

平成 21 年 4 月 21 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2006～2008

課題番号：18790457

研究課題名（和文） 受容体型チロシンキナーゼを標的とした EGCG 大腸発癌抑制の研究

研究課題名（英文） Targeting receptor tyrosine kinases for colon cancer chemoprevention by green tea catechin, EGCG

研究代表者

清水 雅仁 (SHIMIZU MASAHIRO)

岐阜大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：90402198

研究成果の概要：

我々は本研究で、緑茶カテキン EGCG が、IGF/IGF1-R の異常活性を阻害し、ヒト大腸および肝癌細胞の増殖を抑制すること、また肥満および炎症関連マウス大腸発癌を抑制することを明らかにした。さらに、緑茶抽出物である GTE の補助投与が、内視鏡的切除術後の大腸腺腫の異所性再発を有意に抑制することも明らかにした。今回の研究結果は、EGCG や他の緑茶抽出物を用いた大腸および肝発癌予防の可能性を示唆するものと考えられた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,500,000	0	1,500,000
2007年度	1,000,000	0	1,000,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	240,000	3,540,000

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

キーワード：EGCG、RTK、大腸癌、発癌予防

## 1. 研究開始当初の背景

大腸癌は、食生活を含めたライフスタイルの欧米化により近年著しい増加傾向を示しているが、このことは日常の「食生活」が癌予防の大切な一歩となりうることを示唆している。一方、日常生活で恒常的かつ容易に摂取可能である、緑茶カテキンを代表とするある種の phytochemical が、様々な受容体型チロシンキナーゼ (Receptor Tyrosine Kinase: RTK) とそれらの下流に位置するシ

グナル伝達経路に作用し、発癌予防効果を発揮することが明らかになってきている。そこで我々は、緑茶カテキン EGCG やその他の(緑)茶抽出物による大腸癌予防のメカニズムを「分子標的療法」的概念に基づき検討し、新たな大腸癌予防法(薬)の開発を目指して、研究を開始するに至った。

## 2. 研究の目的

EGFR や IGF-1R といった RTK は、様々なヒ

ト腫瘍細胞（組織）においてしばしば過剰発現や機能異常をきたしており、その発現、異常活性化（リン酸化）を抑制することは腫瘍細胞増殖抑制に繋がるものと考えられている。本研究の目的は、RTK を標的とした緑茶カテキン EGCG (epigallocatechin-3-gallate)の腫瘍細胞抑制効果を明らかにし、そのメカニズムを解明することにある。EGCG やその他の（緑）茶抽出物は、日常生活で恒常的かつ容易に摂取可能であるポリフェノールである。従って本研究の最終目標は、「EGCG の腫瘍細胞増殖抑制効果」について分子生物学的考察に基づいた「Evidence」と「Biomarker」を *in vivo*、*in vitro* の研究を通じて臨床の場に提示し、EGCG やその他のポリフェノールによる大腸癌予防の実践をめざすことにある。

### 3. 研究の方法

EGCG の RTK に対する効果に主眼をおきながら、*in vitro*、*in vivo*における EGCG の発癌抑制効果の研究を進め、将来的な臨床応用にむけての基礎研究を進めていく。*in vitro*の研究としては、ヒト大腸癌細胞株における各種 RTK の発現、活性化（リン酸化）状態、および各種 RTK に対するリガンドの発現状態についてスクリーニングを行い、今後標的となりうる RTK に対して検索を行っていく。また具体的な大腸発癌モデルとして、1. DSS/AOM 投与による腸炎由来大腸発癌モデル、2. EGFR、HER2、HER3、IGF1-R といった RTK を強発現する、SW837 大腸癌細胞株を移植したヌードマウスモデル、3. 遺伝子背景 (*Apc*<sup>Min/+</sup>マウス使用) に基づいた腸管発癌モデル、の 3 系統を用いて EGCG の大腸発癌抑制効果を検討する。EGCG はマウスに飲水投与（濃度 0.01%、0.1%）する。発生した腫瘍に関しては、肉眼的検討（腫瘍の発生頻度、発生個数、サイズ）、組織学的検討（悪性度、浸潤、転移の有無も含む）、標的分子（各種 RTK とリガンド）の免疫組織学的検討を行う。腫瘍、あるいは腸管粘膜から蛋白、mRNA を抽出し、標的分子の発現、活性化（リン酸化）の状態について検討する（Western Blot、RT-PCR、etc）。またマウス血清における各種リガンドの測定を行うとともに、特に 1 の腸炎由来大腸発癌モデルに関しては、TNF・、IL-1、IFN・などヒト腸炎にて重要な marker とされるサイトカインの変化についても検討する（ELISA assay）。

