

# 大豆イソフラボンの乳癌の予防薬や治療薬としての可能性の探索

千葉 奈津子  
東北大学加齢医学研究所 准教授

## 緒言

家族性乳癌原因遺伝子 *BRCA1* は、1994 年にポジショナルクローニングによって三木らにより同定された癌抑制遺伝子である<sup>1)</sup>。*BRCA1* はその後の解析により家族性乳癌卵巣癌の 80%、家族性乳癌の 30%の原因遺伝子とされ、*BRCA1* の生殖細胞変異による乳癌は、散発性癌に比較して若年発症で、両側乳癌や多臓器重複癌の頻度が高いとされている。

一方、散発性癌では *BRCA1* 遺伝子変異をほとんど認めないが、散発性乳癌の 30%、散発性卵巣癌のほとんどで *BRCA1* の mRNA やタンパク発現が減少し、その頻度は悪性度の高いものほど高いとされている。また、これらの癌で *BRCA1* 遺伝子がメチル化されていることが報告された<sup>2)</sup>。また、*BRCA1* 遺伝子変異による家族性乳癌が、散発性癌の 10～15%を占める Basal-like 乳癌と酷似した遺伝子発現プロファイルを示し<sup>3)</sup>、散発性癌の中に *BRCA1* 変異による家族性乳癌に近いサブグループが存在することが明らかになり、*BRCA1* が散発性乳癌の発症機構にも関与することが推察される。

以前より大豆食品の摂取は乳癌や前立腺癌のリスクを減少させることが知られており、大豆イソフラボンによるこれらの癌の予防や治療の効果が期待されている。代表的な大豆イソフラボンであるゲニステインは、エストロゲンと類似した構造をしており、エストロゲン受容体結合能をもち、そのために癌抑制作用を示すと考えられてきたが、一方でエストロゲン受容体非依存性の癌抑制効果を示すことも報告されている<sup>4)</sup>。また最近、*BRCA1* 欠損細胞のゲニステイン処理で DNA 損傷チェックポイントの活性化、細胞周期停止、細胞分裂の異常が引き起こされ、細胞増殖が抑制されることが報告された<sup>5)</sup>。

本研究では、ゲニステイン処理による *BRCA1* やその関連分子の細胞内応答の影響を検討することにより、大豆イソフラボンの乳癌の予防薬や治療薬としての可能性を探索した。

## 方法

### 細胞核局所レーザー照射

Saos-2 細胞を 35 mm のガラスボトムディッシュに撒き、DMEM 培地で 37 度、5% CO<sub>2</sub> 存在下で一晩培養した。その後 FuGene (Roche) を用いて GFP-*BRCA1* または GFP-Ku80 発現ベクターを導入し、48 時間培養した。DMSO またはゲニステインで処理後スキャンレーザーシステム (Olympus) を用いて細胞の核の一部に線状に 405 nm 波長のレーザーを照射し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

### siRNA 安定発現細胞の樹立

siRNA-Ready pSIREN-RetroQ ベクターにコントロールと BARD1-interacting protein (BIP) の siRNA の配列を挿入し、HeLa 細胞に導入し、puromycin でベクターがゲノム内に組み込まれた細胞を選択した。クローン化した細胞の BIP の発現抑制はウェスタンブロットにより確認した。

### 免疫染色

HeLa 細胞は、DMSO またはゲニステインで処理後、phosphate-buffered saline (PBS)/ 3% paraformaldehyde/ 2% sucrose solution で室温にて 10 分間処理をして固定した。PBS で 3 回洗浄し、1% Bovine serum albumin (BSA) 含有 PBS (1% BSA-PBS) で希釈したローダミンファロイジンを加え 37℃ で 20 分間反応させた。PBS-T (0.05% Tween 20 含有 PBS) で 3 回洗浄した後、VECTASHIELD Mounting Medium for Fluorescence with DAPI (VECTOR) で封入した。約 500 個の細胞を観察し、多核細胞をカウントした。

