

大豆成分によるがん細胞の貪食促進効果およびその分子機構の解析

永長一茂*

金沢大学医薬保健研究域薬学系

Analysis of the Effects of Soybean on Phagocytosis Against Cancer Cells

Kaz NAGAOSA

Institute of Medical, Pharmaceutical and Health Sciences, Kanazawa University, Kanazawa 920-1192

ABSTRACT

We investigated whether soy peptide was effective in down-regulation of carcinogenic risk by using *Drosophila melanogaster* as a model for cancer research. Precancerous cells must induce apoptosis and be engulfed by phagocytes to prevent carcinogenesis, and this removal is believed to occur by a cell competition-related mechanism. It has been reported that a *Drosophila* cell in which cell competition has failed grows more slowly than a normal cell. In our study, phagocytosis of apoptotic cells by macrophages was down-regulated in soy peptide-treated *Drosophila*. The developmental period from embryo to adult was also delayed by feeding soy peptide. Furthermore, fewer of these *Drosophila* reached adulthood compared with ones fed normal food. These results suggest that soy peptide may suppress cell competition and have a negative effect on phagocytosis, growth rate, and normal development. Further study is needed to clarify whether soy peptide decreases carcinogenic risk. *Soy Protein Research, Japan* **13**, 164-168, 2010.

Key words : soy peptide, phagocytosis, cancer, cell competition, *Drosophila*

大豆によるがんの阻害あるいは促進効果に関する報告は多数あるが、がん発症のメカニズムに基づいた研究はほとんどなされていない。本研究ではそれを知る手がかりを得るための実験を行った。体内で常に現われる役割を終えた細胞、感染細胞、DNA複製が正しく行われなかった細胞などは、長期間存在し続けると突然変異を起こしてがん化する恐れがある。こういっ

た“がんの素”となる細胞にはアポトーシスと呼ばれる細胞死が誘導され、免疫細胞や近隣の細胞などが貪食受容体を介して特異的かつ迅速に貪食排除する。がんの素の効率的な除去には、増殖速度の速い細胞が増殖の遅い細胞を排除して空いたスペースに増殖する“cell competition”の関与が示唆されている¹⁾。本研究では、がん研究に有用なモデル動物のショウジョウバエに大豆ペプチドを与え、アポトーシス細胞の貪食程度と、cell competitionの指標となる個体の発生速度を

*〒920-1192 金沢市角間町

調べた。また、がんの素は正常な個体の体内でも常に生まれており、それらが適切に排除されない個体は死にやすい可能性がある。そこで、大豆ペプチドを摂取したショウジョウバエが産んだ胚が成虫にまで発生する割合を調べた。

方 法

ショウジョウバエは、正常な食食受容体を持つコントロールとして w^{1118} 、食食受容体の βv integrin（著者未発表データ）およびDraper²⁾の二重欠損体として w ; $\beta vInt-nu^2$; $drpr^{45}$ の遺伝型を有する系統をそれぞれ用いた。

ショウジョウバエは24℃ ± 1℃、湿度40–60%の環境下で、100 g/Lグルコース / 70 g/Lコーンミール / 50 g/L乾燥酵母 / 10 g/L寒天 / 4 mL/Lプロピオン酸 / 0.7 g/L p-ヒドロキシ安息香酸ブチルおよび精製水からなる餌の入った飼育容器内で飼育した。大豆成分含有餌は、上記餌に終濃度50 g/LハイニュートAMあるいは50 g/LフジプロFを加えた。

アポトーシス細胞を食食するヘモサイトの割合は、以下の方法で解析した。通常の餌もしくは大豆成分を含む餌で飼育したショウジョウバエより産まれた胚のうち、発生段階がステージ16の胚のみを顕微鏡下で分け取った。胚細胞を分散させて調製し、そこに含まれるヘモサイトを抗Croquemort抗体を用いた免疫染色で、アポトーシス細胞をターミナル・デオキシヌクレオチジル・トランスフェラーゼ-dUTPニック末端標識（TUNEL）法で、それぞれ同定した。両方のシグナルを持つ細胞をアポトーシス細胞を食食したヘモサイトとみなして、その割合を測定した。これを3回繰り返し、平均値をアポトーシス細胞を食食するヘモサイトの割合とした。

