

# 香辛料の細胞癌化に対する抑制効果およびその遺伝子機構の解析

侯 徳 興 (鹿児島大学農学部助教授)

## 1. はじめに

香辛料は古くから利用されて、食生活を豊かにし、多くの機能が知られてきており、特に抗菌性、抗酸化性などの研究が進展している。最近、香辛料には発癌予防の可能性があると指摘されている<sup>1)</sup>。しかしながら、これらの報告は動物個体を用いた現象レベルでの研究が多く、その遺伝子メカニズムはほとんど解明されていない。我々は遺伝子工学および細胞工学などの手法を用いて、香辛料に含まれる「癌予防因子」がどのように、どの遺伝子に影響を与えるか検討し、その「抗癌効用」を遺伝子レベルでの解明を試みている。そのモデル系として、日本独特の香辛料であるワサビを研究材料とした。ワサビの辛みの成分であるアリルイソチオシアナートは微生物の生育抑制効果を持ち、食品の保存に使われている<sup>2)</sup>。最近、沢ワサビの水抽出画分から6-メチルスルフィニルヘキシルイソチオシアナート (6-MITC) という成分が単離・同定されている<sup>3)</sup>。この成分は沢ワサビの特有の香りを構成する成分の一つであるが、ワサビの辛み成分の主成分ではない。その生理的活性については胃癌細胞 MKN-28 の増殖抑制<sup>4)</sup> およびマウス実験腫瘍の転移抑制効果が報告されており<sup>5)</sup>、6-MITC が抗腫瘍成分として期待されている。そこで、本研究はワサビの6-MITC の

- 1) 細胞癌化抑制効果およびその遺伝子調節機構、
- 2) 発癌抑制酵素であるキノノキシドレグクターゼ (QR) の誘導効果およびその遺伝子調節について解析を行った。

## 2. 材料および実験方法

### 2.1 細胞培養

マウス新生児皮膚細胞 (JB 6 細胞) は5%牛胎児血清を含む MEM 培地で5% CO<sub>2</sub>, 37°C で培養した。マウス肝癌細胞 Hepa 1c1c7 は5%牛胎児血清を含む  $\alpha$ MEM 培地で5% CO<sub>2</sub>, 37°C で培養した。

### 2.2 細胞癌化能の解析 (コロニーアッセイ)

JB 6 細胞を用いてコロニーアッセイを行った。細胞癌化実験は軟寒天内に JB 6 細胞に発癌プロモーター TPA (20 ng/ml) を加えて細胞癌化を誘導した。5% CO<sub>2</sub>, 37°C で2週間培養後癌化細胞のコロニー数を計測した。6-MITC による細胞癌化抑制作用は各種濃度の6-MITC を添加した状態で TPA 誘導を行い、さらに2週間培養後癌化細胞コロニーの発生抑制率で計測した。

### 2.3 レポーター遺伝子アッセイ

ホルボールエステル応答配列およびルシフェラーゼ遺伝子を導入した JB 6 細胞を用いてレポーター遺伝子アッセイを行った。各種濃度の6-MITC を添加し、30分後に TPA で24時間処理した。6-MITC 無添加の細胞をコントロールとした。得られた細胞上澄液をルシフェリン基質と混合し、それぞれの蛍光強度を測定し、6-MITC の AP-1 転写活性に対する阻害作用を調べた。

### 2.4 RNA 抽出および RT-PCR

6-MITC を添加した培養細胞と無添加培養細胞から ISOGEN (ニッポンジーン) で total RNA を抽出した。QR 遺伝子および GAPDH 遺伝子

の核酸配列は GenBank から検索し、PCR 用のプライマーをそれぞれ設計・合成した。RT-PCR は、まず逆転写酵素を用いて 42°C、30 分で total RNA から cDNA を合成した。PCR 反応にあたり、QR 遺伝子および GAPDH 遺伝子の発現を検出する最適鋳型量および反応サイクル数を検討した。得られた PCR 産物は 2% アガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色後 CCD カメラで写真撮影・保存した。PCR 産物の定量は Image Gauge ソフト (富士フィルム) で行った。

