

平成 21 年 6 月 20 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19790419
 研究課題名（和文） 大腸癌の血行性転移に対する緑茶カテキンの予防効果と機序解析
 研究課題名（英文） Preventive effects of green tea catechin on hematogenous metastasis of colon cancer cells
 研究代表者
 小笠原 勝（OGASAWARA MASARU）
 富山県薬事研究所 バイオテクノロジー・和漢薬研究課 主任研究員
 研究者番号：30443427

研究成果の概要：本研究では、緑カテキンとして、エピガロカテキンガレート(EGCG)、ガロカテキンガレート、エピカテキンガレート、エピガロカテキンのがん転移抑制活性を、マウス colon26-L5 結腸がん細胞の実験的肺転移モデルを用いて比較検討した。その結果、EGCG が最も強力な抑制効果を示すことを明らかにした。さらに作用メカニズムについて検討を行ったところ、アシアロ GM1 陽性細胞が極めて重要であることを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 19 年度	900,000	0	900,000
平成 20 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,700,000	240,000	1,940,000

研究分野：薬理学

科研費の分科・細目：社会医学・衛生学

キーワード：エピガロカテキンガレート、大腸がん、転移、アシアロ GM1 陽性細胞、予防効果

1. 研究開始当初の背景

癌の早期発見、早期治療が可能となっているにもかかわらず、日本では現在、3人に1人が癌で亡くなっている。この主な原因の一つは、癌の転移を阻止できないことであり、癌の転移を抑制することは、癌患者の延命に関わる最重要課題の一つとして位置付けられている。

大腸癌の発生は、北米や欧州、オセア

ニアなど、肉を主食とする地域に多く、日本を含むアジア諸国においては少ないとされてきた。しかし、近年に見られる食生活の急激な欧米化の結果、日本においても男女共に大腸がんの発症が急激に増加し、に1世紀中には、現在減少しつつある胃癌を抜いて最も多い癌の一つになると予測されている。

大腸癌は、その発生部位の特徴から、食品因子の影響を最も強く受ける癌の一つであると考えられる。これまでの数多くの研究から、様々な食品因子の中には悪性化因子だけでなく抑制因子もあることが示唆されており、とりわけ、植物に含まれるポリフェノールやビタミン類が大腸癌の悪性化進展を阻止できる可能性が示唆されている。これらの多くは、実験動物を用いた発ガン実験において、ラジカルなどの発癌イニシエータによるDNAの酸化的障害を阻害することや、ホルボールエステルなどの発癌プロモーターの活性阻害に基づく報告である。これら発癌の化学予防効果に加えて、近年、これら化合物の抗腫瘍活性も詳細に検討されており、癌細胞におけるアポトーシスの誘導や血管新生に対する阻害作用、また、それらの細胞内シグナル伝達制御メカニズムについても明らかにされつつある。一方、癌の転移についてもいくつかの報告はなされているが、それらの作用メカニズムは多くの場合、癌細胞の浸潤能の阻害、アポトーシスの誘導、あるいは血管新生の阻害が重要であると考えられており、いずれも癌細胞に対する直接作用あるいは増殖能の制御であることから、基本的には抗腫瘍メカニズムと同様であると言える。すなわち、多くの場合において、転移した癌に対する治療効果を主に評価した結果となっていると考えられる。このことから、癌の転移に対するポリフェノールやビタミン類の予防効果の評価は、ほとんど検討がなされていないのが現状であると言える。この点に関して、申請者らは、最近、既に機能性食品素材として用いられている多数のポリフェノールやビタミン類等について、それらの癌転移予防活性を比較検討したところ、数種の化合物に統計的に有意な

予防活性を見出し、とりわけ緑茶成分のエピガロカテキンガレートに最も強い予防効果が期待できることを報告した。エピガロカテキンガレートと癌との関わりについては、既に発癌抑制効果や抗腫瘍効果、および癌転移の治療的効果については報告されているが、癌の転移に対する予防効果については、申請者の知る限りにおいて、報告がなされていない。