成長速度および成虫までの生存率は、以下の方法で解析した。産卵後2時間以内の胚100から200個を餌の上に移動して飼育し、羽化した成虫を毎日これを3回以上繰り返し、平均値を成長速度および生存率とした。

結 果

ショウジョウバエ胚では、ステージ16の発生段階において血球細胞のヘモサイトによるアポトーシス細胞の食食が盛んに観察される。アポトーシス細胞を認識する食食受容体の βv integrinとDraperの二重欠損体では、このような食食が著しく抑制される。大豆ペプチドを主成分とするハイニュートAMを含む餌で飼育し

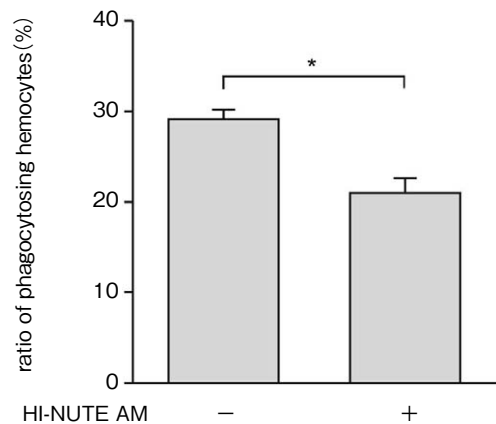


Fig. 1. Ratio of phagocytosing hemocyte in soy peptide treated *Drosophila* embryos. Embryos were laid by normal (-) or soy peptide (Hi-Nute AM) -treated (+) normal *Drosophila*, w^{1118} , and they were dispersed by homogenizing with proteases. Croquemort protein (a marker protein in hemocyte) and degraded DNA (a marker of apoptosis) in these cells were simultaneously detected by immunocytochemistry and TUNEL staining. Then the ratio of apoptotic cell-containing hemocytes per total hemocytes was estimated by counting them. The data are means \pm S.D. (n=3). * $p < 0.002$.

たショウジョウバエより得た胚では、食食受容体二重欠損体ほどではないものの、通常餌で飼育したものと比べアポトーシス細胞を食食するヘモサイトの割合が有意に低下した（Fig. 1）。このことから、大豆ペプチドにはアポトーシス細胞食食を阻害する働きのある可能性が示唆された。

食食受容体二重欠損体では、胚ヘモサイトにおけるアポトーシス細胞の食食が抑制されるだけでなく、成虫までの成長速度の有意な遅延が観察される（著者未発表データ）。大豆ペプチド含有餌で飼育したショウジョウバエの成長速度にも遅延が見られるかどうかを調べたところ、ハイニュートAM含有餌で飼育したショウジョウバエの成長速度は、通常餌での飼育と比べ有意な遅延が見られた（Fig. 2）。このことから、大豆ペプチドにはショウジョウバエの成長を遅らせる効果のあることがわかった。一方、ハイニュートAMの原料となるフジプロF含有餌ではそのような遅延は観察されなかった（Fig. 2）。従って、成長速度の遅延はハイニュートAM中のペプチド以外の成分ではなく、ペプチドそのものに起因することがわかった。また、食

食受容体二重欠損体で同様の実験をしたところ、ハイニュートAM依存に更なる成長速度の遅延が観察された (Fig. 3). よって、大豆ペプチドによる成長遅延効果は、既知食食受容体非依存の現象であることがわかった。

胚から成虫まで発生が進む個体数を調べたところ、食食受容体の有無にかかわらず、その数はハイニュートAM含有餌で飼育すると通常餌あるいはフジプロF含有餌での飼育と比べて半減した (Fig. 4, 5). よって、大豆ペプチドには既知食食受容体非依存にショウジョウバエの生存に負に働く効果があることがわかった。

考 察

本研究では、大豆ペプチドにがん抑制効果があるか否かを、がん発症を未然に防ぐ複数の現象に着目して実験を行った。

がんの素となる変性自己細胞にはアポトーシスが誘導され、食細胞により特異的に食食除去される。アポトーシス細胞食食の解析では、大豆ペプチドを含む餌を飼育したショウジョウバエより得られた胚において、アポトーシス細胞を食食するヘモサイトの割合が有意に減少した。これは、大豆ペプチドが存在するとがんの素となる細胞の排除が進まず、がん発症の確率が高まる可能性があることを意味する。

