

大豆由来イソフラボンのエストロゲン非依存性乳がんの 抑制効果に関する基礎的研究

松岡洋一郎*・塚本麗子

関西医科大学第二病理学講座

Analysis of Tumor-Suppressive Effects of Soy Isoflavones on Estrogen-Independent Mammary Carcinoma Cells

Yoichiro MATSUOKA and Reiko TSUKAMOTO

Second Department of Pathology, Kansai Medical University,
Moriguchi 570-8506

ABSTRACT

In vivo and *in vitro* studies have indicated that the isoflavones including genistein in soybeans may be responsible for mammary tumor suppressive effects. We confirmed the tumor suppressive effects of soy isoflavones using c-Ha-ras transgenic rats which develop estrogen-independent as well as estrogen-dependent mammary carcinomas. Three estrogen receptor positive, cell lines C3, C11 and C17 (estrogen receptor β positive) among seven lines established from the tumors in this transgenic rat were tested for estrogen responsiveness and revealed as estrogen-independent cells. Genistein at $\geq 50 \mu\text{M}$ of concentration suppressed DNA synthesis of these rat cell lines as well as MCF-7 human cells even in the presence of estrogen. In contrast, the inhibitory effect of genistein was only observed on estrogen-independent C3 and C11 cells in the absence of estrogen. Cell cycle was arrested at G2/M phase and apoptosis was induced in C11 cells after 72 hr incubation with $10 \mu\text{M}$ genistein. A number of genes encoding transcription factors and apoptosis-related factors were included in the genes that showed >2 -fold change in their expression levels after the treatment of C11 cells. These results suggest that genistein suppresses mammary carcinomas mainly due to cell cycle arrest at G2/M phase and an apoptosis-inducing effect in an estrogen receptor-independent manner. *Soy Protein Research, Japan* **8**, 127-132, 2005.

Key words : estrogen, genistein, isoflavone, mammary carcinoma

* 〒570-8506 守口市文園町10-15

本邦女性の乳がん死亡率は近年急激に上昇しており、乳がんに対する有効な予防法の確立が緊急の課題である。最近、大豆の摂取量と乳がん発症率の相関が注目され、大豆イソフラボンによる乳がんの予防効果が期待されている。しかしながら、大豆イソフラボンは弱いながらもエストロゲン受容体結合能を有し¹⁾、内分泌かく乱作用を持つことも動物実験により示されている²⁾。したがって、ヒトにおいて乳がん予防の目的で大豆イソフラボンを大量摂取した場合、副作用としての内分泌かく乱作用や受容体を介する乳がん増殖作用が懸念される。そこで、内分泌かく乱作用を有さない天然がん予防化学物質の発見や誘導体の開発が待たれるとともに、大豆イソフラボンの乳がん抑制作用がエストロゲン受容体依存性か否か明らかにする必要がある。本研究の目的は、大豆イソフラボンがエストロゲン受容体への作用を介さず乳がんを抑制し得ることを示し、さらにその分子機序を明らかにすることである。

大豆イソフラボンによる乳がん抑制がエストロゲン受容体を介する作用であるのか否か未解決のままである。大豆イソフラボンの腫瘍抑制効果は乳がん³⁾のみならず、エストロゲン非依存性がんである大腸がん⁴⁾、皮膚がん⁵⁾でも報告されている。著者らも、エストロゲン非依存性乳がんを好発する正常型ras遺伝子導入ラットを用いた動物実験で大豆イソフラボンの発がん抑制効果を確認した⁶⁾。また、大豆イソフラボンは弱いエストロゲン受容体結合能を有するものの、タモキシフェン等の抗エストロゲン剤が持つエストロゲン受容体阻害作用は認められない¹⁾。以上の結果から著者らは、大豆イソフラボンの乳がん抑制効果がエストロゲン受容体を介さない作用機序によるものであろうと考えるに至った。当該研究では、上記遺伝子導入ラット乳がんより樹立したエストロゲン非依存性細胞株⁷⁾を用いて大豆イソフラボンによる乳がん抑制効果を示し、その抑制機構の解明を目指す。本研究により、大豆イソフラボンの乳がん抑制効果の本態が細胞増殖抑制にあるのか、あるいは細胞死誘導にあるのか明らかになる。また得られた結果は、内分泌かく乱作用を有さない乳がん予防物質や薬剤の発見、創製へ向けた基盤となるものと期待される。

