

学位論文題名

緑茶カテキン類の抗変異原性に関する研究

学位論文内容の要旨

序論

緑茶の飲用がヒトのがん発生率を低下させる可能性が疫学研究から示唆されている。齧歯類において、タールなどに含まれる benzo[a]pyrene (B[a]P) は肺、胃、皮膚などにがんを誘発する。緑茶に含まれるカテキン類は B[a]P による肺、胃などの発がんを抑制することが報告されている。化学発がんのイニシエーションは、がん原物質の活性代謝物が、がん遺伝子やがん抑制遺伝子などに突然変異を誘発する過程である。緑茶カテキン類は遺伝子突然変異の誘発を抑制する可能性が示唆されている。本研究では、緑茶カテキン類が発がんのイニシエーションを抑制するか、すなわち抗変異原性を有するかを明らかにすることを目的とし、1) 変異原・がん原物質の代謝的活性化、2) 変異原・がん原物質の解毒化、3) 損傷を受けた遺伝子の修復、のそれぞれの過程におよぼすカテキン類の影響を検討した。さらに、4) 緑茶カテキン類の抗変異原性について *in vivo* にて検証した。

I. 変異原・がん原物質の代謝的活性化に関与する酵素の活性におよぼす緑茶カテキン類の影響

環境中の変異原・がん原物質の多くは生体内で活性化されて初めて毒性を示す。この代謝的活性化にはチトクローム P450 (CYP) の関与が最も大きいことが明らかとなっている。そこで、ヒト CYP による変異原・がん原物質の代謝的活性化におよぼす緑茶カテキン類の影響を検討した。酵素源として CYP と NADPH-CYP 還元酵素 (OR) を同時に発現するサルモネラ菌の膜画分を使用した。緑茶カテキン類は B[a]P、PhIP および AFB₁ の CYP1A1、CYP1A2 および CYP3A4 による代謝的活性化を阻害した。緑茶カテキン類の主成分である epigallocatechin galate (EGCG) による阻害が最も強く、CYP1A1 による 10 μ M B[a]P の代謝的活性化に対する阻害の IC₅₀ 値は約 15 μ M であった。また、EGCG は多種の CYP 分子種による薬物の酸化反応を非特異的に阻害した。例えば CYP1A1 による 7-エトキシレゾルフィン O-脱エチル化に対する阻害の Ki 値は約 15 μ M であった。さらに、緑茶カテキン類によるヒト CYP の非特異的阻害の一因として、OR への緑茶カテキン類の影響を検討したところ、EGCG が OR を Ki 値約 2.5 μ M で阻害した。

以上、緑茶カテキン類の主成分である EGCG が、CYP による変異原・がん原物質の代謝的活性化を阻害すること、また OR の阻害が一因であることを明らかにした。

II. 変異原・がん原物質の解毒酵素の発現量におよぼす緑茶カテキン類の影響

B[a]P の解毒化に関与する glutathione S-transferase (GST)、UDP glucuronosyltransferase (UGT) および NADPH: quinone oxidoreductase₁ (NQO₁) の発現におよぼす緑茶カテキン類の影響を検討した。7 週令の雄性 C57BL/6J マウスに EGCG を含む溶液を与え 1 週間飼育した。薬物代謝に関与する主要臓器である肝と、B[a]P による発がんの標的臓器の一つである肺のミクロソームおよび細胞質画分を調製した。GST、UGT および NQO₁ の mRNA 量および酵素活性を測定した。EGCG の投与により、肝臓で

GSTA1 の mRNA は約 3 倍、肺では GSTA1 と GSTA3 の mRNA がそれぞれ約 2 倍、約 3 倍に増加した。

B[a]P は生体内で代謝的に活性化され、B[a]P-7,8-ジヒドロジオール-9,10-エポキシド (BPDE) が生成する。BPDE は究極発がん物質として知られている。BPDE の解毒化に関与する GST の活性におよぼす EGCG の効果を検討した。ラット肝ミクロゾームを B[a]P の活性化酵素源とし、EGCG を含む飲料水で飼育したマウスの肝および肺の細胞質画分を解毒酵素源とした。これら酵素およびサルモネラ菌 TA98 株をグルタチオンの存在下、非存在下で 2.5 μ M B[a]P と共に処理した。EGCG 非投与のマウスの細胞質画分を用いたときの復帰変異コロニー数を 100% とし、EGCG 投与の影響を評価した。0.005% EGCG、0.05% EGCG を投与したマウスの肝および肺細胞質画分を解毒酵素源として用いたときに対照に比べて復帰変異コロニー数が約 80% に減少したことより、GST が誘導されグルタチオン抱合能が増加したことが明らかとなった。また、EGCG は肝臓および肺で NQO1 の mRNA を最大約 1.6 倍に上昇させた。また、0.005% の EGCG を投与したマウスの肝臓で UGT1A7 の mRNA が約 2 倍に、肺で UGT1A6 の mRNA が約 3 倍に増加した。

