

がん抑制遺伝子（コネキシン43）の発現・機能回復による中皮腫発生抑制に関する研究  
—大豆由来のBowman-Birk protease inhibitorを用いた検討—

矢野友啓<sup>\*1</sup>・柏木維人<sup>1</sup>・佐藤洋美<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>(独)国立健康・栄養研究所 <sup>2</sup>千葉大学医学薬学部

**Negative Growth Control of Bowman-Birk Inhibitor from Soy Bean Against  
Mesothelioma Based on Restoration of Connexin 43-Dependent  
Tumor-suppressive Effect**

Tomohiro YANO<sup>1</sup>, Korehito KASHIWAGI<sup>1</sup> and Hiromi SATO<sup>1,2</sup>

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

<sup>2</sup>Graduate School of Medical and Pharmaceutical Sciences, Chiba University, Chiba 263-8522

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 Bowman-Birk protease inhibitor (BBI)-dependent tumor-suppressive effect. In this study, we investigated if BBI could regulate growth of mesothelioma cells via the restoration of Cx43-dependent tumor-suppressive effect. In an *in vitro* tumor promotion model, BBI prevented disruption of Cx43-dependent gap junction intercellular communication (GJIC) from tumor promotion stimulation. In other *in vitro* mesothelioma cell culture study, we found that BBI induced Cx43 mRNA as well as stabilization of Cx43 protein in mesothelioma cancer cells. Especially, the stabilization of Cx43 protein by BBI depended on inhibition of chymotrypsin-like activity in proteasome. Furthermore, we confirmed that BBI-dependent induction of Cx43 was closely associated with negative growth control of the mesothelioma cells. We also found that cisplatin-dependent cytotoxicity against the mesothelioma cells was reinforced by BBI treatment, maybe via the restoration of Cx43-dependent GJIC. Taken together, it is concluded that BBI-dependent restoration of Cx43 is effective for prevention and therapy in mesothelioma. *Soy Protein Research, Japan* **10**, 115-119, 2007.

Key words: Bowman-Birk protease inhibitor, mesothelioma, connexin 43, proteasome inhibitor, prevention and therapy

\*〒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和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年の初めにがん予防に有効とされるがん予防食品群のリスト（デザイナーフーズ計画）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、その代表的な成分としてisoflavoneが特定された<sup>3)</sup>。Isoflavoneに加えて、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）遺伝子のに着目し<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。我々の過去2年間の検討から、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>7,8)</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<sup>9)</sup>、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。

腫瘍の中でもっとも悪性度が高く、新たな予防法の構築が求められている中皮腫は、Cx分子種の中でCx43が唯一がん抑制遺伝子として働いている可能性が指摘されている<sup>10)</sup>。本研究では、BBIがCx43の発現・機能回復により中皮腫細胞の増殖抑制が可能か検討した。

## 方 法

### BBIの抗プロモーター活性測定

NIH-3T3細胞を用いてPKH-26でプレラベルした細胞（recipient cell）ないしはPKH-26未標識細胞をPMA（5  $\mu$ M）とBBI（0～400  $\mu$ g/mL）ないしはpositive control（Ellagic acid, 50  $\mu$ g/mL）で24時間処理し、PKH-26未標識細胞をCalceinでラベルした後、PKH-26標識細胞とcalcein標識細胞を6：1の割合で混ぜて、6穴プレートに飽和密度の2倍程度の細胞数を播き、4時間程度培養し、氷冷したホルマリンで固定する。

この固定したサンプルをFACSを用いて、解析した全細胞に占めるCalceinとPKH-26とで2重ラベルされた細胞の比率を算定する。

### BBIによる中皮腫細胞におけるCx43誘導と細胞増殖抑制作用解析

BBIによる中皮腫細胞におけるCx43の発現・機能回復作用を解析するために、ヒト中皮腫表皮型細胞株（H28）を用いて検討した。BBIは最終濃度200ないしは400（ $\mu$ g/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、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、Cx43タンパクレベルはimmunoblot法で、proteasome中のchymotrypsin-like activityは蛍光probeを基質として用いた方法で測定した。また、Cx43の発現抑制にはアンチセンス法を用いた。

