

平成 22 年 4 月 15 日現在

研究種目：基盤研究（C）
研究期間：2007～2009
課題番号：19590797
研究課題名（和文） 合成メチル化カテキンによる抗腫瘍効果のメカニズムの解析及び臨床応用への基礎研究
研究課題名（英文） **3”O-methylEGCG (metylated-(3”)-epigallocatechin gallate) regulated the cellular proliferation in hepatoma cell line Huh7 in vitro and in vivo.**
研究代表者
橋本 修 (HASHIMOTO OSAMU)
久留米大学 医学部 助教
研究者番号：50289427

研究成果の概要（和文）：メチル化カテキンは肝癌細胞株Huh7に対し、in vitroにおいて強いPI3K/Aktシグナル系抑制作用、抗酸化作用をしめすことを示した。さらに、in vivoにおいても、癌移植マウスにおいて腹腔内投与、さらには経口投与（一日7.5mg/Kg）にても腫瘍増殖抑制効果を示した。このことは、メチル化カテキンが抗癌剤への応用につながる可能性を得ることができるという成果を得た。カテキン540 mg含有のお茶の飲料品があることを考えるとその副作用はかなり少ないと考えられる。さらに、ある飲料会社がメチル化カテキン高濃度（20%）含有ベにふうき茶抽出パウダーを開発していた。それを、当初は無料で条件なしで供与していただけるようになった。現在、カプセル化して一日500mgのメチル化カテキン（250mgのカプセル、10錠を一日）をのんでいただく準備を終了した（3人分 30日分）。これら、具体的な製剤の作製は臨床研究へすすむことへの大きな成果である。

研究成果の概要（英文）：We herein report a new finding, namely, the anti-proliferate potential of MethylEGCG and attempt to clarify its mechanism of action against a Huh7 hepatoma cell line. inhibition by flow cytometry. MethylEGCG was found to induce cell proliferation at a very low concentration (5 μ M). The expression of pAkt was down-regulated after treatment at concentrations under 5 μ M. We observed the *in vivo* growth of a tumor graft model (5×10^6 Huh7 cells grafted in the skin of nude mice). The tumor growth of the 1mg/1kg MethylEGCG i.p and 7.5mg/kg MethylEGCG orally group showed a significant difference (after 2 weeks, vs. control; $p < 0.05$ and after 3 weeks, vs control; $p < 0.01$ ($n=12$)). In summary, these findings suggest that MethylEGCG may be an important chemoprevention agent for the treatment of hepatoma.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学(細目番号 7202)

キーワード：メチル化カテキン、肝癌治療

1. 研究開始当初の背景

(1) カテキンなどのポリフェノールは、その抗酸化作用を介し抗腫瘍作用があることは広く知られている。

(2) カテキンより抗酸化力価が強いとされるメチル化カテキンは抗腫瘍効果も強いと考えられる。

2. 研究の目的

(1) 抗酸化作用は PI3K/Akt シグナルを抑制することで抗腫瘍作用を示すといわれている。

(2) 我々は、メチル化カテキンの肝癌細胞に対する抗腫瘍効果を PI3K/Akt シグナルも含め、in vitro、in vivo で検討した。

(3) さらに、効果が期待できるであろうと考えられる製剤の開発を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 細胞増殖抑制の検討。Huh7 をメチル化カテキンで処理、BrdU の取り込みを ELISA 法にて、細胞周期の変化をフローサイトメトリーで観察した。

(2) PI3K/Akt シグナルの活性化 (Akt のリン酸化) の検討。肝癌細胞株 Huh7 に 0, 0.5,

2, 5, 10, 20 μ M のメチル化カテキン処理、リン酸化 Akt (活性型) の割合を検討した。その後、脱リン酸化効果を示した最低濃度で、肝癌細胞株 Huh7 を 12 時間処理した。リン酸化 Akt の発現と、この下流分子である細胞周期促進分子の経時的変化を検討した。

(3) メチル化カテキンの抗酸化作用の検討。Huh7 を 1 mM H₂O₂ で細胞を処理した後、酸化マーカーである DCF-DA によるフローサイトメトリーで測定した。同時にリン酸化 Akt の発現も検討した。

(4) In vivo での検討。ヌードマウスに 5 \times 10⁶ の Huh7 を皮下に移植し、1mg/kg メチル化カテキンを連日腹腔内に、7.5mg/Kg を連日経口投与し、その増殖の程度を生食群と比較した。