以上、EGCG がマウス肝および肺において解毒酵素の発現を誘導し、変異原・がん原物質の解毒能を亢進させることを明らかにした。

III. DNA 修復関連遺伝子の発現におよぼす緑茶カテキン類の影響

DNA array を用い、EGCG が DNA 修復関連遺伝子の mRNA 発現量におよぼす影響を検討した。7 週令の雄性 C57BL/6J マウスに EGCG を含む溶液を与え 1 週間飼育し、肝および肺 RNA を調製した。Clontech の Atlas Mouse Stress/Toxicology Array を用いて mRNA 量を解析した。この DNA array には 140 の遺伝子断片がプロットされている。各遺伝子のスポットのシグナル強度を、ハウスキーピング遺伝子のスポットのシグナル強度で補正後、対照と EGCG 投与群における各遺伝子の mRNA 量を比較した。EGCG 投与により xeroderma pigmentum complementation group A (XPA)、xeroderma pigmentum complementation group C (XPC)、mHR23A および mHR23B の発現量が増加した。さらに、これら遺伝子の mRNA 量を RT-PCR 法にて定量した。EGCG を与えたマウスの肝で、XPC および mHR23B の mRNA 発現量が増加することが確認された。XPC と mHR23B は複合体を形成し、ヌクレオチド除去修復の初期段階である DNA 損傷の認識に関与することが報告されている。これら遺伝子の発現が増加することにより、DNA 損傷の修復が亢進する可能性が示唆された。

IV. 緑茶カテキン類の抗変異原性の *in vivo* における検証

B[a]P による発がんイニシエーションに EGCG がおよぼす影響を *in vivo* にて検証した。方法として、遺伝子突然変異を *in vivo* で解析できる HITEC マウスを用いた。HITEC マウスには大腸菌由来の *rpsL* 遺伝子が遺伝子突然変異のモニター遺伝子として導入されている。7 週令の雄性 HITEC マウスに EGCG を含む溶液を与え飼育し、EGCG 投与開始から 1 週間後 500 mg/kg の B[a]P を腹腔内に単回投与した。B[a]P の投与から 2 週間後に肺を回収し、モニター遺伝子である *rpsL* 遺伝子に起きた遺伝子変異の頻度を解析した。B[a]P のみを投与した時、HITEC マウス肺の *rpsL* 遺伝子における変異の頻度は、対照の約 4 倍に上昇した。また、B[a]P が誘発する変異の頻度が高い塩基 (ホットスポット) は AGG、CGT、CGG 配列中のグアニン塩基であった。これらは喫煙者の肺がんにおける p53 遺伝子変異のホットスポットであるコドン 157 (¹⁵⁶CGC-¹⁵⁷GTC-¹⁵⁸CGC)、248 (²⁴⁷AAC-²⁴⁸CGG-²⁴⁹AGG)、273 (²⁷²GTG-²⁷³CGT-²⁷⁴GTT) と同じ配列を含んでおり、HITEC マウスが発がんイニシエーションの予測系として有用であると考えられた。B[a]P が誘発する変異の頻度はヒトが約 10 杯の緑茶を飲んだ場合に相当する 0.005% EGCG 投与群で、EGCG を与えなかった群に対して約 40% に減少した。また、それぞれのホットスポットにおける変異頻度が、EGCG の投与により減少した。以上、EGCG が B[a]P による発がんイニシエーションを抑制することを明らかにした。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 鎌 滝 哲 也

副 査 教 授 長 澤 滋 治

副 査 助 教 授 有 吉 範 高

副 査 助 教 授 高 橋 和 彦

学 位 論 文 題 名

緑茶カテキン類の抗変異原性に関する研究

申請者は緑茶に含まれるカテキン類による発がん予防のメカニズムの解明を目的とし、世界的な研究成果を得た。すなわち、本研究では緑茶カテキン類が、変異原・がん原物質の代謝的活性化、解毒化、DNA 損傷の修復におよぼす影響を検討した。さらに、緑茶カテキン類の抗変異原性を *in vivo* で検証した。本研究はがんの予防研究に有用な概念を提供するものであり、以下に詳述するように極めて優れた研究成果であると評価される。

I. 変異原・がん原物質の代謝的活性化に関与する酵素の活性におよぼす緑茶カテキン類の影響

ヒト CYP による変異原・がん原物質の代謝的活性化におよぼす緑茶カテキン類の影響を検討した。酵素源として CYP と NADPH-CYP 還元酵素 (OR) を同時に発現するサルモネラ菌の膜画分を使用した。緑茶カテキン類は B[a]P、PhIP および AFB₁ の CYP1A1、CYP1A2 および CYP3A4 による代謝的活性化を阻害した。緑茶カテキン類の主成分である epigallocatechin gallate (EGCG) による阻害が最も強かった。例えば、CYP1A1 による 10 μ M B[a]P の代謝的活性化に対する阻害の IC₅₀ 値は約 15 μ M であった。また、EGCG は複数の CYP による薬物の酸化反応を非特異的に阻害した。例えば、CYP1A1 による 7-エトキシレゾルフィン O 脱エチル化に対する阻害の *K_i* 値は約 15 μ M であった。さらに、緑茶カテキン類によるヒト CYP の非特異的阻害の一因として、OR への緑茶カテキン類の影響を検討したところ、EGCG が OR を *K_i* 値約 2.5 μ M で阻害した。

