

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11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

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
総括研究報告書

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： 緑茶一日10杯の飲用が、がん、虚血性心疾患や糖尿病などの老年病の予防に役立つと考える。緑茶の頻回飲用の意味を考えるため、³H-EGCGを経口的にマウスに2回投与し、³H-EGCGの体内分布を検討した。³H-EGCGの2回投与後、血液、肺、肝臓、脳、及び膵臓などに分布した放射活性は、予想以上に高い値を示した。緑茶の頻回飲用は、血液や標的臓器における茶ポリフェノール濃度を高く維持することに役立っていると考えられる。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。TNF- α 欠損マウスはオカダ酸の発がんプロモーションに対して抵抗性を示した。茶ポリフェノールが遺伝子発現に及ぼす効果を、cDNA Expression Arrayを用いて588個の遺伝子について検討した。EGCGをヒト肺がん細胞株、PC-9に処理すると、10個の遺伝子発現が抑制され、一方、15個の遺伝子発現が亢進されていることを見出した。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、正常の10~20倍高いコレステロール値を示すマウスである。このSHLマウスに0.1%緑茶抽出物を8週間飲用させた。緑茶の飲用がSHLマウスの血清総コレステロール値を減少させることを見出した。

分担研究者

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

A. 研究目的

高齢化社会を迎えるに当たって、私共は高齢になっても健康を維持し、良い生活の質を維持することが必要である。そのためには、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。中でも生活スタイルの無理な変更を伴わず、安価で、誰もができる効果的な老年病の予防法を確立することが重要である。日本人が日常飲用し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有し、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。この結果は、緑茶ががんだけでなく他の老年病の予防に役立つことを示唆している。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、科学的データを検証することを目的とする。特に茶ポリフェノールの抗酸化作用に基づく研究とは別に、私共は緑茶の新しい作用機構について研究を進めている。次に、疾患モデルマウスとして、自然発症高脂血症（spontaneously hyperlipidemic : SHL）マウスや、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の証明を研究の目的とする。

B. 研究方法

(1) ³H-EGCGを用いた薬理学的研究

i) ³H-EGCGの2回投与によるマウス体内分布の増加

³H-EGCG 3.7 MBqを含む0.05% EGCG溶液をCD-1マウス雌に、経口ゾンデで直接胃に投与した。その6時間後、同量の³H-EGCG溶液を再び投与した。二回目の³H-EGCGを投与した6時間後、血液、尿、糞便、及び臓器を採取し、サンプルオキシダイザーで放射活性を測定した。2回の投与によって、血液や各臓器に分布する放射活性がどの程度増加す

るか³H-EGCGを一回のみ投与した場合と比較検討した。

0.1%緑茶抽出物を含む飲料水を1週間飲用させたCD-1マウスを用意した。このマウスに10 mg/200 μlのEGCGを経口ゾンデで直接胃内に投与し、血液中のEGCG量をHPLCで測定した。コントロールとして、水を飲用させたマウスに同量のEGCGを同様に投与して、血液中のEGCG量を比較した。HPLCの条件は以下の通りである。

Column: YMC Pack ODS-A

Solvent: 水:メタノール:酢酸 (80:16:4)

Detection: UV 280 nm

ii) ³H-EGCGの細胞内分布とマイクロオートラジオグラフィによる解析

ヒト肺がん培養細胞株(PC-9)を³H-EGCG 100 μM (4 x 10⁷ dpm)存在下で4時間培養した。PBSで細胞を洗浄した後、lysis bufferでホモジネートしてcell lysateを調整した。細胞内に取り込まれた³H-EGCG量はlysateの³H放射活性をシンチレーションカウンターで測定して求めた。更に、細胞を、細胞膜、細胞質、及び核に分画し、それぞれの放射活性を測定し、³H-EGCGの細胞内分布を検討した。

マイクロオートラジオグラフィは、³H-EGCGの存在下で培養したPC-9細胞をエタノールでスライドガラス上に固定し、ハイパーコートエマルジョンを用いて行った。13日間暗室にて保存した後、現像して放射活性を銀粒子として観察した。

(2) TNF-α欠損マウスを用いた研究

i) 発がんプロモーター、オカダ酸によるサイトカイン遺伝子の発現

TNF-α欠損マウスは、メモリアル スローン ケタリングがんセンターのL. J. Oldのグループによって1997年に樹立された。TNF-α欠損マウスはTNF locus phosphoglycerate kinase-neomycin 発現ベクターを用いたジエンターゲッティングによって、TNF-α遺伝子のプロモーター領域とexon 1と2を欠損している。TNF-α欠損 (TNF^Δ129/Svj) マウスとその同系のTNF^Δ129/Svjマウスは、Dr. Oldのグループより供与いただいた。8~10週令のTNF-α欠損マウスの背部皮膚に、1 μgあるいは10 μgのオカダ酸を塗布し、24時間後に皮膚から総RNAを抽出した。更に、oligo(dT)₃₀でpoly(A)⁺RNAを精製し、定量性RT-PCRでTNF-α、IL-1α、とIL-1β遺伝子の発現を検討した。Glyceraldehyde-3-phosphate (GAPDH)の発現をコントロールとし、TNF-αを発現するCD-1マ

ウスの背部皮膚でのサイトカイン遺伝子の発現と比較した。

ii) TNF-α欠損マウスを用いたオカダ酸による発がん二段階実験

実験には、TNF-α欠損マウスと、コントロールとしてTNF^Δ129/SvjマウスとCD-1マウスを用いた。それぞれのマウス(8週令)の背部皮膚に100 μgの7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA)を塗布してイニシエートした。その1週間後から、5 μgのオカダ酸を週に2回、20週間塗布した。実験は、1群10匹で行った。長径1 mm以上の腫瘍を毎週計測した。

(3) 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産生抑制

Surfactant protein C (SP-C) 遺伝子のプロモーターの制御によって、肺胞II型上皮細胞で特異的にTNF-αが発現するマウスを樹立した。このTNF-αトランスジェニックマウスは、TNF-αの発現に伴ってヒトの間質性肺炎に類似した症状を呈する。TNF-αトランスジェニックマウスに、緑茶抽出物を0.1%の濃度で飲料水に混ぜ、胎児期から生後4ヶ月まで飲用させた。肺をlysis bufferでホモジネートした後、100,000 x gの上清を調整した。蛋白質を定量した後、サイトカイン (TNF-α、IL-6) の濃度をenzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)法で測定した。サイトカイン量はμg/mg蛋白として表し、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と比較した。

(4) cDNA Expression Arrayを用いたEGCGの遺伝子発現に対する効果

EGCG (200 μM) で7時間処理したPC-9細胞(1 x 10⁷)から、総RNAを調整した後、oligo(dT)₃₀でpoly(A)⁺RNAを精製した。poly(A)⁺RNA 1 μgをα-³²P-dATPの存在下で、MMTV reverse transcriptaseによってcDNAとした。³²PでラベルしたcDNAを用い、array membraneでhybridizeして、588個の遺伝子発現を検討した。コントロールとして、未処理のPC-9細胞から調整したpoly(A)⁺RNAを用いた。GAPDHなどのhouse keeping genesのカウントがコントロールとEGCGを処理したものとで同等であることを確認した後、コントロールと比較して解析した。40%以上の増加、あるいは、40%以下の減少を有意な変化とした。