(5) これまで、メチル化カテキンの添加において細胞の抗酸化、ひいては PI3K-Akt の不活性化を Akt のリン酸化にてみてきた。それを確信するために Huh7 細胞株に Akt を遺伝子導入して過剰発現させ、この細胞がメチル化カテキンで増殖抑制がかからないかどうかを検

討した。

(6) 製薬会社、食品会社、試薬会社等に大
學が広報できるいくつかのイベントで発表し
た。企業への直接の問い合わせを当大学の知
的財産本部からしていただいた。

4. 研究成果

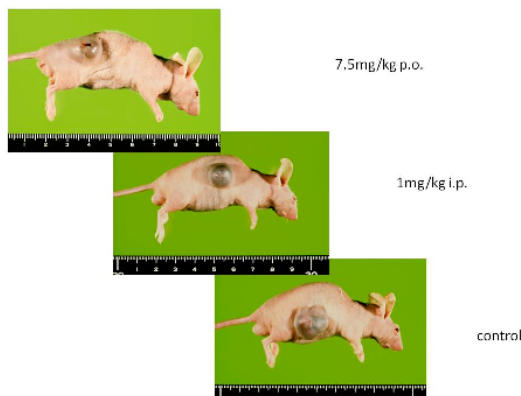
(1) BrdU の取り込みはの $5 \mu\text{M}$ の低濃度で
低下した。細胞周期も G1 arrest がみられた。

(2) メチル化カテキン処理にて Huh7 でリ
ン酸化 Akt の割合の低下が最低濃度 $5 \mu\text{M}$ の
低濃度からみられた。Huh7 ではリン酸化 Akt
と Cyclin E の発現はメチル化カテキン処理 6
時間以後で低下していた。

さらに Akt を過剰発現させた Huh7 細胞に
同処理をおこなった、細胞周期の観察では G1
arrest は起こらなかった。メチル化カテキン
が Akt のリン酸化を抑えていることで Cell
cycle arrest がおこすことに確証をえられた。

(3) $5 \mu\text{M}$ のメチル化カテキン前処理にて
 $1\text{mM H}_2\text{O}_2$ 処理での細胞の酸化を抑えることが
できた。同時にそれに伴う Akt のリン酸化も
抑えた。

(4) In vivo では生食群に比較してメチル
化カテキン 1mg/kg 腹腔内群、 7.5mg/Kg 経口
投与群では 2 週目、3 週目ともに有意な腫瘍
体積の差を認めた。



p.o 経口、i.p 腹腔内投与

メチル化カテキンは肝癌細胞株 Huh7 に対
し、in vitro において強い PI3K/Akt シグナ
ル系抑制作用、抗酸化作用をしめすことを示
した。さらに、in vivo においても、癌移植
マウスにおいて腹腔内投与、さらには経口投
与（一日 7.5mg/Kg 、 60Kg で 500mg ）にても腫
瘍増殖抑制効果を示した。このことは、メチ
ル化カテキンが抗癌剤への応用につながる
可能性を得ることができるという成果を得
た。

(6) 安全性；カテキン 540mg 含有のお茶
の飲料品があることを考えるとその副作用
はかなり少ないと考えられる。

(7) さらに、ある飲料会社がメチル化カ
テキン高濃度（ 20% ）含有べにふうき茶抽出
パウダーを開発していた。知的財産本部をと
うして、それを、当初は無料で条件なしで供
与していただけるようになった。現在、カプ
セル化して一日 500mg のメチル化カテキンを
（ 250mg のカプセル、 10 錠を一日）のんでい
ただく準備を終了した（ 3 人分 30 日分）。
これらは、具体的な製剤の作製は臨床研究へ
すすむことへの大きな成果である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

1) 3”O-methylEGCG

(metylated-(3”)-epigallocatechin gallate) regulated the cellular proliferation in hepatoma cell line

Huh7 in vitro and in vivo.

Miami meeting; Miami University.
2009/3/16

2) The Methylated-(3”)-epigallocatechin gallate; MethylEGCG inhibits cell growth both *in vitro* and *in vivo* in a Huh7 hepatoma cell line

AACR; San Diego. 2008/4/13

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：メチル化カテキンを応用した抗癌剤の開発

発明者：橋本 修

権利者：橋本 修

種類：PCT

番号：PCT/JP2008/065006

出願年月日：2008年8月22日

国内外の別：海外

○取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

橋本 修 (HASHIMOTO OSAMU)

久留米大学 医学部 助教

研究者番号：50289427

(2) 研究分担者

上野 隆登 (UENO TAKATO)

久留米大学先端癌治療研究センター 教授

研究者番号：70176618