

厚生科学研究費補助金
長寿科学総合研究事業
研究報告書

平成10年度.

緑茶による老年病予防に関する研究

(H10-長寿-021)

埼玉県立がんセンター研究所

菅沼 雅美

緑茶による老年病予防に関する研究

主任研究者 菅沼雅美 埼玉県立がんセンター研究所 主任研究員

研究要旨： 緑茶による老年病の予防について、 ^3H -EGCGを用いた薬理学的研究、及び、疾患モデルマウスを用いた研究を行った。 ^3H -EGCGを、雄あるいは雌マウスの胃に直接投与すると、放射活性は血液中や全身の臓器で認められた。経口摂取した茶ポリフェノールは、消化管以外の遠隔臓器、例えば、脳や肺に到達することが示された。腫瘍壊死因子（TNF- α ）はがん、動脈硬化や糖尿病等の老年病の発症や進展に関与するサイトカインである。EGCG、ECGやEGC等の茶ポリフェノールはヒト胃がん細胞株、KATO IIIやBALB/3T3細胞からのTNF- α の遊離を抑制した。EGCGは転写因子AP-1やNF- κ Bの活性化を抑制してTNF- α 遺伝子発現を抑制した。更に、不活性型のECがEGCGの取り込みを促進して、TNF- α の遊離抑制効果を増強することを見いだした。すなわち、緑茶の方が、EGCG単独よりも老年病の予防において有効であると考えられる。次に、間質性肺炎のモデルであるTNF- α トランスジェニックマウスに0.1%の緑茶抽出物を4ヶ月間飲用させた。緑茶抽出物の飲用がTNF- α トランスジェニックマウスの肺におけるTNF- α 遺伝子更に、IL-6やIL-10遺伝子の発現を抑制することを見出した。

分担研究者

菅沼雅美 埼玉県立がんセンター研究所 主任研
松島芳文 埼玉県立がんセンター研究所 主任研
岡部幸子 埼玉県立がんセンター研究所 研究員

A. 研究目的

高齢者の主な疾患であるがん、動脈硬化、循環器疾患、及び、糖尿病などの老年病に対する効果的な予防法の確立が望まれている。緑茶にはいろいろな茶ポリフェノールが含まれ、それぞれ抗酸化作用をもちヒトの健康と長寿に役立つと推測されている。埼玉県のある地域住民を対象とした前向きコホート研究は、緑茶を一日10杯以上飲むヒトは3杯以下のヒトに比べ、虚血性心疾患や糖尿病の有病率が低いことを見出した。即ち、緑茶が老年病の予防に役立つことが示唆された。本研究は、緑茶による老年病の予防について、 ^3H -(-)-epigallocatechin gallate (^3H -EGCG)を用いた薬理学的研究、及び、生化学的、分子生物学的な研究を行い、科学的データを提示することを目的とする。次に、疾患モデルマウスとして、自然発症の高脂血症（Spontaneously hyperlipidemic : SHL）マウス、間質性肺炎のモデルとなるTNF- α トランスジェニックマウス等を用い、緑茶の老年病に対する予防効果を証明することを目的とする。

B. 研究方法

(1) ^3H -EGCGを用いた薬理学的研究

^3H -EGCG 3.7 MBqを含む0.05% EGCG溶液をCD-1マウス雄あるいは雌に、経口ゾンデで直接胃に投与した。その後、経時的に血液、尿、糞便、及び臓器を採取し、オキシダイザーで放射活性を測定した。尿中の放射活性はHPLCで分析した。尿はC₁₈のカートリッジカラムで前処理した後、逆相カラムYMC Pack ODS-A、溶媒：水：メタノール：酢酸（80：16：4）で分析し、280 nmの吸収と ^3H 放射活性を測定した。

(2) 茶ポリフェノールによるTNF- α 産生抑制に関する研究

i) TNF- α 遊離の抑制

ヒト胃がん細胞株 KATO III (2×10^5 cells/well)を茶ポリフェノールで処理した。その1時間後、発がんプロモーター、オカダ酸（50 nM）を加えて更に24時間培養した。培養液中に遊離されたTNF- α をELISA法を用いて測定した。オカダ酸によるTNF- α の遊離を100%として表した。

PE501/TNF細胞は、ヒトTNF- α cDNAを組み込んだレトロウイルスベクターの導入によって、持続的にTNF- α を産生して、培養液中に遊離する細胞である。この細胞を茶ポリフェノールで2時間処理した後、培養液中のTNF- α 量をELISA法で測定

し、その抑制効果を検討した。

ii) TNF- α 遺伝子発現の抑制

茶ポリフェノールによるTNF- α 遺伝子発現の抑制は、RT-PCR法で検討した。上記と同様に茶ポリフェノールとオカダ酸を8時間後処理し、AGPC法によって総RNAを得た。総RNA 1 μ gを逆転写酵素によってcDNAとして、TNF- α のプライマーを用いて³²P-dCTP存在下で、PCRを行った。PCR産物の量は、³²PのカウントをBASイメージアナライザーで測定した。この際、GAPDH遺伝子の発現をコントロールとした。

iii) 転写因子AP-1及びNF- κ Bの活性化の抑制
茶ポリフェノール及びオカダ酸で処理した細胞から、核抽出物を調整した。その核抽出物を予め³²PでラベルしたAP-1結合サイトのオリゴヌクレオチド、あるいは、NF- κ B結合サイトのオリゴヌクレオチドとincubateし、ゲルシフト法によって、転写因子の活性化に対する影響するを検討した。

(3) ECとEGCGの相乗効果

i) ECによる³H-EGCGのPC-9細胞への取り込みの促進

ヒト肺がん細胞株PC-9 (2 x 10⁵ cells/ml) を³H-EGCG 100 μ Mの存在下で2時間培養した後、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、(-)-epigallocatechin (EGC)、(-)-epicatechin gallate (ECG) 及び(-)-epicatechin (EC) を加えて細胞に取り込まれた放射活性を測定した。

ii) TNF- α 遊離抑制におけるECとEGCGの相乗効果

EC + EGCG、EGCG単独、あるいは、EC単独でBALB/3T3細胞 (2 x 10⁵ cells/well) を処理した。その1時間後に、200 nMのオカダ酸を加えた。更に、24時間培養して培養液中のTNF- α をELISA法で測定した。