(5) 自然発症高脂血症 (SHL) マウスにおける緑茶抽出物による血清コレステロール値の低下作用

埼玉県立がんセンターで樹立したSHLマウスは、apolipoprotein Eの欠損によって、高脂血症を自然に発症するマウスである。SHLマウスに、0.1%緑茶抽出物を含む飲料水を投与し、経時的に血液を採取した。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。コントロールとして、水を飲用させたSHLマウスの血清総コレステロール値と比較した。動脈硬化については、病理組織学的に検討し、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。

(6) 動脈硬化症マウスの樹立

SHLマウスは非常に高い血清コレステロール値を示すにも関わらず、動脈硬化があまり生じない。重症の動脈硬化を生じるマウスを樹立するためSHLマウスの雄とC57BL/6マウス、BALB/cマウスあるいは、C3H/Heマウスの雌とを交配させ、コンジェニックマウスを樹立した。それぞれのコンジェニックマウスを、C57BL/6-*shl^{flx}*、BALB/c-*shl^{flx}*、C3H/He-*shl^{flx}*と命名した。血中総コレステロール値と大動脈起始部に生じた動脈硬化を測定し、SHLマウスと比較した。

C. 研究結果

(1) ³H-EGCGを用いた薬理学的研究

i) ³H-EGCGの2回投与によるマウス体内分布の増加

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て、がん、虚血性心疾患や糖尿病などの有病率が低いことが、前向きコホート研究によって見出されている。次に、緑茶の頻回飲用の意味を考えるため、³H-EGCGをマウスに2回投与し、各臓器での放射活性の分布が1回投与に比べて充進されるか検討した。2回目の³H-EGCGを投与した6時間後、血液、臓器、糞便、及び尿の放射活性をサンプルオキシダイザーによって測定した。血液中の放射活性は、2回投与によって明らかに増加し、1回投与後の5.9倍であった。また、各臓器に分布した放射活性は、血液と同様に1回投与の2倍以上に増加したものと、2倍以下のものに分類された。たとえば、4倍以上の増加を認めた臓器は、脳、肺、肝臓、脾臓、膀胱、及び骨であった。一方、十二指腸、小腸、大腸などの消化管に分布した放射活性は、1.3~2.0倍であった。³H-EGCGの2回投

与による体内分布の増加は、投与24時間後においても同様に観察された。すなわち、³H-EGCGの1回投与に比べて、脳、肺、肝臓、脾臓、及び、骨では3倍以上の放射活性を示した。これらの結果から、緑茶を頻回に飲用することは、血液、及び、標的臓器において茶ポリフェノールを高濃度に維持する役割を果たしていると考えられる。

次に、あらかじめ1%の緑茶抽出物を飲料水として1週間与えたマウスと、水だけを与えたマウスを用意した。それぞれのマウスに、10 mg EGCGを直接経口ゾンデで、胃内に投与して2時間後、血液中のEGCG濃度を比較した。緑茶をあらかじめ飲用していたマウスは、水だけを飲用していたマウスに比べ、血液中のEGCG濃度が約10倍高いことを見出した。この結果は、³H-EGCGを2回投与した場合と一致した。

ii) ³H-EGCGの細胞内分布とマイクロオートラジオグラフィーによる解析

³H-EGCGをヒト肺がん細胞株PC-9に処理すると、細胞に取り込まれる³H-放射活性は時間経過に伴って増加した。³H-放射活性の詳細な細胞内分布を検討するため、細胞を細胞膜、細胞質、及び核に分画して、それぞれの³H-放射活性を測定した。2時間培養した後の細胞内放射活性は、細胞膜：2.6%、細胞質：94%、核：5.6%であった。この結果は、³H-EGCGが、細胞膜を通過し、核にも分布することを始めて示した。

この結果を更に確認するため、³H-EGCGで1時間、あるいは24時間処理したPC-9細胞をスライドグラス上に固定し、マイクロオートラジオグラフィーを行った。³H-放射活性を示す銀粒子が、³H-EGCGで1時間培養した細胞では、主に細胞膜と細胞質に観察された。更に、24時間後では、多数の銀粒子が、細胞膜、細胞質、更に、核に認められた。細胞分画の実験結果と同様、³H-EGCG等の茶ポリフェノールが核にも分布することが確認された。

(2) TNF- α 欠損マウスを用いた研究

i) 発がんプロモーター、オカダ酸によるサイトカイン遺伝子の発現

オカダ酸1 μ gをCD-1マウスの背部皮膚に塗布すると、24時間後、TNF- α mRNAの発現は未処理に比べて、約15倍に充進した。一方、TNF- α 欠損マウスにおいては、1 μ gあるいは10 μ gのオカダ酸を塗布しても全くTNF- α mRNAの発現は認められなかった。次に、TNF- α と同様な炎症性サイトカイ

ンであるIL-1 α とIL-1 β のmRNA発現について検討した。1 μ gあるいは10 μ gのオカダ酸処理は、TNF- α 欠損マウスの背部皮膚にIL-1 α とIL-1 β のmRNA発現を誘導した。たとえば、10 μ gオカダ酸処理で、IL-1 α は3.1倍、IL-1 β は3.7倍に発現が亢進した。オカダ酸によるIL-1 α とIL-1 β のmRNA発現の亢進は、TNF- α を発現するCD-1マウスと同等であった。従って、TNF- α 欠損マウスでのTNF- α 以外の炎症性サイトカインの発現は、野生マウスと同様であることが示された。

ii) TNF- α 欠損マウスを用いたオカダ酸による発がん二段階実験

発がんプロモーターであるオカダ酸の1回塗布量は、通常の発がん二段階実験で、100%のCD-1マウスに腫瘍が発生する量、すなわち、5 μ gとした。実験は、TNF- α 欠損 (TNF^{-/-}129/Svj) マウス、その同系の TNF^{+/+}129/Svjマウス、及び、CD-1マウスで行った。DMBA 100 μ gを背部皮膚に塗布してイニシエートした後、1週後からオカダ酸を週に2回、20週間塗布した。TNF- α を発現する TNF^{+/+}129/SvjマウスとCD-1マウスは、10週、あるいは、11週に最初の腫瘍が生じ、17週で100%の腫瘍発生頻度に達した。一方、TNF- α 欠損マウスでは、19週まで腫瘍は生じず、20週で1匹に1個、1 mm程度の腫瘍が生じたのみであった。実験終了20週での腫瘍発生頻度は、TNF- α 欠損マウス：10%、TNF^{+/+}129/Svjマウス：100%、CD-1マウス：90%であり、平均腫瘍個数は、それぞれ0.1、4.0、及び8.8であった。この結果は、TNF- α 欠損マウスはオカダ酸の発がんプロモーション活性に対して抵抗性を持つことを示した。すなわち、TNF- α が、発がんの初期の過程である発がんプロモーションのプロセスにおいて、本質的なサイトカインであることを証明することができた。

(3) 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産生抑制

昨年度、緑茶抽出物の投与がTNF- α トランスジェニックマウスの肺組織でのTNF- α mRNA発現を抑制することを報告した。TNF- α トランスジェニックマウスでは、TNF- α の発現は、SP-Cのプロモーターによって制御されている。肺におけるSP-C mRNAの発現は、緑茶投与群、及び、未処理群では同等であった。従って、緑茶抽出物によるTNF- α mRNAの発現抑制効果は SP-Cプロモーター

