

厚生科学研究研究費補助金
長寿科学総合研究事業

緑茶による老年病予防に関する研究
(H10-長寿-021)

平成 12 年度 総括研究報告書

埼玉県立がんセンター研究所
主任研究者 菅沼 雅美

平成 13 (2001) 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告	
緑茶による老年病予防に関する研究	……………1
菅沼 雅美	
II. 分担研究報告書	
1. 緑茶によるがん予防に関する研究、及び、 ³ H-EGCG の薬理学的研究	
菅沼雅美	……………8
2. 緑茶による遺伝子発現変化に関する研究	
岡部幸子	……………13
3. 緑茶による肺がんの予防機構に関する研究	
藤本伸一	……………16
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	……………19
IV. 研究成果の刊行物・別刷	……………21

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杯の飲用は、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。本年度は、茶ポリフェノールであるEGCGとがん予防薬sulindacとの併用が、腫瘍壊死因子（TNF- α ）の遊離抑制、及び、がん細胞のアポトーシス誘導等に相乗効果をもたらすことを見出した。更に、緑茶エキスとsulindacとの併用は、Apc遺伝子に異常を持つMinマウスの消化管腫瘍の発生をそれぞれ単独処理よりもより強力に抑制した。一方、EGCGとtamoxifenとの組み合わせは、相加的ながん予防効果を示した。すなわち、緑茶とがん予防薬との併用は、毒性のない実用的ながん予防法になると考える。次に、EGCGによる遺伝子の発現変化をcDNA Expression Arrayを用いて検討した。EGCGはTNF- α のシグナル伝達に關与するNF- κ B inducing kinase (NIK)の発現を減少し、retinoic acid receptor α 1とinsulin growth factor binding protein 3の発現を増加した。更に、EGCGとsulindacの併用は、単独では変化しなかった遺伝子の発現を新たに亢進、あるいは、抑制することを見出した。Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein B1 (hnRNPB1)は、肺発がんの早期から発現が亢進しているタンパク質である。このタンパク質の高発現はがん化に關与していると考え研究を進めている。今回、EGCGの処理がhnRNPB1の発現を転写レベルで抑制することを始めて見出した。

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
岡部幸子 埼玉県立がんセンター研 研究員
藤本伸一 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、ヒトは高齢になっても健康を維持し、生活の質を向上することができるよう努力する必要がある。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を無理に変更せず、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っていると推測される。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、がんの発症年齢が遅れること、更に、虚血性心疾患や糖尿病の有病率が低いことを明らかにした。この結果は、緑茶ががんだけでなくいろいろな老年病の予防に役

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した。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。これまで、私共は、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を明らかにしてきた。本年度は、緑茶とがん予防薬との併用による相乗効果に関する研究を進めた。その結果、緑茶とがん予防薬との組み合わせは、がん予防効果を相乗的に増強することを見出した。更に、その作用機構について、遺伝子発現のレベルで検討した。

B. 研究方法

(1) 緑茶とがん予防薬との相乗効果

i) TNF- α の遊離に対する相乗的抑制効果

BALB/3T3細胞をオカダ酸で処理すると、TNF- α が培養液中に遊離される。オカダ酸を処理する1

時間前に、様々な濃度のEGCG, sulindac, tamoxifen、EGCG + sulindac、あるいは、EGCG + tamoxifen で BALB/3T3細胞を処理し、オカダ酸を加えて24時間培養した。培養液中のTNF- α は、抗TNF- α 抗体を用いたELISA法によって測定した。抑制効果は、オカダ酸処理によって遊離されたTNF- α を100%として表した。

ii) がん細胞のアポトーシス誘導における相乗効果

ヒト肺がん細胞株、PC-9 (2×10^5 cells/ well)をEGCG, sulindac, tamoxifen, EGCG + sulindac あるいは、EGCG + tamoxifenの存在下で2日間培養した。アポトーシスは断片化DNA量で測定した。すなわち、細胞質中のヌクレオソームに結合した断片化DNA量を抗ヒストン抗体と抗DNA抗体によるELISA法を用い415 nmの吸収で測定した。

iii) がん細胞の増殖抑制効果における相乗効果

PC-9細胞 (4×10^5 cells/ml)をEGCG, sulindac、あるいは、EGCG + sulindac で2日間培養し、生細胞数をトリパンブルー染色で測定した。未処理の細胞数を100%として増殖抑制効果を表した。

ヒト乳がん細胞株MCF-7 (1×10^4 cells/ml)をEGCG, tamoxifen、あるいは、EGCG + tamoxifenで2日間培養し、生細胞数をMTT法で測定した。

iv) Minマウスにおける消化管腫瘍の発生に対する相乗的抑制効果

雄 C57BL/6J-Min/+マウスはジャクソンラボラトリーから購入した。Minマウスを1) 0.1%緑茶エキスを含む飲料水投与群、2) 0.03% sulindacを含む餌投与群、3) 緑茶エキス + sulindac投与群、4) 未処理のコントロール群の4群に分けて、生後6週から16週令までそれぞれ処理した。緑茶エキスは11.2% EGCG, 10.3% (-)epigallocatechin (EGC), 2.5% (-)epicatechin (EC), 及び、2.3% (-)epicatechin gallate (ECG)を含む。実験終了時に、消化管を摘出し、0.1%のメチレンブルーで染色した。長径0.4 mm以上の腫瘍を実体顕微鏡下で測定した。更に、腫瘍は組織病理学的に検討し、過形成、腺腫、及び、腺がんに分類した。

(2) cDNA Expression Arrayを用いたEGCGによる遺伝子発現変化

i) EGCG処理による遺伝子発現変化

EGCG (200 μ M) で7時間処理したPC-9細胞 (1×10^7)から、全RNAを調整した後、oligo(dT)₃₀を用いpoly(A)⁺RNAを精製した。poly(A)⁺RNA 1 μ gを α -³²P-dATPの存在下で、MMTV reverse transcriptase

によってcDNAとした。cDNAを³²Pでラベルし、array membraneとhybridizeして、588個の遺伝子発現を検討した。遺伝子発現はBAS2000 イメージアナライザーで測定した。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と β -actinのカウントでnormalizeした後、遺伝子の発現を比較した。相対的な遺伝子の発現量は β -actinの発現量を1.0として表した。EGCGの処理により遺伝子発現がコントロールに比較して2倍以上の増加したもの、あるいは、0.5倍以下の減少を示したものを、有意に発現変化した遺伝子とみなした。

ii) EGCGとsulindacとの併用による遺伝子発現の変化、

PC-9細胞 (1×10^7)をEGCG (100 μ M), sulindac (100 μ M), あるいは、EGCG + sulindac で24時間処理し、全RNAを抽出した。精製したpoly(A)⁺RNAを上記の方法に従いcDNAにして、遺伝子発現パターンをarray membraneで検討した。それぞれの遺伝子発現を未処理の発現パターンと比較した。また、解析は上記の方法に従った。

