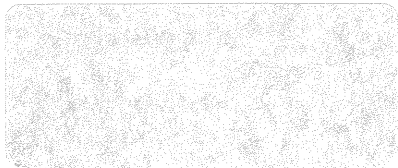


199800131A

ヒトがんの予防に役立つ物質に関する研究

主任研究者
藤 木 博 太



ヒトがんの予防に役立つ物質に関する研究

主任研究者 藤木博太 埼玉県立がんセンター研究所

研究要旨：ヒトがんの予防に役立つ物質として、緑茶とカバラクトンの研究を行った。緑茶ポリフェノールの細胞内取り込みについて研究を進めている際、不活性型のエピカテキンECが、ガロイル基をもつ緑茶ポリフェノールの取り込みを促進し、それらの作用を亢進することを見出した。この結果は、単一な緑茶ポリフェノールよりも、緑茶抽出物で十分ながん予防効果が得られることを示唆した。更に、EGCGとがん予防薬（sulindac と tamoxifen）との併用が、肺がん細胞株PC-9細胞のアポトーシスを相乗的、相加的に誘導することも見出した。この結果は、緑茶の飲用が、sulindac 或いは tamoxifen の投与量を減量することが可能であることを示唆している。乳がん患者472名中123名の再発例について、緑茶の飲用と再発との関係を検討した。I と II 期の乳がんについて、緑茶の飲用を1日4杯以下と5杯以上の群に分けると、再発率が24.3%から16.7%と減少し、再発までの期間が2.8年から3.6年と延長していることを見出した。又、閉経前期の乳がん患者では、緑茶飲用量の増加に伴って、転移腋窩リンパ節の数は減少した。南太平洋の島で特にいろいろながんの発症率が低いフィジーの住民に注目し、生活習慣から現地の人々が飲用するカバについて検討した。カバからまず2種類のカバラクトンを分離し、TNF- α の遊離抑制を証明した。この活性の強さは緑茶ポリフェノールと同等の強さを示したので、カバの飲用はフィジーの住民のがん予防に役立っていると考え、更に、研究を進めている。以上の研究から、私共はがん予防をがん治療に対し前期と後期の2段階に分けて考えることを提案した。緑茶の飲用は明らかにがん発症前期に有効である。しかも、がん治療後のがん予防には、がん予防薬との併用により、更なるがん予防効果を緑茶に求めることが可能であることも示された。これを私共は二段階のがん予防と呼ぶ。

分担研究者

1. 埼玉県立がんセンター研 所 長 藤木 博太
2. 埼玉県立がんセンター研 専門研 菅沼 雅美
3. 埼玉県立がんセンター研 主 任 末岡榮三朗
4. 埼玉県立がんセンター研 専門調 中地 敬
5. 埼玉県立がんセンター研 研究員 赤木 究
6. 埼玉県立がんセンター研 研究員 岡部 幸子

A. 研究目的

1987年、緑茶の主成分(-)エピガロカテキンガレート(EGCG)がマウス皮膚の発がんプロモーション活性を抑制することを発表した。その後、多くの研究者により、EGCG及び、緑茶が、いろいろな臓器の発がんを抑制することが報告された。これらの結果から、緑茶はヒトがんの予防に役立つ物質として注目されている。私共は緑茶を日本ではがん予防物質、或いは、外国ではがん予防薬として進めていく上で、必要とされる実験データ及びコホート研究による臨床疫学的データの検討を目的として研究を進めた。特に、緑茶とが

ん予防薬sulindacとの相乗効果、及び、緑茶の飲用が乳がん患者（IとII期）の再発予防に与える影響について詳細な検討をすることを目的とした。

1980年代、南カリフォルニア大学のB. E. Henderson博士は、太平洋の島々について、がんの疫学調査を行った。1985年の論文によると、フィジー島のメラネシア人は、がんの発生頻度が、他の島に比較して低いとの報告がある。特に、肺、胃、乳腺、前立腺のがんは低い。例えば、肺がんでは人口10万人（男性）に対し、フィジーのメラネシア人5.5、インド人2.0に対し、他の島のミクロネシア人46.7、ニューカレドニア人34.3であった。女性も同様の傾向を示した。“何故フィジーは肺がんが低いのか、フィジーの人は何を食べ、何を飲んでいるのか”の検討から始めた。太平洋の島々の中で、フィジーの人はカバ（別名ヤンゴーナ）を飲用する。カバの根を乾燥させ、鉄の鉢に入れ、太い鉄棒で碎き粉末にする。それを水でとかし、布で濾過したものを頻回に飲用する習慣があると伺った。カバの中にがん予防物質が含まれているか検討を進め、まず2