一方、緑茶カテキンには、エピガロカテキンガレートのほかに、構造の類似した数種のカテキン化合物が存在する。それらカテキン化合物の癌細胞の特性（浸潤能、増殖能など）に及ぼす比較研究については、主にインビトロでの実験結果にもとづいた報告がいくつかなされているが、動物を用いた癌転移の予防効果の比較研究についての報告はなされていない。また近年、エピガロカテキンガレートや粗カテキン抽出物、あるいは緑茶抽出物の抗腫瘍活性などがインビトロやインビボの実験系で検討されているが、これらの実験はいずれもカテキン含量等でお互いの整合性は取られておらず、各々独立して行われているにもかかわらず、主成分のエピガロカテキンガレートの効果のみでその作用メカニズムが考察されている場合が多々見受けられる。このような考え方は一方では不十分である可能性が示唆されている。たとえば、経口投与されたエピガロカテキンガレートは消化管から吸収されるが、この消化管からの吸収が、精製品と緑茶抽出物とは異なること、また、カテキン類は血中内ではグルクロン酸などにより抱合を受けるが、この抱合の程度もカテキン化合物間で異なることが報告されている。さらに、癌細胞増殖に対して、各種カテキン化合物を併用することにより、相乗的な阻害効果が見られることも明らかにされている。

る。また一方では、近年の健康志向において、粗カテキン抽出物や緑茶抽出物を原料とした様々な飲料などの製品が利用されていることから、各種カテキン化合物に加えて、カフェインや茶サポニン、茶多糖、アミノ酸類、ビタミン類などの機能性成分の影響も考慮する必要があると考えられる。これらのことから、薬理的・薬理的・天然物化学的な観点から、個々の緑茶カテキンの生物活性を比較検討するとともに、精製カテキン化合物、粗カテキン抽出物、および緑茶抽出物についても、それらを整合性の取れる形で実験系を組み立て、効果を比較検討することは、機能性食材としての相乗効果、複合効果の有無を明らかにする上で不可欠である。

2. 研究の目的

(1) 各種緑茶カテキンの大腸癌転移に対する予防効果を、実験動物を用いて比較検討し、大腸癌転移予防における緑茶カテキンの有用性を明らかにする。

(2) 精製カテキン化合物、粗カテキン抽出物、および緑茶抽出物の大腸癌転移予防活性を、整合性の取れる条件で比較検討し、精製カテキン単独では得られない多成分系での相乗効果の有無を動物実験にて明らかにする。

(3) 緑茶カテキンの大腸癌転移予防メカニズムを、動物・細胞・分子レベルで明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 実験試薬 カテキン化合物、抗アジアロ GM1 血清および 2-クロロアデノシンは和光純薬工業より購入した。カテキン化合物はジメチルスルホキシド(DMSO)に溶解し、他はリン酸緩衝生理食塩水(PBS)に溶解して実験に用いた。

(2) 細胞及び細胞培養

マウス結腸がん細胞株：colon26-L5 は 10% の非動化ウシ胎児血清(FBS), 100 U/ml のペニシリン, 0.1 mg/ml のストレプトマイシン及び 55 μ M の 2-メルカプトエタノールを含む RPMI-1640 培地中にて継代, 維持した。

(3) 実験的がん転移抑制実験

PBS(200 μ l) に懸濁したがん細胞 (3×10^4 個) をマウス(Balb/c, 7 週令, 雌) に尾静脈より接種し, 13 日後に肺を摘出して, 肺表面に形成された転移結節の数を実体顕微鏡下にて計測し, がん転移の指標とした。カテキン化合物 (1 μ mol/マウス) は, がん接種 3 日前から接種 1 日後まで, 一日一回, 計 5 回腹腔内に投与した。抗アジアロ GM1 血清 (200 μ g/マウス) および 2-クロロアデノシン (50 μ g/マウス) は, エピガロカテキンガレート (2 μ mol/マウス) をがん接種 3 日前から接種前日まで, 一日一回, 計 3 回腹腔内に投与後, 最終投与直後に尾静脈内に投与した。対照群には DMSO あるいは PBS を同様にして投与した。一方, 粗カテキン抽出物および緑茶抽出物のがん転移予防効果は, これらの水溶液をがん接種 7 日前から接種直前まで, 自由に摂取させることで評価した。実験には一群当たり 5 匹のマウスを使用した。

(4) 血清中サイトカイン濃度の測定

EGCG (2 μ mol/マウス) については, 一日一回, 計 3 回, poly(I:C) (0.2 mg /マウス) については, 一回のみ腹腔内に投与後, 経時的に採血し, 市販の ELISA キットにより血清中のサイトカインの濃度を測定した。

