

緑茶カテキンEGCGの抗炎症作用メカニズムに関する研究

山下, 麻衣

<https://hdl.handle.net/2324/7182538>

出版情報 : Kyushu University, 2023, 博士 (農学), 課程博士
バージョン :
権利関係 :



令和5年度 博士論文

緑茶カテキン EGCG の
抗炎症作用メカニズムに関する研究

九州大学大学院 生物資源環境科学府

生命機能科学専攻 食糧化学研究室

山下 麻衣

目次

第 1 章 緒論	…P1
第 2 章 EGCG の Tollip 発現上昇作用における Elf-1 の関与	…P6
第 3 章 EGCG の Tollip 発現上昇作用における PP2A の関与	…P18
第 4 章 EGCG の Tollip 発現上昇作用における cGMP の関与	…P25
第 5 章 <i>in vivo</i> において EGCG が Tollip の発現制御機構に及ぼす影響	…P34
第 6 章 EGCG の Tollip 発現上昇作用における Akt および eNOS の関与	…P42
第 7 章 やぶきたの血清コレステロール値低下作用における Eriodictyol の併用 効果	…P51

第 8 章 ヒト膵臓がんにおける cGMP 産生の PPAR α および PDK4 の発現に 及ぼす影響	…P65
第 9 章 総括	…P80
参考文献	…P93
謝辞	…P109

略語一覧

- Toll-like receptor (TLR)
- Lipopolysaccharide (LPS)
- Tumor necrosis factor- α (TNF- α)
- Interleukin-6 (IL-6)
- Epigallocatechin-3-O -gallate (EGCG)
- 67-kDa laminin receptor (67LR)
- Toll-interacting protein (Tollip)
- Cyclic guanosine monophosphate (cGMP)
- E74-like factor-1 (Elf-1)
- Protein phosphatase 2A (PP2A)
- Endothelial nitric oxide synthase (eNOS)
- Soluble guanylyl cyclase (sGC)
- Alanine aminotransferase (ALT)
- Asparatate aminotransferase (AST)
- 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase (HMGCS)
- 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coA reductase (HMGCR)
- High fat high sucrose (HF/HS)

- LDL receptor (LDLR)
- Pancreatic Ductal Adenocarcinoma (PDAC)
- Cancer stem cell (CSC)
- Peroxisome proliferator-activated receptor- α (PPAR α)
- Pyruvate dehydrogenase E1 subunit alpha 1 (PDHA1)

第 1 章 緒論

炎症反応は細菌類、ウイルスなど人にとって有害な病原体を排除する一連のプロセスである (1)。この病原性細菌の排除を担う免疫応答には獲得免疫系と自然免疫系が存在する。獲得免疫系は主にリンパ球が活躍し、B 細胞から産生される抗体や T 細胞受容体により特異的に異物を認識する。一方、自然免疫系は広範な保存されている生物の生存に必須の感染防御機構である。そのため、抗体のような特異的な病原体認識機構は持たないが、病原体に共通の構造を認識して病原体を捕食、攻撃、排除する。この病原体の認識に中心的な役割を果たしているのが Toll-like receptor (TLR) というパターン認識受容体である (2)。

細菌およびウイルスの構成成分を特異的に認識する TLR にはいくつかのファミリーが存在し、それぞれが特定の細菌構成成分を認識することが知られている (3)。その中でも細菌の細胞壁構成成分を認識するものは TLR2 と TLR4 であり、TLR2 はグラム陽性細菌の細胞壁構成成分である peptidoglycan を認識し、TLR4 はグラム陰性細菌の細胞壁構成成分である lipopolysaccharide (LPS) を認識する。これらが TLR によって認識されると、TLR シグナル伝達により ERK1/2、JNK、p38 に代表される mitogen-activated protein kinase (MAPK) のリン酸化を介して tumor necrosis factor- α (TNF- α)、interleukin-6 (IL-6) などの炎症性

サイトカインの転写や nitric oxide (NO) の産生が促進され、結果的に発熱やアポトーシス誘導といった炎症関連イベントが引き起こされることが知られている (4)。

このように TLR を介した炎症反応は我々にとって重要な生体防御機構である。しかし、過度の急性炎症は敗血症を引き起こし、また、近年では慢性的な炎症の蓄積は糖尿病、動脈硬化といった生活習慣病を惹起することが報告されている (5-8)。実際に、TLR4 シグナリングを担う JNK や I κ B Kinase (IKK) がリン酸化されることでインスリン抵抗性を引き起こし、TLR4 の発現抑制は、糖尿病の主な原因となっているインスリン抵抗性の改善に繋がる (5)。そのため、生活習慣病の予防・治療の一つとして TLR4 を介した過度な炎症や慢性的な炎症を制御することが重要と考えられている。

一方、茶 (*Camellia sinensis* L.) は多様な生理機能性が解明されており、世界的に注目されている嗜好飲料である。近年では、科学的解析により抗酸化作用、抗がん作用、血圧上昇抑制作用、抗ウイルス作用、抗アレルギー作用、消臭作用、脂質代謝改善作用等が明らかとなっている (9)。茶葉にはカテキン類、カフェイン、各種ビタミン、テアニン等のアミノ酸、フラボノイド、食物繊維、微量元素類、サポニン等が含まれているが、特にポリフェノール類であるカテキンの生理機能が多数報告されている (10)。緑茶カテキンの成分は主として、epicatechin

(EC)、epigallocatechin (EGC)、epicatechin-3-*O*-gallate (ECG)、epigallocatechin-3-*O*-gallate (EGCG) の 4 種類が知られている。その中で EGCG は約半分の含有率を占めており、最も生理活性が高いことから多くの研究対象となっている。

これまでの研究により、当研究室では EGCG の細胞膜上受容体として 67-kDa laminin receptor (67LR) を同定し、EGCG が 67LR を介して細胞内にシグナル伝達し、抗がん作用や抗アレルギー作用、抗炎症作用等を示すことが見出されている (11,12)。抗炎症作用においては、生理的低濃度の EGCG が 67LR を介して TLR4 のリガンドである LPS によって誘導される炎症応答を抑制すること、また、その活性に TLR4 シグナル抑制分子である Toll-interacting protein (Tollip) の発現上昇が重要であることが明らかにされている (13)。しかし、EGCG がどのように Tollip の発現を上昇させるのか、その詳細なメカニズムは未だ不明である。セルフメディケーションが推進され、機能性食品成分への関心が高まっている中、より安全に、より有効的に食品の生理作用を享受するためには、何に効くかだけでなく、どのようにして効くかといった機能性発現メカニズムの解明は極めて重要である。そこで本研究では、EGCG の抗炎症作用の中核となる Tollip 発現の制御機構について検討を行った。

また、これまでにメタボリックプロファイリング法を用いた 43 種の茶品種の比較により、柑橘類に多く含まれるポリフェノールである Eriodictyol が

EGCG/67LR/Akt/endothelial nitric oxide synthase (eNOS)/ soluble guanylyl cyclase (sGC)/ cyclic guanosine monophosphate (cGMP)経路を増強することが見出されている (14)。ことから、高脂肪・高ショ糖食摂食によって誘導した肥満モデルマウスに対し、EGCG を多く含む緑茶抽出物（やぶきた品種）と Eriodictyol を摂取させ、EGCG の抗肥満作用に対する併用効果ならびに体重、脂肪重量、肝臓などの各種パラメーターや肥満ならびにコレステロール関連遺伝子の発現に与える影響を検討した。

さらに、様々ながんに対する EGCG の抗がん作用が報告されており (15, 16)、特に、当研究室では、膵臓がんにおいて EGCG が cGMP を介してがん幹細胞 (CSC) に対する抗がん作用を示すことを明らかにしている (17)。また、EGCG が膵臓がん細胞においてステロイドホルモン受容体スーパーファミリーに属する核内受容体の一つであるペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 α (PPAR α) の発現を上昇させることも見出されている (18)。さらに、我々はピルビン酸デヒドロゲナーゼ A1 (PDHA1)が膵臓がんの幹細胞性に関与していることを明らかにしており (19)、他にもピルビン酸脱水素酵素キナーゼ 4 (PDK4) が PDHA1 の活性を阻害することや PPAR が PDK4 遺伝子の転写活性化を促進することが報告されている (20)。以上のことから、cGMP 誘導剤の膵臓がん

対する抗がん作用において、PPAR ならびに PDK4 の関与について検討を行った。

第2章 EGCG の Tollip 発現上昇作用における Elf-1 の関与

第1節 緒言

Lipopolysaccharide (LPS) はグラム陰性菌細胞壁外膜の構成成分であり、宿主細胞の細胞膜表面に存在する Toll-like-Receptor4 (TLR4) を介したシグナル伝達によって種々の炎症性サイトカインの分泌を促進する (4)。

これまでに当研究室では、マクロファージにおいて緑茶カテキンの主成分である epigallocatechin-3-*O*-gallate (EGCG) が膜タンパク質である 67-kDa laminin receptor (67LR) を介して TLR4 シグナル抑制分子である Toll-interacting protein (Tollip) の発現量を増加させ、その結果、炎症性サイトカインである TNF- α および IL-6 の発現量を低下させることが見出されている (13)。

