

がん抑制遺伝子（コネキシン）の機能回復をターゲットにしたがん化学予防に関する研究
—大豆由来のBowman-Birk inhibitorを用いた検討—

矢野友啓*¹・鈴木一由²・浅野隆司²

¹国立健康・栄養研究所 ²日本大学生物資源学部

**Chemoprevention of Bowman-Birk Inhibitor from Soy Bean Against Cancers
Based on Restoration of Connexin 43-Dependent Tumor-Suppressive Effect**

Tomohiro YANO¹, Kazuyuki SUZUKI² and Ryuzi ASANO²

¹National Institute of Health and Nutrition, Tokyo 162-8636

²College of Bioresource Sciences, Nihon University, Fujisawa 252-8510

ABSTRACT

As a promising strategy for cancer chemoprevention, the restoration in expression and function of tumor suppressor gene has been notable. Of tumor suppressor genes, connexin (Cx) gene, a member of gap junction (GJ), acts as a tumor suppressor by maintaining electrical and metabolic homeostasis via GJ-driven cell-cell communication, and the tumor-suppressive effect is cell- and tissue- specific. Thus, the restoration and/or maintenance of the Cx gene contribute to establishment of tissue-specific cancer prevention. On the other hand, it has been known that Bowman-Birk inhibitor (BBI) from soy bean acts as a potential chemopreventive agent, and part of the chemopreventive effect may depend on the restoration of Cx43 gene expression. In this study, we examined if BBI could be a promising chemopreventive agent against cancers caused by the down-regulation of Cx43 gene. In a mouse xenograft model, BBI treatment reduced the relative tumor weight as well as proliferating cell nuclear antigen (a marker of cell proliferation) in a dose-dependent manner. In contrast, the BBI treatment restored the level of Cx43 mRNA in the dose-dependent manner. These results suggest that the anti-carcinogenic effects of BBI induced negative growth control caused by the expression of Cx43 gene in mouse xenograft model and that the restoration of Cx43 is one of the important factors for cancer prevention by BBI. *Soy Protein Research, Japan* **8**, 113-116, 2005.

Key words : Bowman-Birk inhibitor, cancer chemoprevention, connexin 43, negative growth control

*〒162-8636 新宿区戸山1-23-1

疫学的解析から、大豆製品の積極的な摂取は低発がんと低がん死亡率と密接に関係していることが判明し、実際、実験的研究からいくつかの大豆由来成分ががん化学予防成分として有用であることが報告されている^{1),2)}。その代表的な成分としてisoflavoneが挙げられる³⁾。その一方、大豆に多く含まれているserine protease inhibitorの1種であるBowman-Birk inhibitor (BBI) が強いがん抑制作用があることが報告されて以来、そのがん予防作用について精力的に研究され、毒性がほとんど認められないことから、臨床応用が可能ながん予防成分として期待されている⁴⁾。

BBIのがん抑制機構については、いくつかの検討が行われているが、その詳しい機構については不明のままである⁵⁾。我々は以前より、gap junction (GJ) を形成し、細胞間の情報伝達を介して細胞間の恒常性維持に働くことにより、がん抑制遺伝子として働くことが知られているコネキシン (Cx) 遺伝子に着目^{6),7)}、その抑制機構を使ったがん化学予防の可能性を探ってきた。最近、BBIが細胞レベルでCx遺伝子分子種の1つであるCx43遺伝子の発現を回復することが明らかとなった⁸⁾。また、Cx遺伝子のがん抑制機能は、そのCx遺伝子が発現している母体細胞から発生してくるがんに対して特異的に認められることが示された⁹⁾。従って、Cx43のがん抑制機能に着目すれば、BBIはCx43のがん抑制機能が期待できるがんに対する予防物質として特に期待がもてる。以上の根拠に基づき、Cx43のがん抑制機能が期待できるがんの検索とBBIによるCx43の発現回復ががん抑制に寄与するか手術材料とマウス移植モデル系を用いて解析した。