(5) 細胞傷害活性の評価

EGCG (2 μ mol/マウス) を, 一日一回, 計 3 回, あるいは poly(I:C) (0.2 mg /マウス) を, 一回腹腔内に投与した後, 翌日に脾臓を採取し, 脾細胞を調製してエフェクター細胞とした。標的細胞には calcein-AM で標識した Yac-1 細胞を用いた。これらを比率を変え

て共培養し，3 時間後の上清中の蛍光量を測定し，細胞傷害活性の指標とした．細胞傷害活性は次式により算出した．細胞傷害活性(%)=(測定値-自然放出量)/(最大蛍光量-自然放出量)×100

(6)フローサイトメトリー解析

EGCG (2 μ モル/マウス) を，一日一回，計 3 回，あるいは poly(I:C) (0.2 mg /マウス) を，一回腹腔内に投与した後，翌日に脾臓を採取し，脾細胞を調製した．この細胞を，抗体(2.4G-2)により Fc R をブロッキングした後，各種細胞表面マーカーに対する抗体で処置し，FACS 解析を行った．

(7)統計処理

測定値の有意差検定は，ステューデントの t 検定により行い，有意水準(P)が 5%未満の場合に有意であるとした．

4．研究成果

(1)各種緑茶カテキンの大腸癌転移に対する予防効果の比較検討

EGCG，ガロカテキンガレート (GCG)，エピカテキンガレート(EGC)，エピガロカテキン (EGC) について (図 1)，

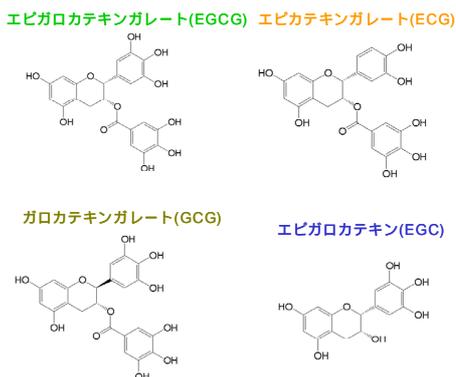


図 1 各カテキンの構造式

がん転移抑制活性を比較検討した(図 2)．投与量は，1 μ モル/マウス/日とし，がん接種の前後 5 日間，腹腔内に連日投与した．

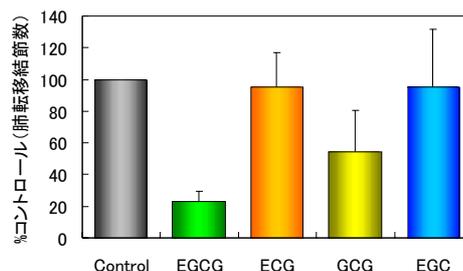


図 2 がん転移抑制活性の比較検討

EGCG が最も強力な抑制効果を示し，GCG にも統計的に有意な抑制活性を認めた．一方，ECG および EGC には抑制活性は全く認められなかった．

(2)EGCG，粗カテキン抽出物，および緑茶抽出物の大腸癌転移予防活性の比較検討

まず，粗カテキン抽出物，および緑茶抽出物に含まれる EGCG を HPLC にて定量し，EGCG の含量を合わせた条件で試料溶液を調製してがん転移予防効果を検討した(図 3)．

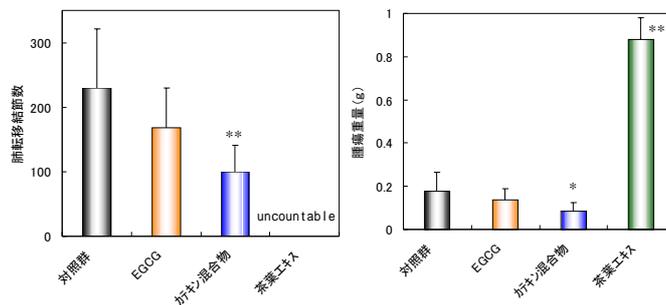


図 3 EGCG，カテキン混合物，茶葉エキスのがん転移抑制効果の比較検討

その結果，EGCG 単独よりも粗カテキン抽出物の方が抑制効果が強かった．一方，緑茶抽出物投与群では逆に転移の増悪が認められた．これらのことから EGCG 単独よりも他のカテキンと併用することにより抑制効果が増強されることが示された．緑茶抽出物の投与による増悪についてはカテキン以外の成分の関与が示唆され，この点については今後の課題である．

(3)緑茶カテキンの大腸癌転移予防メカニズ

ム解析

まず,EGCG の作用部位を明らかにするため,EGCG の投与をがん細胞を接種する前後に分けて行い,がん転移抑制効果を比較検討した(図4).

