総 説

茶ポリフェノール類のがん転移抑制効果

山本(前田)万里*

Inhibitory Effect of Tea Polyphenols on Cancer Metastasis

Mari MAEDA-YAMAMOTO

* National Research Institute of Vegetables, Ornamental Plants and Tea, MAFF

1. は じ め に

茶は、近年、生理機能性が多数解明され^{1)~3)}、注目されてきた嗜好飲料である。茶はツバキ科の植物で、もともと中国で薬用とされてきた。日本には、平安朝(唐の時代)に伝来したが、一時すたれ、鎌倉時代に入って臨済宗の開祖・栄西禪師が茶種子とともに中国・宋の喫茶法を普及して本格的な茶飲が始まった。茶葉には、カテキン類(渋み)、カフェイン(苦み)、各種ビタミン(C, B, A, E)、テアニン等のアミノ酸(旨み)、フラボノイド、微量金属類、多糖類、サポニンなどが含有されている。特に数多くの生理機能性が報告されているのがポリフェノール類のカテキンである。緑茶に含まれているカテキン類は10~20%で、その主要なものは、カテキン類の約半量を占めるエピガロカテキンガレート(EGCG)、その他エピガロカテキン(EGC)、エピカテキンガレート(ECG)、エピカテキン(EC)である。紅茶ではそれらの重合したテアフラビン(TF1)、テアフラビン-3-O-ガレート(TF2A)、テアフラビン-3'-O-ガレート(TF2B)、テアフラビン-3,3'-O-ジガレート(TF3)(図1)、テアシネンシン類が含まれている。EGCGは、茶以外の植物では見いだされていない特殊な成分である。また、筆者らは最近、生理機能性の高いエピガロカテキン-3-O-(4-O-メチル)ガレート(EGCG4"Me)という新規なカテキンも茶葉中に見いだしている³⁾⁴⁾。本報では、解明されてきたポリフェノール類のがん転移抑制効果について概説したい。

2. が ん 転 移

浸潤性の悪性腫瘍が、血行性あるいはリンパ行性に体内を循環し、他臓器に生着して再び増殖を始めることががんの転移である。このように、がんの転移には血管内転移とリンパ節転移が知られている。血管内転移は、まず原病巣から離脱した悪性がん細胞が血管侵襲し、血管内を移行、血管内皮細胞への接着、浸潤を経て、血管新生によって成立する⁵⁾(図2)。その際、様々なタンパク質で構成されている細胞外マトリクス(ECM; 基底膜, 間質)を分解しながら転移性がん細胞は移動していく必要があり、その分解酵素の分泌が重要なイベントの1つとなっている⁶⁾⁷⁾。このような過程のどこを欠いてもがん転移の成立はむずかしいとされているが、現在、がん転移抑制のためにスクリーニングされている薬剤は、がん細胞の浸潤⁸⁾あるいは血管新生⁹⁾を抑制する物質に絞られている。

特に、基底膜(ECM)を破壊するマトリクスメタロプロテアーゼ(Matrix metalloproteinases; MMPs)は現在、膜型MMP(MT-MMP)を含み20まで知られているが、その阻害剤(金属酵素阻害剤)については、欧州を中心として各製薬メーカーが抗がん剤として臨床試験に入っており、今までにないタイプの抗がん剤として市場に出回ってくると予想される。臨床開発中の薬剤は、欧州で第Ⅱ相試験に入ったMarimastat(British Biotech社)、第Ⅰ相試験に入ったCGS27023A(Ciba-Geigy社)やAG3340(Agaaron社)、MMP-3, -2, -9活

* 農林水産省野菜・茶葉試験場(〒428-8501 静岡県榛原郡金谷町金谷2769)