### 4. 研究成果

我々は現在までの研究で、EGCG が腫瘍細胞から産生される増殖因子 IGF-1/2 の発現を抑制し、IGF-1/2 のレセプターで受容体型チロシンキナーゼの一つである IGF1-R とその下流分子（ERK、Akt、Stat3）の活性を阻害す

ることで、大腸癌および肝癌細胞にアポトーシスを誘導し、増殖抑制効果を発揮することを明らかにしてきた。IGF/IGF1-R システムの異常活性は、各種の肥満関連発癌に深く関与しているが、我々は EGCG が同システムの活性を阻害するとともに、高血糖・高インスリン血症・高脂血症・高レブチン血症を改善することで、肥満マウス (*db/db mice*) の大腸化学発癌を抑制することも明らかにした。また EGCG が腸管の炎症を改善し、COX-2 や種々の炎症性サイトカインの発現を抑制することで、DSS/AOM 誘発による腸炎関連大腸化学発癌を抑制することも報告した。一方、我々は臨床試験において、緑茶抽出物である GTE の supplementation (1.5g/day) が、内視鏡的切除術後の大腸腺腫の異所性再発を有意に抑制することも明らかにした。受容体型チロシンキナーゼの異常活性、肥満、慢性炎症は、大腸や肝発癌における重要な risk factor であることより、EGCG がこれら肥満および腸炎関連大腸発癌を抑制したこと、また GTE が大腸前癌病変である腺腫の発生を抑制したことは、今後、EGCG やその他の（緑）茶抽出物を用いた大腸および肝発癌予防の可能性を考える上で、重要かつ有意義な結果と考えられた。

### 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 13 件）

1. Shimizu M, Shirakami Y, Sakai H, Tatebe H, Nakagawa T, Hara Y, Weinstein IB, Moriwaki H. EGCG inhibits activation of the insulin-like growth factor (IGF)/IGF-1 receptor axis in human hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Lett* 2008; 262: 10-18. (査読有)
2. Tatebe H, Shimizu M, Shirakami Y, Tsurumi H, Moriwaki H. Synergistic growth inhibition by 9-cis-retinoic acid plus trastuzumab in human hepatocellular carcinoma cells. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 2806-2812. (査読有)
3. Shirakami Y, Shimizu M, Tsurumi H, Hara Y, Tanaka T, Moriwaki H. EGCG and Polyphenon E attenuate inflammation-related mouse colon carcinogenesis induced by AOM plus DDS. *Mol Med Rep* 2008; 1: 355-361. (査読有)
4. Shimizu M, Shirakami Y, Sakai H, Adachi S, Hata K, Hirose Y, Tsurumi H, et al. (-)-Epigallocatechin gallate suppresses azoxymethane-induced