方 法

動物実験

生後6週齢雌のヒト正常型c-Ha-rasトランスジェニック (Tg) ラットを対照群 (基礎食) 4匹、投与群 (基礎食+0.25%大豆抽出物、純度70%) 5匹の2群と

した。給餌開始後7日目 (7週齢時) に*N*-methyl-*N*-nitrosourea (MNU) を静脈内1回投与 (50 mg/kg) し、MNU投与後20日目に屠殺した。我々が報告した簡便法⁶⁾に従い腹乳腺からパラフィン包埋標本を作製し、乳腺の組織学的変化を比較観察した。

ラット乳がん細胞株の樹立

ラット乳がん細胞株は7, 12-dimethylbenz[*a*]anthracene投与によりヒト正常型遺伝子トランスジェニックラット1個体に発生した腫瘍よりHallowsらの方法⁸⁾に従い樹立した。方法を略記すると、細切した1.5 g腫瘍組織を0.2%コラゲナーゼ、0.1%ヒアルロニダーゼ、5%ウシ胎児血清含有199メディアウム中で37°C、2時間処理した。分離細胞塊を500 μ m、70 μ mメッシュフィルターにて濾過後、40 μ mフィルターにて残った細胞を再浮遊し、培養皿に2時間接着させた。非接着上皮細胞を採取、培養し、2回の限界希釈により単コロニー由来の細胞株7株 (C1, C2, C3, C6, C11, C15, C17) を樹立した⁷⁾。

Polymerase chain reaction (PCR) とp53, H-ras遺伝子変異解析

ラットp53遺伝子変異の有無はまず全長cDNA (1176bp) のシーケンスにより判定した。全RNAからの1st. strand cDNA合成はReverTra Ace α (東洋紡, 大阪) を用い、増幅はKOD plus (東洋紡, 大阪) により行った。最初の解析によりC11株コドン246の変異が疑われた。次いで、センスプライマー (5'-ACTTTG ACCCTTGATCCTTAGTTGG-3') とアンチセンスプライマー (5'-TAGATAGGGTAGGGTAAAGAGGGCT-3') によりエクソン5, 6をPCR増幅し、シーケンスにより変異を確認した。ラットH-ras遺伝子変異についてはエクソン1, 2をセンスプライマー (5'-CCTTGGGTT AGGCATCTATTAGCAGTCTCA -3') とアンチセンスプライマー (5'-TGGGGTGTATATGAGCCAGCTAGCA-3') により25サイクル増幅後、50倍希釈液をテンプレートとして同じプライマーセットでさらに35サイクル増幅し直接シーケンスした。ヒトH-ras遺伝子コドン12, 61の変異解析は文献⁹⁾の方法に従い行った。用いたプライマーは以下の通りである。

コドン12

センス: 5'-GCAGGCCCTGAGGAGCGAT-3'

アンチセンス: 5'-AGCAGCTGCTGGCACCTGGA-3'

コドン61

センス: 5'-AGCCCTGTCTCTCTGCAGGAT-3'

アンチセンス: 5'-GGCCAGCCTCACGGGGTTCA-3'

5'-CGCATGGCGCTGTACAGCTC-3'

エストロゲン受容体 (ER) α , β の遺伝子発現解析

PCR増幅はKOD plus (東洋紡, 大阪) により、デ

ネイチャー95℃, 15秒, アニール60℃, 30秒, 伸長68℃, 1分, サイクル数30回の条件にて施行した。用いたプライマーは次の通りである。

ER α

センス: 5'-atgaccatgacccttcacaccaaag-3'

アンチセンス: 5'-ggcgtcgtattgtcagaattggacc-3'

ER β

センス: 5'-aggaatggtcaagtgtggatccagg-3'

アンチセンス: 5'-tgctggagtttaactcacggaacc-3'

GAPDH

センス: 5'-ttcaacggcacagtcaagg-3'

アンチセンス: 5'-catggactgtgtcatgag-3'