### 2.5 QR 活性測定

マウス肝臓癌細胞 Hepa 1clc 7 を 96-well プレートに蒔いて 24 時間培養した。その後各種濃度の 6-MITC を添加し、さらに 24 時間培養した。6-MITC 無添加の細胞を対象組とした。QR 活性測定は Prochaska ら<sup>9)</sup> の方法に従って行った。

### 2.6 細胞増殖の測定 (MTT アッセイ)

マウス肝臓癌細胞 Hepa 1clc 7 を 96-well プレートに蒔いて 24 時間培養した。その後各種濃度の 6-MITC を添加し、さらに 24 時間培養した。6-MITC 無添加の細胞を対象組とした。細胞増殖の測定は Camichael ら<sup>7)</sup> の方法に従って行った。

## 3. 結果と考察

### 3.1 6-MITC の JB 6 細胞癌化に対する抑制効果<sup>8,9)</sup>

6-MITC の細胞癌化抑制能の解析はコロニーアッセイを用いて行った。マウス皮膚細胞 JB 6 を軟寒天で培養し、発癌プロモーター TPA (20 ng/ml) を加えて細胞癌化を 2 週間誘導した。一方実験区では、さらに各種濃度の 6-MITC を TPA 誘導時に同時に添加し、さらに 2 週間培養した。染色後それぞれの癌化細胞のコロニー数を顕微鏡で計測した。その結果は図 1 に示している。6-MITC は、TPA により誘導された細胞コロニーの形成を濃度依存的に強く抑制した。コントロールは 1 万細胞あたり 1051 個の癌化コロニーが形成されたのに対して 10 μM 濃度の 6-MITC 添加では 215 個しか形成されず、かなり強い細胞癌化抑制能が見られた。

### 3.2 AP-1 転写活性に対するわさびの抑制効果<sup>8,9)</sup>

AP-1 は転写因子 c-Jun/c-Fos のヘテロ複合体でホルボールエステル応答配列 (TPA responsive element) に結合する転写因子である。AP-1 は細胞増殖および細胞分化に深く関与する。そのモデル系として、マウス新生児皮膚の

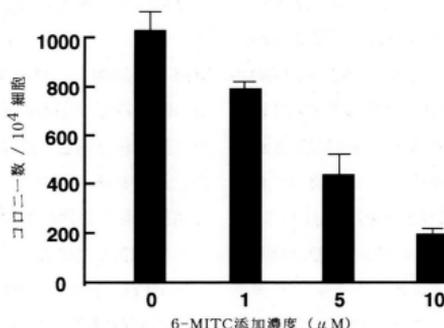


図 1 6-MITC のマウス JB 6 細胞癌化に対する抑制効果

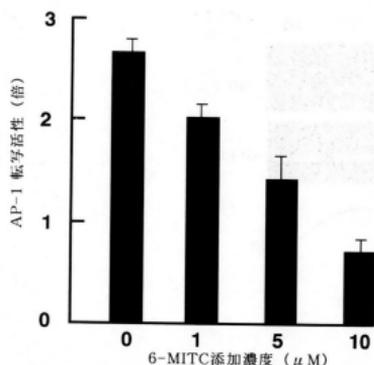


図2 6-MITCのAP-1転写活性に対する抑制効果

JB 6細胞はTPAで処理するとAP-1の転写活性が誘導され、細胞のトランスフォーメーション(細胞癌化)を引き起こすことが知られている。そこで6-MITCのJB 6細胞癌化の抑制効果がAP-1転写活性に関与するかどうか調べた。ホルボールエステル応答配列およびルシフェラーゼ遺伝子を導入したJB 6細胞を用いてレポーター遺伝子アッセイを行った。その結果は図2に示している。6-MITC無添加のコントロールにはTPA (20 ng/ml)で2.7倍のAP-1転写活性が誘導されたが、6-MITCの添加に伴いAP-1の転写活性が濃度依存的に減少した。即ち、6-MITCは濃度依存的にAP-1転写活性を抑制した。これらの結果、6-MITCによるJB 6細胞癌化抑制の遺伝子調節機構としては、6-MITCが細胞癌化を引き起こす転写因子AP-1の活性をブロックすると考えられた。