しかしながら、EGCG が Tollip の発現量を増加させる機構は未だ解明されていない。一方で、ヒト単球細胞株 THP-1 において E74-Like Factor-1 (Elf-1) がリン酸化と糖修飾を受けることで 80 kDa から 98 kDa となって核移行し、Tollip の転写を抑制することが報告されている (21)。このことから、EGCG が Elf-1 の核内における発現を抑制することで Tollip の転写を促進し発現を上昇させる

のではないかと仮定し、EGCG の Tollip 発現上昇作用における Elf-1 の関与を検討した。

第 2 節 材料および方法

第 1 項 細胞および細胞培養

マウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 は 5% ウシ胎児血清 (FBS) (Bio Source International, USA) 添加 DMEM 培地 (Cosmobio, Tokyo) で、37°C 水蒸気飽和した 5%CO₂ 条件下で継代、維持した。DMEM 培地中には 100 U/mL ペニシリン (Meiji seika, Tokyo)、25 mM HEPES (Wako, Osaka) を添加した。細胞を継代するにあたり、対数増殖期で培養維持した。分譲後の早い段階で一度に -80°C で大量凍結し、1 か月以上継代した細胞を用いることを避けて凍結保存した別の細胞を解凍して用いた。凍結培地としてジメチルスルホキシド (DMSO) 10%、FBS 20%、DMEM 培地 70% の割合でそれぞれ混合したものを調製し用いた。

第 2 項 試薬

Sigma Aldrich (St. Louis, USA) より購入した EGCG を 5 mM の濃度となるように超純水に懸濁し、-80°Cに凍結した。使用する際には適宜解凍して用いた。LPS は Sigma Aldrich 社より購入した。TNF- α および IL-6 の ELISA 法による測定には mouse TNF- α ELISA kit (eBioscience)、mouse IL-6 ELISA kit (eBioscience) を用いた。本実験で用いた一般有機試薬は Nacalai Tesque, Inc. (Kyoto, Japan) より購入した。mRNA 測定時のプライマーの塩基配列は

Tollip: Forward ; 5'-TGGACATGTTGGTTGGCTGAA-3'

Reverse ; 5'-TCATCGGGTAGGCATCACTCAC-3' (13)

Elf-1: Forward ; 5'-CAAGTAACGGCATGGAGGAC-3'

Reverse ; 5'-CTGTAAGGGTGATGTCGTC-3' (21)

Actb: Forward ; 5'-CATCCGTAAAGACCTCTATGCCAA-3'

Reverse ; 5'-ATGGAGCCACCGATCCACA-3' (22)

を用いた。ウェスタンブロット法における Immunoblot 解析用の 1 次抗体には、抗 Elf-1 抗体 (Santa Cruz (CA, USA)より購入)、抗 Tollip 抗体 (abcam (Tokyo, Japan)より購入)、抗 β -Actin 抗体 (Sigma (St. Louis, MO) より購入) を 2.5% BSA-TTBS で 2000 倍希釈したものをを用いた。標識 2 次抗体には、HRP 標識抗ラビット IgG 抗体 (Santa Cruz (CA, USA))、HRP 標識抗マウス IgG 抗体 (Zymed Laboratories (CA, USA))、を 10000 倍希釈したものをを用いた。

第3項 炎症性サイトカインの ELISA 解析

マウスマクロファージ細胞株 RAW 264.7 を 24 well plate に 1×10^5 cells/mL となるように播種し、5% FBS-DMEM 培地にて 24 時間前培養を行った。上清を捨て、1% FBS-DMEM 培地 (control 群) および EGCG (2.5 μ M) 含有 1% FCS-培地を添加し、1 時間処理後 LPS (終濃度 50 ng/mL) を添加し、24 時間後に ELISA 法により TNF- α および IL-6 の産生量を測定した。EGCG 添加濃度については過去の報告を参照した (13)。

第4項 RNA 抽出、cDNA 合成ならびにリアルタイム PCR

マウスマクロファージ細胞株 RAW 264.7 を 12 well plate に 1×10^5 cells/mL となるように播種し、5% FCS-DMEM 培地にて 24 時間前培養を行った。上清を捨て、1% FCS-DMEM 培地 (control 群) および EGCG (2.5 μ M) 含有 1% FCS-DMEM 培地を添加し、1 時間培養後 Trizol Reagent (Cosmo bio, Tokyo, Japan) にて回収し、mRNA を抽出した。クロロホルム、2-プロパノール、75%エタノールを使用して抽出・洗浄後 nano drop (Thermo Scientific) にて mRNA 濃度を測定し、Prime Script RT reagent kit (Takara Bio Inc., Shiga) を用いてサーマルサークル (Astec Inc., Fukuoka, Japan) にて cDNA を合成した。cDNA 2

μg に SYBR Green 12.5 μL, プライマー 0.5 μmol を加え、CFX96 Touch リアルタイム PCR 解析システム (Bio-Rad Lab. Inc.) を用いてリアルタイム PCR を行い、Tollip および Elf-1 の mRNA の発現量を測定した。

第 5 項 免疫染色法による Elf-1 関内発現量の解析

マウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 を 2 mL ガラスボトムディッシュに 5% FCS DMEM 培地にて 1×10^5 cells/mL となるよう播種し、24 時間前培養した。EGCG (0, 2.5 μM) 含有 5% FCS DMEM 培地で置換し、1 時間後に 4% パラホルムアルデヒドで細胞を 20 分間氷上で固定した。2.5% Bovine Serum Albumin (BSA) に置換し、1 時間室温で放置した。PBS で洗浄後、anti Elf-1 mouse IgG (Santa Cruz (CA, USA) より購入) を 20 倍希釈した 2.5% BSA-Tween Tris Buffered Saline (TTBS) に置換し、30 分間室温で放置した。PBS で洗浄後、Alexa fluor 555 (Life Technoligies (CA, USA) より購入) を 1,000 倍希釈した 2.5% BSA-TTBS に置換し、30 分間室温で放置した。PBS で洗浄後、Hoechst 33342 (Invitrogen (USA) より購入) を 10,000 倍希釈した 2.5% BSA-TTBS で処理し 15 分間氷上で核を染色後、蛍光顕微鏡に観察を行った。

第 6 項 Elf-1 および Tollip のタンパク質発現量の解析

マウスマクロファージ細胞株 RAW 264.7 を 12 well plate に 1×10^5 cells/mL となるように播種し、5% FCS-DMEM 培地にて 24 時間前培養を行った。上清を捨て、1% FCS-DMEM 培地 (control 群) および EGCG (2.5 μ M) 含有 1% FCS-DMEM 培地を添加した。1 時間培養後、細胞溶解 Buffer にてタンパク質を回収し、ウェスタンブロット法を用いて Elf-1 および Tollip のタンパク質発現量を測定した。

第 7 項 Elf-1 のノックダウンおよびタンパク質発現量の解析

マウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 を 12 well plate に 5% FCS DMEM 培地にて 1×10^4 cells/mL となるよう 1 mL 播種し、24 時間前培養した。その後 siRNA-Elf-1 (10 pmol/ μ L) 3.0 μ L、RNA iMAX 3.0 μ L、DMEM 培地を 50 μ L 混合したものを各 well に添加した。なお、control 群には siRNA-Scr1 を添加した。48 時間後に細胞溶解 Buffer にてタンパク質を回収し、ウェスタンブロット法を用いて Elf-1 および Tollip のタンパク質発現量を測定した。siRNA および RNA iMAX は Sigma 社から購入した。

第 8 項 ウェスタンブロット法

処理を行った細胞に対し、細胞溶解 Buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1% Triton-X 100, 1 mM EDTA, 50 mM NaF, 30 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, 1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF), 2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ aprotinin) を懸濁し、細胞を溶解させた。この細胞溶解液を $1,200\times g$ で 10 分間遠心した後、上清を回収し、タンパク定量を行った。タンパク質の定量には Bicinchoninic (BCA) Protein Assay Reagent (Rockford, IL) を用いた。マイクロプレートリーダーは Sic System (Tokyo, Japan) を用いた。各サンプルが等濃度になるよう PBS で希釈を行った。SDS-PAGE サンプル Buffer (57 mM Tris-HCl (pH 6.8), 9.1% glycerol, 1.8% SDS, 0.02% bromophenol blue, and 0.65 M 2-mercaptoethanol) で 2 倍希釈し、5 分間煮沸後に SDS-PAGE サンプルとした。ニトロセルロースメンブランは Schleicher & Schuell (Keene, NH) より購入した。各サンプルを電気泳動に供し、電気泳動装置およびブロッキングに用いるミニトランスブロットセルは Bio-Rad (Hercules, CA) の装置を用いた。また、Enhanced Chemiluminescence Reagent (ECL) Advance Western Blotting Detection キット (GE Healthcare, UK) を用いて、発色反応を行った。感光はイメージアナライザー Chemi Imager 5500 (Alpha Innotech, San Leandro, CA) を用いた。

第 9 項 統計処理

結果は、平均値 (Mean) と平均値の標準誤差 (S.E.) で示した。2 群間の比較においては Student's *t*-test を、多群間の比較においては Tukey's test もしくは Dunnett's test を用いた。*** : $p < 0.001$ 、** : $p < 0.01$ 、* : $p < 0.05$ で示した。統計解析ソフトは GraphPad Prism4 (Graphpad Software 社, CA, USA) を用いて解析した。