個のカバラクトンを分離した。このカバラクトンについてがん予防効果があるか研究することも目的とした。

B. 研究方法

1) ^3H -EGCGのヒト肺がん細胞株PC-9細胞への取り込み

PC-9細胞 (1×10^6) を $100 \mu\text{M}$ ^3H -EGCG及び、いろいろな濃度の緑茶ポリフェノールを加え 37°C で1時間培養した。その後、細胞内に取り込まれた ^3H のカウントを測定した。緑茶ポリフェノールを含まない場合の取り込みのカウントを100%とし、緑茶ポリフェノール存在下の減少を測定した。緑茶ポリフェノールは、EGCG、ECG、EGC、ECについて検討した。

2) PC-9細胞のアポトーシスに及ぼす効果

24ウェルのプレートにPC-9細胞 (2×10^5) を培養する。ECとEGCGをそれぞれ単独、及び、sulindacとtamoxifenをそれぞれ単独とし、更には、EC+EGCG、EGCG+sulindac、EGCG+tamoxifenによるアポトーシスの誘導を、DNAの断片化を指標にELISA法で測定した。

3) 緑茶の飲用が乳がんの再発に及ぼす効果

1984~1993年に手術目的で埼玉県立がんセンター病院に入院した原発乳がん患者472人 (I期117人、II期273人、III期82人) を対象とし、入院時に緑茶飲用を含む生活習慣・ホルモン関連事項 (初潮年齢、閉経年齢、出産など) に関する疫学面接調査を行った。さらに、この乳がん患者コホートの追跡調査 (平均観察期間6.5年) により、123人の再発が確認された。

4) カバのがん予防効果

フィジー島では、カバ (別名ヤンゴーナ) と呼ばれるコショウ科の根汁を飲用する習慣がある。私共は、カバに注目してTNF- α 産生抑制物質を検索した。フィジー島より入手したカバ粉末をメタノールで抽出した。得られた抽出物はシリカゲルクロマトグラフィーで分離し、まず2個のカバラクトンを得た。次にBALB/3T3細胞に発がん促進物質オカダ酸を処理すると、培養上清中にTNF- α が遊離する。この系にカバラクトンをオカダ酸を処理する1時間前に添加し、24時間後の培養液へのTNF- α 遊離が抑制されるかELISA法を用いて測定した。

C. 研究結果

1) 緑茶には4種類の緑茶ポリフェノール (EGCG、ECG、EGC、とEC) が含まれている。ヒト肺がん細胞株PC-9細胞に対する増殖抑制効果を検討すると、ECG、EGCG、EGCの順で増殖を抑制し、ECには抑制効果はなかった。 $100 \mu\text{M}$ EGCGでは80~90%の抑制が得られた。

2) この実験結果を基に、 ^3H -EGCGのPC-9細胞への取り込みに及ぼす緑茶ポリフェノールの影響を検討した。

EGCGとEGCは非放射活性のEGCGと同様に取り込みを阻害し、EGCGと同様に細胞に取り込まれることが推測された。一方、ECは逆にその取り込みを促進した。この結果からECはガロイル基をもつ3種類の緑茶ポリフェノール、EGCG、ECG、EGCの取り込みを促進し、その作用を亢進すると考えられた。

3) ECの促進作用を証明するために、EGCGがPC-9細胞のアポトーシスを誘導することを指標とした。ECは $200 \mu\text{M}$ までほとんどアポトーシスを誘導しなかった。 $75 \mu\text{M}$ のEGCGもほとんど誘導しなかった。しかし、 $75 \mu\text{M}$ EGCGによるアポトーシスはEC10、50、100、 $200 \mu\text{M}$ の添加につれて濃度依存性に、しかも相乗的に促進した。この結果は、ECがEGCGの細胞内取り込みを促進し、又、EGCGの作用を亢進したと解釈した。

4) ECとEGCGの相乗効果はPC-9細胞のアポトーシスを指標とすることにより、定量的に証明することができた。次に、EGCGとがん予防薬sulindac、或いは、EGCGとsulindac sulfide、及びEGCGとtamoxifenについて相乗効果を検討した。sulindacは $200 \mu\text{M}$ までほとんどアポトーシスを誘導しなかった。しかし、 $75 \mu\text{M}$ EGCGにsulindac (5、10、50、100、 $200 \mu\text{M}$) を添加すると、濃度に依存してアポトーシスの誘導は促進した。例えば、 $10 \mu\text{M}$ sulindac+ $75 \mu\text{M}$ EGCGはそれぞれの単独の場合の20倍も強く促進した。活性型のsulindac sulfideを $1 \mu\text{M}$ の濃度とEGCGとの併用では、20倍以上の相乗効果を認めることができた。

5) EGCGとがん予防薬の相乗効果に注目し、EGCGとtamoxifenの併用効果を検討した。 $75 \mu\text{M}$ EGCGに対しtamoxifen (5、10、 $20 \mu\text{M}$) のいろいろな濃度では、相乗効果ではなく、むしろ、相加効果を認めることができた。いづれにしても、がん予防薬が緑茶ポリフェノールと共にアポトーシスの誘導を相乗的、相加的に促進することが初めて示された。