によって誘導されたTNF- α が、二次的に誘導するTNF- α の発現を抑制しているものと考えられる。そこで、本年度は緑茶抽出物の抑制効果を、サイトカインの蛋白レベルで確認した。水のみを飲用したTNF- α トランスジェニックマウスの肺組織で、TNF- α は3.0 μ g/mg蛋白であった。そのTNF- α 量が緑茶抽出物の投与によって2.1 μ g/mg蛋白と70%に減少した。これは、統計学的に有意であり、TNF- α mRNA発現に対する抑制効果より強いものであった。次に、外の炎症性サイトカインであるIL-6について検討した。緑茶抽出物の投与はIL-6をコントロールの80%に抑制した。この抑制効果は、TNF- α の産生抑制と一致していた。したがって、経口的に投与した緑茶抽出物が肺に到達して、炎症性サイトカインの産生を抑制すると解釈した。

(4) cDNA Expression Arrayを用いたEGCGの遺伝子発現に対する効果

茶ポリフェノールの抗酸化作用とは別の新たな作用機構について研究をすすめるため、cDNA Expression Arrayを用いて検討した。cDNA Expression Arrayは、588個の遺伝子発現を同時に解析できる新しい方法である。増殖期のPC-9細胞は、588個の遺伝子のうち171個の遺伝子が発現していた。EGCGの処理は10種の遺伝子の発現を未処理細胞に比較して60%以下に抑制し、また、15種の遺伝子の発現を140%以上に亢進した。主に、EGCGによって、発現が抑制あるいは亢進される遺伝子は、主に、レセプター、細胞周期、細胞増殖制御因子、増殖因子、サイトカインに分類される遺伝子であった。

(5) 自然発症高脂血症 (SHL) マウスにおける緑茶抽出物の血中コレステロール低下作用

SHLマウスは、apolipoprotein E遺伝子の異常によってApoEタンパク質を欠損し、高脂血症を示すマウスである。SHLマウスは乳児期にもっとも高い血清コレステロール値 (2000 mg/dl) を示し、10週令まで徐々に減少して、その後、1000 mg/dlで一定となる。このコレステロール値は、正常のマウスに比べ、約10倍に相当する。10週令の雌SHLマウスに、0.1%の緑茶抽出物を8週間飲用させた。その間、4週ごとに血清総コレステロール値を測定した。未処理群が850 mg/dlであるのに対し、緑茶抽出物の投与4週後、630 mg/dlと約26%の減少をもたらした。8週後においても緑茶抽出物投与群は、未処理群に比べ、20%ほど低い血清コレステロール値を示し

た。緑茶によるSHLマウスに対するコレステロール低下作用は、決して強力なものではないが、apolipoprotein E遺伝子の異常によって生じる高脂血症を、緑茶の飲用が抑制することを見出した。

次に、SHLマウスの大動脈起始部の動脈硬化巣を病理組織学的に検討した。SHLマウスは、非常に高い血清コレステロール値を示すにも関わらず、動脈硬化はほとんど認められなかった。

(6) 動脈硬化症マウスの樹立

SHLマウスは日本産野生マウスから樹立された。SHLマウスが動脈硬化を生じにくいのは、遺伝的背景によるものと推測された。そこで、それぞれ遺伝的背景の異なる3系統のマウスとSHLマウスを交配し、コンジェニックマウス、C57BL/6-*shl^{flac}*、BALB/c-*shl^{flac}*、C3H/He-*shl^{flac}*を樹立した。それぞれの血清コレステロール値は、C57BL/6-*shl^{flac}*：700 mg/dl、BALB/c-*shl^{flac}*：900 mg/dl、C3H/He-*shl^{flac}*：1000 mg/dlであった。SHLマウスに比べて、3種のコンジェニックマウスはやや低いコレステロール値を示したが、いずれも正常マウスに比べると7~10倍の高い値であった。SHLマウスと3種のコンジェニックマウスは、超低密度リポタンパク質と中密度リポタンパク質の濃度は上昇し、高密度リポタンパク質の濃度は減少していた。次に、大動脈起始部の動脈硬化巣をそれぞれのマウスの30~40週令で比較した。観察された動脈硬化巣の程度は、それぞれのマウスで異なっていた。前述したように、SHLマウスに生じる動脈硬化はもっともmildなものであった。C57BL/6-*shl^{flac}*が最も重篤な動脈硬化を示し、BALB/c-*shl^{flac}*とC3H/He-*shl^{flac}*は、SHLマウスとC57BL/6-*shl^{flac}*との中間の程度を示した。

D. 考察

(1) ³H-EGCGを経口的に2回投与すると、マウスの体内に分布する放射活性は2倍以上に増加した。しかも、これまで緑茶の標的臓器として報告されたいろいろな臓器、例えば、肺、肝臓、脾臓、及び、膀胱では、5~6倍の増加を認めた。又、脳への分布も5倍に増加することから、脳神経疾患の予防に緑茶が有効であると期待される。アルツハイマーやパーキンソン病などの予防に緑茶が有効か、動物モデルを用いた検討が必要と考える。1日10杯の緑茶を飲用することは、血液中や臓器の茶ポリフェノール濃度を高く維持するのに役立っていると考えられる。日常飲用している緑茶と緑茶製剤を

合わせて1日10杯分の緑茶ポリフェノールを摂取して、血液中のEGCGを測定しながら、老年病の予防に有効な血中EGCGを導くことができると考える。

更に、³H-EGCGは、細胞膜や細胞質だけでなく、核にも到達することを見出した。EGCGのDNAへの結合あるいは、転写因子への作用などについて検討することは、茶ポリフェノールの新しい作用機構を明らかにする上で重要であると考えられる。

(2) TNF- α はがん、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。昨年報告したように、私共は、多様な茶ポリフェノールの作用の中で、TNF- α 産生抑制が1つの重要な緑茶の作用機構と考えている。今回、TNF- α 欠損マウスを用いた実験から、発がんプロモーションにおいてTNF- α が重要なサイトカインであることが明らかになった。この実験結果は、私共の考えを証明した。TNF- α 欠損マウスを用いて糖尿病や動脈硬化の発症を検討することは、これらの疾患におけるTNF- α の役割を明らかにすることができると考える。

(3) TNF- α トランスジェニックマウスの肺において、緑茶の飲用がTNF- α タンパク質の産生を有意に抑制することを見出した。TNF- α mRNAの発現の抑制に比べて、より強くTNF- α タンパク質の産生が抑制された。これは、緑茶のTNF- α 産生抑制機構が、単に、TNF- α mRNAの発現抑制だけでなく、TNF- α の遊離に至るまでのいろいろなプロセスを抑制していると推測する。経口的に投与した緑茶抽出物の茶ポリフェノールが、肺に蓄積して抑制効果をもたらしていると考えている。

(4) cDNA Expression Arrayの解析から、EGCGは、処理後7時間で既に様々な遺伝子の発現を抑制、あるいは、亢進していることが始めて明らかになった。これまで、緑茶の効果は、主に、抑制効果として認められていたが、発現亢進される遺伝子が見出された。これらの遺伝子が、EGCGの糖尿病や動脈硬化の予防にどのように関与するか検討を進める。

