

大豆たん白質のがん転移抑制能力を利用した医薬品・機能性食品の開発

小林 浩*・辻 順子

奈良県立医科大学産婦人科

Development of Molecular Targeted Anti-Metastasis Agent Derived from Soybean

Hiroshi KOBAYASHI and Junko TSUJI

Department of Obstetrics and Gynecology, Nara Medical University Kashihara 634-8522

ABSTRACT

Human bikunin, a Kunitz-type trypsin inhibitor, inhibits inflammation by down-regulating the expression of proinflammatory cytokines such as tumor necrosis factor- α (TNF- α) in tumor cells and inflammatory cells. We analyzed the effect of a soybean-derived Kunitz Trypsin Inhibitor (KTI) on TNF- α production in human gingival fibroblasts stimulated by lipopolysaccharide (LPS), an inflammatory inducer. Mitogen-activated protein (MAP) kinase activation and cytokine levels were monitored using Western blot and a specific ELISA. Here, we show 1) a soybean KTI abrogates LPS-induced up-regulation of TNF- α mRNA and protein expression in a dose-dependent manner in gingival fibroblasts; 2) KTI also blocks the induction of TNF- α target molecules, interleukin-1 β (IL-1 β) and IL-6 proteins; 3) inhibition by KTI of TNF- α induction correlates with the suppressive capacity of ERK1/2 and p38 signaling pathways, implicating repressed ERK1/2 and p38 signalings in the inhibition; and 4) pretreatment of cells with KTI blocked LPS-induced NF κ B activation. Our results indicate that KTI inhibits LPS-induced up-regulation of cytokine expression possibly through suppression of ERK1/2 and p38 kinase-mediated NF κ B activation. These findings may identify anti-inflammatory properties of KTI at the level of gingival fibroblasts and may be relevant to the use of KTI in modulating inflammation, including periodontal disease. *Soy Protein Research, Japan* **9**, 113-119, 2006.

Key words : gingival fibroblasts, kunitz trypsin inhibitor (KTI), signal transduction, soybean, TNF- α

* 〒623-8522 橿原市四条町840

我々はヒト羊水・尿からビクニンと命名されたがん転移抑制物質を発見し、すでに商品化した。さらにビクニンの立体構造を変化させてより有効ながん転移抑制治療薬の開発を行ってきたが、これらはいずれも注射剤として使用されてきた。また、研究材料・精製材料としてのヒト羊水・尿には限界がある。近年、我々はビクニンの類似物質の存在をスクリーニングした結果、大豆たん白質にもビクニンに類似した物質が豊富に存在することが確認できた。この物質は従来、食品企業において大豆たん白質を製造するときの廃棄物中に存在する成分で、容易に、大量に、しかも安価に材料を確保することができる。

方法および結果

今回の報告は、①大豆たん白質材料からがん転移抑制活性を有する大豆KTIを生産した、②精製大豆KTIのがん転移抑制剤として臨床応用を目指すための工夫を行った、③医薬品としてのみならず最近の健康食品ブームによってがん転移活性を有する機能性食品や食品添加物として販売するための準備を行った、④大豆KTIは内服可能であるが、ビクニン作用を模倣する、さらに強力な、かつ選択性が高く、副作用の少ないがん転移抑制活性を有する内服可能な低分子薬を我々が開発したバイオインフォマティクス技術を駆使して設計・試作していることについて報告する。

大豆KTIは大豆に含まれるトリプシンインヒビターの一つである。この物質は本来のトリプシン活性阻害作用のみならず、がん細胞やマクロファージ等の炎症細胞においてサイトカインなどによる刺激伝達を阻止する作用が確認されている。

