

沢ワサビ成分の細胞傷害活性を回避して、第2相解毒酵素誘導を増強する方法の開発

舘 山 一 雄 (青森大学工学部生物工学科教授)

1. はじめに

イソチオシアネート化合物は動物の発癌を予防することが知られている¹⁻⁴⁾。この化合物は①第2相解毒酵素を誘導あるいはその誘導を増強することにより、発癌物質を無毒化し、体外に排出したり②第1相解毒酵素を阻害することが報告されている⁵⁻¹⁰⁾。

例えば、ブロッコリーに含まれるスルフォラファンは第2相解毒酵素であるグルタチオン転移酵素 (GST) やキノンレダクターゼ (QR) 等の誘導を増強し、同時に第1相解毒酵素チトクローム P450 を阻害することが報告されている⁹⁾。

一方、第2相解毒酵素 GST の誘導と細胞内酸化ストレス (細胞内活性酸素産生) とが密接に関係し^{8, 11)}、イソチオシアネート化合物はアポトーシスやネクローシスを誘導し細胞を傷害することが報告されている^{12, 13)}。これらのことよりイソチオシアネート化合物の発癌予防効果が、自身の活性酸素誘導能に基づく細胞傷害により減弱する可能性が考えられる。

抗酸化剤グルタチオンや N-アセチルシステイン (NAC) などは活性酸素による細胞傷害を阻害する一方^{8, 14, 15)}、GST の誘導増強をも阻害することが知られている⁸⁾。

しかしながら、イソチオシアネート化合物の生物活性に及ぼすグルタチオンや NAC 等の抗酸化剤の影響について詳細な報告がほとんどない。それで我々は沢ワサビ成分であるイソチオシアネー

ト化合物 6- (methylsulfinyl) hexyl isothiocyanate の第2相解毒酵素 (QR) の誘導増強活性と細胞傷害活性に及ぼす NAC の影響を比較検討した。

2. 結果と考察

2.1 6- (methylsulfinyl) hexyl isothiocyanate による QR 活性の増強

QR 活性は Hepalclc7 肝癌細胞をもちいて Prochaska 等³⁾の方法で行った。図1に示すように該化合物は 10 ~ 20 μ M の濃度で QR 活性を濃度依存的に増大し、最大 1.8 倍にまで増大した。しかし、80 μ M では活性が減少した。Hou 等⁶⁾が Hepalclc7 肝癌細胞をもちいて 6- (methylsulfinyl) hexyl isothiocyanate の QR 活性に及ぼす影響を検討しているが、1 μ M で約 3 倍の活性増大をみている。我々の実験ではこのような高い活性増大はみられず、Hou 等の実験結果との食い違いの正確な理由は現在不明であるが、Hepalclc7 肝癌細胞の培養に用いた培養液の違いがその理由の一つである可能性がある。彼らの培養液より我々の培養液は細胞にとり栄養が豊富で細胞の増殖も早かった。この培養液の違いが両者の実験結果の原因であるかどうかについては今後の検討を必要とする。

2.2 6- (methylsulfinyl) hexyl isothiocyanate の細胞傷害活性

図2に示すように 6- (methylsulfinyl) hexyl isothiocyanate には細胞傷害活性があり、濃度に

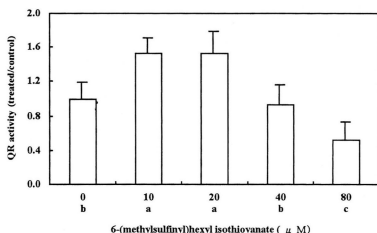


図1 Effect of 6-(methylsulfinyl) hexyl isothiocyanate on QR activity.

Hepalclc7 cells (2×10^4 /well) were treated for 24 h at 37°C with 6-(methylsulfinyl) hexyl isothiocyanate. The results are represented as the ratios of specific QR activities in the treated cultures to those of untreated controls. Values are means $\pm$ SD of three independent experiments (each consisting of six wells). The letter below each treatment indicates the results of a statistical analysis ($P < 0.05$).