(5) 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

ることを見出した。

ヒトにおいて、高脂血症は動脈硬化の危険因子であるが、必ずしも、血清中のコレステロール値と動脈硬化の程度は一致せず、生活習慣や遺伝的素因が関与していると推測されている。SHLマウスと3種のコンジェニックマウスで、それぞれ動脈硬化の程度が異なることを明らかにした。また、動脈硬化の程度は、血清中のコレステロール値とは相関していない。それぞれのマウスの遺伝的背景の違いが、動脈硬化の発症の違いをもたらしているものと推測される。重度の動脈硬化を発症するC57BL/6-*shl^{prc}*と中度の動脈硬化を発症するBALB/c-*shl^{prc}*あるいはC3H/He-*shl^{prc}*を用いて、動脈硬化に対する緑茶の発症予防効果を検討する準備が整った。

E. 結論

³H-EGCGを経口的に2回投与すると、1回の投与に比べて血液や臓器に分布する茶ポリフェノール量が予想以上に増加した。すなわち、緑茶の頻回飲用は、血液や標的臓器での茶ポリフェノールを高濃度に維持することに役立っていること考える。脳への分布も2回投与で増加することから、脳神経疾患の予防にも緑茶が有効であると期待される。

TNF- α はがん、糖尿病や動脈硬化に対して炎症性サイトカインネットワークを介して作用すると考える。TNF- α 欠損マウスは、発がんプロモーターに対して抵抗性を示すことを明らかにした。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、発がんを予防すると解釈する。緑茶の飲用が、自然発症高脂血症マウスの血清コレステロール値を減少させることも見出した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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)
- 2) Fujiki, H. and Suganuma, M. Unique features of the okadaic acid activity class of tumor promoters. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 125: 150-155 (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.* 220: 225-228 (1999)

- 4) 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.* 90: 669-676 (1999)
- 5) Okabe, S., Ochiai, Y., Aida, M., Park, K., Kim, S.-J., Nomura, T., Suganuma, M. and Fujiki, H. Mechanistic aspects of green tea as a cancer preventive effect of components on human stomach cancer cell lines. *Jpn. J. Cancer Res.* 90: 733-739 (1999)
- 6) Suganuma, M., Okabe, S., Sueoka, N., Sueoka, E., Matsuyama, S., Imai, K., Nakachi, K. and Fujiki, H. Green tea and cancer chemoprevention. *Mutat. Res.* 428: 339-344 (1999)
- 7) Suganuma, M., Okabe, S., Marino, M. W., Sakai, A., Sueoka, E. and Fujiki, H. Essential role of tumor necrosis factor α (TNF- α) in tumor promotion as revealed by TNF- α -deficient mice. *Cancer Res.* 59: 4516-4518 (1999)
- 8) Inoue, K., Okabe, S., Sueoka, E., Sueoka, N., Tabei, T. and Suganuma, M. The role of interleukin-6 in inhibition of lung metastasis in subcutaneoustumor-bearing mice. *Oncology Reports* 7: 69-73 (2000)
- 9) Fujiki, H., Suganuma, M., Okabe, S., Sueoka, E., Suga, K., Imai, K. and Nakachi, K. A new concept of tumor promotion by tumor necrosis factor- α , and cancer preventive agents (-)-epigallocatechin gallate and green tea. *Cancer Detect. Prev.* 24: 91-99, 2000
- 10) Matsushima, Y., Sakurai, T., Ohoka, A., Ohnuki, T., Tada, N., Asoh, Y., Tachibana, M. Genetic backgrounds determine the severity of hypercholesterolemia, atherosclerosis and xanthoma in spontaneously hyperlipidemic (SHL) mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, in press, 2000

2. 学会発表

- 1) 緑茶と大腸がん予防薬sulindacによる相乗的がん予防効果
菅沼雅美、岡部幸子、大倉泰男、末岡榮三朗、藤木博太

- 第58回日本癌学会総会記事, p149, 1999.
- 2) TNF- α KOマウスを用いた発がんプロモーション機構の検討
岡部幸子、菅沼雅美、末岡榮三朗、藤木博太
第58回日本癌学会総会記事, p267, 1999
 - 3) 緑茶ポリフェノールによるがん細胞の増殖抑制機構
岡部幸子、菅沼雅美、末岡榮三朗、藤木博太
第22回日本分子生物学会年会, p738, 1999
 - 4) 橘正芳、小林康人、松島芳文
マウスに自然発症する遺伝性アンドロジェン依存性角膜病変
第58回日本癌学会総会記事, p271, 1999
 - 5) Direct evidence of tumor necrosis factor- α (TNF- α) as a tumor promoter, revealed by TNF- α -deficient mice
Suganuma, M., Okabe, S., Marino, M. W. and Fujiki, H. Seoul Symposium of Journal of Cancer Research & Clinical Oncology, p.22, 1999
 - 6) Transformation by TNF- α in BALB/3T3 cells and overexpression of IL-1 gene in the transformants
Suganuma, M. Cytokine, Vol.11, 1999
 - 7) Synergistic effects of (-)-epigallocatechin gallate with sulindac or tamoxifen on cancer preventive activity. Suganuma, M., Okabe, S., Sueoka, N., Sueoka, E. and Fujiki, H. American Association for Cancer Research 90th Annual Meeting. p.627, 1999
 - 8) Mechanistic aspects of green tea as a cancer preventive. Okabe, S., Suganuma, M., Park, K., Kim, S-J. and Fujiki, H. Seoul Symposium of Journal of Cancer Research & Clinical Oncology, p.13, 1999

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： 緑茶の一日10杯の飲用が、がん、虚血性心疾患や糖尿病などの老年病の予防に役立つと考えられている。緑茶の頻回飲用の意味を考えるため、³H-EGCGを経口的に2回投与し、マウスの体内分布を検討した。³H-EGCGの2回投与後に血液、肺、肝臓、脳、及び膵臓などに分布した放射活性は、予想以上に高いことを見出した。緑茶の頻回飲用は血液や標的臓器における茶ポリフェノール濃度を高く維持することに役立っていると考えられる。³H-EGCGをヒト肺がん細胞株、PC-9に処理すると、³H-EGCGは細胞膜、細胞質、更に核に分布することを見出した。更に³H-EGCGが核に分布することは、ミクロオートラジオグラフィーによって確認した。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。TNF- α 欠損マウスはオキサリ酸の発がんプロモーションに対して抵抗性を示すことを明らかにした。

A. 研究目的

高齢化社会を迎えるに当たって、私共は高齢になっても健康を維持し、その生活の質を向上することが必要である。そのためには、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。中でも生活スタイルの無理な変更を伴わず、安価で、誰もができる効果的な老年病の予防法を確立することが重要である。日本人が日常飲用し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。この結果は、緑茶ががんだけでなく他の老年病

の予防に役立つことを示唆している。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、科学的データを検証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

i) ³H-EGCGの2回投与によるマウス体内分布の増加

³H-EGCG 3.7 MBqを含む0.05%EGCG溶液をCD-1マウス雌に、経口ゾンデで直接胃に投与した。その6時間後、同量の³H-EGCG溶液を再び投与した。二回目の³H-EGCGを投与した6時間後、血液、尿、糞便、及び臓器を採取し、サンプルオキシダイザーで放射活性を測定した。2回の投与によって、血液や各臓器に分布する放射活性がどの程