第3節 結果および考察

第1項 マクロファージ細胞株 RAW264.7 における EGCG の抗炎症作用

および Tollip 発現上昇作用

マクロファージ細胞株 RAW264.7 において EGCG が Tollip の発現を上昇させることで LPS 誘導性の炎症性サイトカインの産生を抑制することが報告されていることから、これらの作用について確認した。マウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 を 24 well plate に 1×10^5 cells/well となるように播種し、5% FCS-DMEM にて 24 時間前培養を行った。過去の報告を元に EGCG をそれぞれ 0, 2.5 μ M となるように処理し、1 時間培養後 LPS (終濃度 50 ng/mL) を添加した。24 時間後上清を回収し ELISA 法により TNF- α および IL-6 の産生量を測定した。また、RAW264.7 に EGCG (0, 2.5 mM) を処理し、1 時間培養後 real time PCR により Tollip の mRNA の発現量を測定した。その結果、EGCG 2.5 μ M で 1 時間処理することで LPS により誘導された TNF- α および IL-6 の産生が抑制され、Tollip の mRNA 発現量が有意に増加した (Fig. 1A, 1B)。

第2項 EGCG が Elf-1 核内発現および mRNA に及ぼす影響

第1項より EGCG が mRNA レベルで Tollip の発現を上昇させたことから、EGCG が転写因子である Elf-1 の発現に及ぼす影響を評価した。RAW264.7 細胞株において EGCG 処理により Elf-1 の核内発現が有意に低下した (Fig. 1C)。以前の報告と一致して、Elf-1 は核内に高発現していることが確認された。また、EGCG は Elf-1 の mRNA 発現量には影響を与えなかった (Fig. 1D)。Elf-1 はリン酸化および糖修飾を受けることにより核内に移行するが (21, 23)、EGCG がこのリン酸化および糖修飾を抑制することで Elf-1 の核内への移行を抑制し核内発現を低下させる場合は、EGCG によって核内発現の低下だけではなく細胞質への Elf-1 の蓄積が起こると考えられる。しかしながら、EGCG 処理によって Elf-1 の核内発現低下は見られた一方で細胞質への蓄積は確認されなかった。よって、EGCG は Elf-1 のリン酸化および糖修飾には影響を与えず、核内に存在する Elf-1 の発現を低下させることが示された。以上のことから、EGCG は Elf-1 の mRNA ではなくタンパク質発現量を低下させることが示され、EGCG は Elf-1 の分解誘導に関与していることが示唆された。実際に、人白血病 T 細胞株 Jurka 細胞において Elf-1 はプロテアソーム系によって分解されることが報告されていることから (24)、EGCG がプロテアソーム系による Elf-1 の分解を誘導したと推察される。

第3項 RAW264.7細胞株において Elf-1 ノックダウンが Tollip の発現に及ぼす影響

ヒト結腸がん細胞株 Caco-2 およびヒト単球細胞株 THP-1 において Elf-1 が Tollip の転写を阻害することが報告されていることから (24)、マクロファージ細胞株 RAW264.7 においても同様に Elf-1 が Tollip の発現を制御しているかを検討した。RAW264.7 細胞株において siRNA により Elf-1 をノックダウンしたところ、約 50% の Elf-1 のタンパク質発現量の低下が観察され、また、Elf-1 をノックダウンした細胞において Tollip のタンパク質発現量が有意に上昇した (Fig. 1E)。このことから、マクロファージにおいても Elf-1 が Tollip の発現量を負に制御していることが示された。

第4項 EGCG が Elf-1 および Tollip のタンパク質発現に及ぼす影響

RAW264.7 細胞株において EGCG を処理した細胞では Elf-1 の発現量が低下するとともに Tollip の発現量が有意に上昇した (Fig. 1F)。第3項より Elf-1 をノックダウンした細胞では Tollip の発現量が上昇したことから、EGCG が Elf-1 の発現量を低下させることで Tollip の転写を促し、その発現量を上昇させることが示唆された。

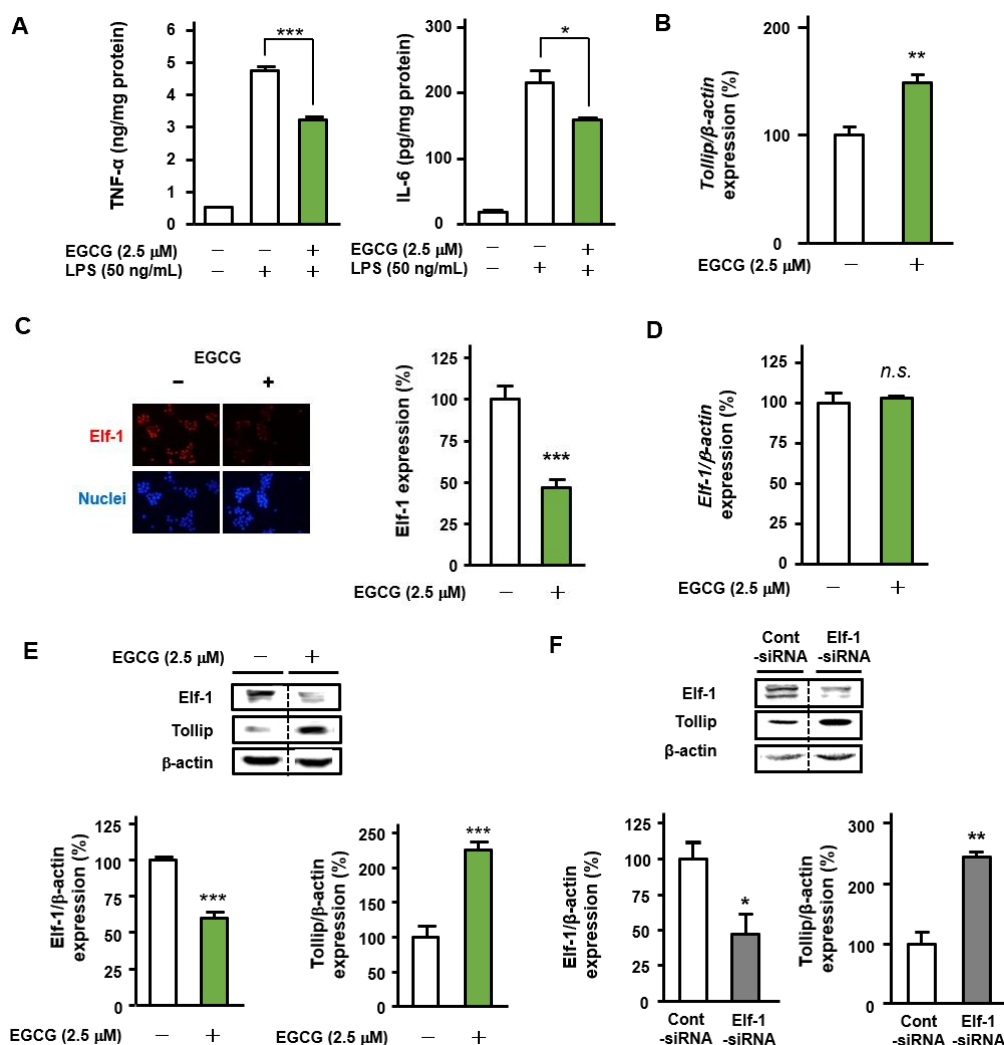


Fig.1 EGCG は Elf-1 の発現を低下させることで Tollip の発現を上昇させる (25)

(A) RAW264.7 細胞株に EGCG (0, 2.5 μ M) を処理し、1 時間培養後 LPS (終濃度 50 ng/mL) を添加した。24 時間後上清を回収し ELISA 法により TNF- α および IL-6 の産生量を測定した。(B) RAW264.7 に EGCG (0, 2.5 μ M) を処理し、1 時間培養後 real time PCR により Tollip の mRNA の発現量を測定した。(C) RAW264.7 に EGCG (0, 2.5 μ M) を処理し、45 分培養後免疫染色法で Elf-1 の核内発現量を評価した。(D) RAW264.7 に EGCG (0, 2.5 μ M) を処理し、45 分培養後 real time PCR により Elf-1 の mRNA の発現量を測定した。(E) RAW264.7 に EGCG (0, 2.5 μ M) を処理し、1 時間培養後回収しウェスタンブロット法を用いて Tollip および Elf-1 の発現量を測定した。(F) RAW264.7 細胞株に Elf-1-siRNA を導入しノックダウン細胞を構築した。48 時間後に回収し、ウェスタンブロット法を用いて Elf-1 および Tollip の発現量を測定した。(A-F) Data is means $\pm$ S.E., Student's *t*-test, ****p* < 0.001, ***p* < 0.01, **p* < 0.05. (A) n = 3, (B) n = 4, (C) n = 10, (D) n = 3, (E) n = 4, (F) n = 3

第3章 EGCG の Tollip 発現上昇作用における PP2A の関与

第1節 緒言

第1章において、マクロファージ細胞株 RAW264.7 において EGCG は Elf-1 の mRNA ではなくタンパク質発現量を低下させることで Tollip の発現量を上昇させることが明らかになった。

脱リン酸化された 98 kDa の Elf-1 は細胞質でプロテアソーム経路によって分解されること (23)、全身性エリテマトーデス患者の T 細胞において脱リン酸化酵素である Protein Phosphatase 2A (PP2A) が Elf-1 の脱リン酸化を行い、98/80 kDa の Elf-1 の発現割合を低下させることが報告されている (24)。さらに当研究室では、EGCG がメラノーマにおいて PP2A を活性化させることで抗がん作用を示すことを見出している (22)。そこで、EGCG が PP2A を活性化させることで Elf-1 の発現量を低下させ、Tollip の発現量を上昇させるのではないかを仮定し、PP2A の関与を検討した。