(3) 茶ポリフェノールによるhnRNPB1タンパク質の発現抑制

i) hnRNPB1タンパク質の発現抑制

ヒト肺がん細胞株A549を茶ポリフェノール(EGCG, ECG)、あるいは、genistein存在下で2日間培養し、lysis bufferを用いて細胞からタンパク質を抽出した。それぞれのタンパク質を10% SDS-PAGEで分離した後、ニトロセルロースメンブランにブロッティングし、抗hnRNPB1抗体でタンパク質を検出した。抗hnRNPB1抗体は、hnRNPB1に特異的な12アミノ酸を抗原として、ウサギを免疫して得たポリクローナル抗体である。

ii) hnRNPB1 mRNAの発現抑制

A549細胞を上記と同様に処理し、全RNAをIsogenを用いて抽出した。hnRNPB1 mRNAの発現はreverse transcription-PCR法(RT-PCR)によって測定した。内部コントロールとしてGAPDHを用い、hnRNPB1の発現量は、GAPDHでnormalizeした後、未処理の細胞での発現量と比較した。

iii) hnRNPA2/B1の転写活性の抑制

hnRNPA2/B1のプロモーター領域(-603/-1)を含むluciferaseレポーターコンストラクトを、A549細胞にトランスフェクトした。その後、いろいろな濃度のEGCG、あるいは、genisteinで2日間培養してluciferase活性をdual-luciferase reporter assay systemで

測定した。

(倫理面への配慮)

実験動物に関しては、動物愛護上の配慮を持って行った。また、当センター内の動物委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

(1) 緑茶とがん予防薬sulindacとの併用による相乗効果

i) TNF- α 遊離の相乗的抑制効果

腫瘍壊死因子TNF- α は発がんを促進するだけでなく、動脈硬化や糖尿病などの様々な疾患の発症に関与するサイトカインである。これまで、茶ポリフェノールによるAP-1やNF- κ Bの活性化の抑制、TNF- α の遺伝子発現を抑制、更に、TNF- α の遊離を抑制等を報告してきた。すなわち、TNF- α の産生抑制が茶ポリフェノールの老年病予防効果において、重要な作用機構であると考えられる。緑茶には、TNF- α 産生を抑制する茶ポリフェノール(EGCG、ECGとEGC)と、抑制しないECが含まれている。不活性なECは³H-EGCG細胞内への取り込みを促進し、TNF- α 産生の抑制を相乗的に増強することを見出した。この緑茶の相乗効果に関する研究を更に展開させた。すなわち、がん予防薬であるsulindacやtamoxifenがTNF- α の遊離を抑制することから、EGCGとsulindac、あるいはEGCGとtamoxifenとの併用効果について検討した。

10 μ Mのsulindac単独処理、あるいは、50 μ M EGCG単独処理は、TNF- α の遊離を抑制しない。しかし、EGCGとsulindacを同時に処理すると、88.5%と著しい抑制効果を示した。すなわち、EGCGとsulindacの併用はsulindac単独処理に比べて9.9倍強い抑制効果を示した。一方、EGCGとsulindacの活性型代謝産物であるsulindac sulfideとの併用はsulindac sulfide単独に比べて2.1倍強く抑制した。

ii) がん細胞のアポトーシス誘導における相乗効果

次に、ヒト肺がん細胞株PC-9のアポトーシス誘導における相乗効果を検討した。Sulindac単独処理では、200 μ Mの濃度までほとんどアポトーシスの誘導は認められなかった。また、75 μ M EGCG単独処理でもわずかなDNA断片化が観察されただけであった。ところが、EGCGとsulindacを併用すると、ほとんどの細胞でアポトーシスが生じた。断片化DNA量で比較すると、それぞれの単独処理に比較して、EGCGとsulindacの併用は20倍以上の相

乗効果を示した。Sulindacは非ステロイド系の抗炎症剤であり、COX-1とCOX-2の阻害活性を示す。Sulindacの代謝産物には活性型のsulindac sulfideと不活性型のsulindac sulfoneとがあるので、次に、EGCGとの相乗効果を2つの代謝産物で比較した。10 μ M sulindac sulfoneとsulindac sulfideは共に全くアポトーシスを誘導しなかった。しかし、75 μ M EGCGとの併用すると顕著にアポトーシスを誘導した。すなわち、COX-1とCOX-2の阻害活性に関係なく、EGCGとの併用はがん細胞のアポトーシスを相乗的に誘導することが見出された。EGCGとsulindacとの併用は、PC-9細胞だけでなくマウス大腸がん細胞株、colon 26の増殖抑制に対しても相乗的な効果を示した。

iv) Minマウスの消化管腫瘍発生に対する抑制効果

EGCGとsulindacとの相乗的がん予防効果を動物実験のレベルで確認するため、Minマウスで発がん抑制実験を行った。MinマウスはApc遺伝子のコドン850のTTGがTAGに変異したヘテロの異常を持つマウスである。Minマウスは生後4週から、小腸と大腸にたくさんのポリープが自然発症し、家族性大腸腺腫症のモデルマウスである。Apc遺伝子の異常は家族性大腸腺腫症だけでなく、多くの大腸がんを認められている。Minマウスを緑茶エキス単独群、sulindac単独群、緑茶エキス + sulindac群とコントロール群の4群に分け、6週令から16週令までの期間、それぞれの餌と飲料水を投与した。実験終了16週令のコントロール群では、一匹当たり平均72.3 \pm 28.3個の腫瘍が生じた。これに対して、緑茶エキス単独群では56.7 \pm 3.5個、sulindac単独群では49.0 \pm 12.7個とそれぞれ21.6%と32.3%の抑制効果を示した。緑茶エキスの飲用は、sulindacと同程度に腫瘍の発生を抑制することを今回の実験で始めて見出した。次に、緑茶エキス + sulindac群は32.0 \pm 18.7であり、それぞれの単独群に比べて、更に強く腫瘍の発生を抑制した。その抑制は55.7%であった。更に、緑茶エキス + sulindac群の抑制効果は、長径1 mm以上の腫瘍で比べるとより顕著であった。すなわち、コントロール群が59.5 \pm 13.1個に対して、緑茶エキス + sulindac群は17.0 \pm 5.0個と71.4%の抑制が得られた。以上の結果は、緑茶エキスとsulindacとの併用は、sulindac単独処理よりも強力に腫瘍の発生と増殖を抑制することを見出した。

Minマウスの消化管には、腺腫と腺がんが認められた。しかし、緑茶エキス単独群、sulindac単独

群、及び、緑茶エキス+sulindac群にはいずれも腺がんは生じなかった。従って、緑茶エキスとsulindacは、腺がんの発生を抑制していると考えられる。この結果は、緑茶が、sulindacのがん予防効果を増強するため、sulindacがもつ消化管に対する副作用を軽減することを目的とする” 実用的がん予防” の例である。

(2) EGCGとがん予防薬tamoxifenとの相加的がん予防効果

乳がんの予防薬であるtamoxifenは、TNF- α 遊離を抑制する。50%の抑制効果を示す濃度IC₅₀は11 μ Mである。EGCGとtamoxifenを同時に処理すると、そのIC₅₀は5 μ Mに減少した。それは丁度、EGCGとtamoxifenの抑制効果を足しあわせた効果であった。すなわち、EGCGとtamoxifenの併用は相加的にTNF- α の遊離を抑制した。

次に、乳がん細胞株、MCF-7細胞の増殖抑制効果について検討した。EGCGは100~500 μ Mで濃度依存性にMCF-7細胞の増殖を抑制した。この系に、1 μ M tamoxifenを加えると、相加的な増殖効果が得られた。すなわち、EGCGとtamoxifenの併用はsulindacとは異なり、相加的な効果をもたらした。