方 法

実験 1

イヌ正常乳腺と乳腺腫瘍の手術材料を用いて、各試料からmRNAを抽出後、RT-PCR法により各Cx遺伝子の発現を解析した。なお、GPDHをinternal standardとして用いた。

実験 2

BDF1 (F1 from C57BL/6 female and DBA/2 male) マウスの背中に、マウス卵巣腫瘍由来のM5076細胞を1頭あたり10,000細胞個皮下摂取し、投与15日後に生理食塩水に溶解したBBIを腹腔投与した(投与量: 10 mg/kg, 20 mg/kg, 40 mg/kg)。投与は、腫瘍摂取後15, 18, 20, 22, 25, 27, 29, 32(日)の計6回行った。BBI最終投与3日後に腫瘍を摘出し、その重量を測定すると同時に、各試料からmRNAとたん白を抽出

した。抽出したmRNAを用いて、RT-PCRを行い、Cx43遺伝子の発現レベルの解析を行った。また、抽出したたん白試料を用いて、細胞増殖の指標であるPCNAレベルをImmunoblot法で定量した。さらに、BBIと各パラメーターの相関を解析するために、Sperman's rank testを行った。

結 果

実験 1

イヌの正常乳腺組織ではCx26とCx43の発現が予測されたにも関わらず、従来のoligo dTを用いたRT-PCR法では発現が確認できない試料が認められた(Fig. 1)。そこで、Cx26とCx43に特異的なprimerを用いてRT-PCRを行ったところ、すべての正常乳腺組織でCx26とCx43の発現が認められた(Fig. 1)。そこで、次にこの方法を用いてイヌ乳腺腫瘍の悪性度とCx26およびCx43の発現の関連を悪性乳腺腫瘍の大部分でCx26の発現抑制が認められたのに対し、Cx43は悪性乳腺腫瘍の中でも悪性度が高い腫瘍にのみ発現抑制が認められた。

実験 2

Fig. 2にBBIの投与量と相対腫瘍重量の相関関係を示した。その結果、相対腫瘍重量はBBIの投与量と負の相関関係を示した($P < 0.05$, $r^2 = 0.301$)。この結果と



Fig. 1. RT-PCR analysis for Cx26 and Cx43 in canine normal mammary glands. In GAPDH-26, Cx26-1 and Cx26-2, and in GAPDH-43, Cx43-1 and Cx43-2, RT-PCRs were performed using the same samples. In GAPDH-26, GAPDH-43, Cx26-1, and Cx43-1, cDNAs were synthesized using RT and poly dT oligonucleotide. In Cx26-2 and Cx43-2, cDNAs were synthesized using each reverse primer for Cx26 and Cx43 instead of poly dT oligonucleotide. The sizes of the PCR products were 272bp in GAPDH, 138bp in Cx26, and 284bp in Cx43.

関連して、Fig. 3に示したように、細胞増殖マーカーであるPCNA量とBBIの投与量と負の相関関係を示した ($P<0.01$, $r^2=0.493$)。これとは対照的に、Cx43の発現レベルはBBIの投与量と正の相関関係を示した (Fig. 4: $P<0.05$, $r^2=0.351$)。

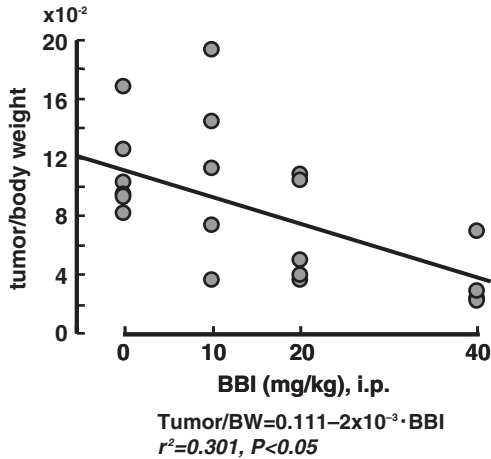


Fig. 2. The relationship between doses of BBI and tumor/body weight ration in tumor bearing mice.