(4) 自然発症高脂血症 (SHL) マウスの解析

SHLマウスはapolipoprotein Eの欠損によって、高脂血症を自然発症するマウスであり、埼玉県立がんセンター研究所で維持している。SHLマウスは普通飼料で飼育し、経時的に血液を採取して、血清総コレステロール値をフジドライケムシステムで測定した。動脈硬化については、病理組織学的に検索し、大動脈起始部に生じた動脈硬化巣の切断面の厚さを測定した。

(5) 間質性肺炎のモデルであるTNF- α トランスジェニックマウスにおける緑茶抽出物のサイトカイン発現の抑制

Surfactant protein C遺伝子のプロモーターに、マ

ウスTNF- α の全コーディング領域を接続したキメラ遺伝子を導入したトランスジェニックマウスでは、肺胞II型上皮細胞において、TNF- α が特異的に発現する。TNF- α の高発現に伴い、ヒトの間質性肺炎に良く類似した病理組織像を示し、また、IL-6やIL-10等のサイトカインの発現も増加することを見出している。TNF- α トランスジェニックマウスに緑茶抽出物を0.1%の濃度で、生後直後から、4ヶ月間飲用させた。実験群は、TNF- α トランスジェニックマウスに水を飲用させた未処理群と緑茶抽出物飲用群の2群と正常マウスの未処理群と緑茶抽出物飲用群の2群の、合計4群とした。肺から総RNAを抽出し、TNF- α 、IL-1 β 、及びIL-10遺伝子の発現を定量的RT-PCR法で測定した。この際、GAPDH遺伝子の発現をコントロールとして発現量をunitで表した。更に、肺組織における炎症については病理組織学的に検討した。

C. 研究結果

1) ³H-EGCGを用いた薬理学的研究

³H-EGCGをマウス胃に直接経口ゾンデで投与し、経時的に血液、臓器、糞便、及び尿の放射活性を測定した。血液中の放射活性は、³H-EGCG投与1時間後から認められ、雄：22.0 x 10³ d.p.m./ml、雌：24.0 x 10³ d.p.m./mlであった。その後、放射活性は徐々に増加し、6時間後で、雌：235.0 x 10³、雄：189.0 x 10³ d.p.m./ml、24時間後で雌：288.0 x 10³、雄：269.0 x 10³ d.p.m./mlであった。24時間後の全血液中の放射活性は、投与した約2%に相当した。尚、この放射活性は、³H-EGCGだけでなく、³H-EGCGの代謝産物、更に、それぞれが蛋白質に結合したもの等の総和である。

また、雄、雌ともに、全身のほとんどの臓器で有意な放射活性が認められた。放射活性は、投与24時間後まで徐々に増加した。たとえば、脳の放射活性は、雌：1.7~22.5 x 10³、雄：1.3~17.3 x 10³ d.p.m./100 mg 組織であった。即ち、EGCGは消化管だけでなく、吸収されて遠隔臓器にも到達することが示唆された。

投与した放射活性の6.4% (雄)、6.6% (雌) が尿中に、33.1% (雄)、37.7% (雌) が糞便中に投与24時間で排泄された。尿中の放射活性をHPLCで分析すると、溶出時間7分に³H-EGCGのピークが認められた。他に5つの³H-放射活性のピークが検出された。これらは、EGCGの代謝産物と考えられる。HPLC分析から、投与した³H-EGCGの0.03~0.59%が³H-EGCGとして尿中に排泄されることが示

された。即ち、飲用した茶ポリフェノールは吸収されて、血液中に取り込まれ、全身の臓器に到達していることが示された。

(2) 茶ポリフェノールによるTNF- α 産生抑制に関する研究

TNF- α はいろいろな老年病の発症や進展に関与しているサイトカインである。茶ポリフェノールによるTNF- α 産生抑制とその作用機構について検討した。

i) TNF- α 遊離の抑制

茶ポリフェノール、EGCG、EGC及び、ECは、KATO III細胞からのTNF- α の遊離を濃度に依存して抑制した。50%の抑制濃度 (IC_{50}) は、EGCG : 48 μ M、ECG : 26 μ M、EGC : 210 μ Mであった。しかし、ECは 500 μ Mの濃度まで、全く抑制を示さなかった。BALB/3T3細胞を用いても、同様の結果が得られた。この結果から、ガロイル基を含む茶ポリフェノールはTNF- α 遊離抑制活性をもつことが明らかとなった。

PE501/TNF細胞は持続的にTNF- α を産生して培養液中に遊離する。例えば、 1×10^4 細胞は2時間で、ヒトTNF- α 400 pg/mlを培養液中に遊離する。EGCGの処理は、濃度依存的にTNF- α の遊離を抑制し、500 μ Mの濃度で80%の抑制を示した。即ち、EGCG、及び、茶ポリフェノールはオカダ酸によるTNF- α の遊離だけでなく、遺伝子操作による強制的なTNF- α の遊離も抑制した。

ii) TNF- α 遺伝子発現の抑制

オカダ酸処理は、KATO III細胞でTNF- α 遺伝子の発現を誘導してTNF- α 遊離をもたらす。EGCGの前処理は、濃度依存性にTNF- α 遺伝子の発現を抑制し、500 μ Mの濃度では、約80%の抑制を示した。即ち、EGCGによるTNF- α 遺伝子発現の抑制は、TNF- α 遊離抑制の結果と良く一致した。従って、茶ポリフェノールは、オカダ酸によるTNF- α 遺伝子の発現を抑制し、その結果、TNF- α 遊離を抑制していると考えられる。

iii) 転写因子AP-1及びNF- κ Bの活性化の抑制

オカダ酸をBALB/3T3細胞、あるいは、KATO III細胞に処理すると、AP-1及びNF- κ Bの活性化が強く誘導される。この系で、EGCGの抑制効果を検討した。EGCGの処理は、BALB/3T3細胞では、AP-1及びNF- κ Bの活性化を共に抑制した。一方、KATO III細胞では、EGCGはAP-1及びNF- κ Bの活性化を抑制しなかった。KATO III細胞ではTNF- α 遺伝子発現を制御している他の転写因子の活性化をEGCGが抑制していると推測される。