## 結果と考察

### 1. *BRCA1* のレーザー照射部位への集積に対する

#### ゲニステインの影響

既に、我々は生細胞の核内の一部にレーザーを照射し DNA 損傷を作成し、DNA 修復因子の応答をリアルタイム

ムで解析できる実験系により<sup>6,7,8)</sup>、BRCA1のDNA損傷に対する応答を解析し、BRCA1のN末端領域とC末端領域がそれぞれ独立にDNA二本鎖切断部位に集積し、さらに、BRCA1のN末端領域の集積は速くKu80依存性で、腫瘍由来の変異体ではその集積能が著しく低下し、C末端領域の集積は遅いことを明らかにしている<sup>9)</sup>。

そこでこのレーザー照射部位へのBRCA1の集積に対するゲニステイン処理による影響を検討した。Green fluorescence protein (GFP)をBRCA1に融合させた融合タンパク質であるGFP-BRCA1を発現するベクターをSaos-2細胞に導入し、40 μMのゲニステインで6時間処理後、GFP-BRCA1発現細胞の細胞核にレーザーを照射し、BRCA1の集積を観察し、kineticsも解析したところ、ゲニステイン処理により、BRCA1の集積は著しく抑制された(図1)。

2. 他のDNA修復因子のレーザー照射部位への集積に対するゲニステインの影響

これまでの研究により我々は、BRCA1のN末端領域の集積がKu80依存性であることを明らかにしている。

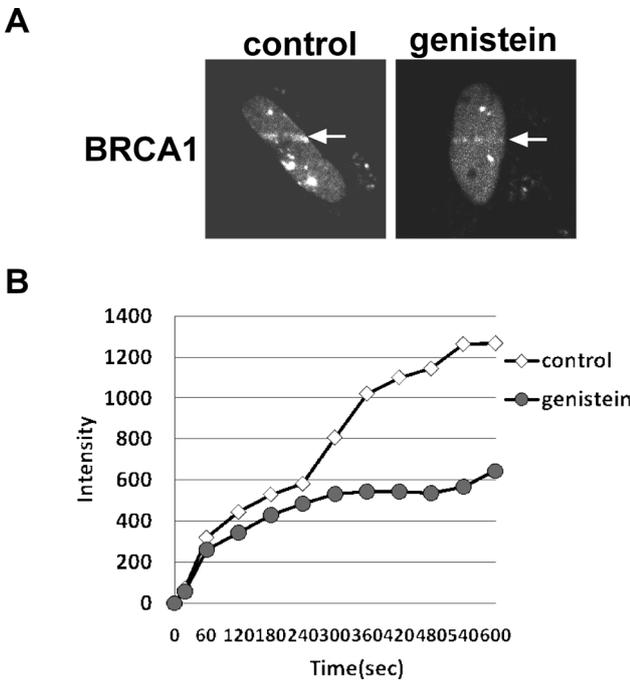


図1 BRCA1のレーザー照射部への集積に対するゲニステインの影響

A. Saos-2細胞におけるBRCA1のレーザー照射部位への集積に対するゲニステインの影響。左；ゲニステイン処理なし。右；ゲニステインで6時間処理後にレーザー照射。B. GFP-BRCA1のレーザー照射部位への集積のKineticsに対するゲニステインの影響。

そこで、次にGFP-Ku80をSaos-2細胞に導入し、同様に40 μMのゲニステインで6時間処理し、GFP-Ku80発現細胞にレーザーを照射したところ、Ku80のレーザー照射部位への集積もBRCA1と同様にゲニステイン処理により抑制された(図2)。

DNA二本鎖切断修復経路には、非相同末端再結合と相同組み換え修復の2経路があることが知られており、Ku80はKu70とヘテロダイマーを形成し、DNA二本鎖切断部位に集積し、非相同末端再結合において働く。そこで、同様にGFP-Ku70についても検討したところ、ゲニステイン処理によりレーザー照射部位への集積が抑制された。一方、DNA二本鎖切断修復経路の非相同末端再結合と相同組み換えの両経路で働くと思われる別のDNA修復因子についても検討したところ、ゲニステイン処理によりレーザー照射部位への集積は変化が認められなかった。

