

乳がんの予防と治療のための大豆イソフラボンと 家族性乳がん原因遺伝子BRCA1の関連の解明

柏木梨佐・松澤綾子・柵木絵美子・柴田 峻・古川裕美子・千葉奈津子*

東北大学加齢医学研究所免疫遺伝子制御研究分野

Analysis of the Effect of Soybean Isoflavones on the Function of BRCA1 in Cancer Prevention and Therapy

Risa KASHIWAGI, Ayako MATSUZAWA, Emiko MASEKI, Shun SHIBATA,
Yumiko FURUKAWA and Natsuko CHIBA

Department of Molecular Immunology Institute of Development,
Aging and Cancer, Tohoku University, Sendai 981-8575

ABSTRACT

The Breast cancer-associated gene 1 (BRCA1) is the most frequently mutated tumor suppressor gene found in familial breast cancers. The risk of breast cancer developing is about 80% in carriers of *BRCA1* mutation. Although somatic *BRCA1* mutations are rarely observed in sporadic breast cancer, the expression of *BRCA1* is down regulated in sporadic breast cancer. Furthermore, gene expression analysis revealed that basal-like subtypes show a profile similar to that of *BRCA1*-related cancers. Therefore, lower expression or function of *BRCA1* is thought to be an important contributing factor in sporadic cancers. In Eastern countries, the risk of breast cancer is lower than in Western countries. A number of studies have shown that this reduced risk may be associated with a high amount of soy consumption. The active inhibitory components of soy are thought to be isoflavones, such as genistein. Recently, it has been reported that genistein inhibits cell proliferation through activation of DNA damage checkpoints, cell cycle arrest, and mitotic catastrophe in *BRCA1*-deficient cells. Here, we report that genistein inhibits the accumulation of *BRCA1* and other DNA repair factors at the DNA lesions induced by laser micro-irradiation. These findings suggest that genistein suppresses the cellular response to DNA damage. Recently, we have identified a novel *BRCA1*-associated protein by proteomic study and found that this molecule is localized at the centrosome in interphase, at the spindle poles in the mitotic phase, and at the midbody in cytokinesis. We have established cells that express siRNA of this

molecule. Treatment of the cells with genistein significantly increased the multi-nuclear cells, suggesting that genistein abolish cytokinesis in these molecule-deficient cells. This indicates that genistein affects the BRCA1-related cellular function in the DNA damage response and the regulation of mitosis. *Soy Protein Research, Japan* **13**, 120-124, 2010.

Key words : isoflavone, genistein, BRCA1, DNA repair, cell cycle regulation

家族性乳がん原因遺伝子*BRCA1*は、1994年に三木らにより単離されたがん抑制遺伝子である¹⁾。*BRCA1*生殖細胞変異による乳がん発症リスクは約80%、卵巣がん発症リスクは約40%と推定されており、散発性がんと比較して若年発症で、両側乳がんや多臓器重複がんの頻度が高く予後不良であるとされる。

一方、散発性がんでは*BRCA1*遺伝子変異をほとんど認めないが、散発性乳がんの30%、散発性卵巣がんのほとんどで*BRCA1*のmRNAやたん白発現が減少し、その頻度は悪性度の高いものほど高く、また、それらのがんで*BRCA1*遺伝子がメチル化されていることが報告された²⁾。また、*BRCA1*遺伝子変異による家族性乳がんが、散発性がんの10-15%を占めるBasal-like乳がんと酷似した遺伝子発現プロファイルを示し³⁾、散発性がんの中に*BRCA1*変異による家族性乳がんに近いサブグループが存在することが明らかになり、*BRCA1*が散発性乳がんの発症機構にも関与することが推察される。

大豆食品の摂取は乳がんや前立腺がん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がん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、そのためにがん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がん抑制効果を示すことも報告されている⁴⁾。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⁵⁾。

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し、大豆イソフラボンの乳がんの予防薬や治療薬としての可能性を探索する。

方 法

細胞核局所レーザー照射

35 mmのガラスボトムディッシュにSaos-2細胞を撒き、DMEM培地で37℃、5%CO₂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。培養後、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、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。