上皮組織では、cell competitionが観察される。すなわち、異なる速度で増殖する細胞が隣接すると、増殖速度の速い細胞が遅い細胞にアポトーシスを誘導して排除し、空きスペースで増殖する³⁾。食食受容体のDraperを欠いた個体ではcell competitionが起こらない⁴⁾。また、がん抑制因子のScribbleを欠いた細胞は増殖速度こそ他の細胞よりも速いにも関わらず、周囲の正常な細胞によりアポトーシスが誘導されて取り除かれることから、cell competitionががん予防の一端を担っているといえる。cell competitionが正しく起こらない個体では、発生速度の遅延が観察される³⁾。本研究で観察された大豆ペプチド含有餌での飼育による成長速度遅延は、同分子によるcell competition抑制機構の存在を示唆する。この予想が正しければ、大豆ペプチドはcell competitionを介したがん予防を妨げることになる。大豆ペプチドによる発生遅延効果は食食受容体欠損体でも観察されたことから、もしも作用機序がアポトーシス細胞食食の阻害であるならば既知の食食受容体を介さない阻害は必ずである。

がんの素の排除が進まないとがんが発症し、成虫になる前に死に至る個体が増えることになる。本研究で

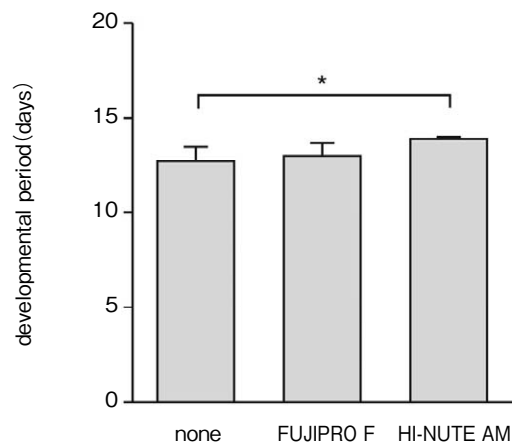


Fig. 2. Growth speed of soy peptide-treated normal *Drosophila*. Early developmental stages of 100-200 embryos, laid by normal *Drosophila*, *w*¹¹¹⁸, were transferred to vials with normal food (none) or soy protein (Fujipro F) or soy peptide (Hi-Nute AM)-containing food. Developmental period from embryo to adult was examined by counting the number of newly-emerged adults every day. The data are means \pm S.D. ($n \geq 3$). * $p < 0.05$.

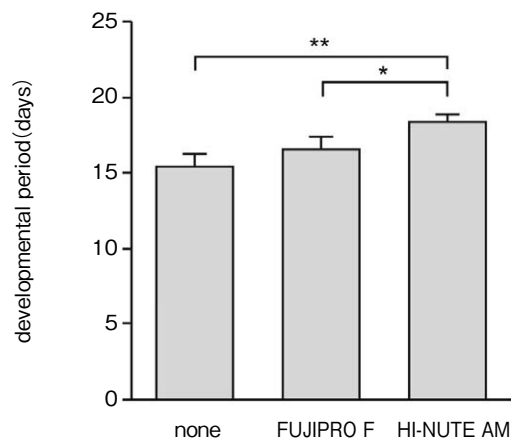


Fig. 3. Growth speed of soy peptide-treated mutant *Drosophila*. Developmental period of phagocytosis receptors-deficient *Drosophila*, *w*; *betaInt-nu*²; *drpr*^{A5}, was examined as figure 2. The data are means \pm S.D. ($n \geq 3$). * $p < 0.02$, ** $p < 0.005$.