以上より、ゲニステインはDNA二本鎖切断修復経路の非相同末端再結合を抑制する可能性が示唆された。このメカニズムをさらに解析するため、ゲニステイン処理が、Ku80とKu70とのヘテロダイマーの形成に影響を

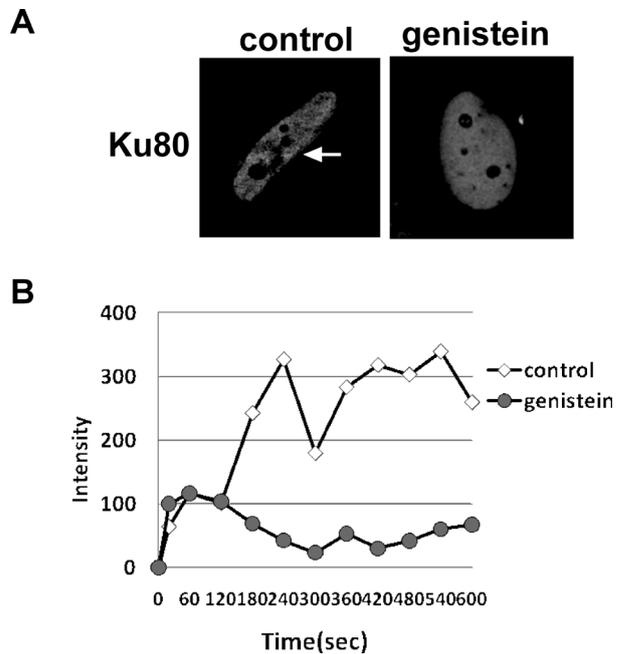


図2 Ku80のレーザー照射部への集積に対するゲニステインの影響

A. Saos-2細胞におけるKu80のレーザー照射部位への集積に対するゲニステインの影響。左；ゲニステイン処理なし。右；ゲニステインで6時間処理後にレーザー照射。B. GFP-Ku80のレーザー照射部位への集積のKineticsに対するゲニステインの影響。

与えるのかどうかを免疫沈降法にて検討したが、ゲニステイン処理はこれらのヘテロダイマー形成には影響を及ぼさなかった。

### 3. BRCA1 関連分子の発現抑制時の多核細胞形成におけるゲニステインの影響

また、最近、我々は BRCA1 とヘテロダイマーを形成する BARD1 に結合する新規分子として BIP を同定した。BRCA1 を発現抑制すると多核細胞が増加することが知られているが、この分子の発現抑制した細胞株では、ゲニステイン処理により、多核細胞が著しく増加していた (図3)。よって、ゲニステイン処理は、BRCA1 の DNA 修復機構に関与する経路に影響するだけでなく、BRCA1 の細胞分裂制御機構にも影響を及ぼすことが明らかになった。

#### 要 約

家族性乳癌原因遺伝子 *BRCA1* の生殖細胞系列変異による乳癌発症リスクは約 80%、卵巣癌発症リスクは約 40% で、若年発症で、両側乳癌や多臓器重複癌の頻度が高いとされる。近年、散発性癌にも *BRCA1* 変異による家族性乳癌に近いサブグループが存在することが示され、BRCA1 が散発性癌の発症にも関与することが示唆されている。以前より大豆食品やイソフラボンの摂取が、