6) 緑茶の飲用量と乳がんの臨床的特性の関係を検討した。緑茶飲用量と乳がん組織のエストロゲンレゼプター蛋白の発現量は、飲用量に伴い増加する ($P=0.07$)。また、閉経後患者のプロゲステロンレセプター蛋白の発現量は、やはり飲用量に依存して増加する ($P<0.05$)。さらに、閉経前患者の転移腋窩リンパ節数は、緑茶飲用量の増加に伴い減少する ($P<0.05$)。しかし、この関係はI期・II期の乳がんにも認められ、III期乳がんでは見出されなかった。

7) これらの臨床特性は乳がんの重要な予後因子であることから、再発との関連を検討した。一日の緑茶飲用量5杯以上 (平均8杯) と4杯以下 (平均2杯) に患者を分けた粗再発率は、I・II期合わせてそれぞれ16.7% (35/209) 及び24.3% (44/181)であった ($P<0.05$)。III期では再発率に違いはなかった。

8) 再発には、他の生活習慣・ホルモン関連事項なども関連している可能性がある。そこで、緑茶飲用と外科以外の治療に関連がないことを確かめた上で、面接調査で得たすべての疫学因子を考慮して、乳がん再発の相対危険を検討した。I・II期乳がんでは、緑茶5杯以上の患者は4杯以下に比べ相対危険は0.564 (95%信頼区間0.350-0.911)であった。

9) カバ粉末から得られたメタノール抽出液は、オキサダ酸で誘導されるBALB/3T3細胞からのTNF- α 遊離を抑制した。メタノール抽出物は、シリカゲルクロマトグラフィーで分離した論文によると、約20種類の化合物の混合物であると報告がある。私共は精製を進め、主成分であるKAVA-1とKAVA-2を単離した。KAVA-1とKAVA-2は濃度依存性にTNF- α の遊離を抑制することを見出した。抑制の強さをオキサダ酸だけの処理で遊離されるTNF- α 量を100%とし、50%抑制する濃度 (IC₅₀) で比較すると、KAVA-1とKAVA-2のIC₅₀は48.7 μ Mと34.0 μ Mであった。一方、がん予防薬として注目されている緑茶抽出物の主成分EGCGのIC₅₀は20 μ Mであったから、KAVA-1とKAVA-2は、ほぼ同等の活性を持つことが示された。

D. 考察

1. 緑茶ポリフェノールについて

1987年私共が緑茶ポリフェノールの主成分であるEGCGが、発がんプロモーション活性を抑制することを発表して以来、EGCGをがん予防薬として開発する動きが世界にはあった。しかし、緑茶ポリフェノールの混合物である緑茶抽出物でも、EGCGとほぼ同等の活性が見られ、緑茶抽出物の有用性も重要であると考えられた。EGCGをがん予防薬として開発可能なアメリカと比較し、日本ではがん予防効果をお茶として広げて行く方が、国民のニーズに答えるとの考えがでてきた。実際に当研究所で行った前向きコホート研究から緑茶飲用によるがん予防効果も示された。今回、緑茶ポリフェノール、4種について検討した結果、ECがガロイル基を含む緑茶ポリフェノールの取り込みを促進し、それらの作用も亢進することが初めて見出され、緑茶抽出物そのものの重要性が確認された。

2. 緑茶ポリフェノールとがん予防薬との相乗効果

今回ECとEGCGの併用が相乗効果を生じることに注目し、がん予防薬についても検討した。EGCGとsulindacには相乗効果、EGCGとtamoxifenには相加効果を初めて見出すことができた。Sulindacは大腸がんの予防薬として、tamoxifenは乳がんの予防薬として投与されているので、EGCGの相乗的、相加的効果は大腸がんでも、乳がんにも期待できる。特にsulindacで度々報告されていた副作用は、緑茶飲用によって減量でき

られると思われる。この場合、sulindacとEGCGの併用はがん予防効果のみに相乗効果となり、sulindacの副作用は相乗的にならないものと考えている。今後、大腸がん患者、及び乳がん患者について緑茶の飲用と、sulindac或いはtamoxifenの併用効果を検討することは重要であると思われる。

3. 緑茶飲用と乳がん再発

乳がん患者472名につき調査した結果、6.5年間の観察期間に123人の再発が認められた。一方、生活習慣調査と比較検討した結果、緑茶の飲用が多い人は再発率も低く、再発までの期間も長かった。この結果は乳がんのI期とII期に於いて認められ、III期の乳がんでは認められなかった。したがって、緑茶飲用によるがん予防効果は早期乳がんの進展に抑制的に作用していることを強く示唆した。更に、III期の乳がんでは緑茶飲用に効果が認められないことは、III期の乳がんには多くの遺伝子異常が蓄積したためと解釈している。がん治療後のがん予防を目的としても、緑茶の飲用が予後に重要な影響を与えることが初めて示された。