度増加するか³H-EGCGを一回のみ投与した場合と比較検討した。

0.1%の緑茶抽出物を含む飲料水を1週間飲用させたCD-1マウスを用意した。このマウスに10 mg/200 μlのEGCGを経口ゾンデで直接胃内に投与し、血液中のEGCG量をHPLCで分析した。コントロールとして、水を飲用させたマウスに同量のEGCGを同様に投与して血液中のEGCG量を比較した。HPLCの条件は以下の通りである。

Column: YMC Pack ODS-A

Solvent: 水：メタノール：酢酸
(80：16：4)

Detection: UV 280 nm

ii) ³H-EGCGの細胞内分布とマイクロオートラジオグラフィーによる解析

ヒト肺がん培養細胞株(PC-9)を³H-EGCG 100 μM(4 × 10⁷ dpm)存在下で4時間培養した。PBSで細胞を洗浄した後、lysis bufferでホモジネートしてcell lysateを調整した。細胞内に取り込まれた³H-EGCG量はlysateの³H-放射活性をシンチレーションカウンターで測定して求めた。更に、細胞を、細胞膜、細胞質、及び核に分画し、それぞれの放射活性を測定し、³H-EGCGの細胞内分布を検討した。

マイクロオートラジオグラフィーは、³H-EGCGの存在下で培養したPC-9細胞をエタノールでスライドグラス上に固定し、ハイパーコートエマルジョンを用いて行った。13日間暗室にて保存した後、現像して放射活性を銀粒子として観察した。

(2) TNF-α欠損マウスを用いた研究

i) 発がんプロモーター、オカダ酸によるサイトカイン遺伝子の発現

TNF-α欠損マウスは、メモリアル スローン ケタリングがんセンターのL. J. Oldのグループによって1997年に樹立された。

TNF-α欠損マウスはTNF locus phosphoglycerate kinase-neomycin発現ベクターを用いたジーンターゲティングによって、TNF-α遺伝子のプロモーター領域とexon 1と2を欠損している。TNF-α欠損(TNF^{-/-}129Svj)マウスとその同系のTNF^{+/+}129/Svjマウスは、Dr. Oldのグループより供与いただいた。8~10週令のTNF-α欠損マウスの背部皮膚に、1 μgあるいは10 μgのオカダ酸を塗布し、24時間後に皮膚から総RNAを抽出した。更に、oligo(dT)₃₀でpoly(A)⁺RNAを精製し、定量性RT-PCRでTNF-α、IL-1α、とIL-1β遺伝子の発現を検討した。Glyceraldehyde-3-phosphate (GAPDH)の発現をコントロールとし、TNF-αを発現するCD-1マウスの背部皮膚でのサイトカイン遺伝子の発現と比較した。

ii) TNF-α欠損マウスを用いたオカダ酸による発がん二段階実験

実験には、TNF-α欠損マウスと、コントロールとしてTNF^{+/+}129/SvjマウスとCD-1マウスを用いた。それぞれのマウス(8週令)の背部皮膚に100 μgの7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA)を塗布してイニシエートした。その1週間後から、5 μgのオカダ酸を週に2回、20週間塗布した。実験は、1群10匹で行った。長径1 mm以上の腫瘍を毎週計測した。

C. 研究結果

(1) ³H-EGCGを用いた薬理学的研究

i) ³H-EGCGの2回投与によるマウス体内分布の増加

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て、がん、虚血性心疾患や糖尿病などの有病率が低いことが、前向きコホート研究によって見出されている。緑茶の頻回飲用の意味を考えるため、³H-EGCGをマウスに2回投与し、各臓器へ

の放射活性の分布が1回投与に比べて亢進されるか検討した。2回目の³H-EGCGを投与した6時間後、血液、臓器、糞便、及び尿の放射活性をサンプルオキシダイザーによって測定した。血液中の放射活性は、2回投与によって明らかに増加し、1回投与後の5.9倍であった。また、各臓器に分布した放射活性は、血液と同様に1回投与の2倍以上に増加したものと、2倍以下のものに分類された。たとえば、4倍以上の増加を認めた臓器は、脳、肺、肝臓、膵臓、膀胱、及び骨であった。一方、十二指腸、小腸、大腸などの消化管に分布した放射活性は、1.3~2.0倍であった。³H-EGCGの2回投与による体内分布の増加は、投与24時間後においても同様に観察された。すなわち、³H-EGCGを一回投与した場合に比べて、脳、肺、肝臓、膵臓、及び、骨は3倍以上の放射活性を示した。これらの結果は、緑茶の頻回飲用は、血液、及び、標的臓器において茶ポリフェノールを高濃度に維持することに役立っていることを示唆した。

次に、あらかじめ1%の緑茶抽出物を飲料水として1週間与えたマウスと、水だけを与えたマウスを用意した。それぞれのマウスに、10 mg EGCGを直接経口ゾンデで、胃内に投与して2時間後、血液中のEGCG濃度を比較した。緑茶をあらかじめ飲用していたマウスは、水だけを飲用していたマウスに比べ、血液中のEGCG濃度が約10倍高いことを見出した。この結果は、³H-EGCGを2回投与した場合と一致した。

ii) ³H-EGCGの細胞内分布とマイクロオートラジオグラフィによる解析

³H-EGCGをヒト肺がん細胞株PC-9に処理すると、細胞に取り込まれる³H-放射活性は時間経過に伴って増加した。³H-放射活性の詳細な細胞内分布を検討するため、細胞を細胞膜、細胞質、及び核に分画して、それぞれの³H-放射活性を測定した。2時間培養

した後の細胞内放射活性は、細胞膜：2.6%、細胞質：94%、核：5.6%であった。この結果は、³H-EGCGが、細胞膜を通過し、核にも分布することを始めて示した。

この結果を更に確認するため、³H-EGCGで1時間、あるいは24時間処理したPC-9細胞をスライドガラス上に固定し、マイクロオートラジオグラフィを行った。³H-放射活性を示す銀粒子が、³H-EGCG存在下で1時間培養した細胞では主に細胞膜と細胞質に観察された。更に、24時間後では、多数の銀粒子が、細胞膜、細胞質、更に、核に認められた。細胞分画の実験結果と同様、³H-EGCG等の茶ポリフェノールが核にも分布することが確認された。

