疫染色像 (A)、乳タンパク質 ( $\beta$ -Casein、Lactoferrin、 $\alpha$ -Lactalbumin) のウエスタンブロッティング像 (B)、それらの存在量をバンドのデンシトメトリー解析で定量化したグラフ (C) を示す。n=6, \*: p<0.05 (vs ctrl, Dunnett's test)

### 乳成分産生能、細胞増殖性、および炎症に関わる細胞内シグナル経路への影響

乳成分産生能を上方調節する転写因子の STAT5、下方調節する STAT3、細胞増殖性に関わる Akt/mTOR と ERK、および炎症性の細胞内シグナル分子である p38 の活性化について、各タンパク質のリン酸化量、総量、総量に対するリン酸化比率をウエスタンブロッティン



グのバンドの定量解析によって調べた (図 3)。pSTAT5 と pSTAT3 はゲニステイン処理によって減少したが、STAT5 量と STAT3 量はコントロールと同レベルであった。また、ゲニステインは pAkt、pmTOR、mTOR、および ERK を減少させ、pERK を減少、pERK/ERK 比を上昇させた。一方、ダイズインは pERK と pERK/ERK 比を増加させ、pp38 を減少させた。エクオールは pERK と pp38 を減少させるとともに、pERK/ERK 比を低下させた。