4. カバラクトンとフィジー住民のがん予防

B. E. Henderson のがん疫学調査にどれだけ信憑性があるかどうかは今回問わないことにする。ただ南太平洋の島々の住民について調査を行い、フィジーの結果は完全に終了したものである。南太平洋の住民は非常に喫煙量が多い、そのため肺がんの発症率も高い、しかしフィジーの住民だけが肺がんも低いことは注目に値すると考えた。南太平洋の住民の中でカバを飲用しているのはフィジーとポナペの住民だけであると云われている。フィジーの住民とカバとの結びつきを考えることにした。カバから精製したカバラクトンのTNF- α 遊離を抑制する活性が緑茶と同様に強いことは、更に研究を進めるに値すると考える。

E. 結論

緑茶の飲用によるがん予防効果を、通常のがん治療と一緒に考えてみた結果、私共はがん治療前期 (がん発症前) のがん予防と、がん治療後のがん予防に分けることが可能であると考えた。しかも、緑茶の飲用はこの両方の段階にも有効であることを見出した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Fujiki, H., Suganuma, M., Okabe, S., Sueoka, E., Suga, K., Imai, K., Nakachi, K. and Kimura, S. Mechanistic findings of green tea as cancer preventive for humans. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. in press (1999)
2. Fujiki, H. and Suganuma, M. Unique features of the

- okadaic acid activity class tumor promoters. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 125: 150-155 (1999)
3. Lim, I. K., Lee, M. S., Ryu, M. S., Park, T. J., Fujiki, H., Eguchi, H. and Park, W. K. Induction of growth inhibition of 293 cells by downregulation of the cyclin E and cyclin-dependent kinase 4 proteins due to overexpression of TIS21. *Mol. Carcinogen.* 23: 25-35 (1998)
 4. Fujiki, H., Suganuma, M., Okabe, S., Sueoka, N., Komori, A., Sueoka, E., Kozu, T., Tada, Y., Suga, K., Imai, K. and Nakachi, K. Cancer inhibition by green tea. *Mutat. Res.* 402: 307-310 (1998)
 5. Fujiki, H., Suganuma, M., Komori, A., Okabe, S., Sueoka, E., Sueoka, N., Kozu, T. and Tada, Y. Natural inhibitors of carcinogenesis. In "Clinical and Biological Basis of Lung Cancer Prevention" (eds. Y. Martinet, F.R. Hirsch, N. Martinet, J.-M. Vignaud, J.L. Mulshine,) Birkhauser Verlag Basel, Switzerland, pp.285-290 1998
 6. Suganuma, M., Okabe, S., Kai, Y., Sueoka, N., Sueoka, E. and Fujiki, H. Synergistic effects of (-)-epigallocatechin gallate with (-)-epicatechin, sulindac, or tamoxifen on cancer preventive activity in human lung cancer cell line, PC-9. *Cancer Res.* in press (1999)
 7. Suganuma, M., Okabe, S., Oniyama, M., Tada, Y., Ito, H. and Fujiki, H. Wide distribution of ³H-(-)-epigallocatechin gallate, a cancer preventive tea polyphenol, in mouse tissues. *Carcinogenesis.* 19: 1771-1776 (1998)
 8. Komori, A., Sueoka, E., Fujiki, H., Ishii, M. and Kozu, T. Association of MTG8 (ETO/CDR), a leukemia-related protein, with serine/threonine protein kinases and heat shock protein HSP90 in human hematopoietic cell lines. *Jpn. J. Cancer Res.* 90: 60-68 (1999)
 9. Sueoka, E., Sueoka, N., Kai, Y., Okabe, S., Suganuma, M., Kanematsu, K., Yamamoto, T. and Fujiki, H. Anticancer activity of morphine and its synthetic derivative, KT-90, mediated through apoptosis and inhibition of NF- κ B activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 252: 566-570 (1999)
 10. Sueoka, E., Sueoka, N., Okabe, S., Komori, A., Suganuma, M., Kozu, T. and Fujiki, H. Tumorigenicity of MTG8, a leukaemia related gene, in concert with v-Ha-ras gene in BALB/3T3 cells. *Br. J. Haematol.* 101: 737-742 (1998)
 11. Sueoka, N., Sueoka, E., Miyazaki, Y., Okabe, S., Kurosumi, M., Takayama, S. and Fujiki, H. Molecular pathogenesis of interstitial pneumonitis with TNF- α transgenic mice. *Cytokine* 10: 124-131 (1998)
 12. Suga, K., Imai, K., Sueoka, N. and Nakachi, K. Phase I clinical trial with green tea tablets in a Japanese healthy population. *Cancer Prev. Int.* 3: 79-88 (1998)
 13. Nakachi, K., Suemasu, K., Suga, K., Takeo, T., Imai, K. Higashi, Y. Influence of drinking green tea on breast cancer malignancy among Japanese patients. *Jpn. J. Cancer Res.* 89:254-261 (1998)
 14. Iwase, K., Iyama, K.-i., Akagi, K., Yano, S., Fukunaga, K., Miyamoto, E., Mori, M. and Takiguchi, M. Precise distribution of neuronal nitric oxide synthase mRNA in the rat brain revealed by non-radioisotopic in situ hybridization. *Mol. Brain Res.* 53: 1-12 (1998)
 15. Okabe, S., Ochiai, Y., Aida, M., Park, K., Kim, S.-J., Nomura, T., Suganuma, M. and Fujiki, H. Mechanistic aspects of green tea as cancer cell lines., *Jpn. J. Cancer Res.* in press (1999)
 16. Okabe, S., Suganuma, M., Tada, Y., Ochiai, Y., Sueoka, E., Kohya, H., Shibata, A., Takahashi, M., Mizutani, M., Matsuzaki, T., and Fujiki, H. Disaccharide esters screened by inhibition of tumor necrosis factor- α release are new anti-cancer agents. *Jpn. J. Cancer Res.*, in press (1999).
 17. Okabe, S., Sueoka, N., Komori, A., Suganuma, M., Endo, Y., Shudo, K. and Fujiki, H. Twist form of teleocidin derivatives is active in *in vivo* tumor promotion by (-)-benzolactam-V8-310. *Biol. Pharm. Bull.* 21(5): 465-468 (1998)
2. 学会発表
省略する。
 - G. 知的所有権の取得状況
 1. 特許取得
 2. 実用新案登録
 3. その他

