

## がん抑制遺伝子（コネクシン）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(Ⅱ)

### —大豆由来のBowman-Birk inhibitorを用いた検討—

矢野友啓\*<sup>1</sup>・斉藤光芳<sup>1,2</sup>・鈴木一由<sup>2</sup>・浅野隆司<sup>2</sup>

<sup>1</sup>(独)国立健康・栄養研究所 <sup>2</sup>日本大学獣医学科

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

Tomohiro YANO\*<sup>1</sup>, Teruyoshi SAITO<sup>1,2</sup>, Kazuyuki SUZUKI<sup>2</sup> and Ryuzi ASANO<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Project for Complementary Factors, National Institute of Health and Nutrition Tokyo 162-8636

<sup>2</sup>Department of Veterinary Medicine, Nihon University Fujisawa 252-8510

### ABSTRACT

In a previous study, we have reported that restoration of connexin (Cx)43, a tumor suppressor gene and a member of gap junctions, is an important factor for cancer prevention by Bowman-Birk inhibitor (BBI). In this study, we tried to clarify a mechanism of BBI-dependent restoration of Cx43 in cancer cells. In a mouse xenograft model, we observed that the expression of Cx43 in tumors preceded occurrence of tumor necrosis, indicating that Cx43 is a key molecule to induce tumor necrosis in tumor-bearing mice treated with BBI. In an *in vitro* study, we found that BBI induced Cx43 mRNA as well as stabilization of Cx43 protein in cancer cells. Especially, the stabilization of Cx43 protein by BBI depended on inhibition of chymotrypsin-like activity in proteasome. Finally, we confirmed that BBI-dependent induction of Cx43 is closely associated with negative growth control of cancer cells. Overall, it is concluded that the main chemopreventive effect of BBI is based on both the induction of Cx43 mRNA and the stabilization of Cx43 protein. *Soy Protein Research, Japan* **9**, 120-125, 2006.

Key words: Bowman-Birk inhibitor, cancer prevention, connexin 43, proteasome inhibitor

疫学的解析から、大豆製品の積極的な摂取は低発がんかつ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<sup>1,2)</sup>。また、NCIでは、1990年の初めのがん予防に有効とされるがん予防食品群のリスト（デザイナーフード計画）を発表したが、その中で大豆が最も強いがん予防作用を持つ食品群に分類され、その代表的な成

\*〒162-8636 東京都新宿区戸山1-23-1

分としてisoflavoneが特定された<sup>3)</sup>。しかしながら、特定された成分の大豆における含量の低さから、大豆のがん予防効果への貢献度が疑問視されている。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<sup>4)</sup>。

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) 遺伝子に着目し<sup>5), 6)</sup>、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<sup>7)</sup>。我々の昨年度の報告でも、*in vivo*マウス腫瘍移植モデルにおいても、BBIはCx43の誘導を介して腫瘍の増殖を抑制する可能性を示した<sup>8)</sup>、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<sup>9)</sup>。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、本研究では、BBIによるCx43の発現回復作用ががん予防に使えるという科学的根拠を提示するために、*in vivo*および*in vitro*の系でBBIによるCx43の発現回復作用機構の解明を行った。

## 方 法

### 実験 1

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8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とたん白質を抽出した。抽出したmRNAを用いて、realtime RT-PCRを行いCx43遺伝子の発現レベルの解析を行った。また、抽出したたん白質試料を用いて、cyclin kinase inhibitorであるp27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。また、一部の

腫瘍サンプルはホルマリン固定し、HE染色により腫瘍の組織像を観察すると同時に、Cx43の局在性を蛍光免疫染色により確認した。

### 実験 2

BBIによるCx43の発現回復機構を解析するために、ヒト骨肉腫細胞株 (U2OS) を用いて検討した。BBIは最終濃度200ないしは400 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) になるようにして、各Figure legendに示した条件で処理した。細胞増殖はMTTで、細胞の腫瘍性は飽和密度で、細胞周期はFACSで、apoptosisはSubG1の割合でそれぞれ評価した。Cx43の機能回復はScrape loading法で評価した。Cx43mRNAの発現はrealtime RT-PCR法で、proteasome中のchymotrypsin-like activityは蛍光probeを基質として用いた方法で、Cx43のubiquitinationはCx43抗体を用いた免疫沈降後、Cx43のubiquitinationをpolyubiquitination抗体を用いたimmunoblot法で、cyclicAMPレベルはELISA法でそれぞれ測定した。