- colonic premalignant lesions in male C57BL/KsJ-*db/db* mice. *Cancer Prev Res* 2008; 1: 298-304. (査読有)
5. Shimizu M, Shirakami Y, Moriwaki H. Targeting Receptor Tyrosine kinases for chemoprevention by green tea catechin, EGCG. *Int J Mol Sci* 2008; 9: 1034-1049. (査読有)
  6. Shimizu M, Moriwaki H. Synergistic effects of PPAR $\gamma$  ligands and retinoids in cancer treatment. *PPAR Res* 2008; 2008: 181047. (Online, Open access journal) (査読有)
  7. Shimizu M, Fukutomi Y, Ninomiya M, Nagura K, Kato T, Araki H, Suganuma M, Fujiki H, Moriwaki H. Green tea extracts for the prevention of metachronous colorectal adenomas: a pilot study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008; 17: 3020-3025. (査読有)
  8. Adachi S, Nagao T, To S, Joe AK, Shimizu M, Matsushima-Nishiwaki R, Kozawa O, Moriwaki H, Maxfield FR, Weinstein IB. (-)-Epigallocatechin gallate causes internalization of the epidermal growth factor receptor in human colon cancer cells. *Carcinogenesis* 2008; 29: 1986-1993. (査読有)
  9. Kanamori T, Shimizu M, Okuno M, Matsushima-Nishiwaki R, Tsurumi H, Kojima S, Moriwaki H. Synergistic growth inhibition by acyclic retinoid and vitamin K2 in human hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Sci* 2007; 98: 431-437. (査読有)
  10. Yoshimura K, Muto Y, Shimizu M, Matsushima-Nishiwaki R, Okuno M, Takano Y, Tsurumi H, Kojima S, Okano Y, Moriwaki H. Phosphorylated retinoid X receptor  $\alpha$  loses its heterodimeric activity with retinoic acid receptor  $\beta$ . *Cancer Sci* 2007; 98: 1868-1874. (査読有)
  11. Yamazaki K, Shimizu M, Okuno M, Matsushima-Nishiwaki R, Kanemura N, Araki H, Tsurumi H, Kojima S, Weinstein IB, Moriwaki H. Synergistic effects of RXR $\alpha$  and PPAR $\gamma$  ligands to inhibit growth in human colon cancer cells- phosphorylated RXR $\alpha$  is a critical target for colon cancer management-. *Gut* 2007; 56: 1557-1563. (査読有)
  12. Kojima Y, Tsurumi H, Goto N, Shimizu M, Kasahara S, Yamada T, Kanemura N, Hara T, Sawada M, Saio M, Yamada T, Takahashi T, Tomita E, Takami T, Moriwaki H. Fas and Fas ligand expression on germinal center type-diffuse large B-cell lymphoma is associated with the clinical outcome. *Eur J Haematol* 2006; 76: 465-72. (査読有)
  13. Goto N, Tsurumi H, Takemura M, Hara T, Sawada M, Kasahara S, Kanemura N, Yamada T, Shimizu M, Takahashi T, Tomita E, Seishima M, Takami T, Moriwaki H. Serum-soluble tumor necrosis factor receptor 2 (sTNF-R2) level determines clinical outcome in patients with aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Eur J Haematol* 2006; 77: 217-225. (査読有)
- [学会発表] (計 17 件)
1. JDDW2008 2008年10月4日 東京 ワークショップ18「機能性食品や薬物を用いた栄養代謝制御の試み」 IGF/IGF-1Rを標的とした緑茶カテキンEGCGによる肥満関連大腸発癌の抑制 清水雅仁、白上洋平、森脇久隆
  2. 99<sup>th</sup> AACR (American Association for Cancer Research) Annual Meeting. 2008年4月14日 サンディエゴ EGCG suppresses obesity-related colonic preneoplastic lesions in C57BL/KsJ-*db/db* mice. Shimizu M, Shirakami Y, Hata K, Hirose Y, Tanaka T, Moriwaki H.
  3. 99<sup>th</sup> AACR (American Association for Cancer Research) Annual Meeting. 2008年4月14日 サンディエゴ EGCG suppresses tumor growth by inhibiting activation of the VEGF/VEGFR axis in the xenograft model of human colon cancer and hepatoma. Shirakami Y, Shimizu M, Sakai H, Tatebe H, Tanaka T, Moriwaki H.
  4. 99<sup>th</sup> AACR (American Association for Cancer Research) Annual Meeting 2008年4月13日 サンディエゴ (-)-Epigallocatechin Gallate Induces Phosphorylation of Epidermal growth factor Receptor via Activation of p38 MAPK in colon cancer cells. Adachi S, To S, Shimizu M, Moriwaki H, Weinstein IB.
  5. 第67回日本癌学会学術総会 2007年10月30日 名古屋 ワークショップ22 「Natural products & cancer chemoprevention」 Green Tea Catechins for the Prevention of Metachronous Colorectal Adenomas. Shimizu M, Moriwaki H
  6. Asian Pacific Digestive Week 2007 (APDW2007) 2007年10月18日 神戸 Effects of EGCG on activation of the IGF/ IGF-1R system in human colon and