(2) TNF- α 欠損マウスを用いた研究

i) 発がんプロモーター、オカダ酸によるサイトカイン遺伝子の発現

オカダ酸1 μ gをCD-1マウスの背部皮膚に塗布すると、24時間後、TNF- α mRNAの発現は未処理に比べて、約15倍に亢進した。一方、TNF- α 欠損マウスにおいては、1 μ gあるいは10 μ gのオカダ酸を塗布しても全くTNF- α mRNAの発現は認められなかった。次に、TNF- α と同様な炎症性サイトカインであるIL-1 α とIL-1 β のmRNA発現について検討した。1 μ gあるいは10 μ gのオカダ酸処理は、TNF- α 欠損マウスの背部皮膚でIL-1 α とIL-1 β のmRNA発現を誘導した。たとえば、10 μ gのオカダ酸処理で、IL-1 α は3.1倍、IL-1 β は3.7倍に発現が亢進した。オカダ酸によるIL-1 α とIL-1 β のmRNA発現の亢進は、TNF- α を発現するCD-1マウスと同等であった。従って、TNF- α 欠損マウスは、TNF- α 以外の炎症性サイトカインの発現はwildマウスと同様であることが示された。

ii) TNF- α 欠損マウスを用いたオカダ酸による発がん二段階実験

発がんプロモーターであるオカダ酸の塗布量は、通常の発がん二段階実験で、100%のCD-1マウスに腫瘍が発生する量、すなわち、5 μg とした。実験は、TNF- α 欠損 (TNF^{-/-}129/Svj) マウス、その同系の TNF^{+/+}129/Svjマウス、及び、CD-1マウスで行った。DMBA 100 μg を背部皮膚に塗布してイニシエートした後、1週後からオカダ酸を週に2回、20週間塗布した。TNF- α を発現する TNF^{+/+}129/SvjマウスとCD-1マウスは、10週、あるいは、11週に最初の腫瘍が生じ、17週で100%の腫瘍発生頻度に達した。一方、TNF- α 欠損マウスでは、19週まで腫瘍は生じず、20週で1匹に1個、1 mm程度の腫瘍が生じたのみであった。実験終了20週での腫瘍発生頻度は、TNF- α 欠損マウス：10%、TNF^{+/+}129/Svjマウス：100%、CD-1マウス：90%であり、平均腫瘍個数は、それぞれ0.1、4.0、及び8.8であった。この結果は、TNF- α 欠損マウスはオカダ酸の発がんプロモーション活性に対して抵抗性を持つことを示した。すなわち、TNF- α が、発がんの初期の過程である発がんプロモーションのプロセスにおいて、本質的なサイトカインであることを証明することができた。

D. 考察

(1) ³H-EGCGを経口的に2回投与すると、マウスの体内に分布する放射活性は2倍以上に増加した。しかも、これまで緑茶の標的臓器として報告された臓器、例えば、肺、肝臓、膵臓、及び、膀胱では、5~6倍の増加を認めた。又、脳への分布も5倍に増加することから、脳神経疾患の予防に緑茶が有効であると期待される。アルツハイマーやパーキンソン病などの予防に緑茶が有効か、動物モデルを用いた検討が重要と考える。1日10杯の緑茶を飲むことは、血液中や臓器の茶ポリフェノール濃度を高く維持するのに役立っていると考えられる。日常

飲用している緑茶と緑茶製剤を合わせて1日10杯分を摂取して、血液中のEGCGを測定することによって、老年病の予防に有効な血中EGCGを導くことができると考える。

更に、³H-EGCGは、細胞膜や細胞質だけでなく、核にも到達することを見出した。EGCGのDNAへの結合あるいは、転写因子への作用などについて検討することは、茶ポリフェノールの新しい作用機構を明らかにする上で重要であると考えられる。

(2) TNF- α はがん、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。昨年報告したように、私共は、多様な茶ポリフェノールの作用の中で、TNF- α 産生抑制が1つの重要な緑茶の作用機構と考えている。今回、TNF- α 欠損マウスを用いて、発がんプロモーションにおいてTNF- α が重要なサイトカインであることが明らかにした。この結果は、私共の考えを証明した。TNF- α 欠損マウスを用いて糖尿病や動脈硬化の発症を検討することは、これらの疾患におけるTNF- α の役割を明らかにすることができるかと推測される。

E. 結論

³H-EGCGを経口的に2回投与すると、1回の投与に比べて血液や臓器に分布する茶ポリフェノールが予想以上に増加した。すなわち、緑茶の頻回飲用は、血液や標的臓器での茶ポリフェノールを高濃度に維持することに役立っていること考える。脳への分布も2回投与で増加することから、脳神経疾患の予防にも緑茶が有効であると期待される。

TNF- α はがん、糖尿病や動脈硬化に対して炎症性サイトカインネットワークを介して作用する。今回、TNF- α 欠損マウスは、発がんプロモーターに対して抵抗性を示すことを明らかにした。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、がんを予防していると推測する。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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)
- 2) Fujiki, H. and Suganuma, M. Unique features of the okadaic acid activity class of tumor promoters. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 125: 150-155 (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.* 220: 225-228 (1999)
- 4) Suganuma, M., Okabe, S., Sueoka, N., Sueoka, E., Matsuyama, S., Imai, K., Nakachi, K. and Fujiki, H. Green tea and cancer chemoprevention. *Mutat. Res.* 428: 339-344 (1999)
- 5) Suganuma, M., Okabe, S., Marino, M. W., Sakai, A., Sueoka, E. and Fujiki, H. Essential role of tumor necrosis factor α (TNF- α) in tumor promotion as revealed by TNF- α -deficient mice *Cancer Res.* 59: 4516-4518 (1999)
- 6) Fujiki, H., Suganuma, M., Okabe, S., Sueoka, E., Suga, K., Imai, K. And Nakachi, K. A new concept of tumor promotion by tumor necrosis factor- α , and cancer preventive agents (-)-epigallocatechin gallate and green tea. *Cancer Detect.* 24: 91-99, 2000

2. 学会発表

- 1) 緑茶と大腸がん予防薬sulindacによる相乗的がん予防効果
菅沼雅美、岡部幸子、大倉泰男、末岡榮三朗、藤木博太
第58回日本癌学会総会記事, p149, 1999.
- 2) Direct evidence of tumor necrosis factor- α (TNF- α) as a tumor promoter, revealed by TNF- α -deficient mice. Suganuma, M., Okabe, S., Marino, M. W. and Fujiki, H. Seoul Symposium of Journal of Cancer Research & Clinical Oncology, p.22, 1999
- 3) Transformation by TNF- α in BALB/3T3 cells and overexpression of IL-1 gene in the transformants. Suganuma, M. *Cytokine*, Vol.11, 1999
- 4) Synergistic effects of (-)-epigallocatechin gallate with sulindac or tamoxifen on cancer preventive activity. Suganuma, M., Okabe, S., Sueoka, N., Sueoka, E. and Fujiki, H. American Association for Cancer Research 90th Annual Meeting. p.627, 1999

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 研究員

研究要旨： 自然発症の高脂血症（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。血清総コレステロール値は平均1000 mg/dlで、正常マウスに比べ約10倍高い。SHLマウスに、0.1%の緑茶抽出物を8週間飲用させ、血清総コレステロール値の低下を検討した。緑茶抽出物の飲用は、血清総コレステロール値を850 mg/dlから630 mg/dlに、約26%ほど減少した。SHLマウスは、非常に高い血清コレステロール値を示すにも関わらず、動脈硬化はほとんど認められなかった。それぞれ遺伝的背景の異なる3系統のマウスとSHLマウスを交配し、コンジェニックマウス、C57BL/6-*shl*^{apoE}、BALB/c-*shl*^{apoE}、C3H/He-*shl*^{apoE}を樹立した。それぞれの血清コレステロール値は、C57BL/6-*shl*^{apoE}：700 mg/dl、BALB/c-*shl*^{apoE}：900 mg/dl、C3H/He-*shl*^{apoE}：1000 mg/dlであった。動脈硬化巣の程度は、C57BL/6-*shl*^{apoE}が最も強く、続いてBALB/c-*shl*^{apoE}とC3H/He-*shl*^{apoE}であり、SHLマウスが最もその程度が弱かった。動脈硬化のモデルマウスが樹立された。

