

大豆たん白質から設計した分子標的抗転移薬の開発

小林 浩*・辻 順子

奈良県立医科大学産婦人科

Development of Soybean-derived Molecular Targeted Anti-metastasis Agent KTI

Hiroshi KOBAYASHI and Junko TSUJI

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

ABSTRACT

Objective: Activated neutrophils contribute to the development of preterm delivery. Because of its ability to suppress inflammation, bikunin, a Kunitz-type protease inhibitor, is currently in clinical trials. How bikunin inhibits neutrophil activation is poorly understood. Materials and Methods: To investigate the molecular mechanism of this inhibition, we analyzed the effect of bikunin on proinflammatory cytokine production and nuclear factor-kappaB (NF-kB) activation in neutrophils stimulated by lipopolysaccharide (LPS), an inflammatory inducer. Results: Here, we show 1) bikunin blocks LPS-induced secretion of proinflammatory cytokines, including TNF-alpha and IL-1beta, in a dose-dependent manner, reaching 65% inhibition at the highest doses of bikunin tested (5 μM); 2) inhibition by bikunin of cytokine induction correlates with the suppressive capacity of ERK1/2 and p38 signaling pathways, implicating repressed at least two different signalings in the inhibition; and 3) bikunin inhibited sequentially the LPS-induced phosphorylation of IκB-alpha, degradation of IκB-alpha, and nuclear translocation of NF-kB. Conclusion: These results demonstrate that bikunin can inhibit LPS-induced neutrophil activation and also suggest that such effects are important *in vivo* to play a major contributory role in abrogation of neutrophil-mediated inflammatory responses, such as preterm delivery. *Soy Protein Research, Japan* **11**, 82-87, 2008.

Key words : bikunin, lipopolysaccharide, proinflammatory cytokines, neutrophils, NF-kappaB

* 〒634-8522 橿原市四条町840

我々はヒト羊水・尿からクニッツ型インヒビターの一つである「ビクニン」と命名されたがん転移抑制物質（国内ではウリナスタチンとして知られている）を発見し、すでに抗炎症薬および抗転移薬として臨床応用している。ビクニンの立体構造を改変し、より有効ながん転移抑制治療薬の開発を行なってきたが、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。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の立体構造に類似した物質（KTI）が豊富に存在することが確認できた。大豆KTIは大豆に含まれるクニッツ型トリプシンインヒビターの一つである。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。

大豆KTI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、我々が実験に使用した卵巣がん細胞HRA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（活性化）されて、その下流に存在するmitogen-activated protein (MAP) kinase, さらに、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。その後の検討により大豆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、結果としてuPA産生制御を介してがん転移を抑制していることが判明した。以上がビクニンおよびKTIによるがん細胞の浸潤・転移の抑制機序と考察した。

今までの研究により、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。

研究目的

- ① 葉緑体工学を用いたがん転移抑制能力を有する大豆由来クニッツ型インヒビターたん白質の大量生産系の開発
- ② ヒト由来クニッツ型インヒビターたん白質による活性化好中球からの炎症性サイトカインの産生抑制の実証実験

方法および結果

現時点では、①の大豆由来クニッツ型インヒビターたん白質の精製が不十分であり、基礎実験に提供できるほど精製たん白質が得られていないため、ヒト尿由来ビクニンでの②に対する結果について説明する。

クニッツ型インヒビターたん白質はクニッツという特殊な立体構造を呈するプロテアーゼインヒビター群の総称である¹⁻⁷⁾。ヒト尿・羊水由来のクニッツ型インヒビターたん白質を「ビクニン」と、大豆由来のクニッツ型インヒビターたん白質を「KTI」として便宜上使い分けることにする。Fig. 1は左から大豆KTI, リコンビナントビクニン, ヒト尿から精製されたビクニンである。いずれ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、急性肺炎と急性循環不全のみであるが、クニッツ型のインヒビターは、がん転移抑制、炎症の制御、日焼け止め・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）、接触性皮膚炎に治療効果がある。



Fig. 1. Kunitz-type proteinase inhibitors purified from soybean (left), recombinant protein (middle), and human urine (right).