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

i) EGCG処理による遺伝子発現の変化

茶ポリフェノールEGCGの処理によって、様々な遺伝子の発現が変化する。未処理のPC-9細胞では、検討した588の遺伝子の中、163の遺伝子が発現していた。EGCG (200 μ M)で7時間処理すると、未処理の細胞に比べて12の遺伝子の発現が0.5倍以下に減少し、4つの遺伝子の発現が2倍以上に亢進した。EGCGによって発現が減少した遺伝子には、アポトーシスに関連したリン酸化酵素遺伝子 (NF- κ B inducing kinase (NIK) と death-associated kinase 1 (DAK1))、チロシンリン酸化酵素 (SKY), small GTPaseとその制御蛋白(CDC42, Rho B, T-lymphoma invasion and metastasis inducing TIAM1)、細胞周期調節関連遺伝子、(p38 MAPキナーゼ、CDC25B/M-phase inducer phosphatase 2)、細胞間相互作用遺伝子 (Envoplakin, Synapse-associated protein 102)、受容体関連遺伝子 (dishevelled 1, EGFreceptor)であった。中でも、もっとも強く抑制されたNIK遺伝子は、TNF- α 受容体からNF- κ Bの活性化へのシグナル伝達に参与するリン酸化酵素である。EGCGはTNF- α の発現を抑

制するだけでなく、TNF- α のシグナル伝達に参与する遺伝子の発現をも抑制するが初めて見出された。

一方、EGCGによって発現が亢進した遺伝子は、retinoblastoma binding protein (RBQ1), vascular endothelial growth factor (VEGF), retinoic acid receptor α 1 (RAR- α 1) と insulin-like growth factor-binding protein 3 (IGFBP 3)であった。RAR- α 1とIGFBP 3は、がん予防に関連した遺伝子であるので興味深い。

ii) EGCGとsulindacとの併用による遺伝子発現の変化

EGCG処理によって発現が変化した遺伝子を基に、次に、EGCG + sulindacの処理でさらに、どのような遺伝子の発現が変化するかを検討した。EGCG (100 μ M)+sulindac (100 μ M)でPC-9細胞を24時間処理した。同様に、EGCG (100 μ M)単独処理、sulindac (100 μ M)単独処理の細胞からもRNAを抽出し、未処理の場合と比較した。EGCG + sulindacの処理は、GADD153遺伝子の発現を11.6倍、また、WAF1遺伝子の発現を3.0倍亢進した。面白いことに、GADD153とWAF1遺伝子は共にEGCG単独処理、sulindac単独処理でも全く影響を受けなかったものである。更に、EGCG + sulindac処理は、T-plasminogen activator, TIMP3, IL-1 β , Integrin β 4, Cytokeratin 7, Rho C、及び、Rho GDP dissociation inhibitor 1の7つの遺伝子の発現を有意に抑制した。これら7つの遺伝子も、それぞれの単独処理では全く発現が変動しなかった遺伝子である。以上の結果は、EGCGとsulindacの併用は、EGCG単独やsulindac単独処理の場合とは異なる、新たな遺伝子の発現を誘導することが明らかになった。新たに発現が見られた遺伝子が、アポトーシスの誘導やがん予防効果において、相乗的に作用していると考えられる。

(4) 茶ポリフェノールによるhnRNPB1の発現抑制

Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein B1 (hnRNP B1) はhnRNPA2タンパク質のスプライシングバリエーションであり、肺がんの組織では発現が著しく亢進している。すなわち、hnRNPB1タンパク質は臨床病期 I期の肺がん全例に高発現していた。さらに、hnRNP B1タンパク質はレントゲン写真では見出せない微小肺がん組織43例中25例 (58.1%)、前がん病変である気管支異形成においても、63.6%に高発現していた。従って、hnRNPB1タンパク質の高発現は、肺がんのきわめて初期に生じる変化であると思われる。したがって、hnRNPB1は早

期診断や、がん予防の生物学的代理指標に有用であるだけでなく、発がん過程に重要な役割を果たしていると考えられる。

今回、茶ポリフェノールは肺がん細胞でhnRNPB1タンパク質の発現を抑制するか検討した。EGCGは濃度依存性にA549細胞の増殖を抑制し、125 μM EGCGは80%の増殖抑制効果を示した。一方、ECGもEGCGとほぼ同等の強さで増殖を抑制した。大豆に含まれるがん予防物質であるgenisteinは31 μM で65%の増殖抑制を示した。この条件でA549細胞を処理し、hnRNPB1タンパク質の発現を検討した。EGCG、ECG、および、genisteinは、いずれも31~125 μM の濃度の範囲で濃度依存性にhnRNPB1タンパク質の量を減少した。125 μM の濃度で比較すると、hnRNPB1タンパク質はEGCG処理で20%、ECG処理：30%、genistein処理：0%に減少した。hnRNPB1タンパク質の発現抑制は増殖抑制効果を伴っていた。

ii) hnRNPB1 mRNA発現の抑制

次に、hnRNPB1タンパク質の発現が減少した際のmRNAの発現について検討した。hnRNPB1 mRNAの発現は、EGCG、ECGあるいはgenisteinの処理によって濃度依存性に減少した。すなわち、hnRNPB1タンパク質量の減少に一致して、hnRNPB1 mRNAも減少した。従って、EGCG、ECGの茶ポリフェノールと同様、genisteinは、hnRNPB1の発現をmRNAのレベルで抑制していることが明らかになった。

iii) hnRNPB1の転写活性の抑制

hnRNPB1 mRNAの発現は、hnRNPA2/B1共通のプロモーター領域によって、調節されている。茶ポリフェノールが転写活性を抑制しているのか、検討するため、プロモーター領域(-603/-1)を含むluciferaseレポーターを用いた。未処理のA549細胞におけるluciferase活性は210であったのに対し、EGCGを処理した細胞では、35 μM : 89、62 μM : 38、125 μM : 25と濃度依存性に活性は減少した。一方、genisteinも31~125 μM の濃度でluciferase活性の減少を認めた。すなわち、EGCGとgenisteinはともに、hnRNPB1を転写レベルで抑制することを始めて見出した。

D. 考察

(1) 緑茶のがん予防効果は、動物の食道、胃、十二指腸、大腸、肺、肝臓、膵臓、膀胱、前立腺、乳腺、皮膚などの各臓器の発がん実験で確認されている。緑茶は毒性がないことから、一般健常者

を対象としたがん罹患する前の予防に適していると考えている。今回新たに見出した緑茶とがん予防薬との併用による相乗効果は、緑茶のがんの治療後の患者を対象とした場合でも応用できることを示唆した。緑茶とがん予防薬との組み合わせは、がん予防薬の副作用を軽減し、かつ、予防効果を強める実用的ながん予防であると考えられる。

TNF- α はがんだけでなく、動脈硬化、間質性肺炎、糖尿病の発症や進展に関与した炎症性サイトカインである。EGCG単独あるいはsulindac単独に比べ、両者の併用は約10倍強いTNF- α の遊離を抑制した。従って、がん予防効果だけでなく、動脈硬化、糖尿病などの老年病の予防に対しても、この併用は有効であると考えられる。Sulindacはもとも抗炎症剤であることから、副作用を軽減できる緑茶との作用は老年病の予防に応用可能であると考えられる。

一方、tamoxifenは乳がん術後の再発予防に既に用いられている。緑茶を1日10杯以上飲む患者では、tamoxifenの予防効果が増強されているのか興味深い。また、tamoxifenは抗エストロゲン剤であるので、骨粗鬆症の予防効果をもつ。緑茶と併用することによって、tamoxifenの骨粗鬆症予防効果の増強も期待できると思われる。