第2節 材料および方法

第1項 細胞および細胞培養

第2章、第2節、第1項参照。

第2項 PP2A 阻害剤処理後の Elf-1 核内発現量の解析

マウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 を 2 mL ガラスボトムディッシュに okadaic acid (1 nM (26)) (PP2A 阻害剤) 含有 5% FBS DMEM 培地にて 1×10^5 cells/mL となるよう播種し、24 時間前培養した。なお、okadaic acid は DMSO にて溶解し、okadaic acid 処理をしない群は DMSO を等量添加した。以降の作業については第2章、第2節、第5項を参照。

第3項 PP2A 阻害剤処理細胞における Tollip の mRNA 発現量解析

マウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 を 12 well plate に 5%FCS DMEM 培地にて 1×10^5 cells/mL となるよう播種し、24 時間前培養した。okadaic acid 処理をしない群は DMSO を等量添加した。上清を捨て、EGCG (0, 2.5 μ M)、okadaic acid (1 nM) (PP2A 阻害剤) 含有 1%FCS-DMEM 培地を添加し 1 時間培養した。以降の作業については第2章、第2節、第4項を参照。

第4項 EGCG 処理細胞における PP2A 活性化レベルの解析

マウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 を 12 well plate に 5%FCS DMEM 培地にて 1×10^5 cells/mL となるよう播種し、24 時間前培養した。上清を捨て、EGCG (0, 2.5 μ M) 含有 1%FCS DMEM 培地を添加した。1 時間培養後、PBS で一度洗浄後、Lysis buffer を加えて溶解した。12,000 $\times g$ 、4°C で 5 分間遠心して不純物を沈殿させ上清を回収してタンパク定量を行い、タンパク質濃度を各サンプルで等しくなるように PBS で希釈した。Active PP2A kit (R&D Systems (MN, USA) から購入) を用いてプロトコルの指示に従って各サンプルの PP2A の活性化レベルを評価した。

第5項 統計処理

第2章、第2節、第9項を参照。

第3節 結果および考察

第1項 Elf-1 核内発現量増加に対する PP2A 阻害剤の影響

これまでに、全身性エリテマトーデス患者の T 細胞において PP2A が Elf-1 を脱リン酸化させることで Elf-1 の発現を低下させることが報告されている (20)。そこでマクロファージにおいても同様に PP2A が Elf-1 の発現を制御しているかを検討した。マウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 を 12 well plate に 1×10^5 cells/well となるように播種し、5% FBS-DMEM にて 24 時間前培養を行った。EGCG をそれぞれ 0, 2.5 μ M となるように処理し、30 分後細胞を回収して PP2A Activity Assay (R&D systems) を用いて PP2A の活性化レベルを測定した。その結果、RAW264.7 細胞株において PP2A 阻害剤により Elf-1 の核内発現量は有意に低下した (Fig. 2A)。よって、マクロファージにおいても PP2A が Elf-1 の発現量を負に制御していることが示された。

第2項 EGCG の Tollip 発現上昇作用に対する PP2A 阻害剤の影響

第1項より PP2A が Elf-1 の発現を制御していることが示されたことから EGCG の Tollip 発現上昇作用に PP2A が関与しているかを検討した。RAW264.7 に EGCG (0, 2.5 μ M)、PP2A 阻害剤 (okadaic acid 0, 1 nM) を処理し、1 時間

後 real time PCR 法を用いて Tollip の mRNA 発現量を測定した。その結果、EGCG 処理によって Tollip の mRNA 発現が上昇した一方で、PP2A 阻害剤を処理した細胞において、EGCG の Tollip 発現上昇作用の消失が観察された (Fig. 2B)。このことから、EGCG の Tollip 発現上昇作用には PP2A が関与していることが示された。また、EGCG を処理していない 2 群間において、PP2A を阻害することで Tollip の発現量が低下すると予想されたがその傾向は認められなかった。Elf-1 は元々核内に高発現して Tollip の発現量を抑制しているが、炎症が誘導されていない場合、炎症抑制分子である Tollip の発現は必要ではないため、Elf-1 が核内に高発現することで Tollip の発現を強く抑制していると考えられる。そのため、PP2A 阻害剤によって Elf-1 の核内発現量が上昇したとしても Tollip の発現に対してあまり影響を与えなかったと考えられる。

第 3 項 EGCG が PP2A 活性化に及ぼす影響

当研究室ではこれまでにマウスメラノーマ細胞株 B16 において EGCG が 67LR を介して PP2A を活性化させることで抗がん作用を示すことを見出している (21)。そこで EGCG が PP2A の活性化に及ぼす影響を評価したところ、EGCG 処理 45 分後において EGCG によって有意に PP2A の活性化レベルが上昇した。このことから、EGCG はマクロファージにおいても PP2A の活性化を

誘導することが示され、第 1 項および第 2 項の結果から、EGCG が PP2A を活性化することで Elf-1 の発現量を低下させ、Tollip の発現量を上昇させることが示唆された。

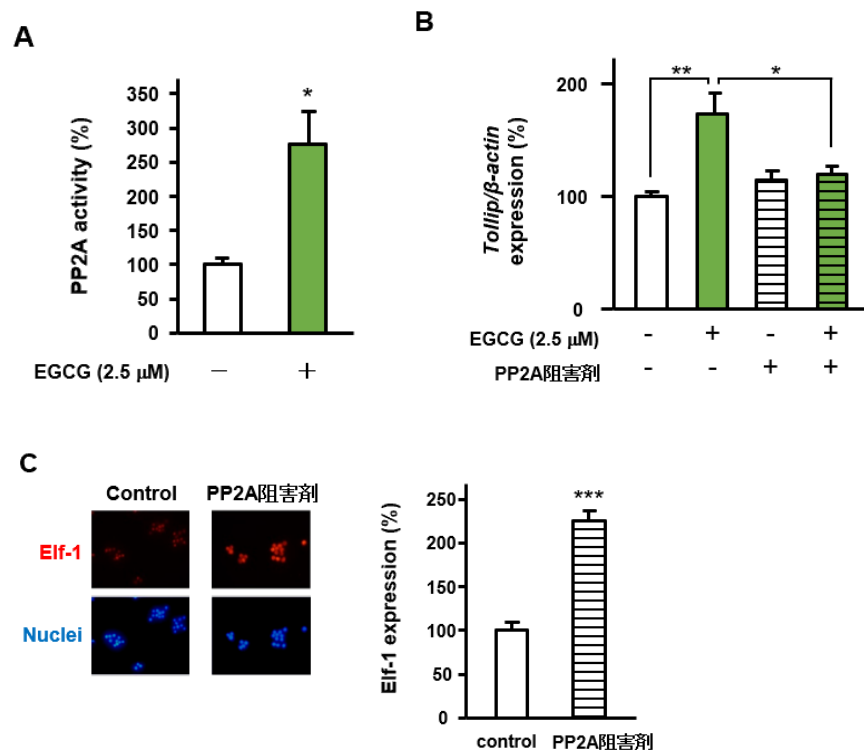


Fig.2 EGCG は PP2A を活性化させ Elf-1 および Tollip の発現を制御する (25)

(A) RAW264.7 細胞株を 5% FBS-DMEM にて 24 時間前培養を行い、EGCG をそれぞれ 0, 2.5 μ M と なるように処理し、30 分後細胞を回収して PP2A の活性化レベルを測定した。(B) RAW264.7 に EGCG (0, 2.5 μ M)、PP2A 阻害剤 (okadaic acid 0, 1 nM) を処理し、1 時間後細胞を回収し Tollip の mRNA 発現量を測定した。(C) RAW264.7 に okadaic acid (0, 1 nM) を処理し、45 分後免疫染色法によって Elf-1 の核内発現レベルを評価した。(A-C) Data is means $\pm$ S.E., * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001. (A) n = 4, Student's t -test, (B) n = 3, Tukey's test. (C) n = 15, Student's t -test.