依存して傷害活性が高くなり、80 μ M では約 70 %の細胞が傷害をうけた。この濃度で QR 活性は約 50%ほど阻害(図1) されることより、該化合物にたいする感受性は細胞傷害活性より QR 活性の方が低いことがわかる。一方、該化合物の上記細胞傷害活性は MTT 法では検出できるが、乳酸脱水酵素法(細胞膜が破壊され細胞外に流失する細胞質の酵素活性)では検出することができないことより、該化合物による細胞傷害はネクロー

シスではなくアポトーシスに基づくものと思われるが、アポトーシスの指標である DNA の分解によるラダーを検出することはできなかった。他のイソチオシアネート化合物も細胞傷害活性を示し、そのメカニズムは化合物の種類、実験に供した細胞などの条件により異なる^{12,13)}。いくつかのイソチオシアネート化合物は活性酸素を誘導し細胞を傷害するが、この細胞傷害がグルタチオンや NAC などにより阻害されることが報告されてい

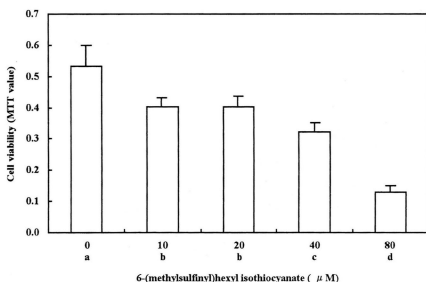


図2 Effect of 6-(methylsulfinyl) hexyl isothiocyanate on cell viability.

Hepalclc7 cells (1.5×10^4 /well) were treated for 24 h at 37°C with 6-(methylsulfinyl) hexyl isothiocyanate. The results are represented as reduced MTT values. Values are means $\pm$ SD of two independent experiments (each consisting of six wells). The letter below each treatment indicates the results of a statistical analysis ($P < 0.05$).

る^{8,14,15)}。そこで次に、我々は 6-(methylsulfinyl) hexyl isothiocyanate の細胞傷害活性に及ぼす NAC の影響を検討した。

2.3 6-(methylsulfinyl) hexyl isothiocyanate の細胞傷害活性に及ぼす NAC の影響

NAC は MTT を還元するので、生細胞の測定は MTT 法ではなく SRB 法¹⁶⁾で行った。6-(methylsulfinyl) hexyl isothiocyanate の細胞傷害活性に及ぼす NAC の影響を検討する前に、NAC の細胞傷害活性について検討した。1mM までは Hepalclc7 癌細胞を傷害しなかったが、5, 10mM では 5, 20% の細胞傷害活性を示した。NAC のこの細胞傷害活性は NAC 溶液の pH (酸性) による影響と考えられるので、pH を 7.5 にした NAC で検討したところ、5, 10mM では細胞の傷害はみられなかった。

図 3 に示すように NAC は 5mM まで濃度に依存して 6-(methylsulfinyl) hexyl isothiocyanate による細胞傷害活性を阻害した。10mM では pH を調節しない NAC では傷害の回復はみられないが (自身の細胞傷害活性に基づく)、pH7.5 に調節した NAC では細胞傷害活性の阻害がみられた (図 3 B)。この事はまた、NAC の活性は NAC 溶液の pH を中性にしても失活しないことを示している。

2.4 高濃度 6-(methylsulfinyl) hexyl isothiocyanate による QR 活性の阻害に及ぼす NAC の影響

高濃度 (80 μ M) の 6-(methylsulfinyl) hexyl isothiocyanate による QR 活性阻害 (図 1) は該化合物の細胞傷害性に基づくかどうかを検討するために NAC の影響を検討した。その結果、NAC

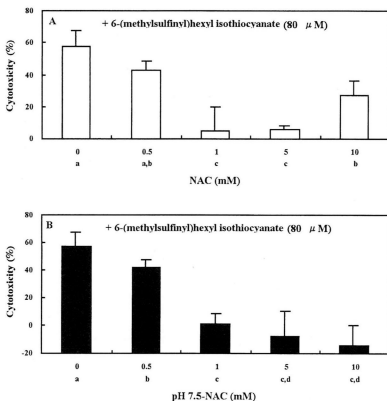


図 3 Effects of N-acetyl-L-cysteine (NAC) on 6-(methylsulfinyl) hexyl isothiocyanate-induced cytotoxicity.