結果と考察

レーザー照射部位への*BRCA1*の集積に対するゲニステインの効果

我々は既に、東北大学加齢医学研究所、加齢ゲノム制御プロテーム寄附研究部門、安井明教授との共同研究により、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で解析できる実験系により^{6, 7, 8)}、*BRCA1*のDNA

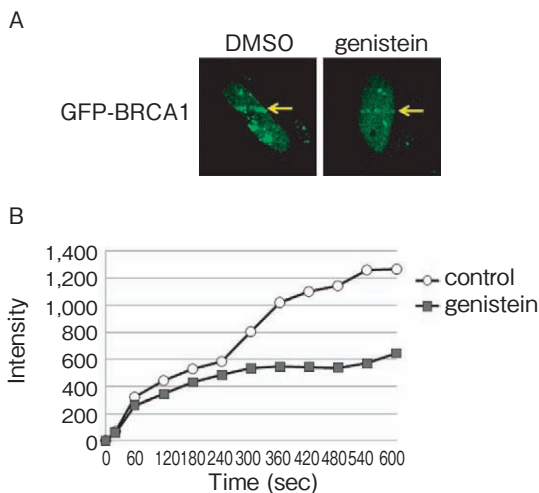


Fig. 1. Effect of genistein on the accumulation of GFP-tagged BRCA1 at laser-irradiated sites. **A.** Accumulation of GFP-tagged BRCA1 in Saos-2 cells in the presence or absence of genistein. **B.** Kinetics of GFP-tagged BRCA1 accumulation after laser irradiation in Saos-2 cells in the presence or absence of genistein.

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⁹⁾。

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に融合させた融合たん白であるGFP-BRCA1を発現するベクターをSaos-2細胞に導入し、40 μ M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 (Fig. 1)。

レーザー照射部位への他のDNA修復因子の集積に対するゲニステインの効果

BRCA1のN末端領域の集積がKu80依存性であることから、次にGFP-Ku80をSaos-2細胞に導入し、同様に40 μ M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 (Fig. 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

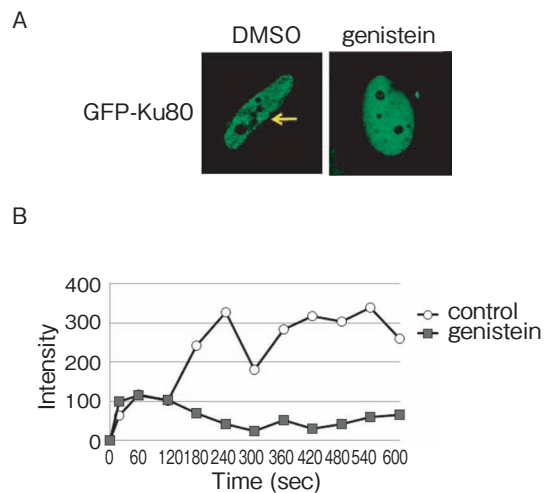


Fig. 2. Effect of genistein on the accumulation of GFP-tagged Ku80 at laser-irradiated sites. **A.** Accumulation of GFP-tagged Ku80 in Saos-2 cells in the presence or absence of genistein. **B.** Kinetics of GFP-tagged Ku80 accumulation after laser irradiation in Saos-2 cells in the presence or absence of genistein.

の2経路があることが知られており、Ku80は非相同末端再結合において働くことが知られている。同様に非相同末端再結合において働く分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考えられる分子については、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。

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 (Fig. 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、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。