## 結 果

### 実験 1

BBIの投与量と相対腫瘍重量の相関関係は負の相関関係を示し (Fig. 1(A):  $P < 0.05$ ,  $r^2 = 0.301$ )、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. 1(B):  $P < 0.05$ ,  $r^2 = 0.301$ )。一方、p27レベルはBBIの投与依存的に増加した (Fig. 1(C):  $P < 0.05$ ,  $r^2 = 0.314$ )。腫瘍の組織学的な解析から、BBI投与により腫瘍の周辺部から中心部に向かって明らかな壊死像が認められ、BBI投与の効果が確認された (Fig. 2)。また、Cx43の局在性は腫瘍が壊死しつつある部分にのみ認められ (Fig. 2)、BBIによるCx43の誘導が腫瘍壊死の引き金になっていることが確認された。

### 実験 2

Fig. 3に示したように、U2OS細胞でBBI処理によりCx43mRNAが誘導されると同時に、Cx43により仲介されるGJを介した細胞間コミュニケーションが回復していることが判明した。BBIによるCx43の誘導と関連して、BBIによりU2OSの増殖が抑制され、接触阻害が回復した (Fig. 4)。さらに、BBIによりU2OSはG1 arrestが引き起こされ、apoptosisも増加することが確認された (Fig. 5)。BBIによるCx43mRNAの発現誘導にはcAMPが関与しているか検討したところ、Cx43の誘導にはcAMPが関与していることが確認されたが、BBIによる誘導はcAMP非依存的に行われていること

が明らかになった (Fig. 6). また, BBIによるCx43発現回復に基づくGJの機能回復には, BBIのchymotrypsin-like activityの阻害によるproteasome活性阻害が関与していることが示された (Fig. 7, 8).

## 考 察

実験1として, 昨年度に引き続いて, *in vivo* (マウス腫瘍移植系モデル) でBBI投与による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投与によりCx43の誘導が腫瘍が壊死しつつある部分にのみ認められ, BBI投与によるCx43の誘導が腫瘍壊死の引き金になっていることが推測された. この結果から, BBIのがん抑制作用の重要な要因として, Cx43の誘導が関与していることが確認された. 従って, Cx43のがん抑制遺伝子として作用していると推測されるがんに対して, 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.

BBIによるCx43誘導作用をさらに詳しく解析するために, Cx43が抑制遺伝子として作用していることが知られているU2OS細胞<sup>10)</sup>を用いて解析した. その結果, BBIはcAMPに非依存的にCx43mRNAを誘導すると同時に, proteasome活性阻害に基づくCx43タンパクの安定化の両作用に依存していることが確認された. 従来, Cx43の機能を回復する手段として, Cx43のmRNAの誘導に加えて, Cxタンパク分解系抑制によるGJの機能回復と安定化が有効とされていた<sup>11)</sup>. この報告をもとにBBIのCx43の機能回復の作用を考慮すると, BBIは単独でCx43のmRNAとタンパクの両方に作用するので, 作用機構から考察しても, BBIはCx43をターゲットにした有望ながん化学予防成分と結論できる.

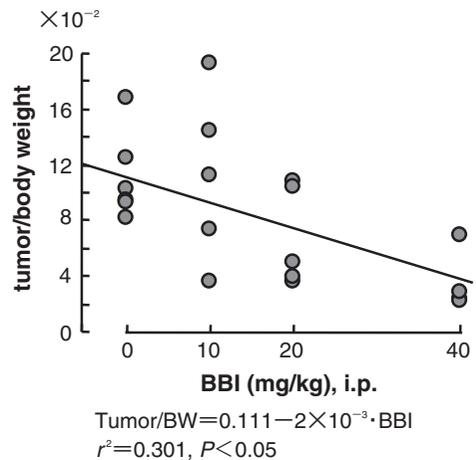


Fig. 1. (A) The relationship between doses of BBI and tumor/body weight ratio in tumor bearing mice.