観察された大豆ペプチド含有餌で飼育したショウジョウバエの生存率低下は、がん予防の妨げの結果なのかも知れない。

本研究ではがん細胞を直接見てはいないが、今回得られた結果から、「大豆ペプチドが既知貪食受容体を介さないアポトーシス細胞の貪食を阻害することで cell competition を抑制し、がん予防を妨げる」仮説を

提唱する。この仮説の検証には、大豆ペプチドによるアポトーシス細胞貪食の阻害機構、cell competition 抑制機構、そして個体の死との関係などを解析する必要がある。また、大豆ペプチドに含まれるどのような分子（オリゴペプチドの配列特異性）が原因かについて調べる必要がある。今後は、これらを明らかにする予定である。

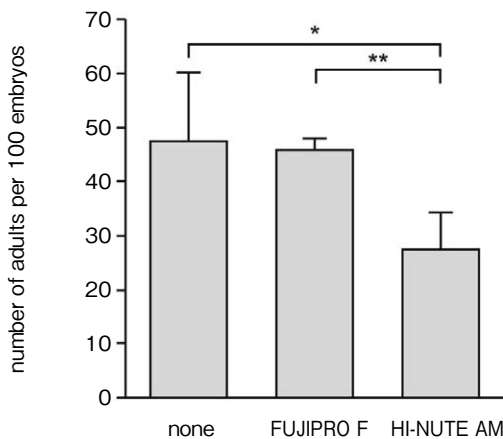


Fig. 4. Developmental rate of soy peptide-treated normal *Drosophila*. The number of adults, emerged from pupa, per 100 embryos was examined. Normal *Drosophila*, w^{1118} , were treated as figure 2. Developmental rate from embryo to adult was examined by counting the number of newly-emerged adults. The data are means \pm S.D. ($n \geq 3$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.02$.

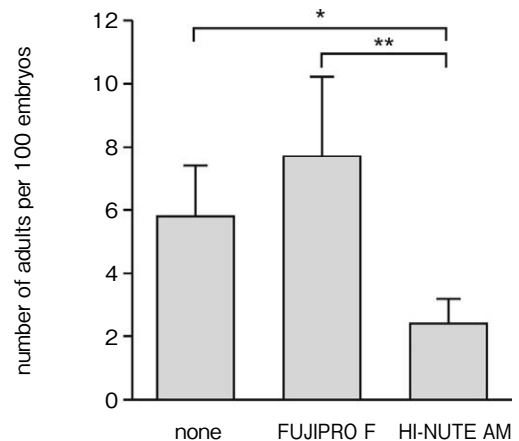


Fig. 5. Developmental rate of soy peptide-treated mutant *Drosophila*. Developmental rate of phagocytosis receptors-deficient *Drosophila*, w ; $\beta Int-nu^2$; $drpr^{A5}$, was examined as figure 4. The data are means \pm S.D. ($n \geq 3$). * $p < 0.02$, ** $p < 0.01$.

要 約

本研究は大豆ペプチドにがん抑制効果があるか否かを知る手がかりを得る事を目的とし、がん研究モデル動物のショウジョウバエを用いて実験を行った。がんの素になる細胞には cell competition を介してアポトーシスが誘導されて貪食により排除されると考えられている。一方、cell competition がうまく起こらない個体の成長速度が遅いことも知られている。大豆ペプチド含有餌で飼育したショウジョウバエでは、アポトーシス細胞の貪食程度が低下し、同動物は成虫までの成長速度の遅延が観察された。そして、成虫にまで発生する個体の割合も低下した。従って、本研究で得られた結果からは、大豆ペプチドが cell competition を抑制することで、個体の正常な発生を妨げた可能性、すなわち大豆ペプチドにはがん予防を妨げる働きがある可能性のあることがわかった。

文 献

- 1) Brumby AM and Richardson HE (2003): *Scribble* mutants cooperate with oncogenic Ras or Notch to cause neoplastic overgrowth in *Drosophila*. *EMBO J*, **22**, 5769-5779.
- 2) Manaka J, Kuraishi T, Shiratsuchi A, Nakai Y, Higashida H, Henson P and Nakanishi Y. (2004): Draper-mediated and phosphatidylserine-independent phagocytosis of apoptotic cells by *Drosophila* hemocytes/macrophages. *J Biol Chem*, **279**, 48466-48476.
- 3) Morata G and Ripoll P (1975): Minutes: mutants of *Drosophila* autonomously affecting cell division rate. *Dev Biol*, **42**, 211-221.
- 4) Li W and Baker NE: (2007): Engulfment is required for cell competition. *Cell*, **129**, 1215-1225.