(3) ECとEGCGの相乗効果

i) ECによる 3 H-EGCGのPC-9細胞への取り込みの促進

3 H-EGCGをヒト肺がん細胞株、PC-9に処理すると、 3 H-EGCGは細胞に取り込まれ、その取り込まれた量は 3 H放射活性として測定できる。この系に非放射活性のEGCGを加えると 3 H-EGCGの取り込みが抑制された。更に、ECGとEGCはEGCGと同様に、 3 H-EGCGの取り込みを濃度依存性に抑制した。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、ガロイル基を持たないECは逆に 3 H-EGCGの取り込みを促進した。例えば、500 μ MのECは約1.5倍に 3 H-EGCGの取り込みを促進した。この結果から、ECは他の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考えた。

ii) TNF- α 遊離抑制におけるECとEGCGの相乗効果

ECとEGCGの相乗効果をTNF- α 遊離抑制で検討した。EGCGは濃度依存性に、BALB/3T3細胞からのTNF- α 遊離を抑制し、50%の抑制濃度 (IC_{50}) は60 μ Mであった。一方、100 μ MのECはそれ自身では全く抑制示さないが、EGCGと一緒に処理すると、EGCGの IC_{50} を15 μ Mへと低い濃度にシフトした。即ち、ECは、EGCGのTNF- α 産生抑制効果を約4倍増強した。更に、ECとEGCGの同時処理は、ECGの IC_{50} を30 μ Mから7 μ Mにシフトして、約4倍の増強した。すなわち、不活性型の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、相乗的に作用していることが示唆された。

(4) 自然発症高脂血症 (SHL) マウスの解析

SHLマウスを用いて、茶ポリフェノールの高脂血症に対する抑制効果を検討するために、まず、血清総コレステロールの経時的な変化、及び、動脈硬化について解析した。SHLマウスは普通飼料の飼育によって、高い血清総コレステロール値を示した。特に、生後6週齢までは、2000 mg/dlを越えるほどの高い値を示す個体も認められた。これは、正常マウスの20倍に相当する。6週齢以降は徐々に減少し、8週齢以降ではほとんどのマウスが約1000 mg/dlの値を示した。動脈硬化病変は大動脈起始部に限局していた。また、皮膚黄色腫は加齢に伴って進展した。これらの結果から、茶ポリフェノールの効果の判定には、8週齢以降から20週齢の間が適当であり、血清総コレステロール値と大動脈起始部の動脈硬化病変が客観的な指標と

なると考える。

(6) 間質性肺炎のモデルであるTNF- α トランスジェニックマウスにおける緑茶抽出物のサイトカイン発現の抑制

水を飲用させた未処理群のTNF- α トランスジェニックマウスの肺では、強いTNF- α 遺伝子の発現が認められ、660 unitであった。一方、0.1%の緑茶抽出物を4ヶ月飲用させたTNF- α トランスジェニックマウスの肺では、TNF- α 遺伝子発現は570 unitと86%に抑制された。更に、緑茶抽出物の飲用はIL-1 β の遺伝子発現を1470 unitから1280 unitに、また、IL-10遺伝子発現も、500 unitから370 unitに減少させた。緑茶抽出物によるIL-1 β 、及びIL-10遺伝子発現の抑制効果は、TNF- α 遺伝子発現の抑制効果と一致していた。一方、正常マウスの肺では、元々、IL-1 β 、及びIL-10遺伝子が弱く発現している。この発現に関しては、緑茶抽出物の飲用は全く影響しなかった。従って、緑茶の飲用は、TNF- α の発現によって二次的に誘導されたIL-1 β 、及びIL-10遺伝子の発現を抑制すると考えられる。病理組織学的には、未処理群の緑茶抽出物処理群の間に差は認められなかった。

D. 考察

(1) ^3H -EGCGを経口的に投与した後、放射活性は血液やいろいろな全身の臓器に認められた。この結果は、緑茶の標的臓器が幅広いことを示唆する。また、尿のHPLC分析の結果から、EGCGは少なくとも5つの代謝産物と共に尿中に排泄されていることがわかった。体内では沢山な代謝産物が産生されていることを示す。更に、EGCGなどのタンニンは蛋白質に結合しやすい性質を持つので、蛋白質に結合したEGCGや代謝産物を含めて測定できるような系を開発することが必要である。

脳に、比較的高い放射活性が認められたので、EGCG等の茶ポリフェノールが脳血液関門を通過すると考えられる。緑茶が脳疾患の予防にも役立つと考えられる。

(2) TNF- α は糖尿病や動脈硬化の発症や進展に関与する炎症性サイトカインである。茶ポリフェノールがTNF- α 産生を抑制していることを見出した。EGCGはBALB/3T3細胞では、転写因子AP-1やNF- κ Bの活性化を抑制して、TNF- α 遺伝子発現を抑制した。また、KATO III細胞では、他の転写因子の活性化も抑制していると推測される。更に、EGCGはPE501/TNF細胞からのTNF- α 遊離を抑制した。TNF- α の遊離を制御しているメタロプロテアー

ゼの活性を茶ポリフェノールが抑制する可能性を示唆した。即ち、茶ポリフェノールは、TNF- α の遺伝子発現から、遊離に至るまでのいろいろなプロセスを抑制している可能性が示唆された。

(3) 緑茶に含まれる茶ポリフェノールの中で、不活型のECが、EGCGの取り込みを促進して、EGCGの効果を増強していることが明らかとなった。更に、ECは他の茶ポリフェノールとも相乗的に作用した。この結果は、緑茶そのもので茶ポリフェノール単独よりも有効な老年病の予防効果が期待できることを示唆する。

(4) 自然発症高脂血症 (SHL) マウスはapolipoprotein E遺伝子の異常によって、アポE蛋白質を欠損しているマウスである。高い血清中の総コレステロール値が緑茶の飲用によって抑制されるか検討を進めている。