## 結 果

### BBIの抗プロモーター活性

今回、一般的に確立されている発がんプロモーター活性検索系であるNIH-3T3細胞／PMAアッセイ系をベースにして新たに開発したCx43により制御されているGJIC機能を指標にした抗プロモーター活性成分評価法を用いて、BBIの抗プロモーター活性を評価したところ、その活性は用量依存性を示し、positive control（Ellagic acid）と同レベルの活性の強さを示した（Fig. 1）。

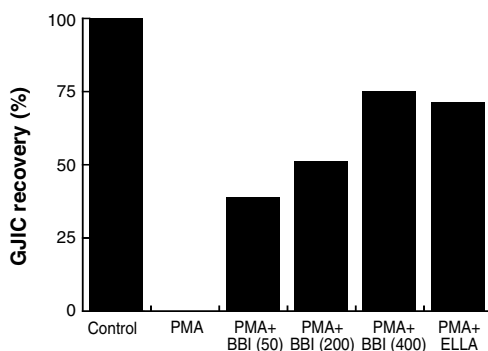


Fig. 1. Effect of BBI on PMA-induced disruption of Cx43-driven GJIC in NIH-3T3 cells. BBI and PMA treatment were carried out for 24 hrs. PMA treatment concentration: 5  $\mu$ M, BBI (50): BBI 50  $\mu$ g/mL, BBI (200): BBI 200  $\mu$ g/mL, BBI (400): BBI 400  $\mu$ g/mL, ELLA: Ellagic acid 50  $\mu$ g/mL (positive control).

## BBIによる中皮腫細胞におけるCx43誘導と細胞増殖抑制作用

Fig. 2に示したように、BBIの用量依存的にH28細胞の増殖が抑制され、その細胞増殖抑制作用と比例してproteasome中のchymotrypsin-like活性が抑制された。それと対照的に、BBIの用量依存的にCx43たん白レベルの上昇が認められた。また、Cx43mRNAレベルおよびscrape loadingで評価したGJIC機能はBBI処理により有意に上昇した。また、Cx43アンチセンスによりBBIにより誘導されるCx43を抑制することにより、BBIのH28細胞増殖抑制作用がある程度解除された

(Fig. 3)。さらに、BBIはH28に対するcisplatinの殺細胞効果を有意に増強した (Fig. 4)。

## 考 察

過去2年間のわれわれの検討から、*in vivo* (M5076マウス卵巣肉腫移植系モデル) および*in vitro* (ヒト骨肉腫細胞U2OS培養系) でBBIによるCx43の発現・機能回復がBBIによるがん細胞増殖抑制効果の重要な要因として特定され、Cx43が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