がん細胞の場合は、卵巣がん細胞を例に挙げると、がん細胞自身や周囲の間質細胞などから分泌されたTGF-betaががん細胞に作用すると、がん細胞膜に存在する特異的受容体であるTGF-betaリセプター(receptor)に結合する。その後直ちにSrcというシグナル伝達物質がリン酸化されて(これが活性化されるという意味と同じである)、その下流の存在するmitogen-activated protein (MAP) kinase, さらにその下流のphosphatidyl inositol-3 (PI3) kinase-Akt系のたん白質をリン酸化することにより、最終的にその情報ががん細胞の核に伝達され、がん細胞が浸潤・転移するのに必要なウロキナーゼ (uPA) を産生するようになる。

様々な検討により大豆KTIはSrc刺激の上流を阻害することによりその下流のシグナル伝達を抑制していることが判明した。今回、その実験成績を以下に示す。

Fig. 1の右2つはヒト尿から精製されたビクニンで左の袋に入っているのが大豆KTIである。両者ともクニッツ型のインヒビターである。

ヒト尿より精製されたビクニンは医薬品として販売されている。保険適応があるのは、急性腭炎と急性循環不全のみである。現在、我々が研究し確認された効果としては、がん転移抑制、炎症の制御、日焼け止め・にきび予防(治療)、歯周病予防(治療用歯磨き粉・トローチ・フィルム)、かぶれ(接触性皮膚炎)防止効果である。

大豆KTIの作用機序を解明するために今回の検討に使用した試薬およびその作用点はFig. 2に示した通りである。

Fig. 3はヒト卵巣がん培養細胞株であるHRAとSKOv-3を使用したときのWestern blotの実験結果である。HRA細胞にTGF-betaを添加するとlane 3に示すようにp-Srcのバンドが濃くなる。これはTGF-betaによってSrcがリン酸化されたことを示している。そのと



Fig. 1. Bikunin derived from soybean and human urine

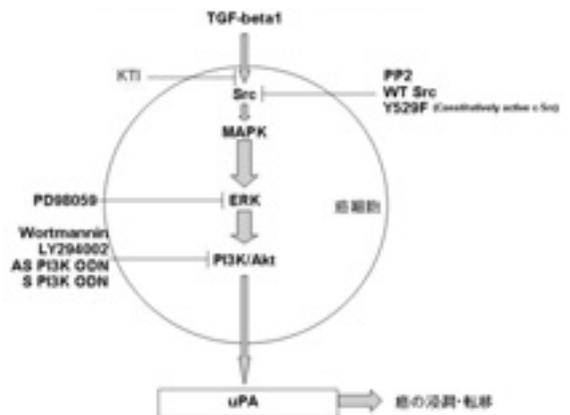


Fig. 2. Biological mechanism of soybean KTI

き, lane 4, 5, 6に示すようにKTIを0.4, 2, 10 μ Mと濃度を増やして添加しておく

とp-Srcのバンドが次第に薄くなってくる。これはKTIによってSrcのリン酸化が抑制されていることを示すものである。SKOV-3においても同様の結果が得られている。なお、下に示したSrcはリン酸化されていない非活性型のSrcの量を示している。すべてのlaneにおいて非活性型Srcの発現量は一定であることの確認である。

Fig. 4Aは各種シグナル伝達を阻止するインヒビターを添加したときの結果である。WortmanninとLY294002はPI3Kの特異的インヒビターである。PD98059はERKすなわちMAPKの特異的インヒビターである。SB202190

は別のMAPK (p38)の特異的インヒビターである。Wortmannin (lane 4), LY294002 (lane 6), PD98059 (lane 8) によりAktのリン酸化が80%以上抑制されていることがわかる。KTIではその抑制効果は約50%である。一方、各種インヒビターにKTIを添加しても抑制効果は増強されない (lanes 5, 7, 9)。また、p38 MAPKはこの系には無関係であるため、SB202190は影響していない (lane 10) ことがわかる。

さて、AS PI3K ODNとはアンチセンスとってPI3K遺伝子そのものを抑制するような遺伝子を外因性に一過性に導入した培養細胞のことである。AS PI3K ODN 遺伝子導入によってPI3K遺伝子が発現し