(5) TNF- α トランスジェニックマウスの肺におけるTNF- α 遺伝子の発現及び、IL-1 β 、及びIL-10遺伝子の発現を緑茶の飲用が抑制する傾向を示した。TNF- α 遺伝子はSurfactant protein C遺伝子のプロモーターによって強制的に発現させられているため、その抑制効果が弱いと考えられる。TNF- α 蛋白質について検討すれば、緑茶の効果がより強く認められるのではないかと考える。経口的に投与した ^3H -EGCGは肺に到達することを見出しているが、その量は、投与した0.2%程度である。肺への新たな投与方法を開発することも必要と考えられる。

E. 結論

経口的に飲用した茶ポリフェノールは、脳にも分布することが示され、脳疾患の予防にも緑茶が有効であると期待される。更に、茶ポリフェノールが互いに相乗的に作用していることから、老年病の予防において、緑茶はより効果的な飲み物であると考えられる。

TNF- α は様々な疾患に関与する炎症性サイトカインであり、TNF- α の発現が、サイトカインネットワークを介して次の様々なサイトカインの発現をもたらす。茶ポリフェノールは、TNF- α 遺伝子の発現、及び遊離を抑制し、サイトカインネットワークによる二次的なサイトカインの発現も抑制することが明らかとなった。

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) Takahashi, K., Nomura, T., Horie, M., Suganuma, M., Okabe, S. and Fujiki, H. A tumor-promoting triterpenoid from *Iris tectorum*. *J. Natl. Prod.*, in press (1999)
 - 3) 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)
 - 5) 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.* 125:150-155 (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.* in press (1999)
 - 6) 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)
 - 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 tissue. *Carcinogen*. 19: 1771-1776 (1998)
 - 8) 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
 - 10) 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).
 - 11) 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)
 - 12) 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. Biol. Res. Commun.* 252: 566-570 (1999)
 - 13) 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. Haemat.* 101: 737-742 (1998)
 - 14) 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)
 - 15) 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)
 - 16) Matsushima, Y., Hayashi, S., Tachibana, M. Spontaneously hyperlipidemic (SHL) mice: Japanese wild mice with apolipoprotein E deficiency. *Mammalian Genome.* 10: 352-357 (1999)
2. 学会発表
- 緑茶のがん予防効果における相乗作用
菅沼雅美、岡部幸子、末岡尚子、末岡榮三朗、藤木博太
第57回日本癌学会総会記事, p94,1998.
- Green tea and cancer
Masami Suganuma
International Symposium on Tea and Health, p15
1998.

Green tea in Cancer Prevention

Suganuma, M., Okabe, S., Sueoka, N.,
Sueoka, E., Matsuyama, S., Imai, K.,
Nakachi, K., and Fujiki, H.

3rd International Conference on Environmental
Mutagens in Human Population 1998.

岡部幸子、菅沼雅美、神谷英彦、藤木博太
TNF- α 遊離抑制を指標として見出したタバコの
葉に含まれる新しい発がん抑制物質
第57回日本癌学会総会記事, p320, 1998.

松島芳文

マウスアポEタンパクの多型現象と脂質代謝モ
デル
第45回日本実験動物学会総会 講演要旨,
p125,1998.

松島芳文

高脂血症マウス：ノックアウトマウスと自然発
症マウスの比較から学んだこと
第21回日本分子生物学会年会, p333, 1998.

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
分担研究報告書

緑茶に関する研究、及び、³H-EGCGの薬理学的研究とコレステロール合成の抑制

主任研究者 菅沼雅美 埼玉県立がんセンター研究所 主任研究員

研究要旨：³H-EGCGをCD-1マウス雄あるいは雌の胃に直接投与して体内動態を検討した。投与1時間後から放射活性は、血液や全身の臓器に認められ、24時間まで徐々に増加した。たとえば、脳の放射活性は、雌：1.7～22.5 x 10³、雄：1.3～17.3 x 10³ d.p.m./100 mg 組織であった。尿中の放射活性をHPLCで分析した結果、わずかではあるが、³H-EGCGそのものが尿中に排泄されることを見出した。経口摂取した茶ポリフェノールは吸収され、全身の臓器に広く分布することが示唆された。緑茶には4種類の茶ポリフェノールが含まれる。不活性型の茶ポリフェノールであるECが、³H-EGCGの細胞への取り込みを促進することを見出した。この結果を基に、ECとEGCG、又、ECとECGが相乗的にTNF-αの遊離を抑制することを見出した。即ち、EGCGでなくとも緑茶そのもので、老年病の予防効果が期待できると考えられる。

A. 研究目的

高齢者の主な疾患であるがん、動脈硬化、循環器疾患、及び、糖尿病などは老年病に対する効果的な予防法の確立が望まれている。緑茶にはいろいろな茶ポリフェノールが含まれ、それぞれ抗酸化作用をもちヒトの健康と長寿に役立つと推測されている。埼玉県のある地域住民を対象とした前向きコホート研究は、緑茶を一日10杯以上飲むヒトは3杯以下のヒトに比べ、虚血性心疾患や糖尿病の有病率が低いことを見出した。即ち、緑茶が老年病の予防に役立つことが示唆された。本研究は、緑茶による老年病の予防について、³H(-)-epigallocatechin gallate (³H-EGCG)を用いた薬理学的研究、及び、生化学的、分子生物学的な研究を行い、科学的データを提示することを目的とする。本年度は、まず、³H-EGCGを経口的にマウスに投与し、体内動態と代謝産物について検討した。更に、緑茶に含

まれる不活性型のECが³H-EGCGの細胞へ取り込みを促進することを見出した。この結果から、ECとEGCGが相乗的に作用すると考えた。腫瘍壊死因子（TNF-α）はがん、動脈硬化、糖尿病等の老年病の発症や進展に関与するサイトカインであるので、TNF-α産生抑制の面からECとEGCGの相乗効果について研究を進めた。