(2) EGCGがいろいろなリン酸化酵素やGTPase等の遺伝子発現を抑制し、レセプター等の発現を亢進することを始めて見出した。その中で、EGCGがNIKの発現を抑制したことは重要である。NIKはMAP kinase kinase kinase familyであり、TNF- α の受容体のエフェクターTRADDとTRAF2と相互に作用し、I- κ Bキナーゼをリン酸化する。すなわち、EGCGはNIKの発現を抑制して、TNF- α の受容体からのシグナル伝達を抑制していると推測される。他のp38 MAPキナーゼの発現抑制やRAR α 1やIGFBP-3の発現亢進がどのようにEGCGのがん予防効果や老年病の予防効果に関与しているか今後の検討が必要である。

EGCGとsulindacとの併用は、それぞれの単独処理では認められなかった新たな遺伝子の発現を誘導した。しかも、sulindacによるCOX-1とCOX-2の抑制効果ではない新しい作用機構が関与していると推測された。併用によって新たに誘導された遺伝子発現が、どのように相乗的ながん予防効果に関与しているのかが今後の研究課題である。

(3) 茶ポリフェノールがhnRNPB1の発現を転写レベルで抑制していることが明らかとなった。しかも、その効果は、チロシンキナーゼ阻害剤genistein

と同様であった。hnRNPB1は肺がんの全がん病変である気管支異形成でも高発現している。茶ポリフェノールがhnRNPB1の発現を抑制することから、hnRNPB1の発現抑制はがん予防の生物学的代理指標としても応用できると考えられる。現在、hnRNPB1の発現の転写調節をする因子について解析を進めている。どのような作用機構で、EGCGが発現抑制を誘導するか、今後、明らかにする必要がある。

(4) 日常の飲み物としての緑茶飲用量から、がんや老年病に対して予防効果を示す飲用量に増量することができれば、緑茶飲料によるがん・老年病の予防が達成できる。そこで、多くのヒトが、容易に一日10杯の茶ポリフェノールを摂取できるよう、埼玉県農林総合研究センター特産支所は緑茶エキス粒を開発した。緑茶エキス粒は凍結乾燥した緑茶の粉末を粒に固めたものである。埼玉県で行った飲用試験によれば、日常飲用している緑茶とこの緑茶エキス粒を合わせて、一日10杯分の茶ポリフェノール量の摂取は、ほとんど多くのヒトに可能であることが明らかになった。日本においては、今後老年病を予防する飲み物として緑茶を活用することが重要である。

一方、緑茶を日常飲用する習慣がないアメリカでは、緑茶エキスのカプセルを用いて、緑茶エキスをがん予防薬として開発するための臨床試験が行われている。この臨床試験は、アメリカ食品医薬品局 (FDA) の認可を受けて、テキサス M. D. アンダーソンがんセンターの Waun Ki Hong 博士のリーダーシップの基に行われている。既に、臨床第一相試験は終了して、最大耐用量が導き出された。それは、1日1g/m²3回であり、これは緑茶30~40杯分に相当する。この結果からも、一日10杯分の緑茶の飲用は、特に問題のない量であることが示された。

E. 結論

緑茶は毒性がないので、高齢者にとっても無理のないがん予防法であると考えられる。今後、緑茶の効能は健康な高齢化社会づくりに受け入れられると考える。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Suganuma, M., Sueoka, E., Sueoka, N., Okabe, S. and Fujiki, H. Mechanisms of cancer prevention by tea polyphenols based on inhibition

of TNF- α expression. *BioFactors*. 13: 67-72 (2000)

- 2) 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
- 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 subcutaneous tumor-bearing mice. *Oncology Reports* 7: 69-73 (2000)
- 4) Nakachi, K., Matsuyama, S., Miyake, S., Suganuma, M. and Imai, K. Preventive effects of drinking green tea on cancer and cardiovascular disease: epidemiological evidence for multiple targeting prevention. *Bio Factors* 13: 49-54 (2000)
- 5) Tori, M., Sono, Y., Nakashiba, Y., Hamada, N., Sono, M., Asakawa, Y., Suganuma, M., Okabe, S., Fujiki, H. Syntheses of isocitric acid derivatives and biological evaluation *Tetrahedron Letters*, 41: 3095-3098 (2000)
- 6) Suganuma, M., Ohkura, Y., Okabe, S. and Fujiki, H. Combination cancer chemoprevention with green tea extract and sulindac shown in intestinal tumor formation in Min mice. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 127: 69-72 (2001)
- 7) Fujiki, H., Suganuma, M., Okabe, S., Sueoka, E., Sueoka, N., Matsuyama, S., Imai, K. and Nakachi, K. Green tea as a cancer preventive. In: *Dietary Anticarcinogen and Antimutagens, Chemical and Biological Aspects.* (I. T. Johnson and G. R. Fenwick eds.) Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK. pp.12-17 (2000)
- 8) Fujiki, H., Suganuma, M., Okabe, S., Sueoka, E., Sueoka, N., Fujimoto, N., Goto, Y., Matsuyama, S., Imai, K. and Nakachi, K. Cancer Prevention with green tea and monitoring by a new biomarker, hnRNP B1. *Mutation Res.* in press (2001)

2. 学会発表

- 1) Suganuma, M., Okabe, S. and Fujiki, H. Effect of green tea polyphenols on gene expression using cDNA expression array. *American Association for Cancer Research 91th Annual*

- Meeting, p.532 (2000)
- 2) 菅沼雅美, 岡部幸子, 藤木博太 TNF- α と IL-1 の協調発現による新しい発がんプロモーション機構
第59回日本癌学会総会記事, p483 (2000)
 - 3) 岡部幸子, 菅沼雅美, 末岡尚子, 藤本伸一, 藤木博太 DNA Expression Array を用いた緑茶ポリフェノールEGCGによる遺伝子発現の解析 第59回日本癌学会総会記事, p215 (2000)
 - 4) Suganuma, M., Okabe, S., Fujimoto, N. and Fujiki, H. Cancer prevention with green tea: Mechanistic approaches. Japan-Korea Cancer Research Symposium, p.24 (2001)
 - 5) Suganuma, M., Okabe, S., Fujimoto, N., Imai, K., Nakachi, K. and Fujiki, H. Cancer prevention with green tea from basic study to clinical intervention. Keystone Symposia, p.44 (2001)
 - 6) Suganuma, M., Okabe, S. and Fujiki, H. Combination cancer chemoprevention with green tea polyphenols and sulindac. American Association for Cancer Research 92th Annual Meeting, p.99 (2001)
 - 7) Fujimoto, N., Sueoka, N., Okabe, S., Suganuma, M., Sueoka, E. and Fujiki, H. hnRNP B1 gene expression in lung cancer cell line and its significance in lung carcinogenesis. American Association for Cancer Research 92th Annual Meeting, p.255 (2001)
 - 8) Fujimoto, N., Sueoka, N., Sueoka, E., Okabe, S., Suganuma, M. and Fujiki, H. Regulation of hnRNP B1 expression in human lung cancer cell lines and its significance as a biomarker for cancer chemoprevention. Japan-Korea Cancer Research Symposium, p.84 (2001)