DNA合成活性の測定

DNA合成活性は5-bromo-2'-deoxy-uridine (BrdU) labeling kit (ベーリンガー・マンハイム, ドイツ) を用いて測定した。対数増殖期にある細胞0.5~1×10⁴個を96穴マイクロタイタープレート各ウェルに播種し, 10%血清存在下24時間培養後, 5%ウシ胎児血清含有または3%チャコール処理血清を含む培養液にてさらに24時間前培養する。0~1,000 pM 17 β -estradiol (E2) あるいは0~50 μ Mのゲニステイン, ダイゼイン, エコール存在下で24~72時間培養後, 10 μ M BrdUで2時間ラベルする。引き続き, 70%エタノール/0.5 M塩酸で-20℃, 30分固定, ヌクレアーゼ処理 (37℃, 30分), peroxidase標識抗BrdU抗体で37℃, 30分インキュベートした後, peroxidase基質を加え405 nmでの吸光度を測定した。

フローサイトメーター

C11細胞を5%ウシ胎児血清を含む培養液に10 μ M ゲニステインを添加し72時間培養後, 細胞周期ならびにアポトーシスの比率を測定した。1~2×10⁴個の細胞を70%エタノール, 4時間固定後, 20 μ g/mL propidium iodide, 0.2 mg/mL RNaseを含むPBSにて30分固定した後1~2×10⁴個の細胞をフローサイトメーターに供した。

DNAマイクロアレイ

遺伝子発現の網羅的解析は, C11細胞を10 μ Mゲニ

ステイン非存在および存在下 (ϕ 6 cmディッシュ各3枚) で72時間培養後, RNeasy Mini Kit (QIAGEN, CA) にて精製した全RNAを鋳型としてcRNAを合成し, アジレント社製ラットオリゴヌクレオチドアレイ (約20,500遺伝子搭載) を用いて行った。

結果と考察

大豆イソフラボンの乳腺発がん高感受性c-Ha-ras Tg ラットに対する発がん抑制効果

腹乳腺の組織学的検索では, 異型過形成および腺がんの合計の発生頻度は対照群100% (4/4), 投与群40% (2/5) で, 投与群で発がんの抑制を認めた。また, 単位面積あたりの腫瘍数にも投与群で有意な抑制が認められた (Table 1)。投与後56日目では, 対照群, 投与群とも全例に腺がんの発生を認めた。しかし, 腫瘍重量では対照群28.9±17.3 g/ラット (n=10), 投与群7.7±5.9 g/ラット (n=11) でイソフラボン食による腫瘍重量の有意 (P<0.01) な抑制が認められた⁶⁾。以上から, MNUイニシエーション法で, イニシエーション後20日目に異型過形成と腺がんの発生頻度あるいは56日目に腫瘍重量を指標として, イソフラボン食の乳腺発がん抑制効果を確認した。Tgラットに発生する乳がんの増殖はエストロゲン非依存性と考えられる¹⁰⁾ (松岡ら, 未発表) ことから, イソフラボンの乳がん抑制効果はそのエストロゲン様作用とは別の機序によると考えられる。

ラット乳がん細胞株のエストロゲン受容体 (ER) 発現と遺伝子変異

ヒト正常型遺伝子トランスジェニックラット1個体に発生した乳腺腫瘍より乳がん細胞7株 (C1, C2, C3, C6, C11, C15, C17) を樹立した。RT-PCR法によるER遺伝子発現の解析では, ER陰性 (C2), ER α のみ陽性 (C3, C6, C15), ER β のみ陽性 (C11, C17), ER α , β 陽性 (C1) の各細胞株であることが判明した (Fig. 1)。

DNA傷害等細胞内傷害によるアポトーシス誘導に

Table 1. Suppressive effects of soy isoflavones on mammary carcinogenesis of c-Ha-ras Tg rats

Group	No. of rats	Early carcinomas ^a	
		Incidence (%)	Numbers/cm ² (mean±SD)
Isoflavones	5	2/5 (40) ^b	0.50±0.86 ^b
Basal diet	4	4/4(100)	3.89±3.51

^aincluding atypical hyperplasia

^bP<0.05 as compared to basal diet group

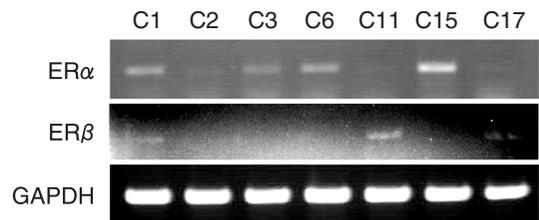


Fig. 1. Expression of estrogen receptor genes in rat mammary carcinoma cell lines.