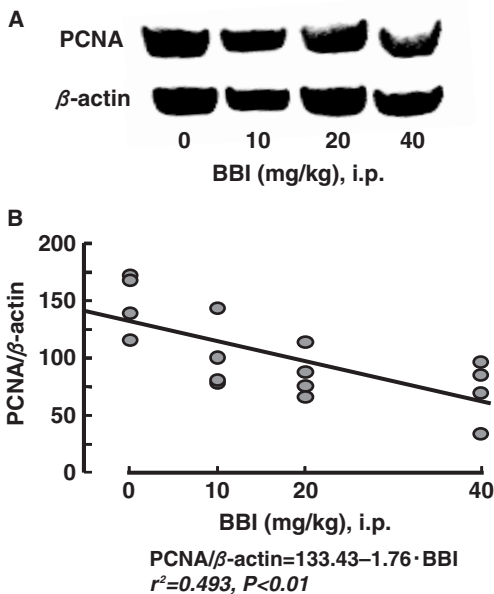


Fig. 3. A: Immunoblot analysis of PCNA level. B: The relationship between doses of BBI and PCNA expression in tumor bearing mice.

考 察

イヌ乳腺腫瘍は、形態学的類似性やヒト乳がん共通した悪性化因子 (例えば、Her-2) 等から一部ヒト乳がん発生モデルとして有用であるという報告がある¹⁰。今回、ヒト乳がんががん抑制遺伝子として働いていることが確認されているCx遺伝子の発現パターンをイヌ乳腺腫瘍で解析したところ、実験1で述べたように、Cx26とCx43の発現抑制がイヌ乳腺腫瘍の発生に関与し、特に乳腺腫瘍の悪性化にはCx43の発現抑制が関与していることが示唆された。従って、イヌ乳腺腫瘍発生抑制には、Cx43遺伝子の発現・機能回復を目的とした予防戦略が有効と思われる。最終的には、この戦略がヒト乳がん発生予防に有効と推測される。

そこで、実験2として、Cx43の発現回復作用があると推測されているBBI[®]を使って、*in vivo* (マウス腫瘍移植系モデル) でCx43の発現回復とがん細胞増殖抑制効果を検討した。その結果、BBIは顕著なCx43の発現回復を引き起こし、この現象と関連して腫瘍の顕著な退縮と細胞増殖 (PCNA level) の抑制が認められた。この結果は、1つの可能性として、BBIがCx43の発現・機能回復を介して*in vivo*でがん細胞の増殖を抑制することが示された。従って、イヌの乳腺腫瘍のよ

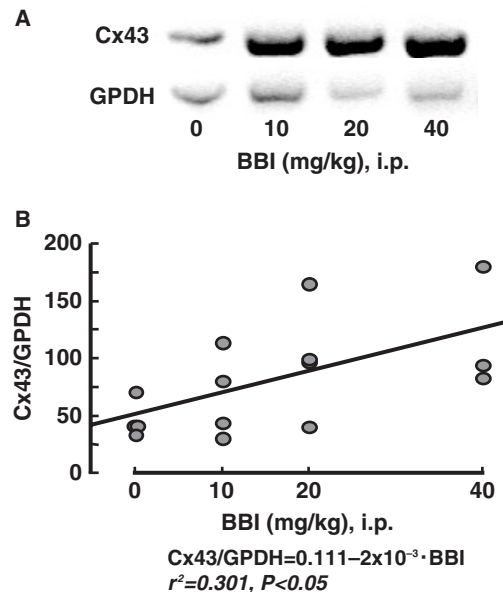


Fig. 4. A: RT-PCR analysis of Cx43 expression. B: The relationship between doses of BBI and Cx43 expression in tumor bearing mice.