A. 研究目的

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。この結果は、緑茶ががんだけでなく他の老年病の予防に役立つことを示唆している。本研究は、埼玉県立がんセンターで樹立した自然発症の高脂血症（Spontaneously hyperlipidemic : SHL）マウスを用い、緑茶の高脂血症、及び、動脈硬化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) 自然発症高脂血症（SHL）マウスにおける緑茶抽出物の血清コレステロール

低下作用

埼玉県立がんセンターで樹立した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る。SHLマウスに、0.1%の緑茶抽出物を含む飲料水を投与し、経時的に血液を採取した。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。コントロールとして、水を飲用させたSHLマウスの血清総コレステロール値と比較した。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。

(2) 動脈硬化症マウスの樹立

SHLマウスは非常に高い血中コレステロール値を示すにも関わらず、動脈硬化があま

り生じない。重症の動脈硬化を生じるマウスを樹立するためSHLマウスの雄とC57BL/6マウス、BALB/cマウスあるいは、C3H/Heマウスの雌とを交配させ、コンジェニックマウスを樹立した。それぞれのコンジェニックマウスを、C57BL/6-*shl*^{apoE}、BALB/c-*shl*^{apoE}、C3H/He-*shl*^{apoE}と命名した。血中総コレステロール値と大動脈起始部に生じた動脈硬化を測定し、SHLマウスと比較した。

C. 研究結果

(1) 自然発症高脂血症 (SHL) マウスにおける緑茶抽出物の血中コレステロール低下作用

SHLマウスは、apolipoprotein E遺伝子の異常によってApoEタンパク質を欠損し、高脂血症を示すマウスである。SHLマウスは乳児期にもっとも高い血清コレステロール値 (2000 mg/dl) を示し、10週令まで徐々に減少して、その後、1000 mg/dlで一定となる。このコレステロール値は、正常のマウスに比べ、約10倍に相当する。10週令のSHLマウス雌に、0.1%の緑茶抽出物を8週間飲用させた。その間、4週ごとに血清総コレステロール値を測定した。緑茶抽出物の投与4週後、未処理群が850 mg/dlであるのに対し、630 mg/dlと約26%の減少をもたらした。8週後においても緑茶抽出物投与群は、未処理群に比べ、20%ほど低い血清コレステロール値を示した。緑茶によるSHLマウスに対するコレステロール低下作用は、決して強力なものではないが、apolipoprotein E遺伝子の異常によって生じる高脂血症を、緑茶の飲用が抑制することを見出した。

次に、SHLマウスの大動脈起始部の動脈硬化巣を病理組織学的に検討した。SHLマウスは、非常に高い血清コレステロール値を示すにも関わらず、動脈硬化はほとんど

認められなかった。

(2) 動脈硬化症マウスの樹立

SHLマウスは日本産野生マウスから樹立された。SHLマウスが動脈硬化を生じにくいのは、遺伝的背景によるものと推測された。そこで、それぞれ遺伝的背景の異なる3系統のマウスとSHLマウスを交配し、コンジェニックマウス、C57BL/6-*shl*^{apoE}、BALB/c-*shl*^{apoE}、C3H/He-*shl*^{apoE}を樹立した。それぞれの血清コレステロール値は、C57BL/6-*shl*^{apoE} : 700 mg/dl、BALB/c-*shl*^{apoE} : 900 mg/dl、C3H/He-*shl*^{apoE} : 1000 mg/dlであった。SHLマウスに比べて、3種のコンジェニックマウスはやや低いコレステロール値を示したが、いずれも正常マウスに比べると7~10倍の高い値であった。SHLマウスと3種のコンジェニックマウスは、超低密度リポタンパク質と中密度リポタンパク質の濃度は上昇し、高密度リポタンパク質の濃度は減少していた。次に、大動脈起始部の動脈硬化巣をそれぞれのマウスの30~40週令で比較した。観察された動脈硬化巣の程度は、それぞれのマウスで異なっていた。前述したように、SHLマウスに生じる動脈硬化はもっともmildなものであった。C57BL/6-*shl*^{apoE}が最もsevereな動脈硬化を示し、BALB/c-*shl*^{apoE}とC3H/He-*shl*^{apoE}は、SHLマウスとC57BL/6-*shl*^{apoE}との中間の程度を示した。

D. 考察

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、ApoE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ことを見出した。

ヒトにおいて、高脂血症は動脈硬化の危険因子であるが、必ずしも、血清中のコレステロール値と動脈硬化の程度は一致せず、

生活習慣や遺伝的素因が関与していると推測されている。SHLマウスと3種のコンジェニックマウスで、それぞれ動脈硬化の程度が異なることを明らかにした。また、動脈硬化の程度は、血清中のコレステロール値とは相関していない。それぞれのマウスの遺伝的背景の違いが、動脈硬化の発症の違いをもたらしているものと推測される。重度の動脈硬化を発症するC57BL/6-*shl^{ppoc}*と中度の動脈硬化を発症するBALB/c-*shl^{ppoc}*あるいはC3H/He-*shl^{ppoc}*を用いて、緑茶の動脈硬化の対する発症予防効果を検討する準備が整った。

E. 結論

緑茶の飲用が、自然発症高脂血症マウスの血清総コレステロール値を低下することを見出した。更に、SHLマウスと3系統のマウスと交配し、コンジェニックマウスを樹立した。動脈硬化を発症するモデルマウスを確立した。

F. 研究発表

1. 論文発表

Matsushima, Y., Sakurai, T., Ohoka, A., Ohnuki, T., Tada, N., Asoh, Y., Tachibana, M. Genetic backgrounds determine the severity of hypercholesterolemia, atherosclerosis and xanthoma in spontaneously hyperlipidemic (SHL) mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, in press, 2000

2. 学会発表

橘正芳、小林康人、松島芳文

マウスに自然発症する遺伝性アンドロジェン依存性角膜病変

第58回日本癌学会総会記事, p271, 1999

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

間質性肺炎と糖尿病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： 間質性肺炎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TNF- α トランスジェニックマウスの肺では、TNF- α 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。TNF- α の蛋白量は、肺の蛋白1mgあたり3.0 μ gであった。一方、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 量が2.1 μ g/mg蛋白、約70%に抑制された。更に、TNF- α によって二次的に発現が誘導されるIL-6の蛋白量も、80%に抑制した。茶ポリフェノールの抗酸化作用とは別の新たな作用機構について研究するため、cDNA Expression Arrayを用いて検討した。EGCGをヒト肺がん細胞株、PC-9に処理すると10種の遺伝子発現を抑制し、また、15種の遺伝子発現を亢進することを見出した。EGCGによって、発現が抑制あるいは亢進される遺伝子は、主に、レセプター、細胞周期、細胞増殖制御因子、増殖因子、サイトカインに分類される遺伝子であった。