緑茶成分の臓器分布と細胞内局在に関する研究

分担研究者 菅沼雅美・末岡 栄三朗 埼玉県立がんセンター研究所 主任研究員

研究要旨：緑茶は4種類の茶ポリフェノール、EGCG、ECG、EGC、及びECを含んでいる。非放射活性のEGCG、ECGとEGCは、³H-EGCGのPC-9細胞への取り込みを抑制した。しかし、不活性型のECは逆に³H-EGCGの取り込みを促進した。この結果から、ECがガロイル基を持つ茶ポリフェノールの取り込みを促進して、茶ポリフェノールの活性を促進すると考えた。ECとEGCGの相乗効果をPC-9細胞のアポトーシス誘導で検討した。ECは濃度依存性に、EGCGが誘導するDNAフラグメンテーションを促進することを見いだした。がん予防における緑茶の重要性が確認された。更に、EGCGと大腸がん予防薬、sulindacあるいはEGCGと乳がん予防薬tamoxifenの併用が、PC-9細胞のアポトーシスを相乗的、あるいは、相加的に誘導することを見いだした。緑茶が、がん予防薬の効果を増強して副作用を軽減する効果を持つ可能性を示した。

A. 研究目的

緑茶はヒトのがん予防に役立つ物質として注目されている。その中で、緑茶成分の臓器分布や培養細胞内の局在などを明らかにすることが求められている。私どもは、³H-EGCGを用いて研究を進めている。本年度は、不活性型のECが³H-EGCGのPC-9細胞への取り込みを促進した結果を基に、ECとEGCGの相乗効果、更に、EGCGとがん予防薬、sulindacとtamoxifenとの相乗効果について検討を進めた。

B. 研究方法

1) ³H-EGCGの細胞内取り込み

³H-EGCG 100 μMをヒト肺がん細胞株PC-9 (2 × 10⁵ cells/ml) に2時間処理した後、細胞を溶解して細胞内に取り込まれた放射活性を測定した。この際、非放射活性の茶ポリフェノール、EGCG、EGC、ECG及びECあるいは、caffeineを加えて細胞に取り込まれた³H-放射活性を測定した。

2) PC-9細胞のアポトーシス誘導

アポトーシスの誘導はDNAフラグメンテーションで測定した。PC-9細胞 (2 × 10⁵ cells/ml) をEC単独、EGCG単独、EC+EGCG、EGCG+sulindac、EGCG+tamoxifen、sulindac単独、あるいは、tamoxifen単独で2日間処理した。その後、細胞質を分離し、細胞内のオリゴヌクレアソームの量を抗DNA抗体と抗ヒストン抗体をもちいたELISA法で測定した。

C. 研究結果

1) ECによる³H-EGCGの細胞内取り込みの促進

³H-EGCGでヒト肺がん細胞株、PC-9細胞を2時間処理すると、10⁶細胞あたり、約1.2 × 10⁵ dpmの³H放射活性取り込まれた。EGCG、ECGあるいはEGCは³H-EGCGの取り込みを抑制した。この結果は、ガロイル基を持つ茶ポリフェノールはEGCGと同様の機構で細胞に取り込まれることを示した。しかし、不活性型のECは逆に³H-EGCGの取り込みを促進した。従って、ECはガロイル基を持つ茶ポリフェノールの取り込みを促進して、その効果を増強すると推測された。

2) アポトーシス誘導におけるECとEGCGの相乗効果

ECは200 μMの濃度まで、ほとんどPC-9細胞のアポトーシスを誘導しない。しかし、ECを75 μMのEGCGと同時に処理すると、EGCGによるアポトーシスの誘導を濃度に依存して促進した。更に、ECはガロイル基をもつECGとEGCによるアポトーシスの誘導も促進した。従って、ECは取り込みを促進して、茶ポリフェノールの作用を増強したと考えられた。