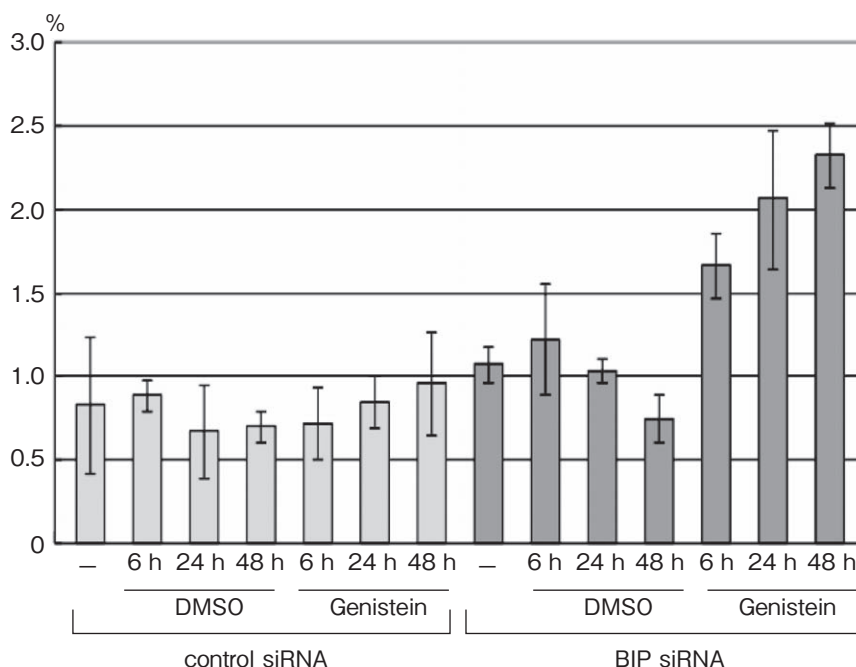


Fig. 3. Effect of genistein on the production of multi-nuclear HeLa cells that express stably control or BIP siRNA. Cells were treated with DMSO or genistein, fixed, and stained with DAPI. The multi-nuclear cells and mono-nuclear cells were counted and the percentages of multi-nuclear cells were scored. At least 500 cells were counted in each experiment. Data represent the means and standard deviation of at least three independent experiments.

要 約

家族性乳がん原因遺伝子*BRCA1*の生殖細胞系列変異による乳がん発症リスクは約80%、卵巣がん発症リスクは約40%で、若年発症で、両側乳がんや多臓器重複がんの頻度が高いとされる。近年、散発性がんにも*BRCA1*変異による家族性乳がんに近いサブグループが存在することが示され、*BRCA1*が散発性がん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、乳がんや前立腺がん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がん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、この新規分子の発現抑制し、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がん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。

文 献

- 1) Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harshman K, Tavtigian S, Liu Q, Cochran C, Bennett, LM, Ding W and et al. (1994). A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science*, **266**, 66-71.
- 2) Turner N, Tutt A and Ashworth A (2004): Hallmarks of 'BRCAness' in sporadic cancers. *Nat Rev Cancer*, **4** (10): 814-819.
- 3) Sorlie T, Tibshirani R and Parker J, Hastie, TMarron JS, Nobel A, Deng S, Johnsen H, Pesich R, Geisler S, Demeter J, Perou CM, Lonning PE, Brown P O, Borresen-Dale AL and Botstein D (2003): Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci USA*, **100** (14): 8418-8423.
- 4) 松岡洋一郎, 塚本麗子 (2005) : 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. 大豆たん白質研究, **8**, 127-132.
- 5) Tominaga T, Wang A, Wang RH, Wang X and Deng CX (2007): Genistein inhibits Brcal mutant tumor growth through activation of DNA damage checkpoints, cell cycle arrest and mitotic catastrophe. *Cell Death Differ*, **14**, 472-479.
- 6) Lan L, Nakajima S, Oohata Y, Takao M, Okano S, Masutani M, Wilson SH and Yasui A (2004): In situ analysis of repair processes for oxidative DNA damage in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, **101**, 13738-13743.
- 7) Lan L, Nakajima S, Komatsu K, Nussenzweig A, Shimamoto A, Oshima J and Yasui A (2005): Accumulation of Werner protein at DNA double-strand breaks in human cells. *J Cell Sci*, **118**, 4153-4162.
- 8) 蘭利, 中嶋敏, 安井明 (2006) : in situ解析からみえてきた細胞の中でのDNA損傷応答機構. 実験医学, **24**, 364-370.
- 9) Wei L, Lan L, Hong Z, Yasui A, Ishioka C and Chiba N (2008): Rapid recruitment of BRCA1 to DNA double-strand breaks is dependent on its association with Ku80. *Mol. Cell. Biol.*, **28** (24), 7380-7393.