第4章 EGCG の Tollip 発現上昇作用における cGMP の関与

第1節 緒言

第3章までに、マクロファージ細胞株 RAW264.7 において EGCG が PP2A を活性化し、Elf-1 の発現量を低下させることで Tollip の発現量を上昇させることを明らかにした。

一方、心筋細胞における心保護作用において、cyclic GMP (cGMP) が PP2A を活性化させることが報告されている (27)。また、当研究室では、多発性骨髄腫において EGCG の 67LR を介した抗がん作用に cGMP 産生が重要であることを見出している (28)。そこで、本章ではマクロファージにおける EGCG の Tollip 発現上昇作用に対する cGMP の関与を検討した。

第 2 節 材料および方法

第 1 項 細胞および細胞培養

第 2 章、第 2 節、第 1 項参照。

第 2 項 EGCG 処理後のマクロファージにおける cGMP 産生量の解析

マウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 細胞を 5×10^6 cells/mL PBS (10 μ M vardenafil 含有) で 10 分処理したのち、EGCG (終濃度 2.5 μ M) となるよう添加し、384 plate (Perkin Elmer White plate OPTiPlate 384) に 10 mL ずつ播種した。30 分後 cGMP- d_2 溶液 5 mL (Cicbio; cGMP conjugates & lysis buffer で 5 倍希釈したもの) を添加し、さらに、上から anti-cGMP-cryptate 5 mL (Cicbio; cGMP conjugates & lysis buffer で 5 倍希釈したもの) を加えて、室温で 1 時間反応させ、TR-FRET にて Ex 320nm, Em 660 nm の条件で測定した。

第 3 項 sGC 活性化剤処理後の Tollip の mRNA 発現量解析

マウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 を 12 well plate に 5%FCS DMEM 培地にて 1×10^5 cells/mL となるよう播種し、24 時間前培養した。上清を捨て、cGMP 合成酵素 soluble guanylate cyclase (sGC) 活性化剤である Bay41-2272 (0,

2.5, 5, 10 μ M) (ALX (Japan) より購入) 含有 1%FCS DMEM 培地を添加し 1 時間培養した。以降の作業については第 2 章、第 2 節、第 4 項を参照。

第 4 項 EGCG および sGC 阻害剤処理後の Tollip の mRNA 発現量解析

マウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 を 12 well plate に 5%FCS DMEM 培地にて 1×10^5 cells/mL となるよう播種し、24 時間前培養した。上清を捨て、sGC 阻害剤である NS-2028 (0, 2.5 μ M (28)) (ALX (Japan) より購入) 含有 1%FCS-DMEM 培地を添加した。NS-2028 を処理をしない群は DMSO を等量添加した。上清を捨て、EGCG (0, 2.5 μ M)、NS-2028 (0, 2.5 μ M) 含有 1%FCS DMEM 培地を添加し 1 時間培養した。以降の作業については第 2 章、第 2 節、第 4 項を参照。

第 5 項 sGC 活性化剤処理後の Elf-1 および Tollip タンパク質発現量解析

マウスマクロファージ細胞株 RAW 264.7 を 12 well plate に 1×10^5 cells/mL となるように播種し、5% FCS-DMEM 培地にて 24 時間前培養を行った。上清を捨て、1% FCS-DMEM 培地 (control 群)、Bay41-2272 (5 μ M) 含有 1% FCS-DMEM 培地 (Bay41-2272 群)、EGCG (2.5 μ M) 含有 1% FCS-DMEM 培地 (EGCG 群) を添加した。1 時間培養後、細胞溶解 Buffer にてタンパク質を回収

し、ウェスタンブロット法（第2章、第2節、第8項を参照）を用いて Elf-1 および Tollip のタンパク質発現量を測定した。

第6項 sGC 活性化剤処理後の Elf-1 の核内発現量解析

マウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 を 2 mL ガラスボトムディッシュに 5% FCS DMEM 培地にて 1×10^5 cells/mL となるよう播種し、24 時間前培養した。上清を捨て、1% FCS-DMEM 培地（control 群）、Bay41-2272 (5 μ M) 含有 1% FCS-DMEM 培地（Bay41-2272 群）、EGCG (2.5 μ M) 含有 1% FCS-DMEM 培地（EGCG 群）を添加し 1 時間培養した。以降の作業については第2章、第2節、第5項を参照。

第7項 sGC 活性化剤後の PP2A 活性化レベルの解析

マウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 を 12 well plate に 5%FCS DMEM 培地にて 1×10^5 cells/mL となるよう播種し、24 時間前培養した。上清を捨て、Bay41-2272 (0, 0.5, 1.0, 2.5 μ M) 含有 1%FCS DMEM 培地を添加 1 時間培養した。以降の作業については第3章、第2節、第4項を参照。

第8項 統計処理

第 2 章、第 2 節、第 9 項を参照。

第3節 結果および考察

第1項 EGCGがマクロファージにおけるcGMP産生に及ぼす影響

当研究室では、多発性骨髄腫においてEGCGの抗がん作用にcGMP産生が重要であることを見出している(28)。そこで、マクロファージにおいてEGCGがcGMP産生を誘導するかを検討した。マウスマクロファージ細胞株RAW264.7を12 well plateに 1×10^5 cells/wellとなるように播種し、5% FCS-DMEMにて24時間前培養を行い、EGCG(0, 2.5 μ M)で処理し、30分後細胞を回収しcGMP量を測定した。その結果、RAW264.7細胞株においてEGCG処理30分後にcGMP産生が有意に上昇した(Fig. 3A)。このことから、EGCGはマクロファージにおいてもcGMP産生を誘導することが示された。

第2項 sGC活性化剤がTollipの発現量に及ぼす影響

第1項よりEGCGがマクロファージにおいてcGMP産生を誘導することが示されたことから、cGMP産生がTollipの発現を制御しているかを検討した。RAW264.7にcGMP合成酵素活性化剤Bay41-2272(0, 2.5, 5, 10 μ M)を処理し、1時間後real time PCR法を用いてTollipのmRNA発現量を測定した。その結果、cGMP合成酵素であるsGCの活性化剤(Bay41-227)5 μ M以上の処理

によって Tollip の mRNA 発現量が有意に上昇した (Fig. 3B)。よって、マクロファージにおいて cGMP 産生が Tollip の発現量を制御していることが示された。なお、本結果より、以降の Bay41-2272 の処理濃度は 5 μ M とした。

第 3 項 sGC 阻害剤が EGCG の Tollip 発現上昇作用に及ぼす影響

第 2 項より cGMP 産生が Tollip の発現を制御していることから、EGCG の Tollip 発現上昇作用に cGMP が関与しているかを検討した。EGCG (0, 2.5 μ M) および cGMP 合成酵素阻害剤 NS2028 (0, 2.5 μ M) で処理し、1 時間後トライゾールにて細胞を回収し real-time PCR 法により Tollip の mRNA 発現量を測定した。その結果、sGC 阻害剤 (NS2028) を処理した細胞において、EGCG の Tollip 発現上昇作用の消失が認められた (Fig. 3C)。このことから、EGCG は cGMP 産生を介して Tollip の発現を上昇させることが示された。

第 4 項 sGC 活性化剤が Elf-1 および Tollip の発現量に及ぼす影響

第 3 項より EGCG の Tollip 発現上昇作用に cGMP が関与していることが示されたことから、sGC 活性化剤が Elf-1 の発現に及ぼす影響を検討した。その結果、ウェスタンブロット解析により、sGC 活性化剤が EGCG 同様 Elf-1 の発現量を低下させ、同時に Tollip の発現量を上昇させた (Fig. 3D)。また、EGCG 同

様 sGC 活性化剤により Elf-1 の核内発現量の低下が観察された (Fig. 3E)。このことから、cGMP 産生は EGCG 同様 Elf-1 の発現低下および Tollip の発現上昇を誘導することが示された。

第 5 項 sGC 活性化剤が PP2A の活性に及ぼす影響

第 2 章までに、EGCG が PP2A を活性化させ、Elf-1 の発現を低下させることで Tollip の発現を上昇させることを明らかにしたことから cGMP 産生が PP2A の活性化に及ぼす影響を評価した。RAW264.7 に Bay41-2272 (0, 2.5, 5, 10 μ M) を処理し、30 分後細胞を回収して PP2A Activity Assay (R&D systems) を用いて PP2A の活性化レベルを測定した。その結果、sGC 活性化剤により有意に PP2A の活性化レベルが上昇した (Fig. 3F)。このことから、マクロファージにおいて cGMP 産生が PP2A の活性化を制御していることが示され、EGCG が sGC/cGMP を介した PP2A の活性化により Elf-1 の発現量低下および Tollip の発現量上昇を誘導することが示唆された。