3) EGCGとsulindacあるいはEGCGとtamoxifenとの併用効果

茶ポリフェノールの相乗効果の研究から、次に、EGCGとほかのがん予防薬との併用効果の検討に進めた。EGCG+sulindac、EGCG+sulindac sulfideあるいは、EGCG+tamoxifenの併用効果をPC-9細胞のアポトーシス誘導で検討した。75 μMのEGCGは5、10、

50、100、200 μ Mのsulindacによるアポトーシスを8~20倍亢進した。更に、活性型のsulindac sulfideは1 μ Mではほとんどアポトーシスを誘導しないが、75 μ MのEGCGとの同時処理で、著しい誘導を示した。すなわち、EGCGはsulindacの効果を相乗的に促進することが明らかとなった。一方、EGCGとtamoxifenとの併用は、相乗効果ではなく、むしろ、相加的な効果であった。

D. 考察

1) 緑茶には4種類の茶ポリフェノールが含まれる。不活型のECが、活性をもつ茶ポリフェノールの取り込みを促進して効果を增強していることが明らかとなった。この結果は、がん予防における緑茶そのものの重要性を示した。

2) EGCGが大腸がんの予防薬であるsulindacと相乗的に作用し、また、乳がんの予防薬であるtamoxifenと相加的に作用することを初めて見いだした。EGCGの併用効果が、大腸がんの予防及び、乳がんの予防で期待される。まず、発がん実験でEGCGとがん予防薬との併用効果を検討する計画である。更に、大腸がんあるいは、乳がんの患者について、緑茶の飲用とsulindacあるいは、tamoxifenとの併用効果について検討することも必要と考える。

E. 結論

緑茶の飲用ががん予防薬の効果を增強し、副作用を軽減させる可能性が今回の結果から示唆された。緑茶によるがん予防を、がん予防薬との併用によって、がん治癒後の2次がんの予防にも応用できると考える。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Suganuma, M., Okabe, S., Sueoka, N., Sueoka, E., Matsuyama, S., Imai, K., Nakachi, K., and Fujiki, H., Green tea in cancer chemoprevention. *Mutat. Res.*, in press (1999).
- 2) Fujiki, H., Suganuma, M., Okabe, S., Sueoka, E., Suga, K., Imai, K., Nakachi, K. and Kimura, S. Mechanistic findings of green tea as cancer preventive for humans. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* in press (1999)
- 3) Fujiki, H. and Suganuma, M. Mechanistic aspects of the okadaic acid class compounds, non-12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate type tumor promoters. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 125: 150-155s(1999)

- 4) Suganuma, M., Okabe, S., Kai, Y., Sueoka, N., Sueoka, E. and Fujiki, H. Synergistic effects of (-)-epigallocatechin gallate with (-)-epicatechin, sulindac, or tamoxifen on cancer preventive activity in human lung cancer cell line, PC-9. *Cancer Res.* 59: 44-47 (1999)
- 5) Otsuka, T., Ogo, T., Eto, T., Asano, Y., Suganuma, M., and Niho, Y. Growth inhibition of leukemic cells by(-)-epigallocatechin gallate, the main constituent of green tea. *Life Science*, 63, 1397-1403 (1998).
- 6) Suganuma, M., Okabe, S., Oniyama, M., Tada, Y., Ito, H. and Fujiki, H. Wide distribution of 3 H-(-)-epigallocatechin gallate, a cancer preventive tea polyphenol, in mouse tissue. *Carcinogenesis* 19: 1771-1776 (1998)
- 7) Fujiki, H., Suganuma, M., Okabe, S., Sueoka, N., Komori, A., Sueoka, E., Kozu, T., Tada, Y., Suga, K., Imai, K. and Nakachi, K. Cancer inhibition by green tea. *Mutat. Res.* 402: 307-310 (1998)
- 9) Fujiki, H., Suganuma, M., Komori, A., Okabe, S., Sueoka, E., Sueoka, N., Kozu, T. and Tada, Y. Natural inhibitors of carcinogenesis. In "Clinical and Biological Basis of Lung Cancer Prevention" (eds. Y. Martinet, F.R. Hirsch, N. Martinet, J.-M. Vignaud, J.L. Mulshine,) Birkhauser Verlag Basel, Switzerland, pp.285-290 (1998)

2. 学会発表

省略する。

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他

厚生科学研究費補助金（がん克服戦略研究事業）
分担研究報告書

ヒトへの薬剤投与による研究

分担研究者 中地 敬 埼玉県立がんセンター研究所 主任研究員
赤木 究 埼玉県立がんセンター研究所 研究員

研究要旨 緑茶飲用が乳がんの臨床的特性及び再発に与える影響を、原発乳がん患者472人の追跡調査によって明らかにした。すなわち、乳がん発症にいたるまでの長期の緑茶飲用量の増加に伴って、再発に重要な乳がんの臨床的特性であるエストロゲンレセプターとプロゲステロンレセプターの発現は亢進し、腋窩リンパ節転移は減少する。その結果、I期II期乳がんにおける再発は、緑茶の飲用量の多い患者で低かった。