中心的役割を担うp53の遺伝子変異について解析した。全株についてRT-PCRで全長p53遺伝子が増幅され、大きな欠失等は存在しなかった。また、PCR産物の塩基配列を解析した結果C11のコドン246に1塩基変異が検出された。この変異は、ゲノムDNAの塩基配列解析により確認された。さらに、導入ヒトH-ras遺伝子には全株で変異が認められたのに対して、ラットH-ras遺伝子には変異が見られなかったことは興味深い⁷⁾ (Table 2)。

Table 2. p53 and human Ha-ras gene mutations in Tg rat mammary carcinoma cells

Cell line	Sequence of gene		
	p53	Human Ha-ras ^a	
		codon 12	codon 61
C1	W ^b	GA/TC	W
C2	W	GA/TC	CGG
C3	W	GAC	W
C6	W	GA/TC	W
C11	GGC (codon 246 ^c)	GAC	CAT
C15	W	GA/TC	CAT
C17	W	GAC	W

^aThe wild-type sequences are as follows: codon 12 is GGC and codon 61 is CAG.

^bW denotes the wild-type sequence.

^cThe wild-type sequence of codon 246 is CGC.

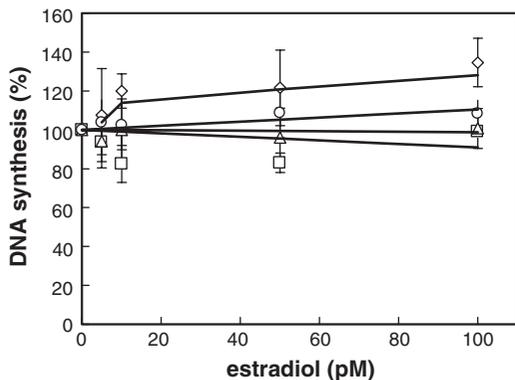


Fig. 2. Estrogen responses of C3, C11 and C17 cell lines.

□: C3, △: C11, ○: C17, ◇: MCF-7

Table 3. Cell cycle analysis after 72 hr incubation with genistein

Treatment	Cell cycle (% cells)			
	subG1	G0/G1	S	G2/M
Untreated	5.3±0.1	32.9±1.9	57.7±6.0	9.5±5.4
Genistein	12.3±9.2	41.7±0.3	1.9±3.0	56.4±2.7

C3, C11, C17株の増殖のエストロゲン依存性

C3 (ER α 陽性), C11 (ER β 陽性), C17 (ER β 陽性)細胞のエストロゲン依存性を0~1,000 pM E2添加によるDNA合成活性の変動により検討した (Fig. 2)。1,000 pM E2添加時のDNA合成活性はそれぞれ非添加対照群のC3 91.1±2.0%, C11 96.5±10.9%, C17 101.3±16.6%でいずれもエストロゲン非依存性であった。エストロゲン依存性MCF-7細胞では1,000 pM E2添加により約1.6倍のDNA合成の上昇を認めた。

ゲニステインの細胞増殖および細胞周期への影響

C3, C11, C17細胞はいずれもエストロゲン非依存的に増殖することから、ゲニステインの細胞増殖への影響をエストロゲン存在下で検討した。C3, C11細胞では10 μ Mから、MCF-7細胞では25 μ Mから明らかなDNA合成抑制が見られ、50 μ Mゲニステイン存在下ではC3, C11, C17, MCF-7細胞でそれぞれ90%, 96%, 66%, 56%の阻害が認められた。この結果より、ゲニステインの増殖抑制効果はERを介さない機構によるものと考えられる。

ゲニステインの細胞周期およびアポトーシスへの影響をアポトーシス高感受性C11細胞⁷⁾を用いて解析した。10 μ M ゲニステイン添加72時間後にはG2/M期細胞の増加とS期細胞の減少が極めて顕著で、さらにアポトーシス細胞の増加も認めた (Table 3)。S期細胞の著明な減少はゲニステインによるDNA合成抑制ならびにG2/M期での細胞周期停止による影響と思われる。以上の結果から、ゲニステインによる乳がん抑制はG2/M期での細胞周期停止による増殖抑制を主因とするものであろうと考察される。