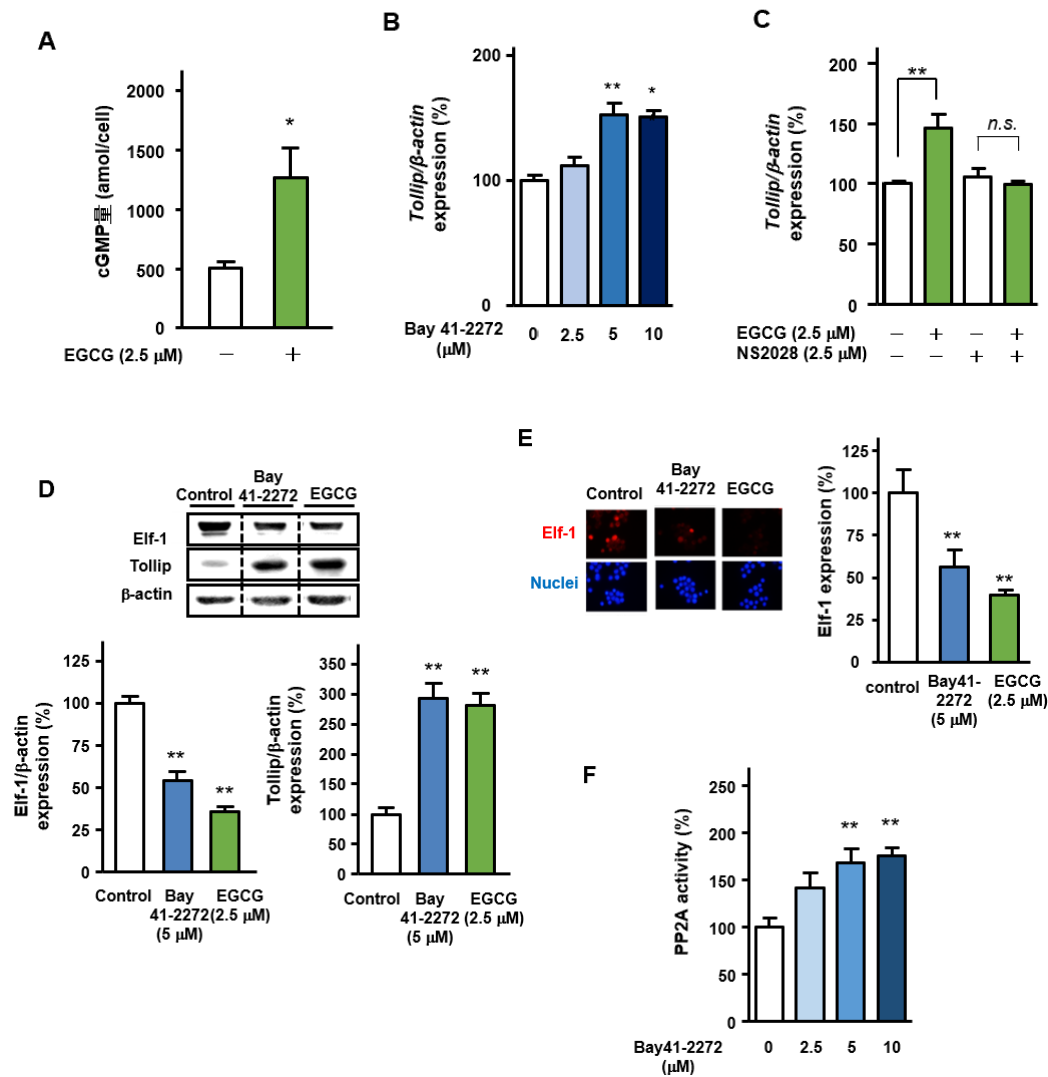


Fig.3 EGCG は cGMP 産生を介して PP2A/Elf-1/Tollip 経路を誘導する (25)

(A) RAW264.7 細胞株を EGCG (0, 2.5 μ M) で処理し、30 分後細胞を回収して cGMP 量を測定した。(B) RAW264.7 に Bay41-2272 (0, 2.5, 5, 10 μ M) を処理し、1 時間後細胞を回収し Tollip の mRNA 発現量を測定した。(C) RAW264.7 に EGCG (0, 2.5 μ M) および NS2028 (0, 2.5 μ M) で処理し、1 時間後細胞を回収し Tollip の mRNA 発現量を測定した。(D) RAW264.7 を EGCG (0, 2.5 μ M) および Bay41-2272 (0, 5 μ M) で処理し、1 時間後細胞を回収しウェスタンブロット法により Tollip および Elf-1 のタンパク質発現量を測定した。(E) RAW264.7 に EGCG (0, 2.5 μ M) および Bay41-2272 (0, 5 μ M) を処理し、45 分後免疫染色法によって Elf-1 の核内発現レベルを評価した。(F) RAW264.7 に Bay41-2272 (0, 2.5, 5, 10 μ M) を処理し、30 分後細胞を回収して PP2A の活性化レベルを測定した。(A-F) Data is means $\pm$ S.E., ** p < 0.01, * p < 0.05. (A) n = 3, Tukey's test, (B) n = 3, Dunnett's test, (C) n = 3, Student's t -test, (D) n = 4, Dunnett's test, (E) n = 10, Dunnett's test, (F) n = 4, Dunnett's test.

第 5 章 *in vivo* において EGCG が Tollip の発現制御に及ぼす影響

第 1 節 緒言

第 4 章までに、マクロファージ細胞株 RAW264.7 において EGCG が cGMP を介して PP2A を活性化させ、Elf-1 の発現量低下および Tollip の発現量上昇を誘導することを見出した。

一方、EGCG の Tollip 発現上昇作用は EGCG の感知レセプターである 67LR を介していることが見出されている (13)。67LR はがん細胞において高発現しており、RAW264.7 細胞株はがん細胞由来の細胞株であるため正常細胞に対する影響は異なる可能性がある。また、食品成分を摂取する場合、吸収性、安定性、血中動態等によりその機能を発揮できないことが懸念される。そこで、本章ではマウスを用いた *in vivo* において EGCG が RAW264.7 細胞株と同様に Tollip 発現上昇機構を誘導するかを検討した。

第2節 材料および方法

第1項 倫理規定

実験動物の飼育、保管および動物実験を実施するため、教育訓練を受講し、動物実験従事者として登録した。実験を行う際は、「動物の保護および管理に関する法律」（昭和48年法律第105号）および「実験動物の飼養及び保管に関する基準」（昭和55年総理府告示第6号）に従って実験を行った。さらに、動物実験を実施する際は動物実験計画書を作成し、九州大学の動物倫理委員会の承認（審査番号：A26-090-2）を受けた上で実験を実施した。

第2項 EGCG および cGMP 合成酵素活性化剤の投与および腹腔内マクロファージの回収

9週齢の BALB/cN Sea 雄マウス（九動株式会社（Saga, Japan）より購入した。飼育は MF 食による自由摂食、自由飲水、室温 $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、相対湿度 $60 \pm 5\%$ 、12 時間白色蛍光灯照明下で行った。1 週間予備飼育し、体重が等しくなるよう 3 群に分け、3% チオグリコレート培地（Sigma Co. (St Louis, MO) より購入）を腹腔内に投与することでマクロファージを腹腔に誘引させた（29）。3 日後、Control 群には 80%DMSO（ナカライテスク（Tokyo, Japan）より購入）を 100

$\mu\text{L}/\text{mouse}$ 、EGCG 群には EGCG (Sigma (Tokyo, Japan) より購入) ($3.3 \text{ mg}/\text{mL}$) 含有 80%DMSO を $100 \mu\text{L}/\text{mouse}$ 、Bay41-2272 群には Bay41-2272 (ALX (Tokyo, Japan) より購入) ($3.3 \text{ mg}/\text{mL}$) 含有 80%DMSO を $100 \mu\text{L}/\text{mouse}$ となるよう経口投与を行った。4 時間後、イソフルラン麻酔下において 10%ウシ胎児血清 (FBS) (Bio Source International, USA) 添加 RPMI 培地 (Nissui Pharmaceutical Co. LTD, Tokyo) により腹腔内を懸濁し、その懸濁液を回収した。懸濁液を 5% Sodium azide (Wako (Tokyo, Japan) より購入) で処理し腹腔内マクロファージとした。懸濁液を $1,200 \text{ g}$ で 5 分間遠心後、PBS で懸濁し、 $2 \times 10^6 \text{ cells}/\text{mL}$ となるよう PBS で調整した。

第 3 項 フローサイトメーターによる Tollip の発現量評価

$2 \times 10^6 \text{ cells}/\text{mL}$ に調整した脾臓細胞および腹腔内マクロファージの懸濁液を $250 \mu\text{L}$ ずつ分注し、 $1,200 \text{ g} \times 5$ 分遠心後、上清を捨て、Anti-Tollip 抗体 (Abcam (Tokyo, Japan) より購入) を 200 倍希釈した 2.5%BSA-TTBS 液に置換し、1 時間室温で放置した。上清を捨て、Anti-mouse IgG (MBL (Tokyo, Japan) より購入) を 50 倍希釈、Anti-F4/80 抗体 (Abcam (Tokyo, Japan) より購入) を 10 倍希釈した 2.5%BSA-TTBS 液に置換し、1 時間室温で放置した。上清を捨て 250

μL の PBS で懸濁し、フローサイトメーター (BD Biosciences (California, USA)) に供した。

第 4 項 脾臓における Tollip の mRNA 発現量の評価

回収した脾臓細胞を TRizol に溶解して RNA を抽出し、cDNA 合成後、リアルタイム PCR により Tollip の mRNA の発現量を測定した。詳細については、第 2 章、第 2 節、第 4 項を参照。

第 5 項 免疫染色法による腹腔内マクロファージにおける Elf-1 発現の評価

2×10^6 cells/mL に調整した腹腔内マクロファージの細胞懸濁液を 100 μL ずつ分注し、 $1,200 \times g$ で 5 分遠心後、上清を捨て 4% パラホルムアルデヒド (Wako, Japan より購入) で 20 分間氷上で固定した。それ以降の作業については、第 2 章、第 2 節、5 項を参照。

第 6 項 腹腔内マクロファージにおける cGMP 量の測定

2×10^6 cells/mL に調整した細胞懸濁液を 1 mL ずつ分注し、 $1200 \times g$ で 5 分遠心後、上清のタンパク質濃度を 1.1 mg/mL に調整した。得られたライゼート 10 μL に 0.4M HCl 20 μL を添加し、さらに 80 μL の EIA Buffer を添加するこ

とで希釈した。得られた希釈液 20 μL をさらに EIA Buffer 80 μL で希釈し、50 μL ずつサンプルをアプライし、cGMP EIA kit (Cayman (Ann Arbor, MI, USA) より購入) を用いて cGMP 産生量を測定した。