今回はビクニンの抗炎症作用を確認するために、活性化好中球からのproinflammatory cytokineであるTNF-alphaとIL-1betaの産生およびその細胞内シグナル伝達制御に関して検討した。まず、マウスの骨髄から好中球を採取し*in vitro*培養系の確立を行った。好中球の活性化のためにlipopolysaccharide (LPS) を1 microg/mLの濃度で刺激し、その90分後に培養液中のサイトカイン濃度をELISAで測定した。一方、ビクニンの抗炎症効果を見るために、LPS刺激60分前にビクニンを前投与し、次にLPS添加実験を開始した。

Fig. 2-A, Fig. 2-Bはそれぞれ培養上清中のTNF-alphaとIL-1beta濃度を測定した結果である。LPS刺激によりTNF-alphaとIL-1beta濃度はいずれも増加するが、ビクニン前添加により濃度依存性にサイトカイン産生を抑制した。3回の実験とも同様の結果を得た。

LPS添加後の細胞内シグナル伝達機序を調べるためにMAP kinaseであるERKとp38のリン酸化を調べた。Fig. 3-AはLPS添加後のERKのリン酸化をみたもので、Fig. 3-BはLPS添加後のp38のリン酸化をみたものである。LPS添加によりERKとp38はリン酸化されたが、

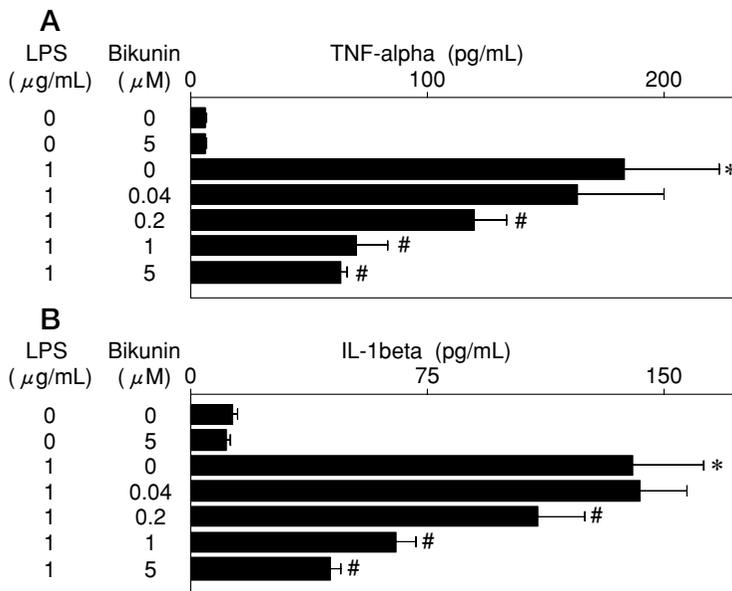


Fig. 2. Bikunin inhibits LPS-induced TNF-alpha (A) and IL-1beta (B) expression.

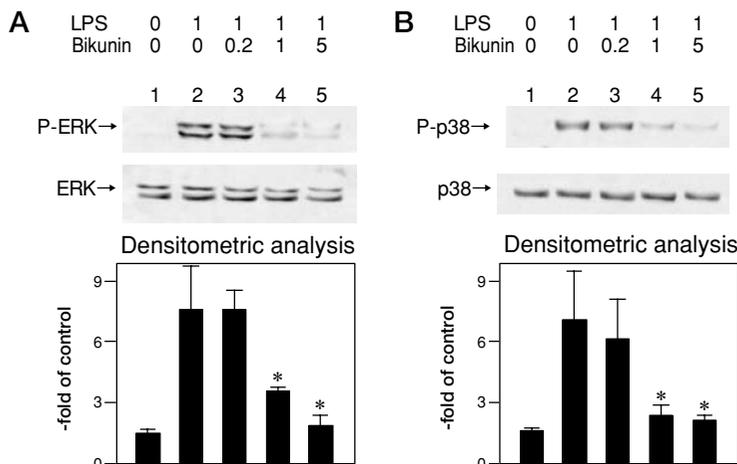


Fig. 3. Bikunin inhibits LPS-induced phosphorylation of ERK (A) and p38 (B).