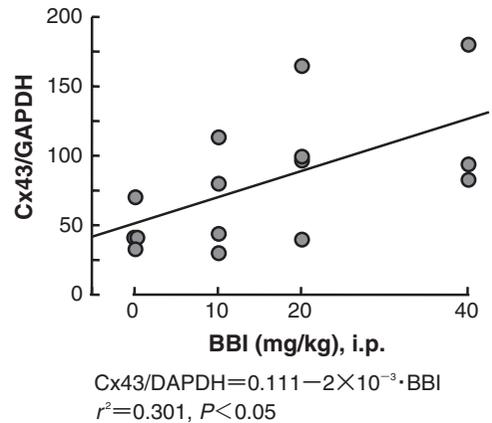


Fig. 1. (B) The relationship between doses of BBI and density of Cx43/GAPDH in tumor bearing mice.

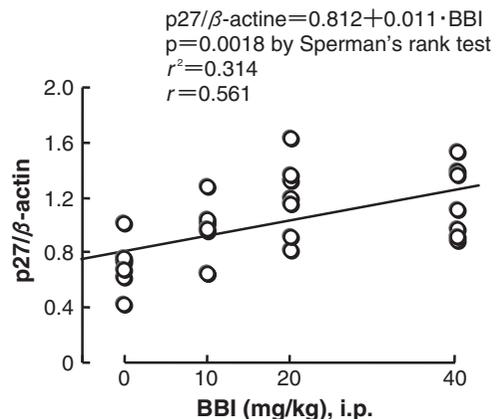


Fig. 1. (C) The relationship between doses of BBI and density of p27/ $\beta$ -actin in tumor bearing mice.

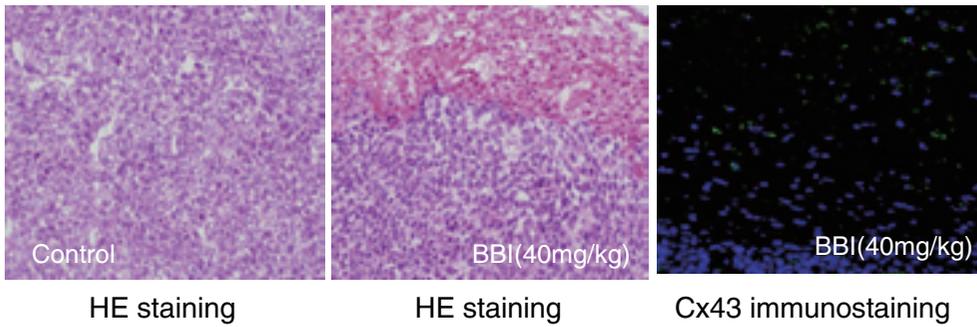


Fig. 2. Histological profiles of M5076 in control and BBI-treated group and Cx43 expression in BBI-treated group Cx43 immunostaining; blue, DAPI staining; green, FITC (Cx43).