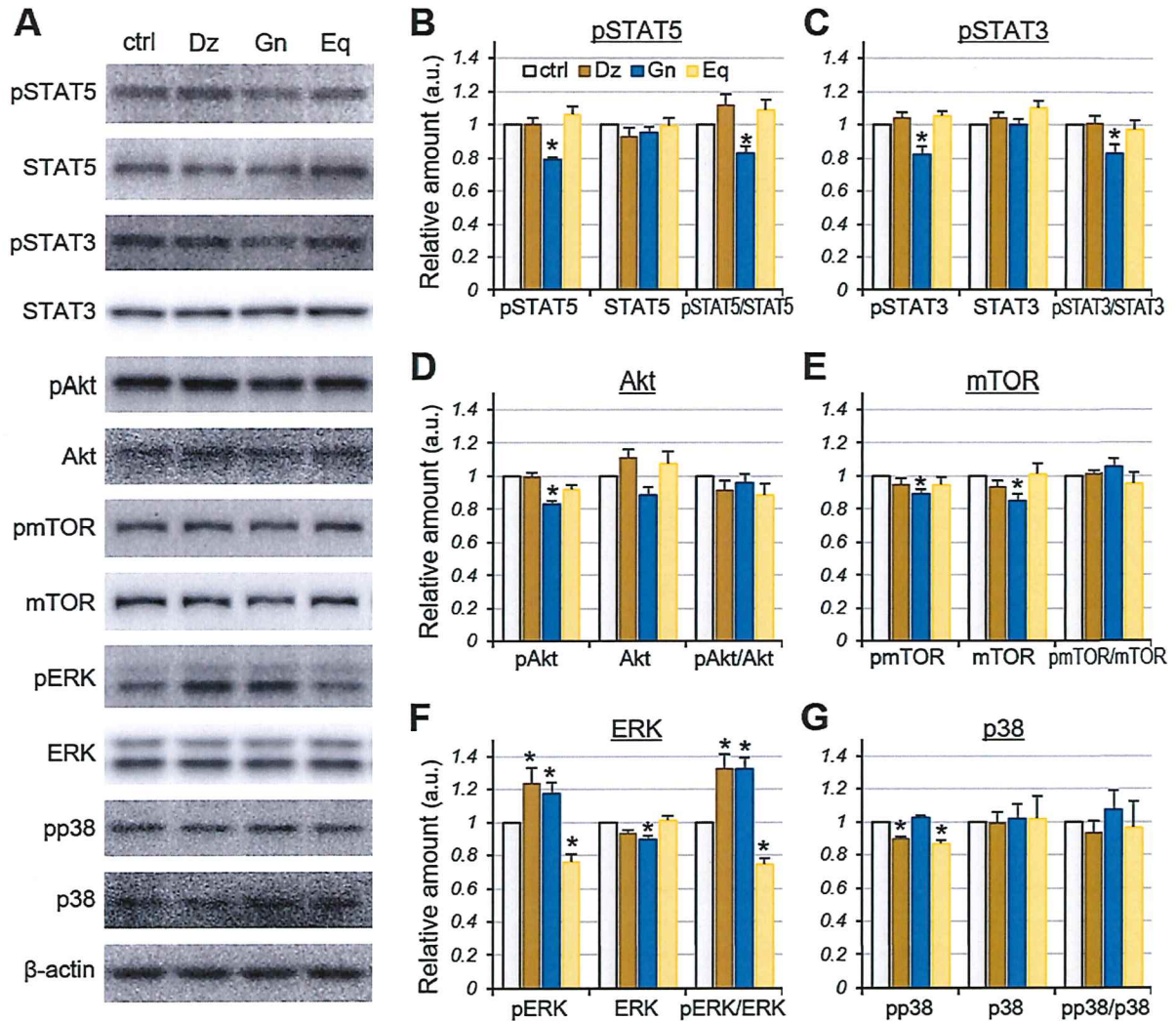


図3 イソフラボンがヒト乳腺上皮細胞の細胞内シグナル経路に与える作用

ダイズイン、ゲニステイン、エクオール各 20  $\mu$ M 存在下で 1 日間培養した乳腺上皮細胞における細胞内シグナル分子のウェスタンブロッティング像 (A)、およびそれらの存在量をバンドのデンスイットメトリー解析で定量化したグラフを示す (B-G)。n=6, \*: p<0.05 (vs ctrl, Dunnett's test)

### 考察

大豆食品を摂取すると、ダイゼイン、ゲニステイン、およびダイゼインの代謝物であるエクオールなどが体内に吸収される。しかし、個々の大豆イソフラボンがそれぞれ体内で

どのように機能しているのかは不明な点が多く残る。そこで本研究では、大豆イソフラボンがヒト乳腺上皮細胞の乳成分産生能に与える効果を調べた。その結果、ゲニステインのみが乳腺上皮細胞の増殖や乳タンパク質産生を抑制し、ダイズインやエクオールの影響は認められなかった。しかし、増殖性、乳成分産生能、および炎症を制御する細胞内シグナル経路について調べたところ、ダイズインが上皮増殖促進因子受容体の下流である ERK を活性化し、サイトカインやストレスに対する細胞応答を制御する p38 MAP キナーゼを不活性化することがわかった。p38 MAP キナーゼの不活性化はエクオール処理した乳腺上皮細胞でも確認されたが、ダイズインとは異なり ERK は不活性化していた。一方、ゲニステインは乳産生を促進する転写因子の STAT5、乳産生を抑制する STAT3、および細胞増殖を制御する Akt/mTOR の不活性化を誘導した。さらに、ゲニステインはダイズイン同様に ERK の活性化をも誘導した。以上のことから、ダイズイン、ゲニステイン、およびエクオールは乳腺上皮細胞の増殖性、乳成分産生能、および炎症に対してそれぞれ異なる作用をすることが考えられる。

本研究の結果より、ゲニステインには乳産生抑制作用、ダイズインとエクオールには抗炎症作用があることが示唆された。これらの結果は概ねマウスおよびウシ乳腺上皮細胞の研究結果とも一致する。現在、ゲニステインには乳がんの発症を抑える作用があると考えられている(Liu *et al.* 2019)。また、ダイズインは大腸菌内毒素によって引き起こされた脳内の炎症を p38 MAP キナーゼの不活性化とともに抑える作用がある(Chinta *et al.* 2013)。エクオールにも ERK 経路を介した腫瘍細胞の形質転換を阻害する作用が報告されている(Kang *et al.* 2007)。今後、本研究と同様に大豆イソフラボンの個々の作用を明らかにし、選択的な大豆イソフラボンの摂取を行えば、人類の健康を増進させることができると期待される。