ビクニンの前添加によりそのバンドの濃度は濃度依存性に低下した。約1 microg/mLで抑制されることが判明した。

LPS添加後のNF- κ Bの核内移行を調べるために転写因子であるNF- κ Bの核内移行を調べた。Fig. 4はビクニン前添加によるLPS刺激後のNF- κ Bの核内移行をみたものである。LPS添加により予想通りNF- κ Bは核内に移行したが、ビクニンの前添加によりそのバンドはビクニンの濃度依存性に低下しNF- κ Bの核内移行は抑制された。この作用も約1 microg/mLで制御されることが判明した。

核内にNF- κ Bが移行するためには、細胞質内でLPS刺激によりI κ Bがリン酸化されて、I κ Bそのものが分解され、NF- κ Bとの結合が解除されなければならない。そこで、細胞質内のI κ Bの破壊の程度とそのリン酸化の制御について検討した。Fig. 5-AはLPS添加後のI κ Bの濃度をみたもの（バンドが薄いと分解されているこ

とを意味する）で、Fig. 5-BはLPS添加後のI κ Bのリン酸化をみたものである。ビクニン単独ではI κ Bの分解やリン酸化には何の影響も及ぼさなかった。LPS添加により細胞質内でのI κ Bの分解が進むことが示されたが、ビクニン前添加によりその分解が抑制されたことがわかる。また、I κ Bのリン酸化を見ると、LPSによるI κ Bのリン酸化は促進されるが、ビクニン前添加によりリン酸化が抑制された。

以上より、ビクニンは細胞質内のI κ Bのリン酸化を抑制することにより、I κ Bの分解が阻止され、その結果、転写因子であるNF- κ Bの核内移行が阻止したものと解釈できる。したがってビクニンは細胞内シグナル伝達を制御することにより抗炎症活性を発揮すると思われた。

考 察

我々がかねてより、ヒト尿・羊水由来ビクニンに着目し、その生理活性を研究してきた。がんも炎症も細胞内シグナル伝達に関しては極めて共通点が多く、ビクニンの持つ細胞内シグナル伝達制御作用には興味がある。我々は、がんおよびビクニンの作用として転移抑制に着目している。がんが転移するためには細胞増殖、抗アポトーシス、細胞周期調節機構が働くが、ビクニンはMAP kinaseの制御を介してこれらの作用を制御している可能性がある。また、ビクニンによる抗炎症作用は同様にMAP kinase制御によるサイトカイン産生抑制の結果である。

今回、詳細にビクニンの抗炎症活性を検討し、炎症惹起物質のLPSによるMAP kinase活性化、特に、ERKとp38について検討した。その結果、これらのLPSに

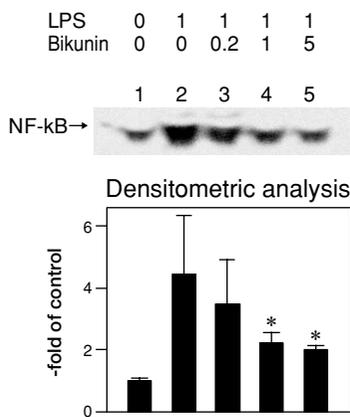


Fig. 4. Bikunin inhibits LPS-induced nuclear translocation of NF- κ B.

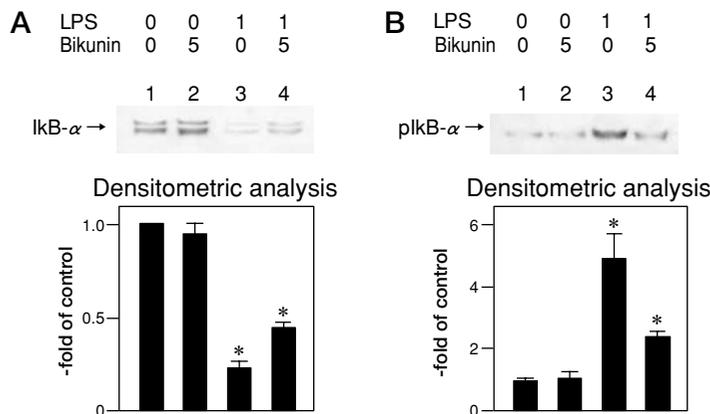


Fig. 5. Bikunin inhibits LPS-induced I κ B- α degradation (A) and I κ B- α phosphorylation.

よるMAP kinaseの活性化を抑制することにより、細胞質内のI κ Bのリン酸化を抑制し、プロテアソームによるI κ Bの分解を抑制し、転写因子のNF- κ Bの核内移行を阻止した。そのために、炎症性サイトカインであるTNF- α とIL-1 β の産生が抑制され、炎症によるサイトカインネットワークが解除されることが確認できた。

この作用を期待して我々は早産予防のためにピクニン膾錠を開発した。早産とは炎症性サイトカインによる破綻の結果もたらされる妊娠早期の子宮収縮や分娩を引き起こすものである。そこで、早産が予想される患者に対して毎日、膾内にピクニン膾錠を挿入することにより早産予防がえられるというエビデンスが蓄積