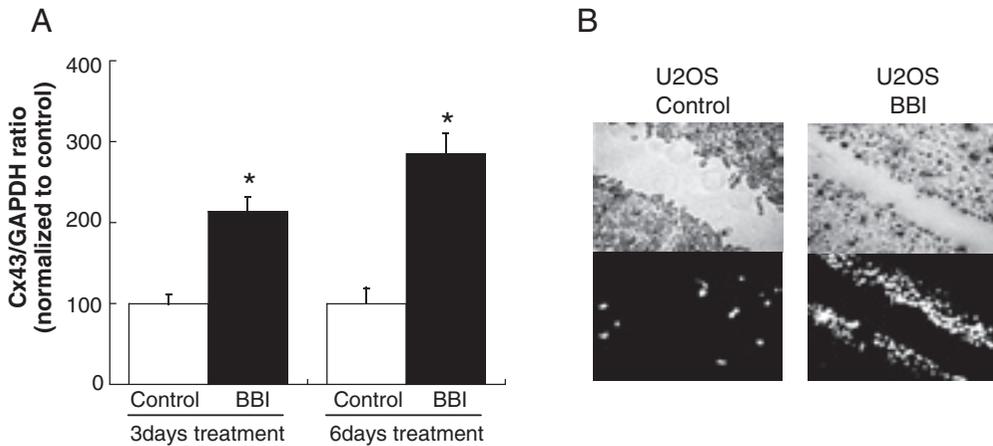


Fig. 3. The effect of BBI on Cx43 mRNA level in U2OS cells (A) and scarpe-loading/dye transfer in U2OS treated with BBI (B). (A) Realtime PCR, \*Significant difference from Control. BBI (200 mg/mL) treatment for 3 days or 6 days. (B) BBI (200 mg/mL) treatment for 3 days. Original magnification,  $\times 200$ .

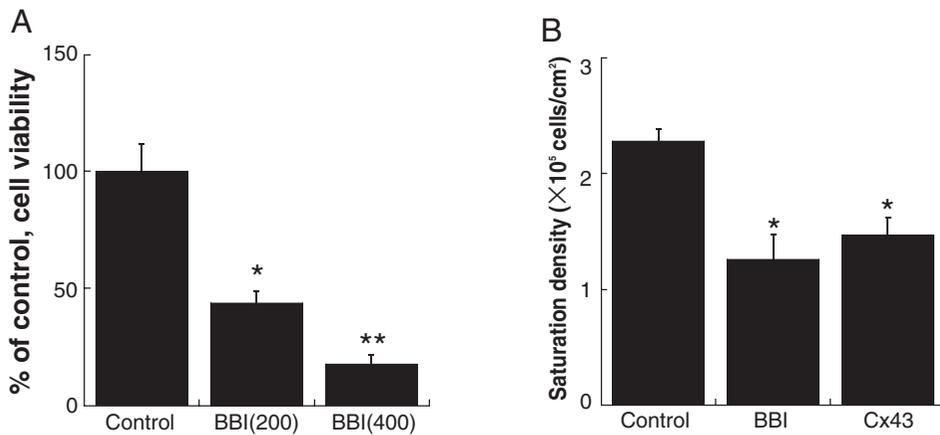


Fig. 4. The effects of BBI on cell viability (A) and saturation density (B) in U2OS cells. (A) BBI (200), 200  $\mu\text{g/mL}$  for 6 days treatment; BBI (400), 400  $\mu\text{g/mL}$  for 6 days treatment. \*Significant difference from control and \*\*significant difference from other groups. (B) BBI, 200  $\mu\text{g/mL}$  BBI for 7 days treatment; PC, Cx43-expressed U2OS cells. \*Significant difference from Control.

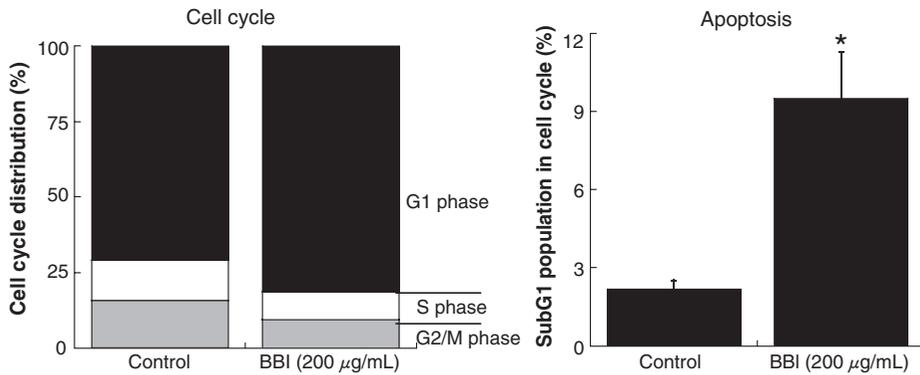


Fig. 5. The effects of BBI on cell cycle progression and apoptosis in U2OS cells. BBI treatment for 7 days. \*Significant difference from Control.