### 3.3 マウス肝癌細胞 Hepa 1c1c7に対する細胞増殖抑制活性<sup>10)</sup>

6-MITCは、抗腫瘍成分として研究されたものであり、強い細胞毒性を有している。QR活性誘導実験の試料濃度を決定するためにHepa 1c1c7に対する細胞増殖抑制活性を調べた。生細胞数の測定は、MTTアッセイにより行った。結果は

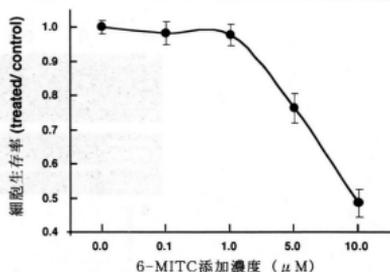


図3 6-MITCのHepa 1c1c7細胞増殖の抑制効果

図3に示したように10 $\mu$ M以上に設定すると細胞の死滅する割合が急増することから、1 $\mu$ Mの6-MITCは細胞に毒性がなく最適濃度と設定した。

### 3.4 6-MITCによるQR活性の誘導効果<sup>10)</sup>

QRはキノノンオキシドレダクターゼで、肝臓第二相解毒酵素の一つである。最近、食品素材などにこうした解毒酵素の誘導を促進する化学物質が見出されてきており、実際に動物実験系においても効果が認められている。このように食品素材による第二相解毒酵素の誘導は癌予防に直接関与していると考えられている。そこでワサビ6-MITCによる肝臓QR活性の誘導効果を調べた。その結果、6-MITCが濃度依存的にマウス肝癌細胞のQR酵素活性を誘導した。1 $\mu$ Mの6-MITC、24-48時間の培養で細胞に対して毒性がなく、最大のQR酵素活性(約2.4倍)が誘導された(図4)。

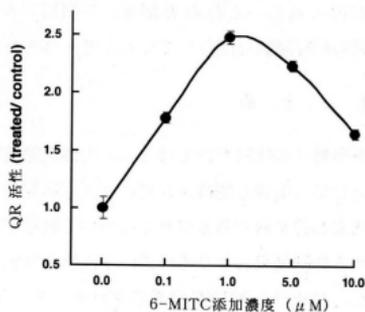


図4 6-MITCのQR酵素活性の誘導効果

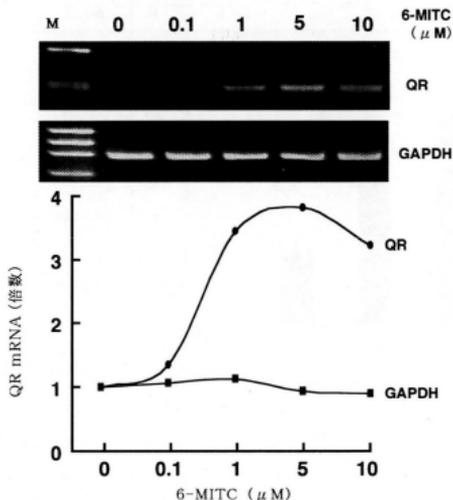


図5 6-MITCのQR mRNAの誘導効果

### 3.5 6-MITCによるQR mRNA発現量の誘導効果<sup>10)</sup>

さらに、6-MITCによるQR酵素の遺伝子レベルでの誘導機構を解析するためにRT-PCR法を用いて、QR遺伝子の発現を検出した。図5に示したように、6-MITCは濃度依存的にQR mRNAを誘導した。1 μMの6-MITC、12時間の培養で細胞に対して毒性がなく、最大のQR mRNA発現量(約3.3倍)を誘導した。QR mRNAの発現量とQR酵素活性との間に高い相関が得られた。これらの結果、6-MITCがQR酵素の転写制御に関与していると考えられた。

## 4. ま と め

香辛料は調味料だけではなく、生体調節機能物質としての用途も期待されている。本研究は日本の代表的香辛料であるワサビについて細胞癌化に対する抑制効果およびその遺伝子機構の解析を行った。ワサビ6-MITCは発癌プロモーターTPAによるマウス新生児皮膚細胞の癌化を著しく抑制

した。レポーター遺伝子アッセイの結果、6-MITCは細胞増殖に関与する転写因子AP-1の転写活性を抑制し、発癌プロモーターTPAによる細胞癌化を阻害するという遺伝子機構を明らかにした。また、6-MITCは発癌抑制酵素として肝臓キノンオキシドレダクターゼ活性を強く誘導し、その活性誘導は遺伝子転写レベルによるものと考えられた。