エストロゲン非存在下でのゲニステイン、ダイゼイン、エコールのDNA合成活性への影響

エストロゲン非存在下、ゲニステイン、ダイゼインとその代謝産物エコール (0~50 μ M) 添加24時間後でのC3, C11, C17, MCF-7細胞のDNA合成活性を測定した。5 μ Mゲニステインまでいずれの細胞でも明らかな影響は認めなかったが、10 μ M添加時よりC11細胞でDNA合成抑制が認められ、50 μ M添加により対照群のC3 34.7±8.0%, C11 63.1±14.4%であった。一方、C17細胞では120.8±9.6%であった。MCF-7細胞では10 μ M添加時より有意なDNA合成亢進を認め、50 μ M添加により約1.3倍のDNA合成上昇を認めた (Fig. 3A)。一方、ダイゼインは50 μ MでC3, C11に対して弱いDNA合成抑制を示したが、C11, C17, MCF-7には無効であった (Fig. 3B)。エコールは50 μ Mまでいずれの細胞のDNA合成活性へも有意な影響を示さなかった。エコールはゲニステインと同等以上の

ER結合親和性を有する¹⁾。以上の結果は、ゲニステインのDNA合成抑制作用がER非依存的であることを強く支持している。

DNAマイクロアレイ解析

C11細胞を用いゲニステイン添加後の遺伝子発現変動をDNAマイクロアレイにより解析した。10 μ Mゲニステイン添加72時間後に2倍以上の発現変動を認めた遺伝子は、発現上昇410個、低下327個の737遺伝子で、全体の3.6% (737/20,500)であった。発現上昇群には eaf2 (2.6倍), IL-15 (2.5倍), tumor necrosis factor receptor superfamily 12 (2.2倍), caspase recruitment domain protein 9 (2.1倍), 発現低下群にはtranscription factor 2a1 (1/4.4倍), apoptosis inhibitor 2 (1/2.5倍), cyclinG (1/2.2倍)が含まれていた。今後さらに定量的PCR法あるいはノザンプロット法による確認が必要である。

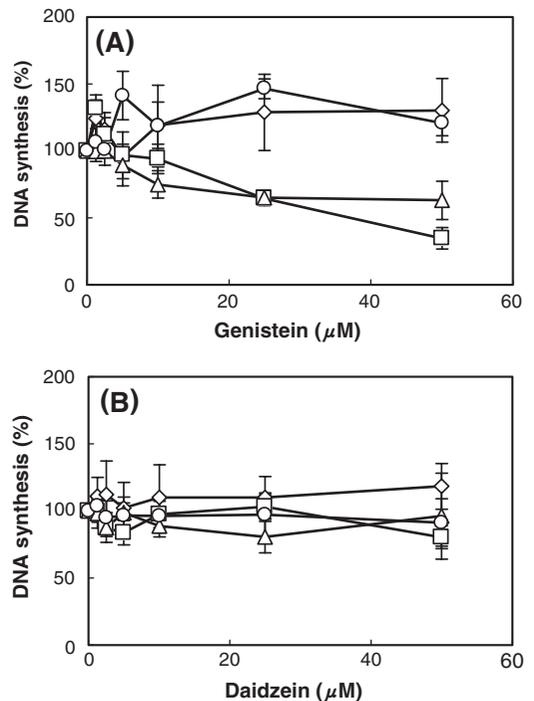


Fig. 3. Effects of genistein and daidzein on DNA syntheses of mammary carcinoma cells.