うにCx43ががん抑制遺伝子として作用しているとがんに対して、BBIは強力ながん化学予防物質として作用する可能性は大きい。

今回、BBIは*in vivo*で強力なCx43の誘導作用が認められたが、*in vitro*では顕著な誘導作用は認められなかった。また、BBIは経口摂取することによってもがん抑制作用が認められることが報告されている¹¹⁾。従って、BBIは生体内のprotease等により部分加水分解され生じたペプチドががん抑制のための活性本体であ

ることが推測される。BBI由来のペプチドは、他の細胞増殖刺激因子のような作用機構で細胞に作用し、細胞膜に局在するたん白機能を修飾し、細胞内のsecond messenger (例えば、c-AMP) のレベルを変化させ、Cx43をはじめとする遺伝子の発現パターンを変え、最終的にがん細胞の増殖を抑制するというスキームが1つのBBIの作用機構として推測できる。今後、BBIのがん抑制の活性本体の特定とその作用機構の解明が期待される。

要 約

ヒト乳がん発生モデルと考えられるイヌ乳腺腫瘍の悪性化にCx43の発現抑制が関与しており、このようながんにおいてはCx43の発現・機能回復を標的としたがん化学予防戦略が有効と考えられた。また、BBIは*in vivo*でCx43の発現を介してがんの増殖を抑制したことから、Cx43の発現・機能回復を標的としたがん化学予防戦略に有用と考えられた。

文 献

- 1) Wu AH, Ziegler RG, Nomura AM, West DW, Kolonel LN, Horn-Ross PL, Hoover RN and Pike MC (1998): Soy intake and risk of breast cancer in Asians and Asian Americans. *Am J Clin Nutr*, **68**, 1437S-1443S.
- 2) Wu AH, Ziegler RG, Nomura AM, West DW, Kolonel LN, Rosenthal JF, Hoover RN and Pike MC (1996): Tofu and risk of breast cancer in Asian-Americans. *Cancer Epidemiol Biomarker Rev*, **5**, 901-906.
- 3) Du X, Beloussow K and Shen WC (2001): Bowman-Birk protease inhibitor and its palmitic acid conjugate prevent 7, 12-dimethylbenz[a]anthracene-induced transformation in cultured mouse mammary gland. *Cancer Lett*, **164**, 135-141.
- 4) Kennedy AR (1998): The Bowman-Birk inhibitor from soy beans as an anticarcinogenic agent. *Am J Clin Nutr*, **68**, 1406S-1412S.
- 5) Clair WH, Billings PC and Kennedy AR (1990): The effects of the Bowman-Birk protease inhibitor on *c-myc* expression and cell proliferation in the unirradiated and irradiated mouse colon. *Cancer Lett*, **52**, 145-152.
- 6) Yano T, Hernandez-Blazquez FJ, Omori Y and Yamasaki H (2001): Reduction of malignant phenotype of HEPG2 cell is associated with the expression of connexin 26 but not connexin 32. *Carcinogenesis*, **22**, 1593-1600.
- 7) Yano T, Ito F, Satoh H, Hagiwara K, Nakazawa H, Toma H and Yamasaki H (2003): Tumor-suppressive effect of connexin 32 in renal cell carcinoma from maintenance hemodialysis patients. *Kidney Int*, **63**, 381
- 8) Sawey MJ (2001): Role of gap-junctional communication in breast cancer progression and chemoprevention. *J Nutr*, **131**, 167S-169S.
- 9) Fujimoto E, Satoh H, Negishi E, Ueno K, Nagashima Y, Hagiwara K, Yamasaki H and Yano T (2004): Negative growth control of renal cell carcinoma cell by connexin 32: Possible involvement of Her-2. *Mol Carcinogenesis*, **40**, 135-142.
- 10) Matsuyama S, Nakamura M, Yonezawa K, Shimada T, Ohashi F, Takamori Y and Kubo K (2001): Expression patterns of the *erbB* subfamily mRNA in canine benign and malignant mammary tumors. *J Vet Med Sci*, **63**, 949-954.
- 11) Witschi H and Espiritu I (2002): Development of tobacco smoke-induced lung tumors in mice fed Bowman-Birk protease inhibitor concentrate (BBIC). *Cancer Lett*, **183**, 141-146.