## 要約

大豆食品にはダイズインやゲニステインなどの大豆イソフラボンが含まれる。本研究ではこれら大豆イソフラボンがヒト乳腺上皮細胞の母乳分泌に与える効果を検証した。

コンフルエントのヒト乳腺上皮細胞を各大豆イソフラボン存在下で培養した結果、いずれの大豆イソフラボンも細胞生存性には影響しなかった。一方、増殖中の乳腺上皮細胞に処理した場合、ゲニステインのみが細胞増殖を抑制した。続いて、乳成分産生能力を調べると、ゲニステインが代表的な乳タンパク質である  $\beta$ -カゼインや乳糖産生に関わる  $\alpha$ -ラクトアルブミンを減少させた。続いて、大豆イソフラボンが乳腺上皮細胞の細胞内シグナル経路に与える効果を調べた結果、ゲニステインが乳産生を促進する転写調節因子 (STAT5) と抑制する転写調節因子 (STAT3)、細胞増殖に関わる Akt/mTOR 経路を不活性化させることがわかった。また、ダイズインとエクオールは炎症性シグナル分子の p38 を不活性化させた。以上のことから、ダイズイン、ゲニステイン、エクオールはそれぞれ異なる様式で乳腺上皮細胞に作用することがわかった。今後、各大豆イソフラボンの作用をさらに調べることで人類の健康増進につながると考えられる。



## 謝辞

本研究の遂行にあたり多大なご支援をいただきましたタカノ農芸化学研究助成財団に心より感謝申し上げます。

## 文献

- Atkinson C, Frankenfeld CL, Lampe JW. Gut bacterial metabolism of the soy isoflavone daidzein: exploring the relevance to human health. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2005 Mar;230(3):155-70. doi: 10.1177/153537020523000302. PubMed PMID: 15734719.
- Chinta SJ, Ganesan A, Reis-Rodrigues P et al. Anti-inflammatory role of the isoflavone diadzein in lipopolysaccharide-stimulated microglia: implications for Parkinson's disease. *Neurotox Res*. 2013 Feb;23(2):145-53. doi: 10.1007/s12640-012-9328-5. PubMed PMID: 22573480; PubMed Central PMCID: PMC3597389.
- Kang NJ, Lee KW, Rogozin EA et al. Equol, a metabolite of the soybean isoflavone daidzein, inhibits neoplastic cell transformation by targeting the MEK/ERK/p90RSK/activator protein-1 pathway. *J Biol Chem*. 2007 Nov 9;282(45):32856-66. doi: 10.1074/jbc.M701459200. PubMed PMID: 17724030.
- Kobayashi K, Tsugami Y, Matsunaga K et al. Prolactin and glucocorticoid signaling induces lactation-specific tight junctions concurrent with beta-casein expression in mammary epithelial cells. *Biochim Biophys Acta*. 2016 Aug;1863(8):2006-16. doi: 10.1016/j.bbamcr.2016.04.023. PubMed PMID: 27130254.
- Kobayashi K, Tsugami Y, Suzuki N et al. Suppressive effects of curcumin on milk production without inflammatory responses in lactating mammary epithelial cells. *Phytomedicine*. 2021 Jan;80:153360. doi: 10.1016/j.phymed.2020.153360. PubMed PMID: 33038867.
- Li Y, Kong D, Bao B et al. Induction of cancer cell death by isoflavone: the role of multiple signaling pathways. *Nutrients*. 2011 Oct;3(10):877-96. doi: 10.3390/nu3100877. PubMed PMID: 22200028; PubMed Central PMCID: PMC3244210.
- Liu R, Yu X, Chen X et al. Individual factors define the overall effects of dietary genistein exposure on breast cancer patients. *Nutr Res*. 2019 Jul;67:1-16. doi: 10.1016/j.nutres.2019.03.015. PubMed PMID: 31078816.
- Lundh T. Metabolism of estrogenic isoflavones in domestic animals. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1995 Jan;208(1):33-9. doi: 10.3181/00379727-208-43828. PubMed PMID: 7892292.
- Pauloin A, Chanut E. Prolactin and epidermal growth factor stimulate adipophilin synthesis in HC11 mouse mammary epithelial cells via the PI3-kinase/Akt/mTOR pathway. *Biochim Biophys Acta*. 2012 May;1823(5):987-96. doi: 10.1016/j.bbamcr.2012.02.016. PubMed PMID: 22426621.
- Tsugami Y, Matsunaga K, Suzuki T et al. Isoflavones and their metabolites influence the milk component synthesis ability of mammary epithelial cells through prolactin/STAT5 signaling. *Mol Nutr Food Res*. 2017 Oct;61(10). doi: 10.1002/mnfr.201700156. PubMed PMID: 28605125.
- Tsugami Y, Suzuki N, Suzuki T et al. Regulatory Effects of Soy Isoflavones and Their Metabolites in Milk Production via Different Ways in Mice. *J Agric Food Chem*. 2020 May 27;68(21):5847-53. doi: 10.1021/acs.jafc.0c01288. PubMed PMID: 32379443.