第 7 項 統計

第 2 章、第 2 節、第 9 項を参照。

第3節 結果および考察

第1項 *in vivo* において EGCG および sGC 活性化剤が Tollip および Elf-1 の発現ならびに cGMP 産生に及ぼす影響

腹腔内マクロファージおよび脾臓細胞において EGCG 群および sGC 活性化剤の両群で Tollip の発現上昇が確認され (Fig. 4A, 4B)、腹腔内マクロファージに比べ脾臓細胞において Tollip 発現量の上昇は緩やかであった (Fig. 4A)。これは、腹腔内に誘引されたマクロファージにおいてチオグリコレート培地によって無菌炎症が誘導され活性化されたためだと考えられる。また、腹腔内マクロファージにおいて EGCG 群および sGC 活性化剤の両群で顕著に Elf-1 の発現量低下が認められた (Fig. 4C)。腹腔内マクロファージにおける cGMP 産生量はポジティブコントロールの sGC 活性化剤群において有意に高値を示し、EGCG も同様に Control 群と比べ有意な cGMP 量の上昇が観察された (Fig. 4D)。これらのことから、*in vivo* においてもマクロファージにおいて EGCG が cGMP 産生、Elf-1 の発現低下および Tollip の発現上昇を誘導することが示されるとともに、sGC 活性化剤による cGMP 産生が同様に Elf-1 および Tollip の発現を制御していることが明らかになった。しかしながら、これまでに EGCG の経口投与による腹腔内マクロファージに対する報告はなく、EGCG が腹腔内に届いてい

るか、また、届いた場合にどの程度の濃度で存在するかは不明である。そのため、この作用が EGCG によるものだと直接証明するためには LC-MS 等を用いて EGCG 投与時の腹水における EGCG の定量が必須となってくる。さらに、今回は単回投与であったため、長期的な EGCG の摂取の影響に対する検討が必要であると考えられる。また、本検討では、腹腔内マクロファージの誘導のために 3% チオグリコレート培地を腹腔内に投与した。本培地による刺激がない場合、回収できるマクロファージはおよそ 1×10^5 cells/匹とされている。一方、チオグリコレート培地で誘導をかけることで 1×10^7 cells/匹のマクロファージを回収できるため、同時に複数の検討を行うことが可能である。しかしながら、チオグリコレート培地によるマクロファージの誘引は無菌性炎症誘発によるため、マクロファージがある程度活性化された状態となってしまう。そのため、より純粋な無刺激状態でのマクロファージにおける評価を行うためには、チオグリコレート培地処理を行わずに PBS での腹腔内洗浄によって回収したマクロファージでの評価が必要となってくる。

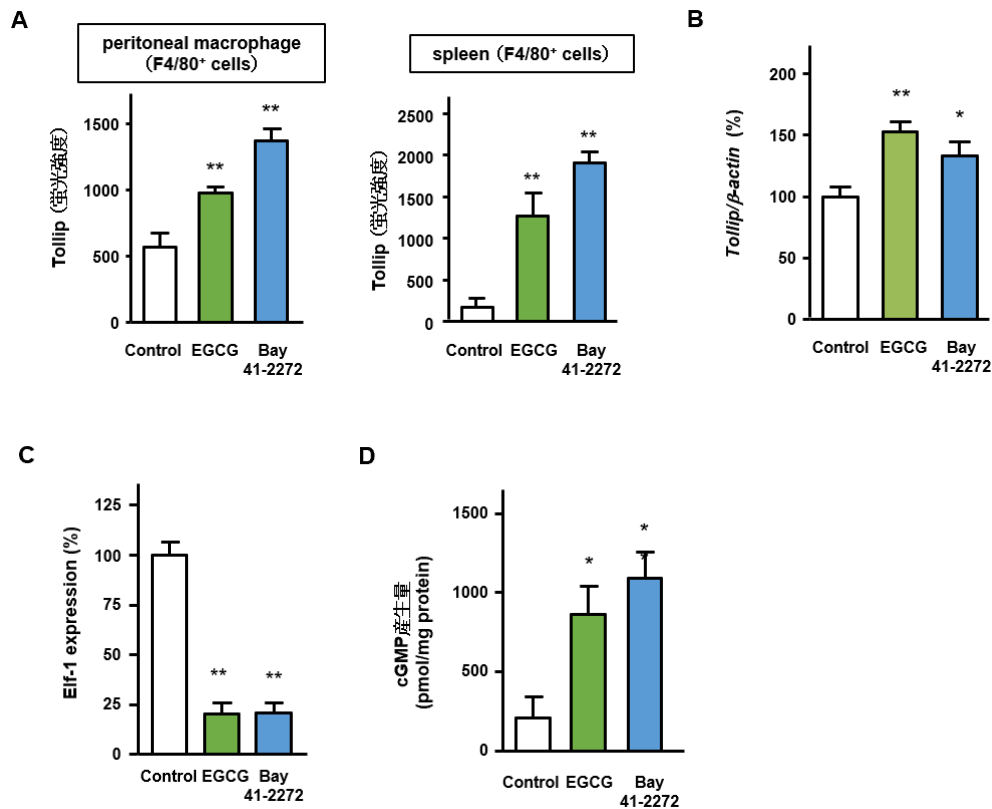


Fig.4 *in vivo*においてEGCGはcGMP産生促進、Elf-1の発現量低下およびTollipの発現量上昇を誘導する (25)

Balb/cN Sea mouse に 80%DMSO (Control 群)、EGCG 10 mg/kg/b.w. in DMSO (EGCG 群)、Bay41-2272 10mg/kg/b.w. in DMSO (Bay41-2272 群) を投与し 4 時間後腹腔内マクロファージおよび脾臓を回収した。

(A) 腹腔内マクロファージおよび脾臓をフローサイトメーターに供し F4/80⁺細胞における Tollip の発現量を評価した。(B) 脾臓における Tollip の mRNA 発現量を real-time PCR 法によって測定した。(C) 回収した腹腔内マクロファージの F4/80⁺細胞における Elf-1 の発現量を免疫染色法により評価した。(D) 腹腔内マクロファージにおける cGMP 産生を測定した。(A-D) Means $\pm$ S.E., Dunnett's test, $^{**}p < 0.01$, $^{*}p < 0.05$. (A, B, D) $n = 6$, (C) $n = 18-20$.

第 6 章 EGCG の Tollip 発現上昇作用における

Akt および eNOS の関与

第 1 節 緒言

第 4 章までに、マクロファージ細胞株 RAW264.7 において EGCG が cGMP/PP2A/Elf-1/Tollip 経路を誘導することを見出した。また、実際に *in vivo* においてもマクロファージにおける cGMP の産生、Elf-1 の発現低下、および Tollip の発現上昇の誘導が確認された。

当研究室では、EGCG が骨髄腫細胞において 67LR/Protein kinase B (Akt)/endothelial NO synthase (eNOS)/sGC/cGMP 経路の誘導により抗がん作用を示すことを報告している (28)。そこで、本章では EGCG の Tollip 発現上昇作用においても同経路が関与しているかを検討した。

第2節 材料および方法

第1項 細胞および細胞培養

第2章、第2節、第1項参照。

第2項 EGCG 処理後の eNOS リン酸化レベルの解析

マウスマクロファージ細胞株 RAW 264.7 を 12 well plate に 1×10^5 cells/mL となるように播種し、5% FCS-DMEM 培地にて 24 時間前培養を行った。上清を捨て、1% FCS-DMEM 培地 (control 群) および EGCG (2.5 M) 含有 1% FCS-DMEM 培地を添加した。30 分培養後、細胞溶解 Buffer にてタンパク質を回収し、ウェスタンブロット法 (詳細については第2章、第2節、第8項を参照。) を用いて eNOS の発現量および p-eNOS ser1777 の発現量を測定し、eNOS のリン酸化レベルを評価した。eNOS 抗体は BD, Japan より購入、p-eNOSser1777 抗体は Santa Cruz, U.S.A より購入した。

第3項 EGCG および eNOS 阻害剤または Akt 阻害剤処理後の Tollip 発現レベルの解析

マウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 を 12 well plate に 5%FCS DMEM 培地にて 1×10^5 cells/mL となるよう播種し、24 時間前培養した。上清を捨て、eNOS 阻害剤の影響を検討するため、eNOS 阻害剤である L-NAME (1.0 mM (28)) (Wako, Japan より購入) 含有 1%FCS-DMEM 培地を添加し、1 時間培養した。Akt 阻害剤の影響を検討する際は Akt 阻害剤である staurosporine (1.0 μ M (30)) (Milipore, USA より購入) 含有 1%FCS-DMEM 培地を添加し、1 時間培養した。L-NAME や staurosporine を処理しない群は DMSO を等量添加した。上清を捨て、EGCG (0, 2.5 μ M)、L-NAME (1.0 mM) 含有 1%FCS DMEM 培地もしくは staurosporine (1.0 μ M) 含有 1%FCS DMEM 培地を添加した。1 時間培養後、TRizol に溶解して RNA を抽出し、cDNA 合成後、リアルタイム PCR により Tollip の mRNA の発現量を測定した。詳細については、第 2 章、第 2 節、第 4 項を参照。

第 4 項 EGCG 処理後の Akt の活性化レベルの解析

マウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 を 12 well plate に 5%FCS DMEM 培地にて 1×10^5 cells/mL となるよう播種し、24 時間前培養した。上清を捨て、EGCG (0, 2.5 μ M) 含有 1%FCS DMEM 培地を添加した。1 時間培養後、PBS で一度洗浄後、Lysis buffer を加えて溶解した。12,000g、4°C で 5 分間遠心して

不純物を沈殿させ上清を回収してタンパク定量を行い、タンパク質濃度を各サンプルで等しくなるように PBS で希釈した。Akt activity kit (Millipore 社, USA) を用いてプロトコルに従って各サンプルの PP2A の活性化レベルを評価した。