Hepalclc7 cells (5×10^3 /well) were pretreated for 30 min with NAC or pH 7.5-adjusted NAC followed by 24 h incubation at 37°C with 6-(methylsulfinyl) hexyl isothiocyanate (80 μ M). The results are represented as % of cytotoxicity: (viability without treatment - viability with treatment) / viability without treatment. A: NAC (open column), B: pH 7.5-adjusted NAC (pH 7.5 NAC) (solid column). Values are means $\pm$ SD of three independent experiments (each consisting of six wells). The letter below each treatment indicates the results of a statistical analysis ($P < 0.05$).

はQR活性の増大をもたらした。しかし、QR活性の測定はMTTの還元に基づく測定法であり、前述したようにNACがMTTを還元する能力を持つことから、この増大は真のQR活性増大を反映していないことは明らかである。このことより、NACの影響の検討にはQR活性の測定を本法以外の方法で行う必要がある。

2.5 6- (methylsulfinyl) hexyl isothiocyanate のQR遺伝子発現に及ぼす影響

6- (methylsulfinyl) hexyl isothiocyanate のQR活性増強のメカニズムを検討するために、該化合物のQR遺伝子発現に及ぼす影響を検討した。図4に示すように6- (methylsulfinyl) hexyl isothiocyanate は10～40 μ Mの範囲で濃度依存的にQR遺伝子の発現を増大した。その増大は40 μ Mで未処置の約7倍であった。しかしながら80 μ Mでは遺伝子発現の増大はみられなかった。これは該化合物が細胞を傷害したためと思われる。そこで、NACで6- (methylsulfinyl) hexyl isothiocyanate の細胞傷害を阻害した場合、該化合物はQR遺伝子発現を増大するかどうかを検討した。図5Aに示すように、NAC (pH7.5に調

整)の濃度に応じて6- (methylsulfinyl) hexyl isothiocyanate は80 μ MでQR遺伝子発現を増大した。しかし、NAC自身はQR遺伝子発現を増大しなかった。

Pinkus等¹¹⁾や中村等⁸⁾はNACやグルタチオンがGSTの遺伝子発現や活性を阻害することを報告している。しかしながら、我々の実験では80 μ M 6- (methylsulfinyl) hexyl isothiocyanate の場合、NACがQR遺伝子発現を阻害するのではなく反対にその活性を増大した(図5A)。NACによるQR遺伝子発現の増大は該遺伝子発現が該化合物により阻害されていた場合のみでみられ、QR遺伝子発現が増大している場合にはみられない可能性がある。そこで、QR遺伝子の発現を増大する6- (methylsulfinyl) hexyl isothiocyanate の濃度40 μ Mに対するNACの影響を検討した。図5Bに示すようにpH7.5に調整したNACは10mMではQR遺伝子発現増大をわずかではあるが有意に阻害した。しかし、1mMでは全く遺伝子発現を阻害しなかった。6- (methylsulfinyl) hexyl isothiocyanate のQR遺伝子発現増大活性は80 μ Mで失われるが、1mM

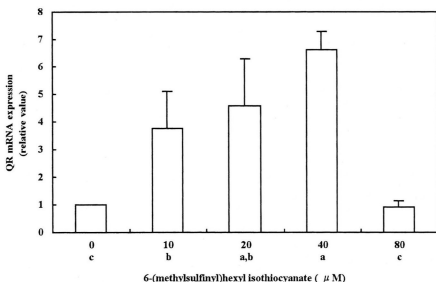


図4 4. Effect of 6- (methylsulfinyl) hexyl isothiocyanate on QR mRNA expression.