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

緑茶によるがん予防に関する研究、及び、³H-EGCGの薬理学的研究

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。本年度は、茶ポリフェノールであるEGCGとがん予防薬sulindacとの併用が、腫瘍壊死因子（TNF- α ）の遊離抑制、及び、がん細胞のアポトーシス誘導において相乗的な効果をもたらすことを見出した。更に、緑茶エキスとsulindacとの併用投与が、Apc遺伝子に異常を持つMinマウスにおける消化管腫瘍の発生をそれぞれの単独処理よりも強力に抑制した。一方、EGCGとtamoxifenとの組み合わせでは、相加的ながん予防効果が得られた。すなわち、緑茶とがん予防薬との併用は、毒性のない”実用的ながん予防”である。

A. 研究目的

高齢化社会を迎えるに当たって、高齢になっても健康を維持し、生活の質の向上することができるよう努力する必要がある。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、がんの発症年齢が遅れること、更に、虚血性心疾患や糖尿病の有病率が低いことを明らかにした。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。

腫瘍壊死因子TNF- α は発がんを促進するだけでなく、動脈硬化や糖尿病などの様々な疾患の発症に関与するサイトカインである。これまで、茶ポリフェノールがAP-1やNF- κ Bの活性化の抑制を介して、TNF- α の遺伝子発現を抑制し、TNF- α の遊離を抑制することを報告してきた。すなわち、茶ポリフェノールの老年病予防効果において、TNF- α の産生抑制が重要な作用機構であると考えている。緑茶エキスには、TNF- α 産生の抑制効果をもつ茶ポリフェノール、(EGCG、ECGとEGC)と抑制しないECが含まれている。

³H-EGCGを用いた研究から、私共は、不活性なECがEGCGの細胞内への取り込みを促進して、TNF- α 産生の抑制効果を相乗的に増強することを見出した。この緑茶の相乗効果に関する研究を更に展開させた。すなわち、がん予防薬であるsulindacやtamoxifenがTNF- α の遊離を抑制することから、EGCGとsulindac、あるいはEGCGとtamoxifenとの併用効果について検討した。

B. 研究方法

(1) TNF- α の遊離に対する相乗的抑制効果

BALB/3T3細胞をオカダ酸で処理すると、TNF- α が培養液中に遊離される。オカダ酸を処理する1時間前に、様々な濃度のEGCG、sulindac、EGCG + sulindac、tamoxifen、あるいは、EGCG + tamoxifenでBALB/3T3細胞を処理し、オカダ酸を加えて24時間培養した。培養液中のTNF- α は、抗TNF- α 抗体を用いたELISA法によって測定した。抑制効果は、オカダ酸処理によって遊離されたTNF- α を100%として表した。

(2) がん細胞のアポトーシス誘導における相乗効果

ヒト肺がん細胞株、PC-9 (2×10^5 cells/well)をEGCG、sulindac、tamoxifen、EGCG + sulindacあるいは、EGCG + tamoxifenの存在下で2日間処理した。アポトーシスは断片化DNA量で定量した。すなわち、細胞質中のヌクレオソームに結合した断片化DNA量を抗ヒストン抗体と抗DNA抗体によるELISA法を用い415 nmの吸収で測定した。

(3) がん細胞の増殖抑制効果における相乗効果

PC-9細胞 (4×10^5 cells/ml)をEGCG、

sulindac、あるいは、EGCG + sulindacで2日間処理し、生細胞数をトリパンブルー染色で測定した。未処理の細胞数を100%として増殖抑制効果を表した。

ヒト乳がん細胞株MCF-7(1×10^4 cells/ml)をEGCG、tamoxifen、あるいは、EGCG + tamoxifenで2日間処理し、生細胞数をMIT法で測定した。

(4) Minマウスにおける消化管腫瘍の発生に対する相乗的抑制効果

雄 C57BL/6J-Min/+マウスはジャクソンラボラトリーから購入した。Minマウスを1) 0.1%緑茶エキスを含む飲料水投与群、2) 0.03% sulindacを含む餌投与群、3) 緑茶エキス + sulindac投与群、4) 未処理のコントロール群の4群に分けて、生後6週から16週令までそれぞれ処理した。緑茶エキスは11.2% EGCG, 10.3% (-)-epigallocatechin (EGC), 2.5% (-)-epicatechin (EC), 及び、2.3% (-)-epicatechin gallate (ECG)の茶ポリフェノールを含む。実験終了時に、消化管を摘出し、0.1%のメチレンブルーで染色した。長径0.4 mm以上の腫瘍個数を実体顕微鏡下で計測した。更に、腫瘍は組織病理学的に検討し、過形成、腺腫、及び、腺がんに分類した。

C. 研究結果

(1) 緑茶エキスとがん予防薬sulindacとの併用による相乗効果

i) TNF- α 遊離の相乗的抑制効果

10 μ Mのsulindac単独処理、あるいは、50 μ M EGCG単独処理は、有意なTNF- α の遊離を抑制を示さない。しかし、EGCGとsulindacを同時に処理すると、88.5%と著しい抑制効果を示した。すなわち、EGCGとsulindacの併用はsulindac単独処理に比べて9.9倍強い抑制効果を示した。一方、sulindacの活性型代謝産物である

sulindac sulfideとEGCGとの併用はsulindac sulfide単独に比べて2.1倍に促進した。

ii) がん細胞のアポトーシス誘導における相乗効果

次に、ヒト肺がん細胞株PC-9のアポトーシス誘導における相乗効果を検討した。

Sulindac単独処理では、200 μ Mの濃度までほとんどDNAの断片化、すなわち、アポトーシスの誘導は認められなかった。また、75 μ MのEGCG単独処理でもわずかなDNA断片化が観察されただけであった。ところが、EGCGとsulindacを併用すると、ほとんどの細胞がアポトーシスを生じた。断片化DNA量で比較すると、それぞれの単独に比較して、EGCGとsulindacの併用は20倍以上の相乗効果を示した。Sulindacは非ステロイド系の抗炎症剤であり、COX-1とCOX-2の阻害活性を持つ。Sulindacの代謝産物には 活性型のsulindac sulfideと不活性型のsulindac sulfoneとがある。次に、EGCGとの相乗効果を2つの代謝産物で比較した。10 μ M sulindac sulfoneとsulindac sulfideは共に全くアポトーシスを誘導しない。しかし、75 μ M EGCGとの併用によって、強いアポトーシスが誘導された。すなわち、COX-1とCOX-2の阻害活性に関係なくEGCGとの併用によって相乗的ながん細胞のアポトーシスが誘導されることが明らかとなった。

EGCGとsulindacとの併用は、PC-9細胞だけでなくマウス大腸がん細胞株、colon 26の増殖抑制に対しても相乗的な効果を示した。

iv) Minマウスの消化管腫瘍発生に対する抑制効果

EGCGとsulindacとの相乗的がん予防効果を動物実験のレベルで確認するため、Minマウスでの発がん抑制実験を行った。MinマウスはApc遺伝子のコドン850のTTG