図 1 茶葉中ポリフェノール類の化学構造式

な開発戦略は食品中の抗がん物質検索にも反映すべき点であると思われる。

3. 茶ポリフェノール類のガン転移阻害作用

(1) がん浸潤抑制作用

茶ポリフェノール類（カテキン類）の機能性として最も知られているのが、発がんイニシエーション（開始）・プロモーション（促進）抑制作用である。また、がん細胞増殖抑制作用も知られている。がんは、発がんイニシエーション（開始）、発がんプロモーション（促進）の過程を経て発生すると考えられている。イニシエーションで、7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) などの発ガン物質が DNA に障害を及ぼして突然変異が起り、12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) などで引き起こされるプロモーション過程で突然変異をおこした細胞が無制限増殖してがん化する。茶成分は、突然変異抑制（発がんイニシエーション抑制）作用^{11)~13)}や発がんプロモーション抑制作用^{14)~16)}、抗腫瘍性（ガン細胞増殖阻止作用）をもつことが報告されている¹⁷⁾¹⁸⁾。カテキン類、特に EGCG は、ラジカルスカベンジャーとして働き¹⁹⁾、フリーラジカル生成を抑制することにより DNA 損傷を抑える結果、発ガン抑制作用を示すものと考えられている。

茶カテキン類は上記の作用のみならず、ガン転移阻害作用を有していることが報告されている。TANIGUCHI ら

図 2 血管内がん転移の過程

性阻害能を持ち放線菌培養液から見いだされた L-N-(N-hydroxy-2-isobutylsuccinylamoyl)-seryl-L-valine (キモトリプシン, トリプシン, パパイン, ペプシンなどの体内タンパク質分解酵素活性や標的がん細胞の増殖を抑制しない, 萬有製薬)¹⁰⁾ などがあり、いずれもヒドロキサム酸骨格を有している。抗がん剤としての MMP 阻害剤に求められるものは、MMP-2, -3, -9 のみを阻害するような高い酵素選択性があり、副作用が少なく、がん細胞への直接的細胞毒性がないなどの点である。このよう

は、マウスメラノーマ細胞 B16 をマウス尾静脈に注入したときの肺への転移を EGCG (経口投与) が抑制すること²⁰⁾, SAZUKA らは、マウス肺ガン LL2-Lu3 細胞が人工基底膜マトリゲルを浸潤する系²¹⁾で EGCG (IC_{50} ; 25 μ M 程度) と ECG (IC_{50} ; 35 μ M 程度) が強く浸潤を阻害すること²²⁾, ISEMURA ら²³⁾や OGATA ら²⁴⁾は、3LL 細胞のウシ肺動脈内皮細胞層及びファイブロンネクチンコートディッシュへの接着を ECG および EGCG が阻害することを報告している。

接着に関しては、SAZUKA ら²⁵⁾は、EGCG アガロースを用いた解析で、EGCG が血漿中のフィブロンネクチン、フィブリノーゲン、ヒスチジンリッチ糖タンパク質と結合することを報告している。さらに、血漿ファイブロンネクチンの C 末端のヘパリン結合ドメイン (Hep II domain) に EGCG アガロースが結合することを見だしており²⁶⁾, EGCG によるがん細胞のフィブロンネクチンへの結合の阻害は、Arg-Gly-Asp 配列 (フィブロンネクチンの細胞接着活性に関係している) を含む細胞結合ドメインへの直接的結合によるものでないことを示した。

また、ZHANG ら²⁷⁾は、ラット肝腫細胞株 AH109A 培養系で、抹茶、ウーロン茶、紅茶がその増殖及び浸潤を抑制し、ラット正常腸間膜中皮細胞 M-cell の増殖には影響を与えなかったことを報告している。それらの茶の活性成分としては、EGCG, ECG, TF1, EGC が挙げられている。

がん細胞の浸潤が成立するためには、前項に記したように、がん細胞が血管内皮細胞の間隙を通りぬけ、MMPs を産生・分泌し基底膜を破壊⁷⁾して血管外に出ていくことが必要となる。そこで、がん細胞からの MMPs 産生を阻害する物質のスクリーニングが以下のように行われている。なお、ゼラチンを分解する gelatinase-A (MMP-2) 及び gelatinase-B (MMP-9) の活性はゼラチンを基質にした非還元 SDS-PAGE を行って、ゲルを塩化亜鉛等で活性化し、分解されたバンドを CBB 染色で確認する (活性バンドは白く抜けたバンドとして検出される) gelatin zymograph 法²⁸⁾を用いることで高感度検出される。