されつつある。

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大豆由来KTI内服の効果を見ているところである。現在実施している研究は、葉緑体への遺伝子導入による大豆KTIの精製、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の生産、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、大豆KTIは内服可能であるが、ピ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したい。

要 約

我々はヒト羊水・尿からピクニンと命名されたがん転移抑制物質（ウリナスタチン）を発見し、抗転移薬として基礎研究を行っている。さらに、抗炎症薬としてすでに臨床応用されている。さらにピ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、我々はピクニン同様、大豆たん白質にもピクニンに類似したクニッツ型インヒビター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、食品企業（不二製油株式会社）との共同研究により大豆ピクニンにがん転移抑制活性があることを証明し、海外論文に報告してきた。大豆ピクニンは大豆たん白質からの精製品として得られる。昨年以来我々は「葉緑体工学」を応用して大量生産系の確立を目指し、植物葉緑体工学による医療用たん白質生産系を利用することにより、医療用たん白質を安全かつ安価に生産する研究を行ってきた。そのため、より安全な葉緑植物やタバコの葉緑体形質転換技術とたん白質合成手法を利用し、大豆ピクニンの大量生産系の確立を目指す研究を行っている。我々は、ヒト羊水・尿から精製したピクニン、リコンビナントピクニン、大豆精製ピクニンをすでに保有しており、抗炎症および抗転移活性の評価を始めたところである。将来の目標は、遺伝子工学的大量生産系技術を利用し、大豆ピクニン活性基を同定後、分子構造からたん白質複合体構造解析ソフトや量子力学理論を用いてヒトピクニンや大豆ピクニン作用を模倣する低分子抗転移薬を設計・試作することである。今回はヒト羊水・尿から精製したピクニン、リコンビナントピクニン、大豆精製ピクニンによる活性化好中球からの炎症性サイトカインの産生抑制効果を比較することを目的とした。現在、大豆ピクニンによる抗炎症活性の評価が終了した。

文 献

- 1) Kobayashi H, Yagyu T, Kondo T, Kurita N, Inagaki K, Haruta S, Kawaguchi R, Kitanaka T, Sakamoto Y, Yamada Y, Kanayama N and Terao T (2005): Suppression of urokinase receptor expression by thalidomide is associated with inhibition of nuclear factor kappa B activation and subsequently suppressed ovarian cancer dissemination. *Cancer Res*, **65** (22), 10464-10471.
- 2) Kobayashi H, Yoshida T, Kanada Y, Fukuda Y, Yagyu T, Inagaki K, Kondo T, Kurita N, Yamada Y, Sado T, Kitanaka T, Suzuki M, Kanayama N and Terao T (2005): A soybean Kunitz trypsin inhibitor reduces tumor necrosis factor- α production in ultraviolet-exposed primary human keratinocytes. *Experimental Dermatol*, **14** (10), 765-774.

- 3) Inagaki K, Kobayashi H, Yoshida Y, Kanada Y, Fukuda Y, Yagyu T, Kondo T, Kurita N, Kitanaka T, Yamada Y, Sakamoto Y, Suzuki M, Kanayama N and Terao T (2005): Suppression of urokinase expression and invasion by a soybean trypsin inhibitor are mediated through inhibition of Src-dependent signaling pathways. *J Biol Chem*, **280 (36)**, 31428-31437.
- 4) Yagyu T, Kobayashi H, Matsuzaki H, Wakahara K, Kondo T, Kurita N, Sekino H and Inagaki K (2006): Enhanced spontaneous metastasis in bikunin-deficient mice. *Int J Cancer*, **118 (9)**, 2322-2328.
- 5) Yagyu T, Tsuji Y, Haruta S, Kitanaka T, Yamada Y, Kawaguchi R, Kanayama S, Tanase Y, Kurita N and Kobayashi H (2006): Activation of mammalian target of rapamycin in postmenopausal ovarian endometriosis. *Int J Gynecol Cancer*, **16 (4)**, 1545-1551.
- 6) Kobayashi H (2006): Endogenous anti-inflammatory substances, inter-alpha-inhibitor and bikunin. *Biol Chem*, **387 (12)**, 1545-1549.
- 7) Kobayashi H, Sumimoto K, Moniwa N, Imai M, Takakura K, Kuromaki T, Morioka E, Arisawa K and Terao T (2007): Risk of developing ovarian cancer among women with ovarian endometrioma: a cohort study in Shizuoka, Japan. *Int J Gynecol Cancer*, **17 (1)**, 37-43.