□: C3, △: C11, ○: C17, ◇: MCF-7

要 約

乳腺発がん高感受性の正常型ras遺伝子導入 (Ras) ラットによる動物実験でイソフラボンの発がん抑制効果を確認した。当該ラットに発生する乳がんの増殖はエストロゲン (E) 非依存性と考えられることから、イソフラボンの乳がん抑制効果はそのE様作用とは別の機序によると思われる。そこでRasラットに発生した乳腺腫瘍より乳がん細胞株7株を樹立した。RT-PCR法によるE受容体 (ER) 遺伝子発現の解析で、ER陰性 (C2), ER α のみ陽性 (C3, C6, C15), ER β のみ陽性 (C11, C17), ER α , β 陽性 (C1) の各細胞株であることが判明した。C3, C11, C17細胞の増殖はいずれもE非依存的であった。さらにゲニステインはE存在下でも50 μ M以上でC3, C11, C17およびMCF-7細胞のDNA合成を有意に阻害した。しかしながら、E非存在下では10 μ M以上でC3, C11にのみDNA合成阻害を認めた。E存在下10 μ Mゲニステイン、72時間処理したC11細胞の細胞周期の解析によりゲニステインが主にG2/M期での細胞周期停止を誘導し、またアポトーシスも誘発することを見出した。また、DNAアレイ解析により発現上昇群にはアポトーシス誘導因子、発現低下群には転写因子およびアポトーシス抑制因子が含まれていた。以上の結果は、ゲニステインが乳がん細胞の細胞周期をG2/M期で停止させることを主因とし、さらにアポトーシスの誘導によりER非依存的に腫瘍抑制作用を発揮していることを示唆している。

文 献

- 1) Takatori S, Kitagawa Y, Oda H, Miwa G, Nishikawa J, Nishihara T, Nakazawa H and Hori S (2003): Estrogenicity of metabolites of benzophenone derivatives examined by a yeast two-hybrid assay. *J Health Sci*, **49**, 91-98.
- 2) Barnes S (1995): Effect of genistein on in vitro and in vivo models of cancer. *J Nutr*, **125**, 777S-783S.
- 3) Shao ZM, Wu J, Shen ZZ and Barsky SH (1998): Genistein exerts multiple suppressive effects on human breast carcinoma cells. *Cancer Res*, **58**, 4851-4857.
- 4) Yu Z, Li W and Liu F (2004): Inhibition of proliferation and induction of apoptosis by genistein in colon cancer HT-29 cells. *Cancer Lett*, **215**, 159-166.
- 5) Wei H, Saladi R, Lu Y, Wang Y, Palep SR, Moore J, Phelps R, Shyong E and Lebwohl MG (2003): Isoflavone genistein: photoprotection and clinical implications in dermatology. *J Nutr*, **133**, 3811S-3819S.
- 6) Matsuoka Y, Fukamachi K, Hamaguchi T, Toriyama-Baba H, Kawaguchi H, Kusunoki M, Yoshida H and Tsuda H (2003): Rapid emergence of mammary preneoplastic and malignant lesions in human c-Ha-ras proto-oncogene transgenic rats: possible application for screening of chemopreventive agents. *Toxicol Pathol*, **31**, 632-637.
- 7) Hamaguchi T, Matsuoka Y, Bechberger J, Ohnishi T, Fujita KI, Naus CC, Kusunoki M, Tsubura A and Tsuda H (2005): Establishment of an apoptosis-sensitive rat mammary carcinoma cell line with a mutation in the DNA-binding region of p53. *Cancer Lett*, *on line*.
- 8) Hallowes RC, Rudland PS, Hawkins RA, Lewis DJ, Bennet D and Durbin H (1977): Comparison of the effects of hormones on DNA synthesis in cell cultures of nonneoplastic and neoplastic mammary epithelium from rats. *Cancer Res*, **37**, 2492-2504.
- 9) Hamaguchi T, Matsuoka Y, Kawaguchi H, Fukamachi K, Takasuka N, Ueda S, Shimizu K, Ohki M, Kusunoki M, Sakakura T, Yoshida H and Tsuda H (2004): Terminal endbuds and acini as the respective major targets for chemical and sporadic carcinogenesis in the mammary glands of human c-Ha-ras protooncogene transgenic rats. *Breast Cancer Res Treat*, **83**, 43-56.
- 10) Asamoto M, Ota T, Toriyama-Baba H, Hokaiwado N, Naito A and Tsuda H (2002): Mammary carcinomas induced in human c-Ha-ras proto-oncogene transgenic rats are estrogen-independent, but responsive to d-limonene treatment. *Jpn J Cancer Res*, **93**, 32-35.