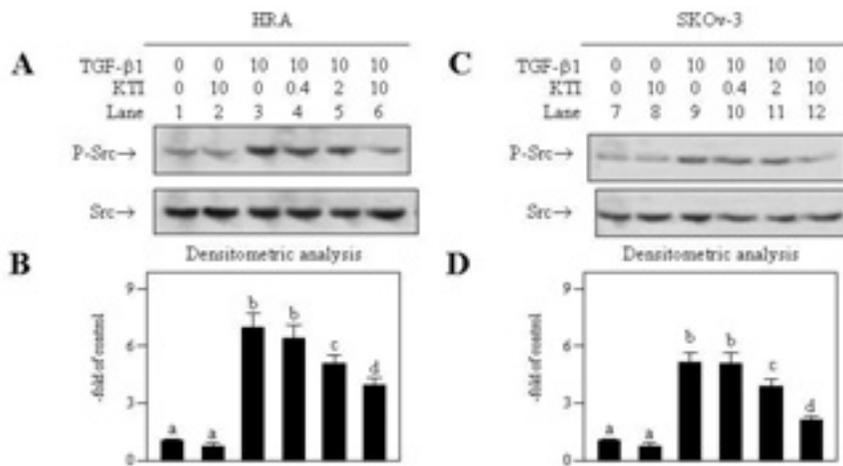


Fig. 3. Inhibition of p-Src by KTI

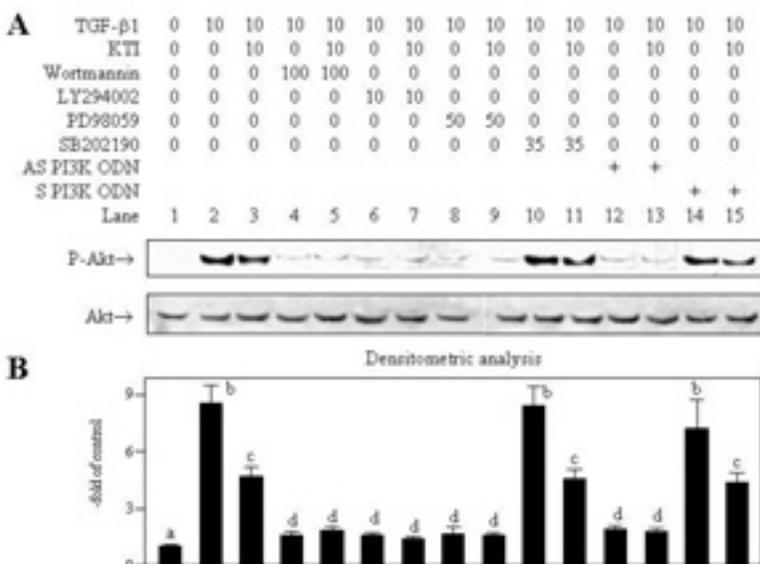


Fig. 4. Inhibition of p-Akt by KTI or pharmacological inhibitors

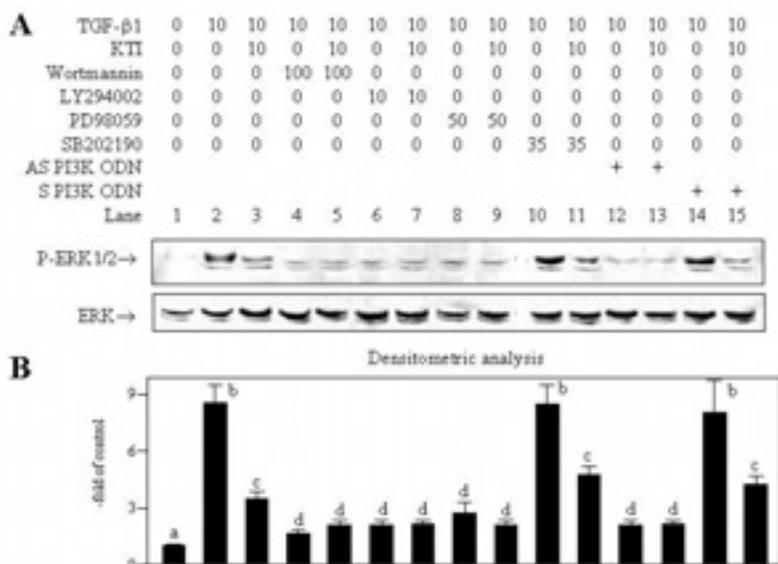


Fig. 5. Inhibition of p-ERK1/2 by KTI or pharmacological inhibitors

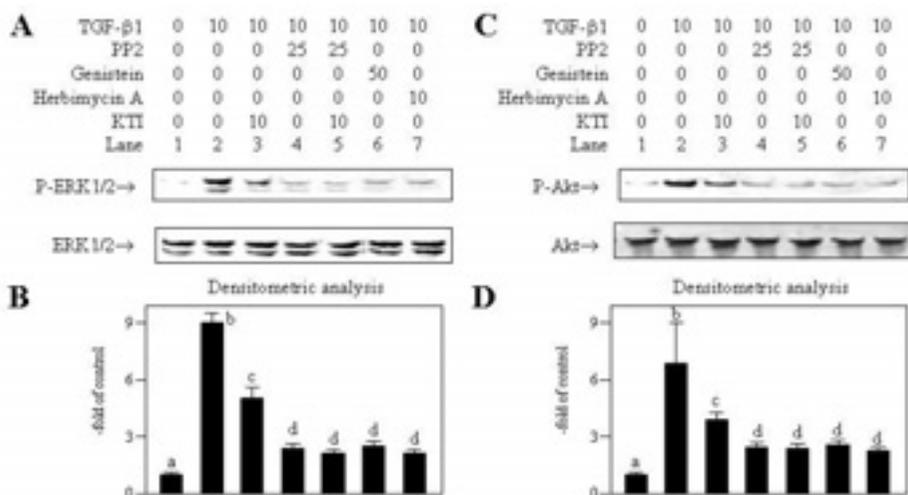


Fig. 6. Inhibition of p-ERK1/2

ないようにしておくこととAktのリン酸化はかなり抑制されていることがわかる。Fig. 4Bはリン酸化されたAkt (p-Akt) の濃度を定量して測定した結果である。バンドの濃さと定量値は一致している。

Fig. 5A, BはMAPKであるERK1/2のリン酸化をFig. 4Aと同じ方法でバンドとして表したものである。Fig. 4AのAktのリン酸化と同じ結果である。

Fig. 6AはERK1/2のリン酸化を、Fig. 6CはAktのリン酸化を示している。今度はインヒビターとしてSrcインヒビターであるPP2、およびチロシンキナーゼのインヒビターであるGenistein, Herbimycin Aを使用し

た。PP2, Genistein, Herbimycin AともにすべてERK1/2およびAktのリン酸化を抑制した。

以上より、KTIはSrcの上流を抑制しているように思われる。これを直接証明するために、がん細胞にSrcの活性化を常に起こすような遺伝子を導入した細胞を使用した。これがY529F細胞である。この細胞はTGF-betaの刺激がなくてもSrcが活性化されており、その下流も二次的に活性化されていることが知られている。そのコントロール細胞がワイルドタイプ (WT) であり、この細胞はTGF-beta刺激時のみにSrcが活性化される。Fig. 7Aに示すように、Y529F細胞にKTIを