## 謝 辞

この研究を遂行するにあたり、研究助成を賜りました浦上食品・食文化振興財団および関係各位に心から感謝すると共に貴財団の益々のご発展を祈念いたします。

また、6-MITCなどをご提供して下さった東京都立短期大学健康栄養学科福家洋子教授に謹んでお礼申し上げます。

## 文 献

- 1) 大澤俊彦：がん予防食品の開発，シーエムシー (1995)

- 2) Isshiki K and Tokuoka K: Allyl isothiocyanate and wholesomeness of food. *Jap. J. Food Microbiology*, **12**: 1-6 (1993)
- 3) Ono H, Adachi K, Fuke Y and Shinohara K, Purification and structural analysis of substances in wasabi (*Eutrema wasabi* Maxim.) that suppress the growth of MKN-28 human stomach cancer cells. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, **43**: 1092-1097 (1994)
- 4) 福家洋子, 大石芳江, 岩下恵子, 小野晴寛, 篠原和毅: 沢わさびの胃ガン細胞増殖抑制作用, *日本食品科学工学会誌*, **41**: 709-711 (1994)
- 5) 福家洋子, 芳賀良子, 沢木佐重子, 野村孝弘, 狐山一雄: 日本癌学会 (1997)
- 6) Prochaska HJ, Santamaria AB and Talalay P: Rapid detection of inducers of enzymes that protect against carcinogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **89**: 2394-2398 (1992)
- 7) Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD and Mitchell JB: Evaluation of a tetrazorium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.*, **47**: 936-942 (1987)
- 8) 侯 徳興, 福家洋子, J-J Li, NH Colburn, 藤井信: わさび 6-MITC の細胞がん化および AP-1 転写活性化の抑制作用, *日本農芸化学会誌 (臨時増刊号)*, **134** (1999)
- 9) 「ワサビ 成分に抗がん効果—鹿児島大遺伝子レベルで解明」, *日本工業新聞*, 1999年 5月19日
- 10) 侯 徳興, 福田真博, 藤井 信, 福家洋子: ワサビ 6-MITC による発癌予防酵素 QR の誘導およびその転写機構の解析, *日本食品科学工学会第47回大会講演集*, **21** (2000)

## Inhibition of mouse JB6 cell transformation and induction of NADPH: quinone oxidoreductase by 6-MITC (*Eutrema wasabi* Maxim)

De-Xing Hou (Department of Biochemical Science and Technology,  
Faculty of Agriculture, Kagoshima University)

6-MITC (6-methylsulfinylhexyl isothiocyanate) is potent antiproliferative components from wasabi (*Eutrema wasabi* Maxim). We assessed the effects of 6-MITC on transformation of mouse JB6 cell. The results show that 6-MITC could inhibit TPA-induced transformation of JB6 P+ cell C141 in a dose-dependent manner. Since our previous results indicated that induced AP-1 activity is required for tumor promoter induced-transformation, we tested whether inhibition of tumor promoter-induced transformation by 6-MITC is through an AP-1 inhibition mechanism. Our results from reporter gene assay indicated that 6-MITC inhibited AP-1 activity at the same dose range for inhibition of transformation. These results demonstrated that 6-MITC has inhibitory effects on JB6 cell tumor promoter-induced transformation and provided the basic knowledge for understanding of 6-MITC action on tumor prevention.

A potential mechanism of dietary anticarcinogenesis involves the induction of detoxifying phase II enzymes such as NADPH: quinone oxidoreductase (QR). This study, therefore, examined the ability of 6-MITC to affect cellular expression of QR in murine hepatoma cells. Hepa 1c1c7 cells were treated with various concentrations of 6-MITC, and then were assessed for QR activity, cell growth, and QR mRNA expression. 6-MITC induced QR activity and QR mRNA levels in a dose-dependent manner at the concentration range of 0.1 to 1  $\mu$ M. A significant correlation between the expression of QR mRNA and the corresponding QR activity was observed. The results demonstrated that wasabi is capable of QR induction in Hepa 1c1c7 cells by promoting QR mRNA expression, and suggest a novel mechanism by which dietary wasabi may be implicated in cancer chemoprevention.