B. 研究方法

1) ³H-EGCGを用いた薬理学的研究

³H-EGCG 3.7 MBqを含む0.05%EGCG溶液をCD-1マウスの雄あるいは雌に、経口ゾンデで直接胃に投与した。その後、経時的に血液、尿、糞便、及び臓器を採取し、オキシダイザーで放射活性を測定した。

尿中の放射活性はHPLCで分析した。100 μlの尿に、100 μlの0.1 N HClを加え、C₁₈のカートリッジで前処理した後、逆相カラム YMC Pack ODS-A、溶媒：水：メタノール：

酢酸（80：16：4）で分析した。EGCGは280 nmの吸収で測定した。

2) 茶ポリフェノールの相乗効果

i) ^3H -EGCGのPC-9細胞への取り込み

ヒト肺がん細胞株PC-9（ 2×10^5 cells/ml）を ^3H -EGCG 100 μM の存在下で2時間培養した後、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、(-)-epigallocatechin (EGC)、(-)-epicatechin gallate (ECG) 及び(-)-epicatechin (EC) を加えて細胞に取り込まれた放射活性を測定した。

ii) TNF- α 遊離抑制におけるECとEGCGの相乗効果

EC+EGCG、EGCG単独、あるいは、EC単独でBALB/3T3細胞（ 2×10^5 cells/well）を処理した。その一時間後に、200 nMのオカダ酸を加え、更に、24時間培養し、培養液中のTNF- α をELISA法で測定した。

C. 研究結果

1) ^3H -EGCGを用いた薬理学的研究

血液中の放射活性は、 ^3H -EGCG投与1時間後から認められ、雄： 22.0×10^3 d.p.m./ml、雌： 24.0×10^3 d.p.m./mlであった。その後、放射活性は増加し、6時間後で、雌： 235.0×10^3 、雄： 189.0×10^3 d.p.m./ml、24時間後で雌： 288.0×10^3 、雄： 269.0×10^3 d.p.m./mlであった。24時間後には、投与した放射活性の約2%が全血液中に取り込まれていた。尚、この放射活性は、 ^3H -EGCGだけでなく、 ^3H -EGCGの代謝産物、更に、それぞれが蛋白質に結合したもの等の総和である。

^3H -EGCG投与1時間後から、雄、雌ともに、全身のほとんどの臓器で有意な放射活性が認められた。放射活性は、投与24時間後まで徐々に増加した。たとえば、脳の放射活性は、雌： $1.7 \sim 22.5 \times 10^3$ 、雄： $1.3 \sim$

17.3×10^3 d.p.m./100 mg 組織であった。これは、投与した放射活性の約0.3%が脳に到達したことを示している。

投与した放射活性の6.4～6.6%が尿中に、又、37.7～33.1%が糞便中に投与24時間排泄された。尿中の放射活性をHPLCで分析すると、溶出時間7分のEGCGと一致して、 ^3H -放射活性のピークが認められた。他に7つの ^3H -放射活性のピークが検出され、これらは、EGCGの代謝産物と考えられる。HPLC分析から算出した結果、尿中に排泄された放射活性の約9%が ^3H -EGCGそのものであると考えられる。即ち、飲用した茶ポリフェノールは吸収されて、血液中に取り込まれ、全身の臓器に到達していることが示された。

2) 茶ポリフェノールの相乗効果

i) ^3H -EGCGのPC-9細胞への取り込み

^3H -EGCGをヒト肺がん細胞株、PC-9細胞に処理すると、細胞に取り込まれた ^3H -放射活性は時間経過に伴って増加する。この系に非放射活性のEGCGを加えると ^3H -EGCGの取り込みが抑制された。又、ECGとEGCはEGCGと同様に、 ^3H -EGCGの取り込みを濃度依存性に抑制した。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、ガロイル基を持たないECは逆に ^3H -EGCGの取り込みを促進した。500 μM のECは約1.5倍に ^3H -EGCGの取り込みを促進した。この結果から、ECは他の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。

ii) TNF- α 遊離抑制におけるECとEGCGの相乗効果

TNF- α はいろいろな老年病の発症や進展に関与しているサイトカインである。私も、EGCGがTNF- α 遊離を抑制することを見出している。ECとEGCGの相乗効果を見出している。ECとEGCGの相乗効果をTNF- α 遊離抑制で検討した。EGCGは濃度

依存性に、TNF- α の遊離を抑制し、500 μ Mで100%の抑制を示した。50%の抑制濃度 (IC_{50}) は、60 μ Mであった。一方、ECは500 μ Mの濃度でも有意な抑制は示さなかった。100 μ MのECをEGCGと同時に処理すると、EGCGの IC_{50} は15 μ Mと低い濃度にシフトした。即ち、ECは、EGCGのTNF- α 遊離抑制効果を約4倍増強した。次に、ほかの茶ポリフェノールであるECGについて、ECの相乗効果を検討した。ECとの同時処理によって、ECGの IC_{50} は30 μ Mから7 μ Mとなり、約4倍の増強効果が認められた。すなわち、不活性型の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、相乗的に作用していることが示唆された。

D. 考察

1) 3 H-EGCGを経口的に投与した後、放射活性が血液やいろいろな全身の臓器に認められた。この結果は、緑茶の標的臓器が幅広いことを示唆する。また、尿のHPLC分析の結果から、飲用した緑茶に含まれるEGCGは吸収されて、血液中に入りいろいろな臓器に到達することが示された。今回は 3 H-放射活性として測定しているので、代謝産物等については、まだ明らかではないEGCGなどのタンニンは蛋白質に結合しやすい性質を持つので、蛋白質に結合したEGCGも含めて測定できるような系を開発することが必要である。

脳に、比較的高い放射活性が認められた。この結果は、EGCG等の茶ポリフェノールが脳血管関門を通過することを示唆し、脳疾患の予防にも役立つと考えられる。

2) 緑茶に含まれる茶ポリフェノールの中で、不活型と考えられていたECが、他の茶ポリフェノールの取り込みを促進して、効果を増強していることが明らかとなった。この結果は、緑茶の方が茶ポリフェノール単独よりも有効であることを示した。