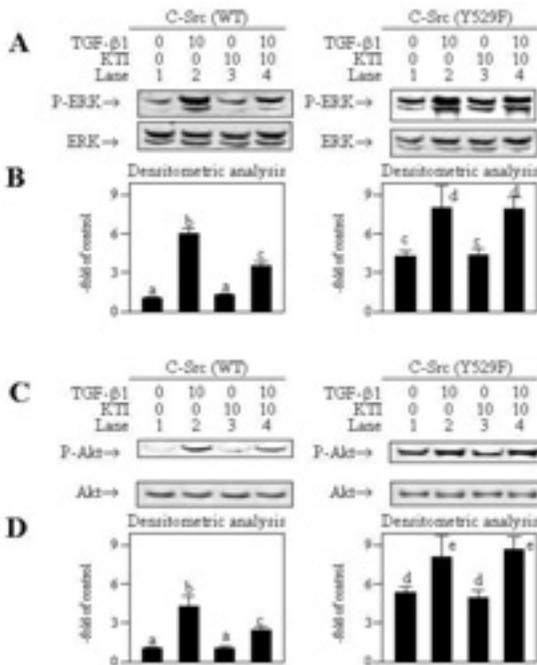


Fig. 7. Inhibition of p-ERK1/2 and p-Akt

添加しても lane 4 に示すように KTI は Src のリン酸化 (p-Src) を抑制できなかった。また, Fig. 7C に示すように, Y529F 細胞に KTI を添加しても lane 4 に示すように KTI は Akt のリン酸化 (p-Akt) を抑制できなかった。したがって, Src が自動的に活性化している細胞では KTI の抑制が認められなかったことは, KTI の作用が Src の下流ではないことを示している。

Fig. 8 は WT 細胞と Y529F 細胞を使用して, uPA 産生が各種インヒビターによってどのように抑制されるのかを調べたものである。A, B が uPA の mRNA レベルを Northern blot で示したものであり, C, D は uPA たん白質量を Western blot で示したものである。WT 細胞では KTI により uPA mRNA 発現は 40~50% 減弱した (lane 3)。しかし, Y529F 細胞では KTI による uPA mRNA 発現は抑制されなかった (lane 3) が, PP2 (lane 4), PD98059 (lane 5), LY294002 (lane 6) による抑制は WT 細胞でも Y529F 細胞でも確認された。一方, 上に示したように SB202190 による影響は認められなかった (lane 7)。uPA たん白質発現は遺伝子量と相関した。