がTAGに変異したヘテロの異常を持つマウスである。Minマウスは生後4週から、小腸と大腸にたくさんのポリープが自然発症する家族性大腸腺腫症のモデルマウスである。Apc遺伝子の異常は家族性大腸腺腫症だけでなく、多くの大腸がんで認められている。Minマウスを緑茶エキス単独群、sulindac単独群、緑茶エキス + sulindac群とコントロール群の4群に分けて、6週令から16週令までのそれぞれの餌と飲料水を10週間投与した。実験終了16週令のコントロール群では、一匹当たり平均72.3 \pm 28.3個の腫瘍が生じた。これに対して、緑茶エキス単独群では56.7 \pm 3.5個、sulindac単独群では49.0 \pm 12.7個とそれぞれ21.6%と32.3%の抑制効果を示した。緑茶エキスの飲用が、sulindacと同程度に腫瘍の発生を抑制することを今回の実験で始めて見出した。次に、緑茶エキス + sulindac群は32.0 \pm 18.7とそれぞれの単独群に比べて、明らかに腫瘍の発生を抑制し、その抑制は55.7%であった。更に、緑茶エキス + sulindac群の抑制効果は、長径1 mm以上の腫瘍で比べるとより顕著であった。すなわち、コントロール群が59.5 \pm 13.1個に対して、緑茶エキス + sulindac群は17.0 \pm 5.0個と71.4%の抑制であった。以上の結果は、緑茶エキスとsulindacとの併用が、sulindac単独処理よりも強力に腫瘍発生を抑制することを明らかにした。

Minマウスの消化管に生じた腫瘍はほとんどが腺腫であったが、コントロール群にのみ腺がんが認められた。しかし、緑茶エキス単独群、sulindac単独群、及び、緑茶エキス + sulindac群のいずれも腺がんは生じなかった。従って、緑茶エキスとsulindacとこれらの併用は、腺がんの発生をより効果的に抑制していると考えられる。

この結果は、緑茶が、sulindacのがん予防効果をより増強するので、sulindacがもつ消化管に対する副作用を軽減する”実用的ながん予防”に適していることを示唆した。

D. 考察

緑茶のがん予防効果は、既に食道、胃、十二指腸、大腸、肺、肝臓、膵臓、膀胱、前立腺、乳腺、皮膚などの臓器の動物発がん実験で確認されている。緑茶は毒性がないことから、がんになる前の一般健康者を対象とした予防に適していると考えていた。しかし、今回新たに見出した緑茶とがん予防薬との併用による相乗効果の誘導は、緑茶ががんの治療後の患者等対象としたがん予防にも応用できることを示唆した。緑茶とがん予防薬を組み合わせは、がん予防薬の副作用を軽減し、かつ、予防効果を強める実用的ながん予防であると考ええる。

EGCGとsulindacとの併用は相乗効果を誘導し、EGCGとtamoxifenとの併用は相加的効果を示した。すなわち、組み合わせるがん予防薬によって、相乗的か相加的かはそれぞれ異なることが分かった。

TNF- α はがんだけでなく、動脈硬化、間質性肺炎、糖尿病の発症や進展に関与した炎症性サイトカインである。EGCG単独あるいはsulindac単独に比べ、両者の併用は約10倍強いTNF- α の遊離を抑制した。従って、がん予防効果だけでなく、動脈硬化、糖尿病などの老年病の予防に対しても、このコンビネーションは有効であると推測される。Sulindacはもともと抗炎症剤であることから、副作用を軽減できる緑茶とのコンビネーションは老年病の予防に応用可能であると考ええる。

一方、tamoxifenは乳がん術後の再発予

防に既に用いられている。緑茶を1日10杯以上飲む患者では、tamoxifenの予防効果が増強されているのか興味深い。また、tamoxifenは抗エストロゲン剤であるので、骨粗鬆症の予防効果をもつ。緑茶と併用することによって、tamoxifenの骨粗鬆症予防効果の増強も期待できると思われる。

緑茶の飲用量を日常の飲み物としての飲用量から、がんや老年病に対して予防効果を示す飲用量に増やすことができれば、緑茶飲料によるがん・老年病の予防を達成できると考える。そこで、多くのヒトが、容易に一日10杯の茶ポリフェノールを摂取できるよう、埼玉県農林総合研究センター特産支所が緑茶エキス粒を開発した。緑茶エキス粒は凍結乾燥した緑茶の粉末を粒に固めたものである。埼玉県で行った飲用試験によって、日常飲用している緑茶とこの緑茶エキス粒を合わせて、一日10杯分の茶ポリフェノールの摂取が、ほとんどのヒトで可能であることが明らかとなった。日本においては、老年病を予防する飲み物として緑茶を活用することが重要である。

一方、緑茶を日常飲用する習慣のないアメリカでは、緑茶エキスのカプセルを用いて、緑茶エキスをがん予防薬として開発するための臨床試験が行われている。これは、アメリカ食品医薬品局 (FDA) の認可を受けて、テキサス M. D. アンダーソンがんセンターの Waun Ki Hong 博士のリーダーシップの基に行われている。既に、臨床第一相試験は終了して、最大耐用量が導き出された。それは、1日1g/m²3回であり、これは緑茶30~40杯分に相当する。この結果からも、一日10杯分の緑茶の飲用は充分可能であることが示された。この結果からも、一日10杯分の緑茶の飲用は、特に問題の内量である異が示

された。

E. 結論

緑茶は毒性がないので、がん予防薬との併用によるコンビネーションがん予防に応用できると考える。更に、緑茶とのコンビネーションは、がん以外の老年病の予防にも応用できると期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Suganuma, M., Sueoka, E., Sueoka, N., Okabe, S. and Fujiki, H. Mechanisms of cancer prevention by tea polyphenols based on inhibition of TNF- α expression. *BioFactors*. 13: 67-72 (2000)
- 2) 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
- 3) Nakachi, K., Matsuyama, S., Miyake, S., Suganuma, M. and Imai, K. Preventive effects of drinking green tea on cancer and cardiovascular disease: epidemiological evidence for multiple targeting prevention. *Bio Factors* 13: 49-54 (2000)
- 4) Suganuma, M., Ohkura, Y., Okabe, S. and Fujiki, H. Combination cancer chemoprevention with green tea extract and sulindac shown in intestinal tumor formation in Min mice. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 127: 69-72 (2001)

2. 学会発表

- 1) Suganuma, M., Okabe, S. and Fujiki, H. Effect of green tea polyphenols on gene expression using cDNA expression array. American

Association for Cancer Research 91th Annual Meeting. p.532 (2000)

- 2) 菅沼雅美、岡部幸子、藤木博太TNF- α とIL-1の協調発現による新しい発がんプロモーション機構
第59回日本癌学会総会記事, p483 (2000)
- 3) Suganuma, M., Okabe, S., Fujimoto, N. and Fujiki, H. Cancer prevention with green tea: Mechanistic approaches. *Japan-Korea Cancer Research Symposium*, p.24 (2001)
- 4) Suganuma, M., Okabe, S., Fujimoto, N., Imai, K., Nakachi, K. and Fujiki, H. Cancer prevention with green tea from basic study to clinical intervention. *Keystone Symposia*, p.44 (2001)
- 5) Suganuma, M., Okabe, S. and Fujiki, H. Combination cancer chemoprevention with green tea polyphenols and sulindac. *American Association for Cancer Research 92th Annual Meeting*. p.99 (2001)

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

緑茶による遺伝子発現の変化に関する研究

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： 茶ポリフェノールの多様な作用機構を明らかにするため、EGCGによる遺伝子発現変化をcDNA Expression Arrayを用いて検討した。ヒト肺がん細胞株PC-9をEGCGで7時間処理して、遺伝子発現パターンを検討した。その結果、EGCGがTNF- α のシグナル伝達に關与するNF- κ B inducing kinase (NIK)の発現を減少し、retinoic acid receptor α 1とinsulin growth factor binding protein 3の発現を亢進することを見出した。更に、EGCGとsulindacが相乗的にアポトーシスを誘導する作用機構を遺伝子発現の面から検討した。EGCGとsulindacの併用が、単独では変化しなかった遺伝子の発現を新たに亢進あるいは抑制することを見出した。