A. 研究目的

緑茶飲用の乳がん再発抑制効果を乳がん患者コホート研究により検証する。

B. 研究方法

1984～1993年に手術目的で埼玉県立がんセンター病院に入院した原発乳がん患者472人（I期117人、II期273人、III期82人）を対象とし、入院時に緑茶飲用を含む生活習慣・ホルモン関連事項（初潮年齢、閉経年齢、出産など）に関する疫学面接調査を行った。さらに、この乳がん患者コホートの追跡調査（平均観察期間6.5年）により、123人の再発が確認された。

C. 研究結果

（1）緑茶の飲用量と乳がんの臨床的特性の関係を検討した。緑茶飲用量と乳がん組織のエストロゲンレセプター蛋白の発現量は、飲用量に伴い増加する（ $P=0.07$ ）。また、閉経後患者のプロゲステロンレセプター蛋白の発現量は、やはり飲用量に依存して増加する（ $P<0.05$ ）。さらに、閉経前患者の転移腋窩リンパ節数は、緑茶飲用の増加に伴い減少する（ $P<0.05$ ）。しかし、この関係はI期・II期の乳がんにのみ認められ、III期乳がんでは見出されなかった。

（2）これらの臨床特性は乳がんの重要な予後因子であることから、再発との関連を検討した。一日の緑茶飲用量5杯以上（平均8杯）と4杯以下（平均2杯）に患者を分けた粗再発率は、I・II期合わせてそれぞれ16.7%（35/209）及び24.3%（44/181）であった（ $P<0.05$ ）。III期では再発率に違いはなかった。

（3）再発には、他の生活習慣・ホルモン関連事項なども関連している可能性がある。そこで、緑茶飲用と外科以外の治療に関連がないことを確かめた上で、面接調査で得たすべての疫学因子を考慮して、

乳がん再発の相対危険を検討した。I・II期乳がんでは、緑茶5杯以上の患者は4杯以下に比べ相対危険は0.564（95%信頼区間0.350-0.911）であった。

D. 考察

基礎研究では、緑茶は発がんの抑制だけでなく、メラノーマ細胞を用いたモデルにより微小転移を抑制することが報告されている。また、緑茶カテキンはリガンドとレセプターの相互作用を非特異的に阻害することにより、リガンド量に依存した発現を示すレセプター、例えばエストロゲンレセプター、に影響を与える可能性もある。本研究では、ステロイドホルモンレセプターの発現と腋窩リンパ節への微小転移が再発の重要なマーカーである乳がんの患者について、緑茶の飲用と臨床特性及び再発の関係を検討した。本研究の結果を、さらに培養細胞及び動物モデルによって検証することは重要であると考えられる。なぜなら、そのメカニズムを解明することにより、増殖因子とそのレセプターが重要な役割を果たす他のがんの進展についても、緑茶の可能性が示されるからである。

E. 結論

乳がん発症にいたるまでの長期の緑茶の飲用は、再発に重要な乳がんの臨床的特性、すなわちエストロゲンレセプターとプロゲステロンレセプターの発現及び腋窩リンパ節転移に影響を与えることが示された。その結果、I期II期の比較的早期の乳がんにおける再発は、緑茶の飲用量の多い患者で低かった。本研究で示された緑茶の飲用による再発の違いは、転移の有無あるいはレセプターの発現の有無といった従来の研究で指摘されている予後因子と比較すると小さく、かつ進行した乳がんの再発には影響しな

い。しかし、副作用のない再発の予防因子として緑茶は重要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Suga, K., Imai, K., Sueoka, N. and Nakachi, K.
Phase I clinical trial with green tea tablets in a Japanese healthy population. *Cancer Prev. Int.* 3: 79-88 (1998)
- 2) Nakachi, K., Suemasu, K., Suga, K., Takeo, T., Imai K. Higashi, Y. Influence of drinking green tea on breast cancer malignancy among Japanese patients. *Jpn. J. Cancer Res.* 89: 254-261 (1998)
- 3) Iwase, K., Iyama, K.-i., Akagi, K., Yano, S., Fukunaga, K., Miyamoto, E., Mori, M. and Takiguchi, M. Precise distribution of neuronal nitric oxide synthase mRNA in the rat brain revealed by non-radioisotopic in situ hybridization. *Mol. Brain Res.* 53: 1-12 (1998)

2. 学会発表

省略する。

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他

増殖抑制及び、ヤンゴーナの茶に関する研究

分担研究者 岡部 幸子 埼玉県立がんセンター研究所 研究員

研究要旨 Fiji島の住民は肺がん、胃がん、前立腺がんの発生率が他の島の住民に比較し極端に低いことが太平洋のがん疫学調査で報告されている。私共はFijiで飲用されているヤンゴーナの茶に注目した。ヤンゴーナの茶から単離したラクトン化合物KAVA-1とKAVA-2は、TNF- α の遊離を抑制した。ヤンゴーナの茶の飲用はFiji住民のがん予防に役立っていると考え研究を進めている。