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持ちヒトの健康と長寿に役だつと推測されている。茶ポリフェノールの抗酸化作用に基づく研究とは別に、私共は緑茶の新しい作用機構について研究を進めている。間質性肺炎、がん、糖尿病や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。昨年、茶ポリフェノールが転写因子であるAP-1及びNF- κ Bの活性化を抑制して、TNF- α mRNAの発現を抑制することを報告した。本研究は、TNF- α トランスジェニックマウスで、緑茶の飲用がTNF- α の産生を抑制して、TNF- α 蛋白量を減少させるか検討することを目的とする。更に、茶ポリフェノールの遺伝子発現に対する効果を、

588個の遺伝子発現を同時に解析ができるcDNA Expression Arrayを用いて検討した。本研究は、茶ポリフェノールが発現を亢進する遺伝子、あるいは抑制する遺伝子を明らかにし、老年病の予防に関与する遺伝子を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

(1) 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産生抑制

Surfactant protein C (SP-C) 遺伝子のプロモーターの制御によって、肺胞II型上皮細胞で特異的にTNF- α が発現するマウスがある。このTNF- α トランスジェニックマウスはTNF- α の発現に伴って、ヒトの間質性肺炎に類似した症状を呈する。TNF- α トランスジェニックマウスに、緑茶抽出物を0.1%の

濃度で飲料水に混ぜ、胎児期から生後4ヶ月まで飲用させた。肺をlysis bufferでホモジネートした後、100,000 x gの上清を調整した。蛋白量を定量した後、サイトカイン (TNF- α , IL-6) の濃度を enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)法で測定した。サイトカイン量は $\mu\text{g}/\text{mg}$ 蛋白として表し、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と比較した。

(2) cDNA Expression Arrayを用いた EGCGの遺伝子発現に対する効果

EGCG (200 μM) で7時間処理したPC-9細胞 (1×10^7) から、総RNAを調整した後、oligo(dT)₃₀ で poly(A)⁺RNAを精製した。1 μg の poly(A)⁺RNA を α -³²P-dATPの存在下で、MMTV reverse transcriptaseによってcDNAとした。³²PでラベルしたcDNAでarray membraneでhybridizeして、588個の遺伝子発現を検討した。コントロールとして、未処理のPC-9細胞から調整したpoly(A)⁺RNAを用いた。GAPDHなどのhouse keeping genesのカウントがコントロールとEGCGを処理したものとで同等であることを確認した後、コントロールに比較して解析した。40%に増加、あるいは、40%以下に減少しているものを有意な変化とした。

C. 研究結果

(1) 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産生抑制

昨年度、緑茶抽出物の投与がTNF- α トランスジェニックマウスの肺組織でのTNF- α mRNA発現を抑制することを報告した。TNF- α トランスジェニックマウスでは、TNF- α の発現は、SP-Cのプロモーターによって制御されている。肺におけるSP-C mRNAの発現は、緑茶投与群、及び、未処理群では同等であった。従って、緑茶抽出物によ

るTNF- α mRNAの発現抑制効果はSP-Cプロモーターによって発現誘導されたTNF- α が二次的に誘導するTNF- α の発現を抑制しているものと考えられる。

そこで、本年度は緑茶抽出物の抑制効果をサイトカインの蛋白レベルで確認した。水だけを飲用したTNF- α トランスジェニックマウスの肺組織で、TNF- α は3.0 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 蛋白であった。そのTNF- α 量が緑茶抽出物の投与によって2.1 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 蛋白と70%に減少した。これは、統計学的に有意であり、TNF- α mRNA発現に対する抑制効果より強いものであった。次に、ほかの炎症性サイトカインであるIL-6について検討した。緑茶抽出物の投与はそれぞれ、IL-6をコントロールの80%に抑制した。この抑制効果は、TNF- α の産生抑制と一致していた。経口的に投与した緑茶抽出物が肺に到達して、炎症性サイトカインの産生を抑制することを確認した。

(2) cDNA Expression Arrayを用いた EGCGの遺伝子発現に対する効果

茶ポリフェノールの抗酸化作用とは別の新たな作用機構について研究するため、cDNA Expression Arrayを用いて検討した。cDNA Expression Arrayは、588の遺伝子の発現を同時に解析ができる新しい方法である。増殖期のPC-9細胞は、588遺伝子のうち171の遺伝子が発現していた。EGCGの処理は10種の遺伝子の発現を未処理細胞に比較して60%以下に抑制し、また、15種の遺伝子の発現を140%以上に亢進した。主に、EGCGによって、発現が抑制あるいは亢進される遺伝子は、主に、レセプター、細胞周期、細胞増殖制御因子、増殖因子、サイトカインに分類される遺伝子であった。

D. 考察

(1) TNF- α トランスジェニックマウスの

肺において、緑茶の飲用がTNF- α タンパク質の産生を有意に抑制することを見出した。TNF- α mRNAの発現の抑制に比べて、より強くTNF- α タンパク質の産生が抑制された。これは、緑茶のTNF- α 産生抑制機構が、単に、TNF- α mRNAの発現抑制だけでなく、TNF- α の遊離に至るまでのいろいろなプロセスを抑制することによると推測される。経口的に投与した緑茶抽出物の茶ポリフェノールが、肺に蓄積して抑制効果をもたらしていると考えている。

(2) cDNA Expression Arrayの解析から、EGCGは、処理後7時間で既に様々な遺伝子の発現を抑制、あるいは、亢進していることが始めて明らかとなった。これまで、緑茶の効果は、主に、抑制効果として認められていたが、発現亢進される遺伝子が明らかとなった。これらの遺伝子が、EGCGの糖尿病や動脈硬化の予防にどのように関与するか検討を進める。

E. 結論

緑茶の飲用がTNF- α トランスジェニックマウスの肺におけるTNF- α 蛋白の産生を抑制し、サイトカインネットワークによって二次的に産生されるIL-6量も減少させることを見出した。

茶ポリフェノールのEGCGは、レセプター、細胞周期、細胞増殖制御因子、増殖因子、サイトカインに分類される遺伝子の発現を亢進あるいは抑制することを見出した。

F. 研究発表

1. 論文発表

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. 90: 669-676 (1999)

2) Okabe, S., Ochiai, Y., Aida, M., Park, K., Kim, S.-J., Nomura, T., Suganuma, M. and Fujiki, H. Mechanistic aspects of green tea as a cancer preventive effect of components on human stomach cancer cell lines, Jpn. J. Cancer Res. 90: 733-739 (1999)

3) Inoue, K., Okabe, S., Sueoka, E., Sueoka, N., Tabei, T. and Suganuma, M. The role of interleukin-6 in inhibition of lung metastasis in subcutaneoustumor-bearing mice. Oncology Reports 7: 69-73 (2000)

2. 学会発表

1) TNF- α KOマウスを用いた発がんプロモーション機構の検討

岡部幸子、菅沼雅美、末岡榮三朗、藤木博太

第58回日本癌学会総会記事, p267, 1999

2) 緑茶ポリフェノールによるがん細胞の増殖抑制機構

岡部幸子、菅沼雅美、末岡榮三朗、藤木博太

第22回日本分子生物学会年会、p738, 1999

3) Mechanistic aspects of green tea as a cancer preventive

Okabe, S., Suganuma, M., Park, K., Kim, S-J and Fujiki, H. Seoul Symposium of Journal of Cancer Research & Clinical Oncology, p.13, 1999