乳癌や前立腺癌のリスクを減少させることが報告されているが、最近、大豆イソフラボンの 1 つであるゲニステインが *BRCA1* 欠損細胞の増殖を抑制することが報告された。本研究は、ゲニステイン処理による、BRCA1 やその関連分子の細胞内応答を検討し、大豆イソフラボンの乳癌の予防薬や治療薬としての可能性を探索することを目的とした。我々は既に生細胞の核内の一部にレーザーを照射することにより、リアルタイムで分子応答を解析できる実験系を用いて、BRCA1 の DNA 二本鎖切断部位への集積について解析し、BRCA1 の集積が BRCA1 の N 末端領域による Ku80 依存性の速い集積と C 末端領域による遅い集積からなることを明らかにしている。この BRCA1 の DNA 損傷部位への集積に対するゲニステイン処理による影響を検討したところ、BRCA1 の集積が著しく抑制され、他の DNA 修復因子では抑制されるものとされないものが見られた。また、最近、我々は BRCA1 とヘテロダイマーを形成する BARD1 に結合する新規分子を同定した。BRCA1 発現抑制すると多核細胞が増加するが、この分子の発現抑制した細胞では、ゲニステイン処理により、多核細胞が著しく増加した。これらの結果は、BRCA1 が関与する細胞応答にゲニステイン処理が影響することを示すものであり、今後の研究の進展により、大豆イソフラボンの乳癌の予防薬や治療薬としての可能性を明らかにすることができると考えられる。

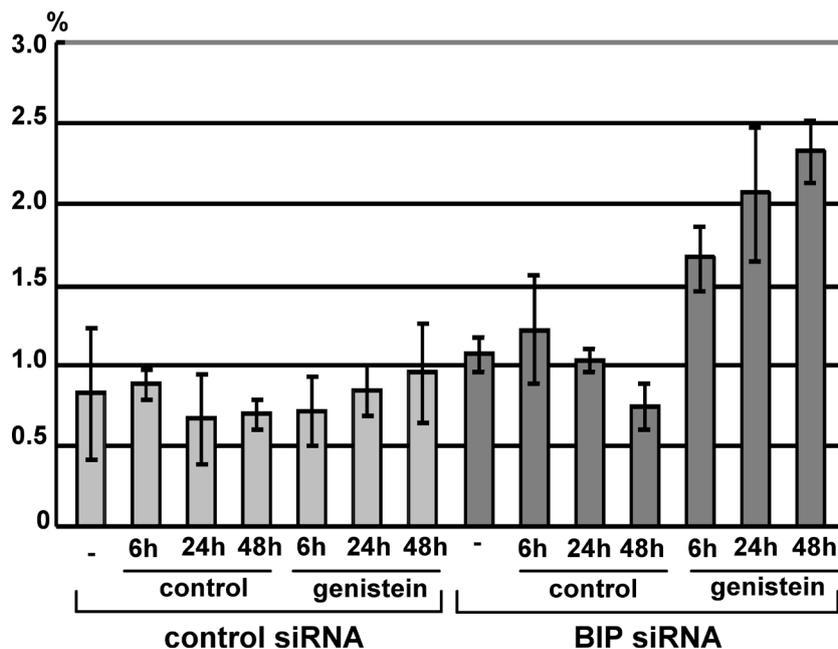


図3 BIP を発現抑制した細胞株での多核細胞の形成に対するゲニステインの効果

## 謝 辞

本研究の実施にあたり、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。また、レーザー照射実験、プロテオミクス解析は、東北大学加齢医学研究所、加齢ゲノム制御プロテオーム寄附研究部門、安井明教授、菅野新一郎博士との共同研究にて行われました。ご協力賜りましたことを感謝申し上げます。

## 文 献

- 1) Miki Y et al. *Science*, **266**, 66-71, 1994.
- 2) Turner N et al. *Nat Rev Cancer*; **4**:814-819, 2004.
- 3) Sorlie T et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, **100**, 8418-8423, 2003.
- 4) 松岡洋一郎, 塚本麗子: 大豆たん白質研究, **8**, 127-132, 2005.
- 5) Tominaga T et al. *Cell Death and Differentiation*, **14**, 472-479, 2007.
- 6) Lan L et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, **101**, 13738-13743, 2004.
- 7) Lan L et al. *J Cell Sci.*, **118**, 4153-4162, 2005.
- 8) 蘭利ほか: 実験医学, **24**, 364-370, 2006.
- 9) Wei L et al. *Mol. Cell. Biol.*, **28**, 7380-7393, 2008.