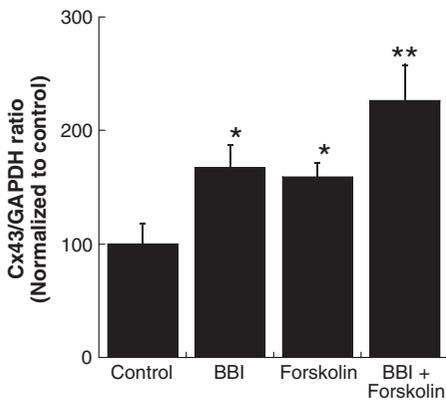


Fig. 6. (A) The effect of BBI and/or forskolin on Cx43 mRNA level in U2OS cells. BBI (200 µg/mL) and/or forskolin (50 µM) treatment for 72 hrs. \*Significant difference from Control group. \*\*Significant difference from other three groups.

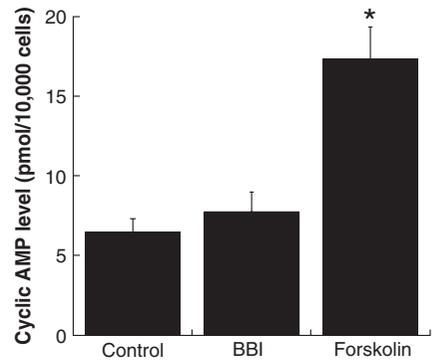


Fig. 6. (B) The effect of BBI or forskolin on cyclic AMP level in U2OS cells. BBI (200 µg/mL) or forskolin (50 µM) treatment for 72 hrs. \*Significant difference from Control and BBI.

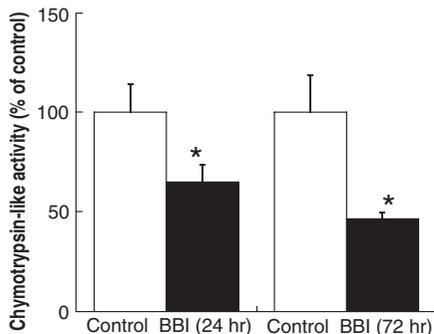


Fig. 7. Specific inhibition of the proteasomal activity (chymotrypsin-like activity) by BBI. Cells were treated with BBI (200 µg/mL) for indicated time, followed by an addition of 20 µM of Suc-LLVY-AMC at 37°C for 2 h. After incubation, the free AMC groups were measured. \*Significant difference from Control.

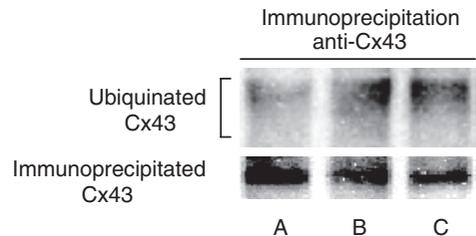


Fig. 8. BBI inhibits ubiquitination of Cx43 in U2OS cells. A, Cx43 expressed cells (positive control); B, BBI (100 µg/mL) for 72 hrs; C, BBI (200 µg/mL) for 72 hrs. Cx43 was immunoprecipitated with anti-Cx43.

## 要 約

BBIは*in vivo*および*in vitro*でCx43の発現を介してがんの増殖を抑制したことや、Cx43mRNAの誘導およびCx43たん白の安定化の両作用によりCx43の機能回復したことから、BBIは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) 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 MY, West DW, Kolonel LN, Horn-Ross PL, 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 Kand 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) Yano T, Hernandez-Blazuque F, Omori Y and Yamasaki H (2001): Reduction of malignant phenotype of HeG2 cell is associated with the expression of connexin 26 but not connexin 32. *Carcinogenesis*, **22**, 1593-1600.
- 6) 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 hemodialysis patients. *Kidney Int*, **63**, 381.
- 7) Sawey MJ (2001): Role of Gap-Junctional Communication in Breast Cancer Progression and Chemoprevention. *J Nutr*, **131**, 167S-169S.
- 8) 矢野友啓, 鈴木一由, 浅野隆司 (2005): 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—。大豆たん白質研究, **8**, 113-116.
- 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**, 134-142.
- 10) Zhang YW, Morita I, Ikeda M, Ma KW and Murota S (2000): Connexin43 suppresses proliferation of osteosarcoma U2OS cells through post-transcriptional regulation of p27. *Oncogene* **20**, 4138-4149.
- 11) Laird DW (2006): Life cycle of connexins in health and disease. *Biochem J* **394**, 527-543.