SAZUKA ら²⁹⁾は、マウス肺がん細胞 LL2-Lu3 を用い、ECG と EGCG が濃度依存的に MMP-2, -9 の活性を抑制すること、EC や EGC といった遊離型カテキンにはそのような作用は見いだされないことを報告している。また、ゼラチンアガロースを用いたアフィニティクロマトにより、MMPs 抑制活性のあるエステル型カテキン類及びテアフラビン類は MMP と直接結合することでそ

の活性を抑制することも見いだしている。また、筆者らは 2 層式のカルチャーチャンバーを用い、上層のインベージョンチャンバー (膜孔径 8 μ m) に基底膜としてゼラチンをコートし、その上にヒト血管内皮細胞株 HUVEC-C を単層培養したものへ、蛍光標識した転移性ヒト線維肉腫細胞株 HT-1080 と試料を添加して 5 時間後、下層に浸潤してくるがん細胞を計測する複合培養系³⁰⁾ (図 3) により茶葉中に含まれるカテキン類の抑制効果を検討した。その結果、エステル型カテキン類及び TF1 が強く浸潤を抑制し、細胞毒性の検討から ECG が最も効果的なカテキンであることを見いだした (図 4)。さらに、MMPs 活性に及ぼす影響を調べたところ、浸潤を抑制したカテキン類は MMP-2, -9 の酵素活性を強く抑制し、酵素の活性化をも阻害することがわかった。 IC_{50} は 20 μ g/ml 程度であった³¹⁾ (図 5)。GARBISA ら³²⁾は、ヒト線維肉腫細胞株 HT1080 を用いて、緑茶の主要カテキンである EGCG が腫瘍の浸潤及び MMP-2, -9 の活性を抑制することを報告した。その IC_{50} は 20 及び 50 μ M であった。また、マトリゲルを使った人工基底膜透過性を調べたところ、EGCG は強く浸潤を抑制し、 IC_{50} は 0.1 μ M 以下であった。彼らは、EGCG が MMP-2 及び MMP-9 の活性を低濃度 (緑茶飲用で十分まかなえる量) で抑制することは大きな意味をもち、アンジオスタチン (内皮細胞成長抑制剤) などの併用により、がん転移を抑制することが可能であると推察している。

MAKIMURA ら³³⁾は酵素としてのコラゲナーゼ活性への影響を検討して、エステル型カテキンが強くその活性を阻害し (100 μ g/ml), C, EC, EGC, GC は阻害活性を示さなかったと報告しており、コラゲナーゼ活性の抑制には、3-galloyl 基が必要な骨格であると考察している。

図 3 In vitro がん浸潤検定系

図 4 エステル型カテキン類のがん浸潤抑制作用

英小字は、有意差を表す。同じ文字の表示がないものは有意差あり (5% 危険率)。

■ 浸潤率; ▨ 細胞生存率

図 5 エステル型カテキン類の MMPs 活性抑制作用

ゼラチンザイモグラム：白く抜けたバンドが MMP によって分解された基質。

92 k, MMP-9; 62-72 k, MMP-2.

(2) 血管新生阻害作用

血管新生の阻害でも、茶ポリフェノールは効果を示している。CAO ら³⁴⁾は緑茶を飲むと血管新生が抑制されると報告している。これは、転移ガン細胞が基底膜から浸潤したあとの血管新生 (CAM アッセイ; 受精鶏卵漿尿膜法; chick embryo chorioallantoic membrane assay による) を緑茶の主要カテキンである EGCG が 10 µg/ml 濃度の添加で有意に抑制したというものである。このことから、緑茶を飲むことにより、がん転移が抑制されると考察している。SWIERCZ ら³⁵⁾は、がん転移における血管新生はウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベータ (u-PA) の酵素活性の抑制により阻害することができると考え、CAM アッセイによりウロキナーゼ阻害剤の検索を行い、EGCG がウロキナーゼ活性を抑制することで、血管新生を有意に阻害することを見だしている。

また、MENON ら³⁶⁾はカレー粉に含まれる抗酸化物質クルクミンとの複合的な作用について報告している。マ

ウスに B16F-10 メラノーマ細胞を注入して誘導する肺転移モデル系において、クルクミンとカテキンは有意に肺転移を抑制し、生存率を高めたと報告している。また、10 µg/ml のクルクミンとカテキン処理により、B16 細胞のインベージョンチャンバーによるコラーゲンマトリクス浸潤は強く抑制され、MMPs 活性が強く阻害されたことによるものと考察している。食品成分の機能性を考えていく上で、複合的な作用というのは常に考えておく必要があると思われる。