- hepatoma cells. Shimizu M, Shirakami Y, Moriwaki H
7. Asian Pacific Digestive Week 2007 (APDW2007) 2007年10月16日 神戸  
Tumor-suppressing effects of green tea catechin on inflammation-related mouse colon carcinogenesis induced by AOM and DSS. Shirakami Y, Shimizu M, Tanaka T, Moriwaki H
  8. 第66回日本癌学会学術総会 2007年10月3日 横浜  
EGCG suppresses azoxymethane (AOM) -induced colonic premalignant lesions in male C57BL/KsJ-*db/db* (*db/db*) mice. Shimizu M, Shirakami Y, Sakai H, Hata K, Hirose Y, Tanaka T, Moriwaki H
  9. 第66回日本癌学会学術総会 2007年10月3日 横浜  
Chemopreventive effects of green tea catechin on inflammation-related mouse colon carcinogenesis induced by AOM and DSS. Shirakami Y, Shimizu M, Tanaka T, Moriwaki H
  10. 66<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Cancer Association 2007年10月3日 横浜  
Effects of EGCG on activation of the IGF/ IGF-1R system in human hepatoma cells. Sakai H, Shimizu M, Shirakami Y, Moriwaki H
  11. The 8th Japan-Korea Cancer and Ageing Symposium. 2007年8月11日 岐阜  
Strategy and mechanism for the prevention of hepatocellular carcinoma (HCC) -Phosphorylated RXR・ might be a critical target for HCC chemoprevention- Shimizu M, Moriwaki H
  12. The 8th Japan-Korea Cancer and Ageing Symposium. 2007年8月11日 岐阜  
Chemopreventive effects of green tea catechin on inflammation-related mouse colon carcinogenesis induced by AOM and DSS. Shirakami Y, Shimizu M, Tanaka T, Moriwaki H.
  13. The 8th Japan-Korea Cancer and Ageing Symposium. 2007年8月11日 岐阜  
Synergistic growth inhibition by 9-cis- retinoic acid plus trastuzumab in human hepatocellular carcinoma cells. Tatebe H, Shimizu M, Shirakami Y, Sakai H, Moriwaki H.
  14. The 8<sup>th</sup> Japan-Korean Cancer and Ageing Symposium 2007年8月11日 岐阜  
Effects of EGCG on activation of the IGF/IGF-1R system in human hepatoma cells. Sakai H, Shimizu M, Shirakami Y, Tatebe H, Moriwaki H.
  15. 98<sup>th</sup> AACR (American Association for Cancer Research) Annual Meeting. 2007年4月17日 ロサンゼルス  
EGCG suppresses azoxymethane- induced colonic premalignant lesions in male C57BL/KsJ-*db/db* mice. Shimizu M, Shirakami Y, Sakai H, Hata H, Hirose Y, Tanaka T, Moriwaki H.
  16. 98<sup>th</sup> AACR (American Association for Cancer Research) Annual Meeting 2007年4月17日 ロサンゼルス  
Chemopreventive effects of EGCG and polyphenon E on inflammation-related mouse colon carcinogenesis induced by AOM and DSS. Shirakami Y, Shimizu M, Tanaka T, Moriwaki H
  17. 98<sup>th</sup> AACR (American Association for Cancer Research) Annual Meeting. 2007年4月15日 ロサンゼルス  
Effects of EGCG on activation of the IGF/ IGF-1R system in human hepatoma cells. Sakai H, Shimizu M, Shirakami Y, I. Bernard Weinstein, Moriwaki H.
6. 研究組織  
(1) 研究代表者  
清水 雅仁 (SHIMIZU MASAHIRO)  
岐阜大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：90402198