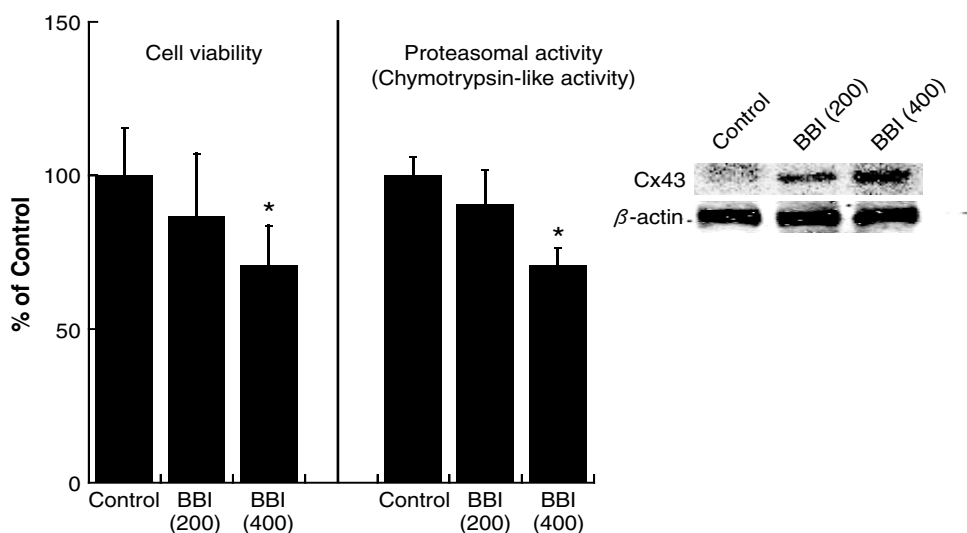


Fig. 2. Dose-dependent changes of BBI in cell viability (left), proteasomal activity of chymotrypsin-like activity (center) and Cx43 protein level of H28 cells (right). BBI treatment period, 5 days in cell viability, 24 hrs in proteasomal activity and 48 hrs in Cx43 protein level. BBI (200): BBI 200  $\mu$ g/mL, BBI (400): BBI 400  $\mu$ g/mL, \*Significant difference from control.

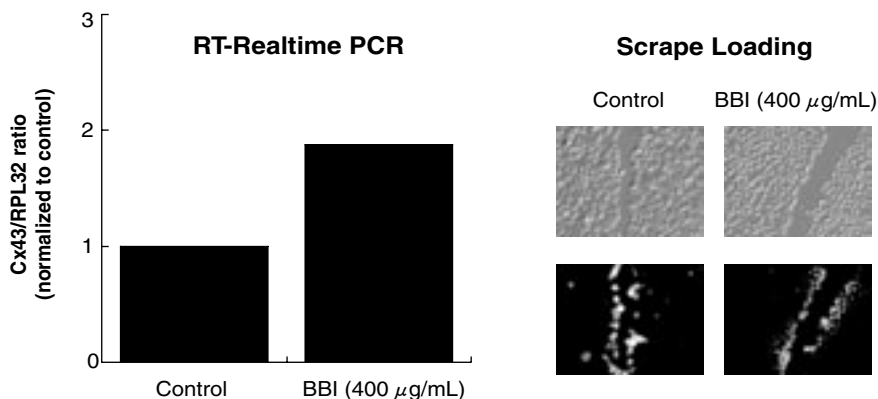


Fig. 3. Cx43 mRNA level and scrape-loading/dye transfer in H28 cells treated with BBI. BBI treatment period, RT-realtime PCR (48 hrs) and scrape loading assay (72 hrs). BBI (400): BBI 400  $\mu$ g/mL.

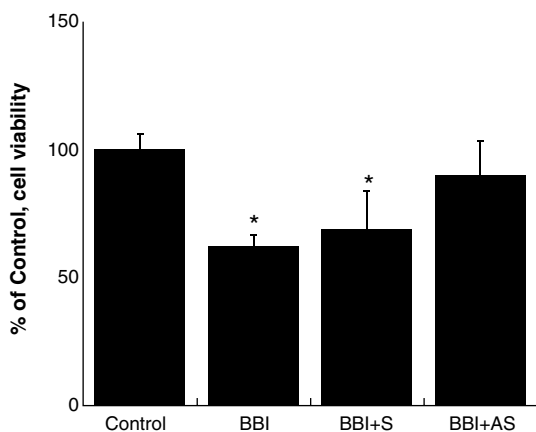


Fig. 4. Change of cell viability in BBI-treated H28 cells under down-regulation of Cx43 by antisense treatment. BBI: BBI (400  $\mu$ g/mL) for 5 days, BBI+S: BBI (400  $\mu$ g/mL) + Cx43 sense (2  $\mu$ M) for 5 days, BBI+AS: BBI (400  $\mu$ g/mL) + Cx43 antisense (2  $\mu$ M) for 5 days. \*Significant difference from control.

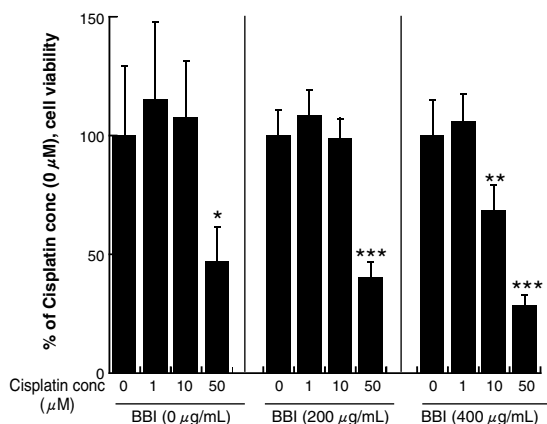


Fig. 5. Enhancing effect of BBI on cisplatin-induced cytotoxicity in H28 cells. The cells were pretreated with BBI (200 or 400  $\mu$ g/mL) for 24 hrs and subsequently co-treated with BBI and/or cisplatin (1, 10 or 50  $\mu$ M) for 48 hrs. \* $p$ <0.01, \*\* $p$ <0.005 and \*\*\* $p$ <0.001 vs. cisplatin conc (0  $\mu$ M).