Hepalc7 cells (10^6) were treated for 24 h at 37°C with 6- (methylsulfinyl) hexyl isothiocyanate. The results are represented as the ratios of QR mRNA levels in treated cultures to those in untreated controls. Values are means $\pm$ SD of four independent experiments. The letter below each treatment indicates the results of a statistical analysis ($P < 0.05$).

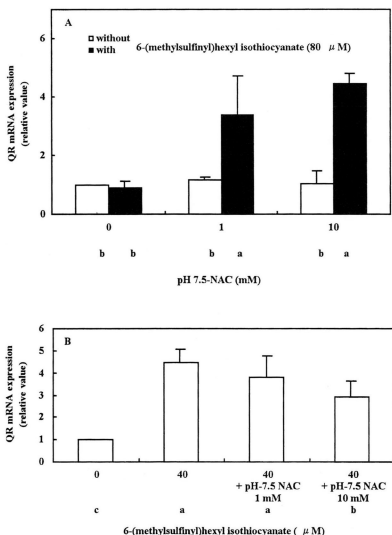


図5 Effects of N-acetyl-L-cysteine (NAC) on QR mRNA expression by 6- (methylsulfinyl) hexyl isothiocyanate

Hepalclc7 cells (10^6) were pretreated for 30 min with pH 7.5-adjusted NAC (pH 7.5 NAC) followed by 24 h incubation at 37°C with 6- (methylsulfinyl) hexyl isothiocyanate (A: 80 μ M, B: 40 μ M). The results are represented as the ratios of QR mRNA levels in treated cultures to those in untreated controls. Values are means $\pm$ SD of four independent experiments. The letter below each treatment indicates the results of a statistical analysis ($P < 0.05$).

NACがそれを有意に回復(図5A)することから、6- (methylsulfinyl) hexyl isothiocyanate によるQR遺伝子発現の方が細胞傷害活性よりNACに感受性が低いことが明らかである。

本実験では6- (methylsulfinyl) hexyl isothiocyanateの細胞傷害活性とQR遺伝子発現増大活性のNACに対する感受性の違いを明らかにした。

一方、今回の研究でQR活性とQR遺伝子発現の6- (methylsulfinyl) hexyl isothiocyanateに対する感受性の違いが明らかになった。即ち、該化合物で増大されたQR遺伝子が全て効率的にその活性発現に結びついていない。今後、遺伝子の発

現が増大してもその産物の活性増大に直接反映されないメカニズムを解明する必要がある。

3. ま と め

沢ワサビ成分6- (methylsulfinyl) hexyl isothiocyanateのHepalclc7マウス肝癌細胞のQR活性及びその遺伝子発現と細胞傷害に及ぼす影響とそれらの活性に及ぼすNACの影響を検討した。6- (methylsulfinyl) hexyl isothiocyanateは濃度依存的にQR活性を増大した。80 μ Mの6- (methylsulfinyl) hexyl isothiocyanateではその活性は阻害され、また細胞傷害がみられたが、

NACにより濃度依存的に細胞傷害が回復した。
6-(methylsulfinyl) hexyl isothiocyanateはQR遺伝子発現を濃度依存的に増大することより、QR活性の増大はその遺伝子発現の増大に基づくと考えられる。80 μ MによるQR遺伝子発現増大の低下も同様にNACにより回復した。一方、40 μ M 6-(methylsulfinyl) hexyl isothiocyanateによるQR遺伝子発現の増大は10mMNACでわずかではあるが有意に阻害されたが、1mMでは影響がみられなかった。