(3) 遺伝子発現抑制作用

MMP-1, MMP-3, MMP-9, u-PA については、それら遺伝子の発現調節領域に、Ets ファミリーの転写因子が結合するモティフが存在し、その転写因子によって、がん転移に重要な働きを示すこれらのプロテアーゼの発現が調節されていることが報告されている^{37)~40)}。この際、近接して存在する他のモティフに結合する AP-1 などの転写因子は、Ets ファミリーの転写因子と協調的に作動するといわれている。実際、MACCARTY⁴¹⁾は、緑茶ポリ

フェノールは Fra-1/Fra-2 を誘導し、拮抗的に転写因子 AP-1 の転写活性を抑制し、そのことががん浸潤、血管新生を抑制する起因になっていると推察している。また、MMPs については、これらのプロテアーゼを活性化する膜型 MMP^{42)~44)} や、不活化する TIMP (Tissue inhibitor of metalloproteinase)⁴⁵⁾ といった物質も知られている。これらの物質の相互作用を考慮した MMPs の調節を目的とした茶葉中ポリフェノール類の探索という研究戦略も考えられる。実際、筆者らは MMP-2 を活性化する MT1-MMP の酵素活性を EGCG が濃度依存的に抑制することを認めている。

(4) 疫学的調査

疫学的な調査も報告されている。NAKACHI ら⁴⁶⁾ は、乳がん切除後の患者 (日本人) の予後を調べ、緑茶消費量と乳がんの再発 (転移) との関係性を明らかにしている。この調査によると、緑茶消費量とがん再発にははっきりとした相関関係があり、1 日 5 杯以上緑茶を飲んでいる人、および 4 杯以下の人のがん再発率はそれぞれ 16.7% と 24.3% であった。しかし、これは、乳がん I 及び II ステージの人であり、III ステージの人では改善は見られなかったという。早期がんの予後と緑茶飲用の関係を表す良い例であろう。

経口投与した場合、体内に入るカテキンの量が問題になるが、キャピラリー液体クロマトグラフ/エレクトロスプレーマスマススペクトロメトリー (cLC/ESI-MS) により茶を飲用した後のヒトの血漿中に 6 つの主要カテキンを分離定量できること⁴⁷⁾、飲用した EGCG の 0.32% が血漿中に見いだされること (化学発光検出 HPLC)⁴⁸⁾、1.2 g の脱カフェイン緑茶を飲用して 1 時間後血漿中に最大 268 ng/ml EGCG、206 ng/ml EGC、80 ng/ml EC (ECG は検出されなかった) が検出されること⁴⁹⁾ 等の報告がある。このような研究結果から有効量に達するため 1 日に何杯程度飲用すべきかが予想される。

いままで述べてきたように、茶のエステル型カテキン類は、がん転移に関わるプロテアーゼ活性を抑制することで、がん浸潤や血管新生を阻害する働きがある。In vitro 及び in vivo でその効果が認められてきたカテキン類であるが、特異性の部分ではまだ不明な点が多いかと思う。このカテキン類については、薬品としてその価値を問うていくのではなく、あくまでも機能性食品としての利用を考えていく方がよいと筆者は考えている。MMP 阻害剤の大量スクリーニングのための効率的マイクロプレートアッセイ⁵⁰⁾ も開発されてきて、食品成分からのがん転移抑制成分の検索もさらに簡便になってき

た。茶カテキン類を単体として利用するばかりでなく、他の食品成分との相乗作用、拮抗作用についても考えていく必要があるだろう。

4. おわりに

本稿では、茶の特徴的な成分であるポリフェノール類 (カテキン類) のもつがん転移抑制効果を取りあげた。カテキン類については、強い抗酸化作用、生活習慣病予防作用、抗う蝕・抗ウイルス・抗菌作用、抗アレルギー作用等が見いだされており、今後は、生体内での各機能性成分の代謝、吸収、作用機作などについても検討していかなければならない。それぞれの機能性を発揮させるための食品素材としての検討も進めていかねばならないだろう。農学、医学、薬学を融合した研究連携での研究の飛躍的な進展を期待したい。