A. 研究目的

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。本研究は、緑茶による老年病の予防について、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。昨年に引き続いて、EGCGによる遺伝子発現の変化を検討した。更に、EGCGとsulindacとの相乗的がん予防効果の作用機構をcDNA expression arrayで検討した。

B. 研究方法

(1) EGCG処理による遺伝子発現の変化

EGCG (200 μ M) 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。

poly(A)⁺RNA 1 μ gを α -³²P-dATPの存在下で、MMTV reverse transcriptaseによってcDNAとした。cDNAを³²Pでラベルし、array membraneとhybridizeして、588個の遺伝子発現を検討した。遺伝子発現はBAS2000イメージアナライザーで測定した。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と β -actinのカウントでnormalizeした後、遺伝子の発現量を比較した。相対的な遺伝子の発現量は β -actinの発現量を1.0として表した。EGCGの処理により遺伝子発現がコントロールに比較して2倍以上の亢進したもの、あるいは、0.5倍以下の減少したものを、有意に発現変化した遺伝子とみなした。

(2) EGCGとsulindacの併用による遺伝子発現の変化、

PC-9細胞 (1×10^7)をEGCG (100 μ M), sulindac (100 μ M), あるいは、EGCG + sulindacで24時間処理し、総RNA抽出し

た。精製したpoly(A)⁺RNAを上記の方法に従い、cDNAにして遺伝子発現パターンをarray membraneで検討した。それぞれの遺伝子発現は未処理の発現パターンと比較した。解析は上記の方法に従った。

C. 研究結果

(1) EGCG処理による遺伝子発現変化

緑茶ポリフェノールEGCGの処理によって、様々な遺伝子発現が変化することを見出した。未処理のPC-9細胞では、検討した588の遺伝子の中、163の遺伝子が発現していた。EGCG (200 μM)で7時間処理すると、未処理の細胞に比べて12の遺伝子の発現が0.5倍以下に減少し、4つの遺伝子の発現が2倍以上に亢進した。EGCGによって発現が減少した遺伝子には、アポトーシスに関連したリン酸化酵素遺伝子 (NF-κB inducing kinase (NIK) と death-associated kinase 1 (DAK1))、チロシンリン酸化酵素(SKY), small GTPaseとその制御蛋白(CDC42, Rho B, T-lymphoma invasion and metastasis inducing TIAM1)、細胞周期調節関連遺伝子、(p38 MAPキナーゼ, CDC25B/M-phase inducer phosphatase 2)、細胞間相互作用遺伝子 (Envoplakin, Synapse-associated protein 102)、受容体関連遺伝子(dishevelled 1, EGFreceptor)であった。中でも、もっとも強く抑制されたNIK遺伝子は、TNF-α受容体からNF-κBの活性化へのシグナル伝達に関与するリン酸化酵素である。EGCGは、TNF-αの発現を抑制するだけでなく、TNF-αのシグナル伝達に関与する遺伝子の発現も抑制することを始めて見出した。

一方、EGCGによって発現が亢進した遺伝子は、retinoblastoma binding protein (RBQ1), vascular endothelial growth factor (VEGF), retinoic acid receptor α1 (RAR-α1)

と insulin-like growth factor-binding protein 3 (IGFBP3)であった。RAR-α1とIGFBP3は、がん予防に関連した遺伝子であるので興味深い。

(2) EGCGとsulindacとの併用による遺伝子発現の変化

EGCG処理によって発現が変化した遺伝子を基に、次に、EGCG + sulindacの処理でさらに、どのような遺伝子の発現変化があるか検討した。EGCG (100 μM) + sulindac (100 μM)でPC-9細胞を24時間処理した。同様に、EGCG (100 μM)単独処理、sulindac (100 μM)単独処理の細胞からもRNAを抽出し、未処理の場合と比較した。EGCG + sulindacの処理は、GADD153遺伝子の発現を11.6倍に、また、WAF1遺伝子を3.0倍に亢進した。面白いことに、GADD153とWAF1遺伝子は共にEGCG単独処理でも、sulindac単独処理でも全く変化しない。更に、EGCG + sulindac処理は、T-plasminogen activator, TIMP3, IL-1β, Integrin β4, Cytokeratin 7, Rho C、及び、Rho GDP dissociation inhibitor 1の7つの遺伝子の発現を有意に抑制した。これら7つの遺伝子も、それぞれの単独処理では全く影響を受けなかった遺伝子であった。以上の結果は、EGCGとsulindacの併用は、EGCG単独やsulindac単独処理では生じない、新たな遺伝子発現の変化を誘導していることが明らかとなった。新たに発現が変化した遺伝子が、がん細胞のアポトーシス誘導やがん予防効果において相乗効果をもたらしていると考えられる。

D. 考察

EGCGがいろいろなリン酸化酵素やGTPase等の遺伝子発現を抑制し、レセプター関連遺伝子等の発現を亢進する結果を始めて得た。その中で、EGCGがNIKの

発現を抑制したことは重要である。NIKはMAP kinase kinase kinase familyであり、TNF- α の受容体のエフェクターTRADDとTRAF2と相互作用してI- κ B キナーゼをリン酸化する。すなわち、EGCGはNIKの発現を抑制して、TNF- α の受容体からのシグナル伝達を抑制していると推測される。他の p38 MAP キナーゼの発現抑制やRAR α 1やIGFBP-3の発現増加がどのようにEGCGのがん予防効果や老年病の予防効果に関与しているか今後の検討が必要である。

EGCGとsulindacとの併用は、それぞれの単独処理では認められなかった遺伝子発現の変化を新たにもたらした。しかも、sulindacによるCOX-1とCOX-2の抑制効果ではない新しい作用機構が関与していると推測された。併用によって新たに誘導された遺伝子発現の変化が、どのように相乗的ながん予防効果に関与しているのかが今後の研究課題である。

E. 結論

EGCGは、4つの遺伝子の発現を亢進し、12の遺伝子発現を抑制することを明らかにした。NIK遺伝子の発現が抑制されたことは、TNF- α のシグナルを抑制する意味において重要であると考えられる。

EGCGとsulindacの相乗効果は、全く新しい遺伝子発現の誘導によってもたらされていた。GADD153遺伝子の発現はEGCG単独、sulindac単独で全く発現が変化しなかったが、11倍に亢進された。相乗効果において重要であると考えられる。

今回初めて、EGCGによって発現が変化する遺伝子を明らかにすることができた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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) Tori, M., Sono, Y., Nakashiba, Y., Hamada, N., Sono, M., Asakawa, Y., Suganuma, M., Okabe, S., Fujiki, H. Syntheses of isocitric acid derivatives and biological evaluation *Tetrahedron. Letters*, 41: 3095-3098 (2000)
- 3) Fujiki, H., Suganuma, M., Okabe, S., Sueoka, E., Sueoka, N., Matsuyama, S., Imai, K. and Nakachi, K. Green tea as a cancer preventive. In: *Dietary Anticarcinogen and Antimutagens, Chemical and Biological Aspects.* (I. T. Johnson and G. R. Fenwick eds.) Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK. pp.12-17 (2000)

2. 学会発表

- 1) 岡部幸子、菅沼雅美、末岡尚子、藤本伸一、藤木博太 DNA Expression Arrayを用いた緑茶ポリフェノールEGCGによる遺伝子発現の解析 第59回日本癌学会総会記事, p215 (2000)