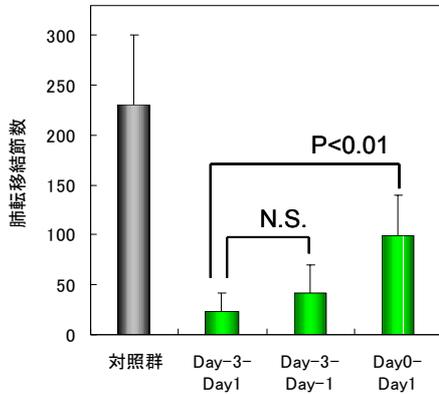


図4 EGCG の投与タイミングの影響

その結果,前投与の方が高い抑制効果を示した.そこで,EGCG の抑制効果における免疫系細胞の関与を明らかにするために,抗アジアロ GM1 抗体あるいは2-クロロアデノシンで処置したマウスを用いて,EGCG をがん接種前に投与した時のがん転移抑制効果を検討したところ,前者では EGCG の抑制効果は消失したが,後者では未処置マウスでの場合と同等の抑制効果を認めた(図5および6).さらに,T細胞の関与を明らかにするため,ヌードマウスを用いて EGCG のがん転移抑制効果を検討した(図7).

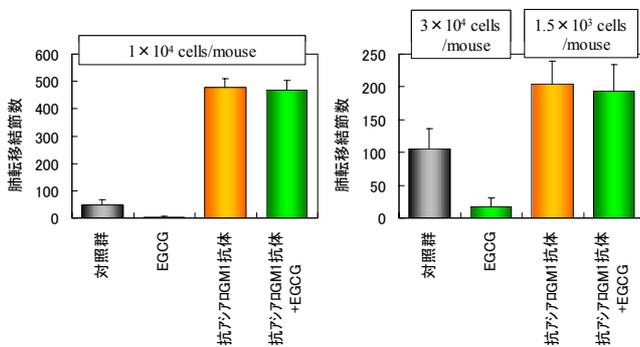


図5 EGCG の抑制効果におけるアジアロ GM1 陽性細胞の関与

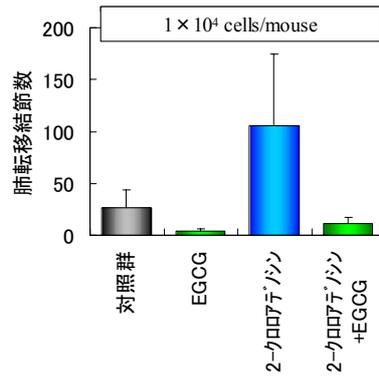


図6 EGCG の抑制効果におけるマクロファージの関与

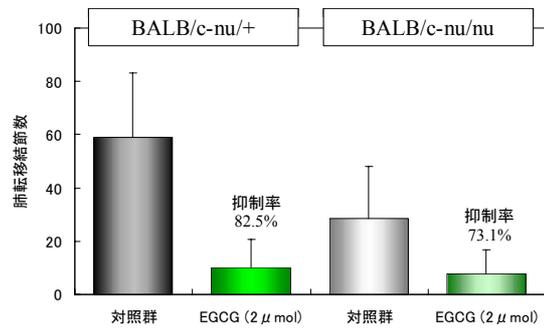


図7 EGCG の抑制効果におけるT細胞の関与

その結果,EGCG の抑制効果は部分的に減弱することが認められたが,より関与の大きなエフェクター細胞としては,アジアロ GM1 陽性細胞の方がより重要であると考えられた.一方,EGCG の投与によるマウス血清中の抗腫瘍性サイトカイン(IFN- α , IFN- γ , IL-12)の濃度に変動は認められなかった(図8).