E. 結論

経口的に飲用した茶ポリフェノールは、脳にも分布することが示され、脳血管疾患の予防に緑茶が有効であると考えられる。更に、茶ポリフェノールが互いに相乗的に作用していることから、老年病の予防において、緑茶はより効果的な飲み物であることを明らかにした。

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) Takahashi, K., Nomura, T., Horie, M., Suganuma, M., Okabe, S. and Fujiki, H. A tumor-promoting triterpenoid from *Iris tectorum*. *J. Natl. Prod.*, in press (1999).
- 3) 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)
- 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.* in press (1999)
- 5) 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.* 125:150-155 (1999)
- 6) 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)
- 7) 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. *Carcinogen.* 19: 1771-1776 (1998)
- 8) 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

緑茶のがん予防効果における相乗作用
菅沼雅美、岡部幸子、末岡尚子、末岡榮三朗、
藤木博太
第57回日本癌学会総会記事, p94, 1998.

Green tea and cancer
Masami Suganuma
International Symposium on Tea and Health, p15
1998.

Green tea in Cancer Prevention
Suganuma, M., Okabe, S., Sueoka, N.,
Sueoka, E., Matsuyama, S., Imai, K.,
Nakachi, K., and Fujiki, H.
3rd International Conference on Environmental
Mutagens in Human Population
1998.

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
分担研究報告書

高脂血症モデルマウスに対する茶ポリフェノールの予防効果

分担研究者 松島芳文 埼玉県立がんセンター研究所 主任研究員

研究要旨 高齢化社会において健康生活を妨げ、老化を促進する重要な疾患として、動脈硬化症に起因する狭心症、心筋梗塞、脳軟化、脳梗塞および脳出血などが挙げられる。したがって動脈硬化の効果的予防法の確立は国家厚生行政に大きく貢献するものである。近年、茶ポリフェノールには抗酸化作用があり、低比重リポタンパク質(LDL)の酸化を防止し、動脈硬化の進展を防止。血小板凝集反応を抑制して血栓ができることを防止。コレステロールや脂質成分の腸管からの吸収を抑制して血清コレステロール値を低下させるといった種々の薬理的作用が存在すると考えられている。これらのことを個体レベルで科学的に実証するための動物実験は従来、マウス・ラット等に高コレステロール飼料を給餌し、人為的に高脂血症状態にした後に検討物質を投与する方法がとられてきたが、元来マウス・ラットなど齧歯類は高脂血症になりやすく、動脈硬化症に至らなかった。このような研究背景において、当然の事ながら自然発症モデルの出現が待たれていたが、松島らは日本産野生マウスの系に自然発生した高脂血症（Spontaneously hyperlipidemic：SHL）マウスを発見し、その主要な病因がアポリポプロテインE（アポE）欠損であることを明らかにした。一方、発生工学的技術の進歩により、すでに作出されていたアポEノックアウトマウスとSHLマウスを比較した結果、高脂血症とそれに伴う種々の病態に著しい差異が認められたことから、今年度はSHLマウスの血清総コレステロール値、動脈硬化および皮膚黄色腫の進展度、平均生存期間などの表現型について、加齢による変化を把握し、SHLマウスのこの方面でのモデル動物としての有用性を検討した。その結果、SHLマウスの血清総コレステロール値、動脈硬化巣のサイズおよび皮膚黄色腫の発症時期と部位は茶ポリフェノールの作用効果を客観的にとらえる有用なパラメーターとなる事が示唆された。また、茶ポリフェノールの投与期間はSHLマウスの血清総コレステロール値の月齢変化、及び平均生存期間などから8から20週齢の間が適当である事が示唆された。

A. 研究目的

SHLマウスはアポリポプロテインE（アポE）を突然変異によって欠損し、

普通飼料によって高脂血症を自然発症する世界で初めてのマウスである。SHLマウスとアポEノックアウトマ

ウスを比較した結果、普通飼料給餌下においてSHLマウスの方が極めて強度の高脂血症を呈する事を見だし、疾患モデル化を推進している。本研究はSHLマウスの高脂血症、皮膚黄色腫および動脈硬化症を指標とした茶ポリフェノールの薬効判定を目的としているが、今年度はSHLマウスの血清総コレステロール値、動脈硬化および皮膚黄色腫の進展度、平均生存期間などの表現型について月齢による変化を把握し、この方面の研究への応用性を検討した。

B. 研究方法

SHLマウスの血清総コレステロール値、動脈硬化症及び皮膚黄色腫の動態、平均寿命などの表現型を薬効のパラメーターとするためにSHLマウスの血清総コレステロール値の月齢変化、動脈硬化症および皮膚黄色腫の発症部位と進展度、生存曲線について基礎データを集積した。血清総コレステロール値は、フジドライケムシステムによって測定した。動脈硬化症及び皮膚黄色腫については、病理組織学的に検索し、大動脈起始部の動脈硬化巣については、同一部位の切断面硬化巣のサイズを測定した。生存曲線はカプラン・マイヤー法で求めた。

C.D. 研究結果および考察

SHLマウスの血清総コレステロール値は、生後6週齢までは2000mg/dlを越える極めて高値を示す個体が認められるが、8週齢以降は約1000

mg/dlであり、性差は認められなかった。動脈硬化症は、大動脈起始部に限局し、皮膚黄色腫は加齢に伴って進展した。いずれも病変部の病理切片には、コレステリン結晶の隙、マクロファージ由来の泡沫細胞が多数認められた。動脈硬化症は大動脈起始部のサイズを計測、皮膚黄色腫は疾患部位と進展度のスコア化によって、抗動脈硬化作用を客観的にとらえることが可能であった。

E. 結論

茶ポリフェノールの薬効検定にSHLマウスの高脂血症、動脈硬化症および皮膚黄色腫などは有用なパラメーターとなる事が示唆された。血清総コレステロール値の月齢変化、及び平均生存期間から茶ポリフェノールの投与期間は8から20週齢の間が適当である。

F. 研究発表

1. 論文発表

Matsushima Y, Hayashi S, Tachibana M: Spontaneously hyperlipidemic (SHL) mice: Japanese wild mice with apolipoprotein E deficiency. *Mammalian Genome*, 10:352-357(1999)

2. 図書

松島芳文(分担執筆) *Molecular Medicine 臨時増刊 自然発症モデル動物* (1999) 中山書店
松島芳文(分担執筆) *遺伝子治療開発ハンドブック* (1999) (株) エヌ・テ

イー・エス

3. 学会発表

松島芳文 マウスアポEタンパクの
多型現象と脂質代謝モデル 第45回
日本実験動物学会総会 講演要旨
p.125, 1998.5.28-30.