Fig. 9 は HRA 細胞の浸潤能を示している。黒い棒が

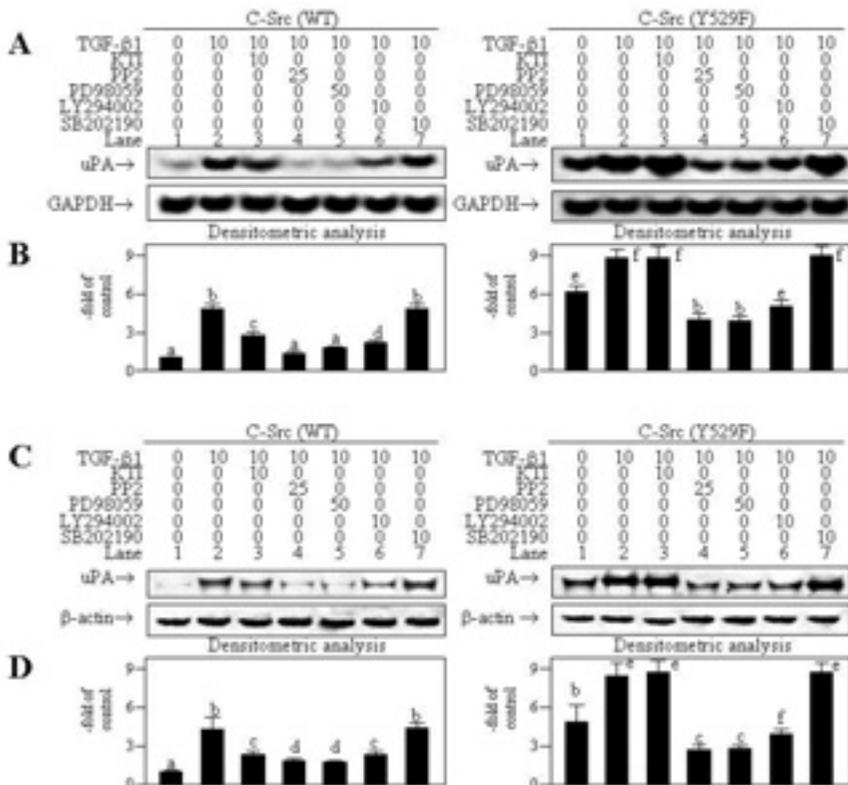


Fig. 8. Inhibition of uPA mRNA and protein in by KTI

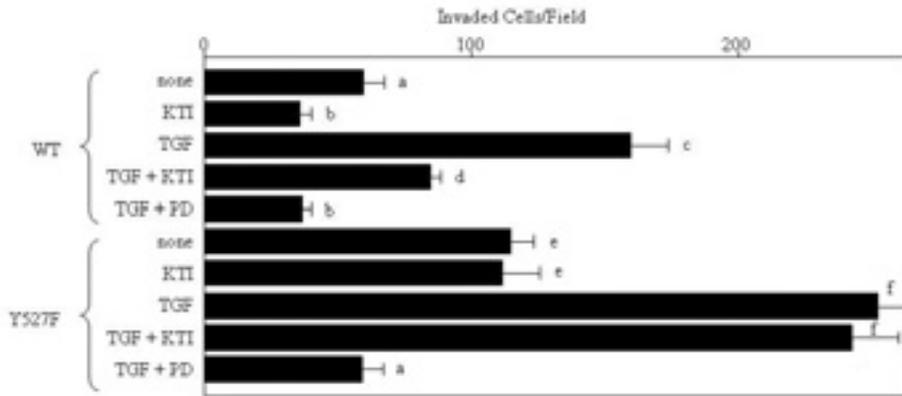


Fig. 9. Inhibition of tumor cell invasion by KTI



Fig. 10. Clinical use of bikunin

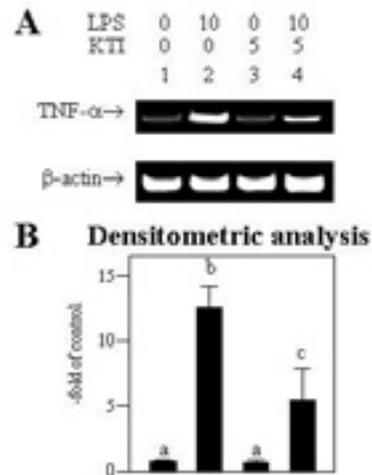


Fig. 12. Inhibition of TNF-alpha mRNA by KTI

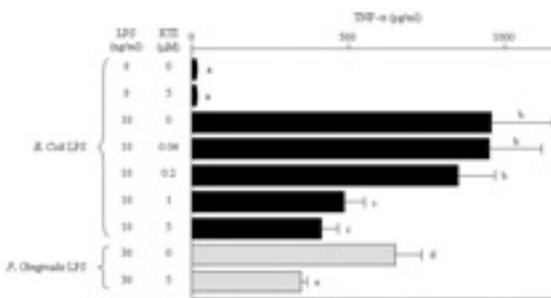


Fig. 11. Inhibition of TNF-alpha by KTI

長いほど浸潤能が高いことを示している。WT細胞ではKTIを添加することにより浸潤能の抑制が見られた。しかし、Y529F細胞ではKTIを添加してもがん細胞の浸潤抑制は見られなかった。

以上の結果より、Fig. 2に示すように、大豆KTIはSrcシグナルの上流を抑制してTGF-beta刺激を阻止しMAPK (ERK1/2), PI3K/Aktの活性化を抑制し、結果としてuPA産生を止めることによりがん細胞の浸潤

を抑制することが判明した。KTIのシグナル伝達抑制作用はがん細胞のみならず、炎症細胞でも同様であり、抗転移物質および抗炎症物質として応用可能である。なお、大豆KTIは内服で有効である可能性がある。

我々はFig. 10のようなプロジェクトを遂行しているが、gingival fibroblastからのサイトカイン産生も大豆KTIが抑制することを報告する。

Fig. 11はエンドトキシン (*E. coli*と*P. gingivalis* LPS)をfibroblastに添加したときのサイトカインであるTNF-alphaの培養液中濃度とKTIの抑制効果を見たものである。エンドトキシンとして*E. coli*と*P. gingivalis* LPSを使用したが、KTIは濃度依存性にTNF-alphaの産生を抑制した¹⁾。