以上、緑茶カテキン類の主成分である EGCG が、CYP による変異原・がん原物質の代謝的活性化を阻害すること、また OR の阻害が一因であることを明らかにした。

II. 変異原・がん原物質の解毒酵素の発現量におよぼす緑茶カテキン類の影響

B[a]P の解毒化に関与する glutathione S-transferase (GST)、UDP glucuronosyltransferase (UGT) および NADPH: quinone oxidoreductase (NQO₁) の発現におよぼす EGCG の影響を検討した。7 週令の雄性 C57BL/6J マウスに EGCG を含む溶液を与え 1 週間飼育し、肝および肺の GST、UGT および NQO₁ の mRNA 量と酵素活性を測定した。EGCG の投与により、肝で GSTA1 の mRNA は約 3 倍、肺では GSTA1 と GSTA3 の mRNA がそれぞれ約 2 倍、約 3 倍に増加した。CDNB に対する GST 活性は 0.05% EGCG の投与により有意に増加し、肝で対照

群の約 1.2 倍、肺では約 1.4 倍であった。また、EGCG は肝および肺で NQO₁ の mRNA を最大約 1.6 倍に上昇させた。メナジオンに対する単位蛋白質量当たりの NQO₁ 活性は肝で対照群の約 1.4 倍に、肺で対照群の約 1.3 倍に上昇した。さらに、0.005% の EGCG を投与したマウスの肝で UGT1A7 の mRNA が約 2 倍に、肺で UGT1A6 の mRNA が約 3 倍に増加した。

以上、EGCG がマウス肝および肺において解毒酵素の発現を誘導し、変異原・がん原物質の解毒能を亢進させることを明らかにした。

III. DNA 修復関連遺伝子の発現におよぼす緑茶カテキン類の影響

DNA array を用い、EGCG が DNA 修復関連遺伝子の mRNA 発現量におよぼす影響を検討した。7 週令の雄性 C57BL/6J マウスに EGCG を含む溶液を与え 1 週間飼育し、肝および肺 RNA を調製した。Clontech の Atlas Mouse Stress/Toxicology Array を用いて mRNA 量を解析した。EGCG の投与により肝において xeroderma pigmentosum complementation group A (XPA)、xeroderma pigmentosum complementation group C (XPC)、mHR23A および mHR23B の発現量が増加した。さらに、これら遺伝子の mRNA 量を RT-PCR 法にて定量した。EGCG を与えたマウスの肝で、XPC および mHR23B の mRNA 発現量が増加することが確認された。XPC と mHR23B は複合体を形成し、ヌクレオチド除去修復の初期段階である DNA 損傷の認識に関与することが報告されている。これら遺伝子の発現が増加することにより、DNA 損傷の修復が亢進する可能性が示唆された。

IV. 緑茶カテキン類の抗変異原性の *in vivo* における検証

B[a]P による発がんイニシエーションにおよぼす EGCG の影響を遺伝子突然変異を *in vivo* で解析できる HITEC マウスを用いて検証した。HITEC マウスには大腸菌由来の *rpsL* 遺伝子が遺伝子突然変異のモニター遺伝子として導入されている。7 週令の雄性 HITEC マウスに EGCG を含む溶液を与え飼育し、EGCG 投与開始から 1 週間後 500 mg/kg の B[a]P を腹腔内に単回投与した。B[a]P の投与から 2 週間後に肺を回収し、*rpsL* 遺伝子に起きた遺伝子変異の頻度を解析した。B[a]P のみを投与した時、HITEC マウス肺の *rpsL* 遺伝子における変異の頻度は、対照の約 4 倍に上昇した。また、B[a]P が誘発する変異の頻度が高い塩基 (ホットスポット) は喫煙者の肺がんにおける p53 遺伝子変異のホットスポットと同じ配列を含んでおり、HITEC マウスが発がんイニシエーションの予測系として有用であると考えられた。B[a]P が誘発する変異の頻度はヒトが約 10 杯の緑茶を飲んだ場合に相当する 0.005% EGCG 投与群で、EGCG を与えなかった群に対して約 40% に減少した。また、それぞれのホットスポットにおける変異頻度は、EGCG の投与により減少した。以上、EGCG が B[a]P による発がんイニシエーションを抑制することを明らかにした。

以上、本研究は緑茶カテキン類ががん原・変異原物質の代謝的活性化を阻害すること、およびがん原・変異原物質の解毒化を亢進することを明らかにした。また、緑茶カテキン類が DNA 修復機構を亢進する可能性を示唆した。さらに、新規の遺伝子突然変異検出系を用い、緑茶カテキン類の抗変異原性を *in vivo* で検証し、世界的にもユニークな研究を展開した。本論文「緑茶カテキン類の抗変異原性に関する研究」に含まれる研究成果は薬学における基礎および応用のいずれにおいても優れており、博士 (薬学) の学位を受けるに充分値するものと認めた。