松島芳文 他 高脂血症マウス：ノック
アウトマウスと自然発症マウスの
比較から学んだこと 第21回日本
分子生物学会年会 講演要旨 p.333,
1998.

G. 知的所有権の取得状況

SHL マウスは1994年に発見され、
1996年10月に特許出願された。
特許出願公開番号は、「特開平10-
117631」であり、1999年1月に特許申
請を行った。発明者は松島芳文、出願
人は埼玉県、発明の名称は「自然発症
アポE欠損高脂血症マウス」である。

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
分担研究報告書

糖尿病と間質性肺炎モデルマウスに対する予防効果

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：茶ポリフェノールがヒト胃がん細胞、KATO IIIでのTNF- α 遺伝子発現を抑制し、その遊離を抑制することを見出した。又、EGCGは転写因子AP-1とNF- κ Bの活性化を抑制した。更に、レトロウイルスベクターを用いて強制的にTNF- α を発現するPE501/TNF細胞でもTNF- α 遊離を抑制し、TNF- α の遊離を制御しているメタロプロテアーゼを阻害している可能性を示唆した。更に、間質性肺炎のモデルマウスであるTNF- α トランスジェニックマウスに0.1%の緑茶抽出物を4ヶ月間飲用させた。水を飲用させたトランスジェニックマウスの肺で、TNF- α 、IL-6やIL-10等が強く発現し、ヒトの間質性肺炎によく類似した病理組織像を示した。緑茶抽出物を飲用したトランスジェニックマウスでは、TNF- α 、IL-6やIL-10の発現が、抑制されることを見出した。茶ポリフェノールは、様々な老年病に関与するサイトカインであるTNF- α の産生を遺伝子発現や遊離のプロセスで抑制することを見出した。

A. 研究目的

緑茶にはいろいろな茶ポリフェノールが含まれ、それぞれ抗酸化作用をもちヒトの健康と長寿に役立つと推測されている。埼玉県のある地域住民を対象とした前向きコホート研究は、緑茶を一日10杯以上飲用するヒトは3杯以下のヒトに比べ、虚血性心疾患や糖尿病の有病率が低いことを見出した。この研究は、緑茶が老年病の予防に役立つことを示唆した。間質性肺炎や糖尿病、動脈硬化などの老年病の発症や進展に、炎症性サイトカインである腫瘍壊死因子（TNF- α ）が関与することが報告されている。本研究は、まず、茶ポリフェノールがTNF- α 産生を抑制するか検討し、更に、その抑制機構を明らかにする。次に、疾患モデルマウスとして、間質性肺炎のモデルとなるTNF- α のトランスジェニックマウスや

糖尿病モデルマウスを用い、緑茶の抗炎症作用、及び、抗糖尿病作用を証明することを目的とする。

B. 研究方法

1) 茶ポリフェノールによるTNF- α 産生抑制

ヒト胃がん細胞株 KATO III (2×10^5 cells/well) をいろいろな濃度の茶ポリフェノールで処理した。その一時間後、発がんプロモーター、オカダ酸を200 nMの最終濃度で処理し、24時間後に培養液中に遊離されたTNF- α をELISA法を用いて測定した。茶ポリフェノールを処理していない細胞での、オカダ酸によるTNF- α の遊離を100%として、抑制効果を表した。

茶ポリフェノールによるTNF- α 遺伝子発現の抑制は、RT-PCR法で検討した。上記

と同様に茶ポリフェノールとオカダ酸を処理したBALB/3T3細胞とKATO III細胞からAGPC法によって、総RNAを得た。総RNA 1 µgを逆転写酵素によってcDNAとして、TNF-αのプライマーを用いて³²P-dCTP存在下で、PCRを行った。この際、GAPDH遺伝子の発現をコントロールとした。PCR産物の量は、³²PのカウントをBASイメージアナライザーで測定した。

転写因子AP-1及びNF-κBの活性化の抑制はゲルシフト法で検討した。茶ポリフェノール及びオカダ酸で処理した細胞から、核抽出物を調整した。その核抽出物を予め³²PでラベルしたAP-1結合サイトのオリゴヌクレオチド、あるいは、NF-κB結合サイトのオリゴヌクレオチドとincubateし、ゲルシフト法によって、転写因子の活性化に対する影響するを検討した。

PE501/TNF細胞は、ヒトTNF-α cDNAを組み込んだレトロウイルスベクターの導入によって、持続的にTNF-αを産生して、培養液中に遊離する細胞である。この細胞を茶ポリフェノールで2時間処理した後、培養液中のTNF-α量をELISA法で測定し、その抑制効果を検討した。

2) 間質性肺炎のモデルであるTNF-αトランスジェニックマウスにおける緑茶抽出物のサイトカイン発現抑制効果

Surfactant protein C遺伝子のプロモーターに、マウスTNF-αの全コーディング領域を接続したキメラ遺伝子を導入したトランスジェニックマウスでは、肺胞II型上皮細胞において、TNF-αが特異的に発現する。TNF-αの高発現に伴い、ヒトの間質性肺炎に良く類似した病理組織像を示し、また、IL-6やIL-10等のサイトカインの発現も増加することを見出している。このトランスジェニックマウスに緑茶抽出物を0.1%の濃度で、生後直後から、4ヶ月間飲用させた。実験群は、トランスジェニックマウスに水を飲

用させた未処理群と緑茶抽出物処理群の2群と正常マウスの未処理群と緑茶抽出物処理群の2群の、合計4群とした。肺におけるTNF-α、IL-1β、及びIL-10遺伝子発現を定量的RT-PCR法で測定した。この際、GAPDH遺伝子の発現をコントロールとし、unitで表した。更に、肺組織における炎症などを、病理組織学的に検討した。