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

緑茶による肺がんの予防機構に関する研究

分担研究者 藤本伸一 埼玉県立がんセンター研究所 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。特に肺がんに対する緑茶の予防効果は、前向きコホート研究や動物の発がん実験から明らかになっている。本年度は、茶ポリフェノールの肺がん予防機構をheterogeneous nuclear ribonucleoprotein B1 (hnRNPB1) の発現抑制の面から研究した。hnRNPB1は、肺発がんの早期から発現が亢進しているタンパク質であり、このタンパク質の高発現はがん化に関与していると考え研究を進めている。今回、EGCGがhnRNPB1の発現を転写レベルで抑制することを初めて見出した。

A. 研究目的

高齢化社会を迎えるに当たって、高齢になっても健康を維持し、生活の質の向上することができるよう努力する必要がある。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。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、がんの発症年齢が遅れることを明らかにした。更に、緑茶のがん予防効果が肺がん、肝臓がん、大腸がん、及び、胃がんで認められることも疫学調査から明らかとなった。肺がんの死亡率は年々増加し、平成9年度より男性では1位、女性では3位を占め、年間の肺がんによる死亡者数は平成10年度には5万人に達した。従って、緑茶をもちいた肺がん予防法の確立は重要である。

Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein B1

(hnRNPA2タンパク質のスーパーライシングバリエーション)であり、肺がんの組織ではその発現が著しく亢進している。すなわち、hnRNPB1タンパク質は臨床病期I期の肺がん全例で高発現していた。さらに、レントゲン写真では指摘できない微小肺がん組織において43例中25例（58.1%）、前がん病変である気管支異形成の組織においても、63.6%の症例で高発現していた。従って、hnRNPB1タンパク質の高発現は、肺がんの初期に生じる変化である。従って、hnRNPB1は早期診断や、がん予防の生物学的代理指標に有用であるだけでなく、発がんの過程においても重要な役割を果たしていると考えている。今回、茶ポリフェノールが肺がん細胞でhnRNPB1タンパク質の発現を抑制するか検討した。

B. 研究方法

- i) hnRNPB1タンパク質の発現抑制
ヒト肺がん細胞株A549を茶ポリフェノー

ル (EGCG、ECG)、あるいは、genistein 存在下で2日間培養し、lysis bufferを用いて細胞からタンパク質を抽出した。それぞれのタンパク質を10%SDS-PAGEで分離した後、ニトロセルロースメンブランにブロッティングし、抗hnRNPB1抗体でタンパク質を検出した。抗hnRNPB1抗体は、hnRNPB1特異的な12アミノ酸を抗原として、ウサギを免疫して得たポリクローナル抗体である。

ii) hnRNPB1 mRNAの発現抑制

A549細胞を上記と同様に処理し、全RNAをIsogenを用いて抽出した。hnRNPB1 mRNAの発現はreverse transcription-PCR法(RT-PCR)によって測定した。内部コントロールとしてGAPDHを用い、hnRNPB1の発現量は、GAPDHでnormalizeした後、未処理の場合の発現量と比較した。

iii) hnRNPA2/B1の転写活性の抑制

hnRNPA2/B1のプロモーター領域(-603/-1)を含むluciferaseレポーターコンストラクトを、A549細胞にトランスフェクトした。その後、いろいろな濃度のEGCG、あるいは、genisteinで処理してluciferase活性をdual-luciferase reporter assay systemで測定した。

C. 研究結果

EGCGは濃度依存性にA549細胞の増殖を抑制し、125 μ M EGCGは80%の増殖抑制効果を示した。一方、ECGもEGCGとほぼ同等の強さで増殖を抑制した。大豆に含まれるがん予防物質であるgenisteinは31 μ Mで65%の増殖抑制を示した。この条件でA549細胞を処理し、hnRNPB1タンパク質の発現を検討した。EGCG、ECG、および、genisteinは、いずれも31~125 μ Mの濃度の範囲で濃度依存性にhnRNPB1タン

パク質量を減少した。125 μ Mの濃度で比較すると、hnRNPB1タンパク質量はEGCG処理で20%、ECG処理：30%、genistein処理：0%に減少した。hnRNPB1タンパク質の発現抑制は増殖抑制効果と一致していた。

ii) hnRNPB1 mRNA発現の抑制

次に、hnRNPB1タンパク質の発現が減少した際のmRNAの発現について検討した。hnRNPB1 mRNAの発現は、EGCG、ECGあるいはgenisteinの処理によって減少した。すなわち、hnRNPB1タンパク質量の減少に一致して、hnRNPB1 mRNAが減少した。従って、EGCG、ECGの茶ポリフェノールとgenisteinは、hnRNPB1の発現をmRNAのレベルで抑制していることが明らかとなった。

iii) hnRNPB1の転写活性の抑制

hnRNPB1 mRNAの発現は、hnRNPA2/B1共通のプロモーター領域によって、発現調節されている。茶ポリフェノールが転写活性を抑制しているのか、プロモーター領域(-603/-1)を含むluciferaseレポーターを用いて検討した。未処理のA549細胞におけるluciferase活性は210であったのに対し、EGCGを処理した細胞では、35 μ M : 89、62 μ M : 38、125 μ M : 25と濃度依存性に減少した。一方、genisteinも31~125 μ Mの濃度でluciferase活性を低下した。すなわち、EGCGとgenisteinはともに、hnRNPB1を転写レベルで抑制することを始めて見出した。

D. 考察

茶ポリフェノールがhnRNPB1の発現を転写レベルで抑制していることが明らかとなった。しかも、その効果は、チロシンキナーゼ阻害剤genisteinと同様であった。hnRNPB1は肺がんの前がん病変である気

管支異形成でも高発現しているタンパク質であり、がん予防物質の緑茶やgenisteinで抑制されることから、hnRNPB1の発現抑制はがん予防の生物学的代理指標としても応用できると考えられる。現在、hnRNPB1の発現の転写調節をする因子について解析を進めているが、どのような作用機構で、EGCGが発現抑制をしているのか今後、検討する必要がある。

最近、口腔がんや食道がんにおいてもhnRNPB1が高発現していることを見出した。従って、EGCGのhnRNPB1の発現抑制効果は、他の臓器のがんでも認められると考えられる。

E. 結論

EGCGがhnRNPB1の発現を転写レベルで抑制していることを始めて見出した。hnRNPB1の発現抑制も肺がんの予防効果において重要であると考えられる。

F. 研究発表

1. 発表論文

- 1) Fujiki, H., Suganuma, M., Okabe, S., Sueoka, E., Sueoka, N., Fujimoto, N., Goto, Y., Matsuyama, S., Imai, K. and Nakachi, K. Cancer Prevention with green tea and monitoring by a new biomarker, hnRNP B1. Mutation Res. in press (2001)

2. 学会発表

- 1) Fujimoto, N., Sueoka, N., Okabe, S., Suganuma, M., Sueoka, E. and Fujiki, H. hnRNP B1 gene expression in lung cancer cell line and its significance in lung carcinogenesis. American Association for Cancer Research 92th Annual Meeting. p.255 (2001)

- 2) Fujimoto, N., Sueoka, N., Sueoka, E., Okabe, S., Suganuma, M. and Fujiki, H. Regulation of hnRNP B1 expression in human lung cancer cell lines and its significance as a biomarker for cancer chemoprevention. Japan-Korea Cancer Research Symposium, p.84 (2001)