文 献

- 1) 山本 (前田) 万里 : 茶の体調調節機能, 日食科工誌, **43**, 653 (1996).
- 2) 山本 (前田) 万里 : 食品工業, **41**, 50 (1998).
- 3) 山本 (前田) 万里・佐野満昭・立花宏文 : バイオサイエンスとインダストリー, **57**, 41 (1999).
- 4) SANO, M., SUZUKI, M., MIYASE, T., YOSHINO, K. and MAEDA-YAMAMOTO, M. : *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 1906 (1999).
- 5) 清木元治 : 実験医学, **12**, 906 (1994).
- 6) WILSON, C., HEPPNER, K., LABOSKY, P., HOGAN, B. and MATRISIAN, L. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 1402 (1997).
- 7) STETLER-STEVENSON, W., ASNAVOORIAN, S. and LIOTTA, L. : *Annul. Rev. Cell Biol.*, **9**, 541 (1993).
- 8) 奥山 彬・内藤恭三 : 細胞工学, **17**, 561 (1998).
- 9) 池山崇一・須藤勝一 : 実験医学, **12**, 1096 (1994).
- 10) NAITO, K., KANABAYASHI, N., NAKAJIMA, S., MURAI, T., ARAKAWA, K. and NISHIMURA, S. : *J. Int. Cancer*, **58**, 730 (1994).
- 11) KADA, T., KANEKO, K., MATSUZUKI, S., MATSUZAKI, T. and HARA, Y. : *Mutation Res.*, **150**, 127 (1985).
- 12) JAIN, A. And SETHI, H. : *Cytologia*, **56**, 539 (1991).
- 13) CONNEY, A., WANG, Z., HUANG, M., LOU, Y. and YANG, C. : *Proceedings of American Association for Cancer Research Annual Meeting*, **36**, 704 (1994).
- 14) HAGIWARA, N., AHN, Y., ISHIDA, M., TATEISHI, M., SAKANAKA, D., KIM, M. and YAMAMOTO, T. :