本実験はイソチオシアネート化合物が本来持つ細胞傷害活性を回避して、第2相解毒酵素活性誘導及びその活性増大をもたらす方法の端緒を明らかにした。

謝 辞

本研究にたいし多大の御助成を下さいました浦上食品・食文化振興財団に厚く御礼申し上げます。

付 記

本研究は2003年7月22日 Anticancer Research (23巻, 2003年) に採用された。

参考文献

- 1) Lin JM, Amin A, Trushin N and Hecht SS: Cancer Lett, 74: 151-159, (1993).
- 2) Zhang Y, Kensler TW, Cho CG, Posner GH and Talalay P: Proc Natl Acad Sci, U S A, 91: 3147-3150, (1994).
- 3) Fuke Y, Haga Y, Ono H, Nomura T and Ryoyama K:

Cytotechnol, 25: 197-203, (1997).

- 4) Yano T, Yajima S, Virgona N, Yano Y, Otani S, Kumagai H, Sakurai H, Kishimoto M and Ichikawa T: Cancer Lett, 155: 115-120, (2000).
- 5) Prochaska HJ, Santamaria AB and Talalay P: Proc Natl Acad Sci, U S A, 89: 2394-2398, (1992).
- 6) Hou DX, Fukuda M, Fujii M and Fuke Y: Cancer Lett, 161: 195-200, (2000).
- 7) Hou DX, Fukuda M, Fujii M and Fuke Y: Int J Mol Med, 6: 441-444, (2000).
- 8) Nakamura Y, Ohigashi H, Masuda S, Murakami A, Morimitsu Y, Kawamoto Y, Osawa T, Imagawa M and Uchida K: Cancer Res, 60: 219-225, (2000).
- 9) Maheo K, Morel F, Langouet S, Kramer H, Le Ferrec E, Ketterer B, and Guillouzo A: Cancer Res, 57: 3649-3652, (1997).
- 10) Singletary K and MacDonald C: Cancer Lett, 155: 47-54, (2000).
- 11) Pinkus R, Weiner LM, and Daniel V: Biochem, 34: 81-88, (1995).
- 12) Yu R, Mandlekar S, Harvey KJ, Ucker DS and Kong AN: Cancer Res, 64: 402-408, (1998).
- 13) Nakamura Y, Kawakami M, Yoshihiro A, Miyoshi N, Ohigashi H, Kawai K, Osawa T and Uchida K: J Biol Chem, 277: 8492-8499, (2002).
- 14) Mayer M and Nobel M: Proc Natl Acad Sci, U S A, 91: 7496-7500, (1994).
- 15) Miyajima A, Nakashima J, Tachibana M, Nakamura K, Hayakawa M and Murai M: Jpn J Cancer Res, 90: 565-570, (1999).
- 16) Skehan P, Storey R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, Warren J, Bokesch H, Kenney S and Boyd MR: J Natl Cancer Inst, 82: 1107-1112, (1990).

Development of a modality which augments Phase 2 enzymes by 6- (methylsulfinyl) hexyl isothiocyanate from wasabi through avoiding its cytotoxicity

Kazuo Ryoyama (Department of Bioscience and Biotechnology, Faculty of Engineering, Aomori University)

We examined both the induction of quinone reductase (QR) by 6- (methylsulfinyl) hexyl isothiocyanate and its cytotoxicity in HepalC1c7 cells, and compared the sensitivity of these two responses to NAC. QR activity was increased by 6- (methylsulfinyl) hexyl isothiocyanate in a dose-dependent manner. At 80 μ M, the compound was significantly toxic to cells, but the resulting QR inhibition was dose-dependently overcome by NAC. Augmentation of QR activity by 6- (methylsulfinyl) hexyl isothiocyanate seemed to be due to augmented expression of QR mRNA, which was significantly increased by the compound. Inhibition of QR gene expression was seen at 80 μ M, and could be overcome by NAC. Optimal induction of QR gene expression by the compound (at 40 μ M) was slightly but significantly inhibited by 10 mM NAC but not by 1 mM. The present study suggests that induction of Phase 2 detoxification enzymes by isothiocyanate compounds may be further enhanced by suppression of their inherent cytotoxic activity.