Fig. 12はKTIはTNF-alphaの遺伝子レベルで産生を抑制しているのかどうか検討したが、KTI5 μMで約50%の抑制をもたらした。

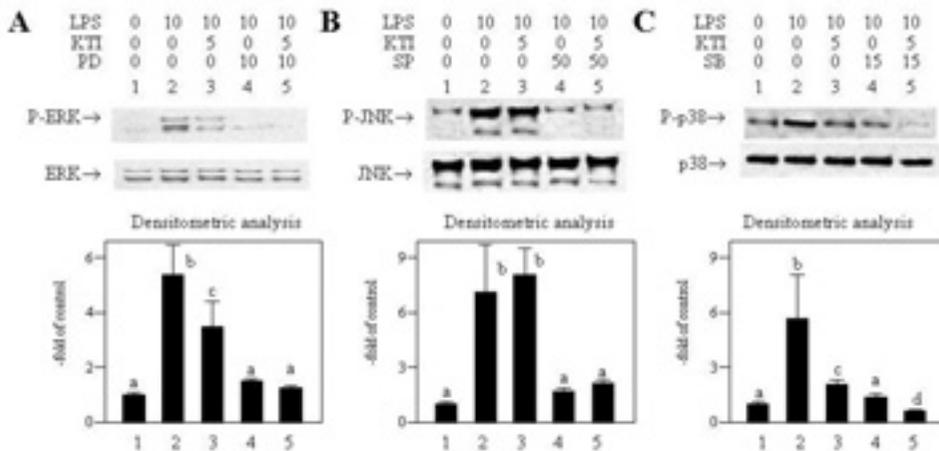


Fig. 13. Inhibition of p-ERK1/2, p-JNK, or p-p38 by KTI

次にLPS刺激による細胞内シグナル伝達を調べると、Fig. 13のようにJNKのリン酸化が著明に確認されたが、KTI5 μ Mでは抑制されなかった。しかし、ERK1/2とp38のリン酸化はKTI5 μ Mで30~50%の抑

制が得られた。したがって、KTIによりLPS刺激の一部の経路を抑制し、サイトカイン産生を遺伝子レベルで制御していることが確認された。

要 約

日本人の死因の第4位は肺炎であり、肺炎死亡の92%は65歳以上の高齢者である。この老人性肺炎の原因として口腔内雑菌を誤嚥する誤嚥性肺炎が主体である。大豆KTIによる抗菌機序が解明できれば、実地臨床に使用可能な、副作用のない抗炎症薬を開発できる可能性がある。KTIの持つ抗炎症効果により、歯周病予防が可能であれば、それによる誤嚥性肺炎による死亡の減少に繋がる可能性がある。現在、この結果を発展させてがん転移抑制効果に関して担がんマウスモデルを用いてKTI内服の効果を見ているところである。実施しているのは、①大豆たん白質材料からがん転移抑制活性を有する大豆ビクニンの生産、②精製大豆ビクニンのがん転移抑制剤として臨床応用を目指すための工夫、③医薬品としてのみならず最近の健康食品ブームにのってがん転移活性を有する機能性食品や食品添加物として販売するための準備、④大豆ビクニンは内服可能であるが、ビクニン作用を模倣する、さらに強力な、かつ選択性が高く、副作用の少ないがん転移抑制活性を有する内服可能な低分子薬を我々が開発したバイオインフォマティクス技術を駆使して設計・試作する、ことについて追加報告する。

文 献

- 1) Kobayashi H, Yoshida R, Kanada Y, Fukuda Y, Yagyu T, Inagaki K, Kondo T, Kurita N, Suzuki M, Kanayama N and Terao T (2005): Suppression of lipopolysaccharide-induced cytokine production of gingival fibroblasts by a soybean trypsin inhibitor. *J Periodontal Res*, **40** (6), 461-468.