- Shoyakugaku Zasshi*, **45**, 199 (1991).
- 15) KOMORI, A., YATSUNAMI, J., OKABE, S., HARA, Y., SUGANUMA, M., KIM, S. and FUJIKI, H.: *Jpn. J. Clin. Oncol.*, **23**, 186 (1993).
- 16) 富田 勲: 遺伝, **43**, 10 (1989).
- 17) WANG, Z., HUANG, M., HO, C., CHANG, R., MA, W., FERRARO, T., REUHI, K., YANG, CS. and CONNEY, A.: *Cancer Res.*, **52**, 6657 (1992).
- 18) 原 征彦・松崎 敏・中村耕三: 栄食誌, **42**, 39 (1989).
- 19) HAYATSU, H., INADA, N., KAKUTANI, T., ARIMOTO, S., MORI, K., OKUDA, T. and SAKATA, I.: *Prev. Med.*, **21**, 370 (1992).
- 20) TANIGUCHI, S., FUJIKI, H., KOBAYASHI, H., GO, H., MIYADO, K., SADANO, H. and SHIMOKAWA, R.: *Cancer Lett.*, **65**, 51 (1992).
- 21) ALBINI, A., IWAMOTO, Y., KLEINMAN, H., MARTIN, G., AARONSON, S., KOZLOWSKI, J. and MCEWAN, R.: *Cancer Res.*, **47**, 3239 (1987).
- 22) SAZUKA, M., MURAKAMI, S., ISEMURA, M., SATOH, K. and NUKIWA, T.: *Cancer Lett.*, **98**, 27 (1995).
- 23) ISEMURA, M., SUZUKI, Y., SATOH, K., MARUMI, K. and MOTOMIYA, M.: *Cell Biology Int.*, **17**, 559 (1993).
- 24) OGATA, K., MUKAE, N., SUZUKI, Y., SATOH, K., NARUMI, K., NUKIWA, T., ISEMURA, M.: *Planta Med.*, **61**, 472 (1995).
- 25) SAZUKA, M., ITOI, T., SUZUKI, Y., ODANI, S., KOIDE, T. and ISEMURA, M.: *Biosci. Biotech. Biochem.*, **60**, 1317 (1996).
- 26) SAZUKA, M., ISEMURA, M. and ISEMURA, S.: *Biosci. Biotech. Biochem.*, **62**, 1031 (1998).
- 27) ZHANG, G., MIURA, Y. and YAGASAKI, K.: *Cytotechnology*, **31**, 37 (1999).
- 28) HEUSSEN, C. and DOWDLE, E.: *Anal. Biochem.*, **102**, 196 (1980).
- 29) SAZUKA, M., IMAZAWA, H., SHOJI, Y., MITA, T., HARA, Y. and ISEMURA, M.: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **61**, 1504 (1997).
- 30) 山本(前田)万里・川原浩治・長田和浩・山口優一・辻 顕光: 茶業研究報告, **86**, 31 (1998).
- 31) MAEDA-YAMAMOTO, M., KAWAHARA, H., TAHARA, N., TSUJI, K., HARA, Y. and ISEMURA, M.: *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 2350 (1999).
- 32) GARBISA, S., BIGGIN, S., CAVALLARIN, N., SARTOR, L., BENELLI, R. and ALBINI, A.: *Nat. Med.*, **5**, 1216 (1999).
- 33) MAKIMURA, M., HIRASAWA, M., KOBAYASHI, K., INDO, J., SAKANAKA, S., TAGUCHI, T. and OTAKE, S.: *J. Periodontol.*, **64**, 630 (1993).
- 34) CAO, Y. and CAO, R.: *Nature*, **398**, 381 (1999).
- 35) SWIERCZ, R., SKRZYPCZAK-JANKUN, E., MERRELL, M., SELMAN, S. and JANKUN, J.: *Oncol. Rep.*, **6**, 523 (1999).
- 36) MENON, L., KUTTAN, R. and KUTTAN, G.: *Cancer Lett.*, **141**, 159 (1999).
- 37) NERLOV, C., CESARE, D., PERGOLA, F., CARACCILO, A., BLASI, F., JOHNSEN, M. and VERDE, P.: *EMBO J.*, **11**, 4573 (1992).
- 38) GUTMAN, A. and WASYLYK, B.: *EMBO J.*, **9**, 2241 (1990).
- 39) WASYLYK, B., GUTMAN, A., NICHOLSON, R. and WASYLYK, B.: *EMBO J.*, **10**, 1127 (1991).
- 40) GUM, R., LENGUEL, E., JUAREZ, J., CHEN, JH., SATO, H., SEIKI, M. and BOYD, D.: *J. Biol. Chem.*, **271**, 10672 (1996).
- 41) MCCARTY, M.: *Med Hypotheses*, **50**, 511 (1989).
- 42) NAGASE, H.: *Biol. Chem.*, **378**, 151 (1997).
- 43) SATO, H., TAKINO, T., OKADA, Y.: *Nature*, **370**, 61 (1994).
- 44) TANAKA, M., SATO, H., TAKINO, T.: *FEBS Lett.*, **402**, 219 (1997).
- 45) WOESSNER, J. Jr.: *FASEB J.*, **5**, 2145 (1991).
- 46) NAKACHI, K., SUEMASU, K., SUGA, K., TAKEO, T., IMAI, K. and HIGASHI, Y.: *Jpn. J. Cancer Res.*, **89**, 254 (1998).
- 47) DALLUGE, J., NELSON, B., THOMAS, J., WELCH, M. and SANDER, L.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **11**, 1853 (1997).
- 48) NAKAGAWA, K. and MIYAZAWA, T.: *Anal. Biochem.*, **248**, 41 (1997).
- 49) LEE, M., WANG, Z., LI, H., CHEN, L., SUN, Y., GOBBO, S., BALENTINE, D. and YANG, C.: *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, **4**, 393, (1995).
- 50) AKIZAWA, T., URATANI, T., MATSUKAWA, M., KUNIMATSU, A., ITO, Y., ITOH, M., OHSHIBA, Y., YAMADA, M. and SEIKI, M.: *Ann. NY Acad. Sci.*, **878**, 622 (1999).

(平成 12 年 3 月 3 日受理)