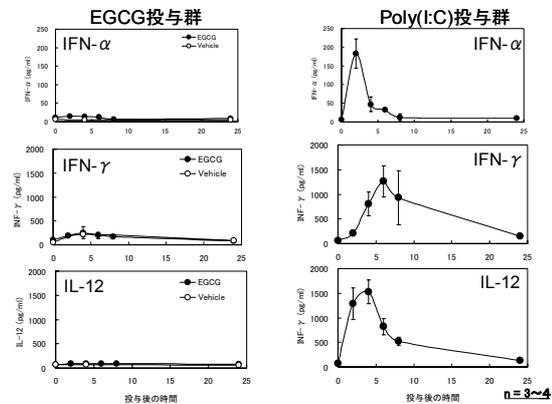


図8 血清中サイトカイン濃度に与える影響

そこで、アシアロ GM1 陽性細胞の中で大部分を占めるナチュラルキラー (NK) 細胞の活性について、NK 細胞に感受性の Yac-1 細胞を用いて細胞傷害活性の評価を行ったところ、若干の活性上昇が認められたが、同程度の転移抑制を示す Poly(I:C) の効果に比較すると明らかに弱かった (図 9)。

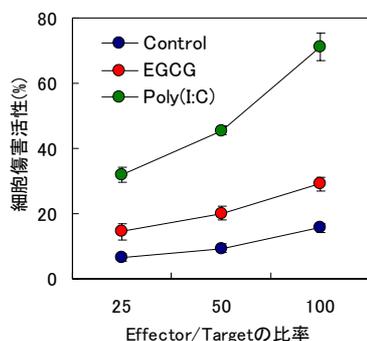


図 9 細胞傷害活性に与える影響

また、FACS にて、パーフォリンの発現量を検討したが、EGCG 処置マウス由来の NK 細胞ではコントロールと同程度の発現量しか認められなかった (図 10)。一方、Poly(I:C) 処置マウス由来の NK 細胞では顕著に発現量が増加していた。これらのことから、EGCG のがん転移抑制効果には、NK 細胞以外のアシアロ GM1 陽性細胞が関与している可能性が示唆された。

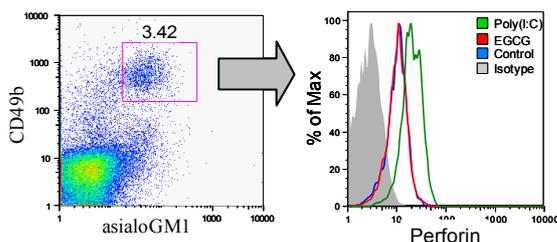
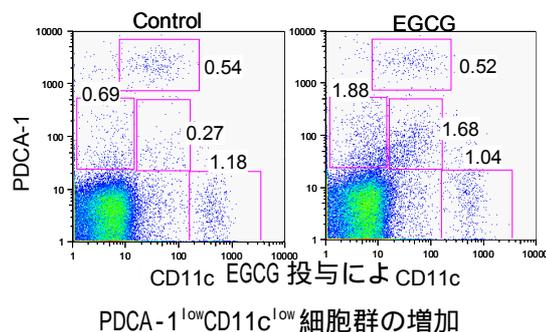


図 10 NK 細胞にけるパーフォリンの発現量

そこで、アシアロ GM1 陽性細胞群について、各種の免疫細胞表面マーカーに対する抗体を用いて、フローサイトメトリーにより検討したところ、全く予期せずして、形質細胞様樹状細胞のマーカー (PDCA-1 および CD11c)

を中程度に発現する細胞群が EGCG 投与マウスで約 5 倍に増加することを見出した (図 11)。



当該細胞群は、その表面マーカー (PDCA-1 および CD11c) の発現量から、未熟な樹状細胞様の細胞と考えられたが、アシアロ GM1 を発現している点で、形質細胞様樹状細胞や骨髓球形樹状細胞とは全く異なる細胞集団であることが示唆された。これまでに、EGCG による樹状細胞の増殖誘導に関する報告はなく、さらに、当該細胞 (PDCA-1^{low}CD11c^{low} アシアロ GM1⁺) に関する報告についても、申請者の知る限りにおいて、全くなされていない。今後、同細胞集団の機能的関与を解明する必要があると思われる。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 1 件)

OGASAWARA M, MATSUNAGA T, NAGAI Y, TAKATSU K

Screening of Antioxidants for Inhibitory Activity against Lung Metastasis of Murine Colon Cancer Cells in Mice.

2nd World Conference on Magic Bullets (Ehrlich), 2008年10月4日, ドイツ, ニュルンベルク

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小笠原 勝 (OGASAWARA MASARU)

富山県薬事研究所 バイオテクノロジー・和漢薬研究課 主任研究員

研究者番号: 30443427