C. 研究結果

1) 茶ポリフェノールによるTNF-α産生抑制

茶ポリフェノール、(-)-epigallocatechin gallate (EGCG)、(-)-epigallocatechin (EGC)及び、(-)-epicatechin gallate (ECG)は、KATO III細胞からのTNF-αの遊離を濃度に依存して抑制した。50%の抑制濃度(IC₅₀)を比較すると、EGCG: 48 µM、ECG: 26 µM、EGC: 210 µMであった。しかし、(-)-epicatechin (EC)は500 µMの濃度まで、全く抑制を示さなかった。この結果から、ガロイル基を含む茶ポリフェノールはTNF-α産生抑制活性をもつことが明らかとなった。

次に、TNF-α遺伝子発現に対する茶ポリフェノールの抑制効果を検討した。KATO III細胞は、オカダ酸処理によって、強いTNF-α遺伝子の発現を誘導した。EGCGの前処理は、濃度依存性に、TNF-α遺伝子の発現を抑制し、500 µMの濃度では、約80%の抑制を示した。一方、EGCG単独処理では、TNF-α遺伝子発現には何ら影響しなかった。即ち、EGCGによるTNF-α遺伝子発現の抑制は、TNF-α遊離抑制の結果と良く一致した。従って、茶ポリフェノールは、TNF-αの遺伝子発現の抑制を介してTNF-α産生抑制をもたらしていると考えられる。

オカダ酸をBALB/3T3細胞、あるいは、KATO III細胞に処理すると、AP-1及びNF-κBの活性化が強く誘導される。この系

で、EGCGの抑制効果を検討した。EGCGの処理は、BALB/3T3細胞では、AP-1及びNF- κ Bの活性化を共に抑制した。一方、KATO III細胞では、EGCGはAP-1及びNF- κ Bの活性化を抑制しなかった。KATO III細胞ではTNF- α 遺伝子発現を制御している他の転写因子の活性化をEGCGが抑制していると推測される。

PE501/TNF細胞は持続的にTNF- α を産生し、たとえば、 1×10^4 細胞は2時間で、ヒトTNF- α 400 pg/mlを培養液中に遊離する。EGCGの処理は、濃度依存的にTNF- α の遊離を抑制し、500 μ Mの濃度で80%の抑制を示した。TNF- α が細胞で産生された後、細胞外に遊離されるプロセスには、メタロプロテアーゼが必要であることが報告されている。PE501/TNF細胞では、EGCGはTNF- α 遺伝子の発現ではなく、むしろTNF- α 遊離のプロセスを抑制していると考えられる。

2) 間質性肺炎のモデルであるTNF- α トランスジェニックマウスにおける緑茶抽出物のサイトカイン発現抑制

水を飲用させた未処理のトランスジェニックマウスでは、強いTNF- α 遺伝子の発現が認められ、660 unitであった。一方、0.1%の緑茶抽出物を4ヶ月飲用させたトランスジェニックマウスでは、570 unitと86%に抑制した。更に、IL-1 β 、及びIL-10遺伝子発現も、未処理トランスジェニックマウスで、1470 unit、及び、500 unitの発現を緑茶抽出物の飲用は1280 unit、及び370 unitに減少させた。緑茶抽出物のIL-1 β 、及びIL-10遺伝子発現抑制効果は、TNF- α 遺伝子発現の抑制効果と一致していた。一方、正常マウスの肺では、元々、IL-1 β 、及びIL-10遺伝子が弱く発現している。この発現に関しては、緑茶抽出物の飲用は全く影響しなかった。従って、緑茶の飲用は、肺でTNF- α の発現を抑制して、IL-1 β 、及びIL-10遺伝子の発

現を抑制していると考えられる。病理組織学的には、未処理群のトランスジェニックマウスと緑茶抽出物処理群の間に差は認められなかった。

D. 考察

1) 茶ポリフェノールが、ヒト胃がん細胞株KATO IIIからのTNF- α 遊離を抑制した。これは、TNF- α 遺伝子発現の抑制を介していることが明らかとなった。TNF- α 遺伝子の発現には、AP-1やNF- κ B以外の転写因子の活性化が関与していることが報告されている。EGCG等の茶ポリフェノールが、他の転写因子の活性化を抑制するか検討する計画である。

更に、EGCGはPE501/TNF細胞からのTNF- α 遊離を抑制した。TNF- α の遊離を制御しているメタロプロテアーゼの活性を茶ポリフェノールが抑制する可能性を示唆した即ち、茶ポリフェノールは、TNF- α の遺伝子発現から、遊離に至るまでのいろいろなプロセスを抑制している可能性が示唆された。

2) TNF- α トランスジェニックマウスの肺におけるTNF- α 遺伝子の発現及び、IL-1 β 、及びIL-10遺伝子の発現を緑茶の飲用が抑制する傾向を示した。飲用した茶ポリフェノールが、肺に到達することを私共は見出しているの点と一致する。しかし、その抑制効果が弱い点は、吸収されて肺に到達する茶ポリフェノールの量が少ないためと考えられる。肺への新たな投与方法を開発することも必要と考えられる。

E. 結論

TNF- α は様々な疾患に関与する炎症性サイトカインであり、TNF- α の発現が、サイトカインネットワークを介して次の様々なサイトカインの発現をもたらす。茶ポリフェノールは、TNF- α 遺伝子の発現、及び遊離

を抑制し、サイトカインネットワークによる次のサイトカインの発現も抑制することが明らかとなった。

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).
- 2) 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.
- 3) 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. Biol. Res. Commun. 252: 566-570 (1999)
- 4) 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. Haemat. 101: 737-742 (1998)
- 5) 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)
- 6) 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

岡部幸子、菅沼雅美、神谷英彦、藤木博太
TNF- α 遊離抑制を指標として見出したタバコの
葉に含まれる新しい発がん抑制物質
第57回日本癌学会総会記事, p320, 1998.