ながん化学予防物質になる可能性を指摘した<sup>7,8)</sup>。今年度はこの可能性を最終確認するために、新たに開発されたCx43が制御しているGJIC機能維持を指標に抗プロモーター活性を持つがん化学予防成分をスクリーニングする方法を用いて、BBIのCx43を介したがん化学予防作用の妥当性を検討した。その結果、BBIにはCx43の発現・機能回復を介したがん化学予防作用があることが確認された。

中皮腫は表皮型、肉腫型および二相型の3種類の組織型に分類されるが、その治療後は平均11ヶ月と他のがんに比べて非常に悪く、既存のがん治療法に対して非常に抵抗性を示す<sup>11)</sup>。従って、中皮腫に対する新たな予防・治療法の開発が必要になってくる。また、最近の報告から、中皮腫（特に表皮型）はproteasome関連分子群の発現が亢進しており、proteasome inhibitor（特にchymotrypsin-like inhibitor活性をもつ阻害剤）でproteasomeたん白質分解活性を抑制することが中皮腫細胞の有効な増殖抑制が可能との報告があった<sup>12)</sup>。昨年度のわれわれの報告にもあるように<sup>8)</sup>、BBIはproteasome中のchymotrypsin-like活性を抑制することにより、Cx43の発現・機能回復によりがん細

胞（骨肉腫細胞）の増殖を抑制することが判明している。これらの結果をもとに、われわれはBBIの持つproteasome chymotrypsin-like活性阻害作用によるCx43の発現・機能回復が中皮腫細胞の効果的な増殖抑制につながると推測した。実際、H28細胞（代表的なヒト中皮腫表皮型細胞株）を用いた解析から、上記の作業仮説が証明され、BBIが中皮腫（表皮型）の発生抑制に有効であることが示唆された。

一方、今回観察されたBBIの中皮腫細胞増殖作用はcytostaticな作用であり、BBI単独では殺細胞効果は認められなかった。しかしながら、今回現在臨床に中皮腫の治療に用いられているcisplatinの殺細胞効果を有意にBBIが増強したことから、BBIはcancer adjuvant therapeutic agentとして有望であることが示された。

## 謝 辞

BBIの抗プロモーター活性測定法の開発に協力いただいたDr David Fast (Nutrilite Health Institute) に心より感謝いたします。

## 要 約

BBIはCx43mRNAの誘導およびCx43たん白質の安定化の両作用によりCx43の機能回復し、中皮腫細胞の増殖を抑制し、かつ抗がん剤の殺細胞効果を増強したことから、BBIはCx43の発現・機能回復を介した新たな中皮腫予防および治療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 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) Yano T, Hernandez-Blazquez 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) 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.
- 8) 矢野友啓, 斉藤光芳, 鈴木一由, 浅野隆司 (2006): 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(Ⅱ)—大豆由来のBowman-Birk Inhibitorを用いた検討—. 大豆たん白質研究, **9**, 120-125.
- 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) Pelin K, Hirvonen A and Linnainmaa K (1994): Expression of cell adhesion molecules and connexins in gap junctional intercellular communication deficient human mesothelioma tumour cell lines and communication competent primary mesothelial cells. *Carcinogenesis*, **15**, 2673-2675.
- 11) Ismail-Khan R, Robinson LA, Williams CC Jr, Garrett CR, Bepler G and Simon GR (2006): Malignant pleural mesothelioma: a comprehensive review. *Cancer Control*, **13**, 255-263.
- 12) Sun X, Gulyas M, Hjerpe A and Dobra K (2006): Proteasome inhibitor PSI induces apoptosis in human mesothelioma cells. *Cancer Lett*, **232**, 161-169.