A. 研究目的

Fiji島の住民のがん発生率は、他の南太平洋の島の住民に比較し、極端に低いことをDr. Brian Hendersonが発表した。私共は、いろいろな発がん抑制物質が共通してTNF- α の発現及び産生を抑制することを見出している。このことから、Fiji島での低い発がん発生率の理由を生活習慣の中からTNF- α 産生抑制を指標として検討した。

B. 研究方法

Fiji島では、ヤンゴーナの茶（別名カバ）と呼ばれるコショウ科の根汁を飲用する習慣がある。私共は、カバに注目してTNF- α 産生抑制物質を検索した。Fiji島より入手したカバ粉末をメタノールで抽出をした。得られた抽出物はシリカゲルクロマトグラフィーで分離した。次にBALB/3T3細胞に発がん促進物質オカダ酸を処理すると、培養上清中にTNF- α が遊離する。この系にカバ抽出物をオカダ酸を処理する1時間前に添加し、24時間後の培養上清中のTNF- α 遊離が抑制されるかELISA法を用いて測定した。

C. 研究結果

カバ粉末から得られたメタノール抽出液は、オカダ酸で誘導されるBALB/3T3細胞からのTNF- α 遊離を抑制した。メタノール抽出物は、シリカゲルクロマトグラフィーで分離した結果、約4種類の化合物の混合物であると推定された。更に精製を進め、主成分であるKAVA-1とKAVA-2を単離した。KAVA-1とKAVA-2は濃度依存性にTNF- α の遊離を抑制することを見出した。抑制の強さをオカダ酸だけの処理で遊離されるTNF- α 量を100%とし、50%抑制する濃度（IC₅₀）で比較すると、KAVA-1とKAVA-2のIC₅₀は48.7 μ Mと34.0 μ Mであった。一方、がん予防薬とし

て注目されている緑茶抽出物の主成分(-)-epigallocatechin gallate (EGCG)のIC₅₀は20 μ Mであるのに対し、KAVA-1とKAVA-2はほぼ同等の活性を持つことが示された。

D. 考察

カバの抽出物は、TNF- α の産生抑制活性を示した。その活性は緑茶に含まれるEGCGと同様に強いことを見出した。EGCGはTNF- α 遺伝子の発現を転写因子AP-1及び、NF- κ Bの活性化抑制を介していることを見出している。KAVA-1及び2についても同様の作用機構でTNF- α 産生を抑制しているか検討を進めている。Fiji島ではヤンゴーナの茶の飲用が、既になん予防物質として作用していると考えている。

E. 結論

Fiji島で飲用されているヤンゴーナの茶から、TNF- α 産生抑制物質を見出し、活性物質KAVA-1とKAVA-2を単離した。ヤンゴーナの茶の飲用がFiji島の低い肺がん発生をもたらししていると推測する。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Okabe, S., Ochiai, Y., Aida, M., Park, K., Kim, S-J., Nomura, T., Suganuma, M., and Fujiki, H. Mechanistic Aspects of green tea as cancer prevention on human stomach cancer cell lines. Jpn. J. Cancer Res. in press (1999)
- 1) Okabe, S., Suganuma, M., Tada, Y., Ochiai, Y., Sueoka, E., Kohya, H., Shibata, A., Takahashi, M., Mizutani, M., Matsuzaki, T., and Fujiki, H. Disaccharide esters screened by inhibition of tumor necrosis factor- α release are new anti-cancer agents.

Jpn. J. Cancer Res., (1999) in press.

- 2) Sueoka, E., Sueoka, N., Kai, Y, Okabe, S., Suganuma, M., Kanematsu, K., Yamamoto, T. and Fujiki, H. Anticancer activity of morphine and its synthetic derivative, KT-90, mediated through apoptosis and inhibition of NF- κ B activation. Biochem. Biophys. Res. Commun. 252: 566-570 (1999)
- 3) Sueoka, E., Sueoka, N., Okabe, S., Komori, A., Suganuma, M., Kozu, T. and Fujiki, H. Tumourgenicity of MTG8, a leukaemia related gene, in concert with v-Ha-ras gene in BALB/3T3 cells. British J. Haematol. 101: 737-742 (1998)
- 4) Okabe, S., Sueoka, N., Komori, A., Suganuma, M., Endo, Y., Shudo, K. and Fujiki, H. Twist form of teleocidin derivatives is active in *in vivo* tumor promotion by (-)-benzolactam-V8-310. Biol. Pharm. Bull. 21(5): 465-468 (1998)
- 5) Sueoka, N., Sueoka, E., Miyazaki, Y., Okabe, S., Kurosumi, M., Takayama, S. and Fujiki, H. Molecular pathogenesis of interstitial pneumonitis with TNF- α transgenic mice. Cytokine 10: 124-131 (1998)

2. 学会発表

省略する。

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他