第 5 項 統計処理

第 2 章、第 2 節、第 9 項を参照。

第3節 結果および考察

第1項 EGCG が eNOS のリン酸化に及ぼす影響

これまでに当研究室では EGCG が骨髓腫細胞における抗がん作用および血管内皮細胞における血液凝固抑制作用において eNOS のリン酸化を促進させることを見出していることから、マクロファージにおいても同様の変化が認められるか確認した。RAW264.7 細胞株を 12 well plate に 1×10^5 cells/well となるように播種し、5% FCS-DMEM にて 24 時間前培養を行った。EGCG (0, 2.5 μ M) を処理し、30 分後ウェスタンブロット法により eNOS のリン酸化レベルを評価した。その結果 EGCG 処理によって eNOS の活性化の指標である Ser1777 のリン酸化レベルが有意に上昇した (Fig. 5A)。したがって、マクロファージにおいても EGCG が eNOS のリン酸化を促進し、cGMP 産生を誘導することが示唆された。

第2項 eNOS 阻害剤が EGCG の Tollip 発現上昇作用に及ぼす影響

第1項より EGCG によって eNOS のリン酸化レベルが上昇したことから eNOS が EGCG の Tollip 発現上昇作用に関与するか検討した。RAW264.7 に EGCG (0, 2.5 μ M) および NOS 阻害剤 L-NAME (0, 1 mM) を処理し、1 時間

後細胞を回収し real-time PCR 法により Tollip の発現量を測定した。その結果、EGCG によって Tollip の mRNA 発現上昇が確認されたのに対し、eNOS 阻害剤 L-NAME を処理した細胞においては EGCG の Tollip 発現上昇作用がキャンセルされた (Fig. 5B)。このことから、EGCG は eNOS のリン酸化を促進し、eNOS を介して Tollip の発現を上昇させることが示された。

第 3 項 EGCG が Akt の活性化に及ぼす影響

RAW264.7 を EGCG (0, 0.5, 1.0, 2.5 mM) で処理し、1 時間後細胞を回収し Akt activity kit を用いて Akt の活性レベルを測定した。EGCG の多発性骨髄腫における抗がん作用と同様、マクロファージにおいて EGCG は Akt の活性化レベルを有意に上昇させた (Fig. 5C)。Akt の活性は Ser473 および Thr308 のリン酸化によって制御されており、Ser473 は mammalian target of rapamycin (mTOR) -Rictor の複合体によりリン酸化され、Thr308 は 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK1) によりリン酸化される (31, 32)。よって EGCG のマクロファージにおける Akt の活性にこれらの因子が関与していることが示唆された。

第 4 項 Akt 阻害剤が EGCG の Tollip 発現上昇作用に及ぼす影響

第 3 項より EGCG によって Akt の活性化レベルが上昇したことから Akt が EGCG の Tollip 発現上昇作用に関与するかを検討した。RAW264.7 に EGCG (0, 2.5 μ M) および Akt 阻害剤 staurosporine (0, 1.0 μ M) で処理し、1 時間後細胞を回収し real-time PCR 法により Tollip の発現量を測定した。その結果、EGCG によって Tollip の mRNA 発現上昇が確認されたのに対し、Akt 阻害剤を処理した細胞においては EGCG の Tollip 発現上昇作用がキャンセルされた (Fig. 5D)。このことから、EGCG は Akt を活性化し、Akt を介して Tollip の発現を上昇させることが示された。

第 5 章までの検討により EGCG が sGC/eNOS/cGMP/PP2A/Elf-1/Tollip 経路を誘導することを見出してきた。また、EGCG の抗がん作用において Akt/eNOS/sGC/cGMP 経路が重要であることを踏まえ、本章結果により EGCG は Akt/eNOS/sGC/eNOS/cGMP を介した PP2A の活性化により Elf-1 の発現を低下させることで Tollip の転写を促し発現を上昇させることが示唆された。

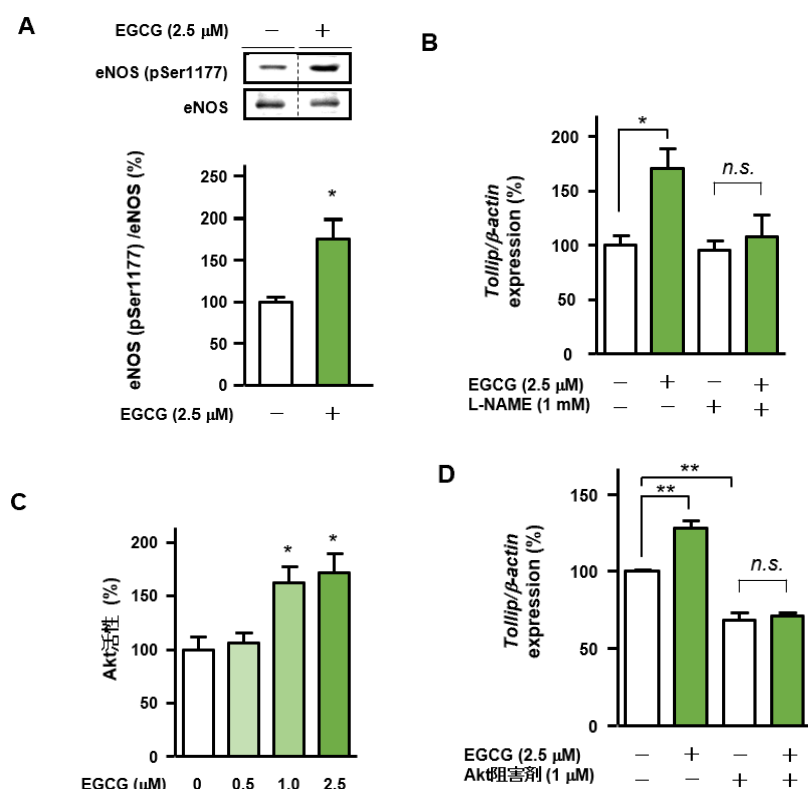


Fig.5 EGCG は eNOS および Akt を介して Tollip の発現を調節する (25)

(A) RAW264.7 細胞株に EGCG (0, 2.5 μ M) を処理し、30 分後ウェスタンブロット法により eNOS のリン酸化レベルを評価した。(B) RAW264.7 に EGCG (0, 2.5 μ M) および NOS 阻害剤 L-NAME (0, 1 mM) を処理し、1 時間後細胞を回収し real-time PCR 法により Tollip の発現量を測定した。(C) RAW264.7 を EGCG (0, 0.5, 1.0, 2.5 μ M) で処理し、1 時間後細胞を回収し Akt activity kit (Millipore 社)を用いて Akt の活性レベルを測定した。(D) RAW264.7 に EGCG (0, 2.5 μ M) および Akt 阻害剤 staurosporine (0, 1.0 μ M) で処理し、1 時間後細胞を回収し real-time PCR 法により Tollip の発現量を測定した。(A-D) Data is means $\pm$ S.E., ** p < 0.01, * p < 0.05. (A) n = 3, Student's t-test, (B) n = 3, Tukey's test, (C) n = 3, Dunnett's test, (D) n = 3, Tukey's test.

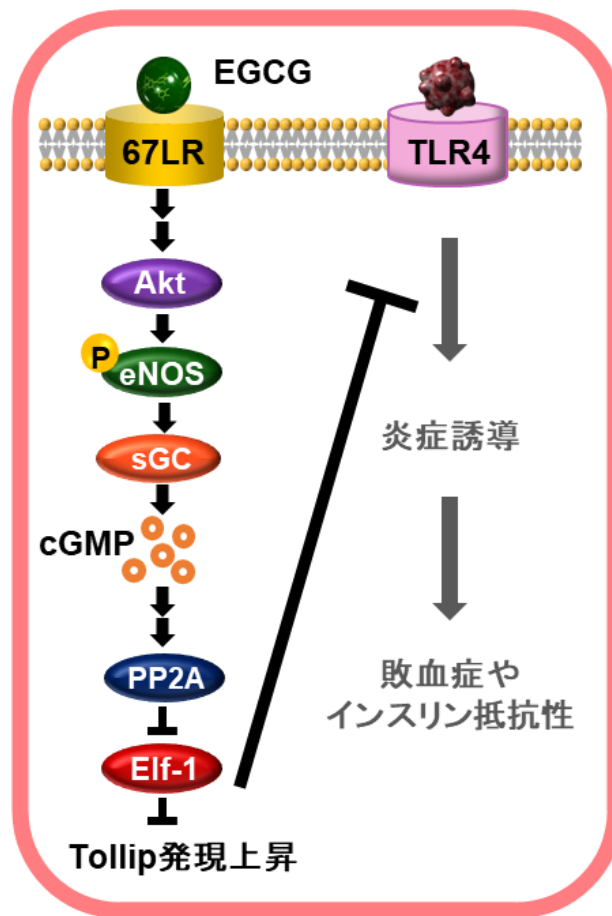


Fig.6 本研究で明らかになった EGCG の Tollip 発現制御機構

第7章 やぶきたの血清コレステロール値低下作用における

Eriodictyol の併用効果

第1節 緒言

近年、食生活の欧米化に伴う高カロリー食摂取や運動不足による肥満を起因とした糖尿病や高脂血症などのメタボリックシンドロームの罹患率増大が社会問題となっている（33）。そのため、脂肪の燃焼促進や腸管からの脂質の吸収を抑える機能を有する食品成分を配合した、メタボリックシンドローム対応型の特定保健用食品や機能性表示食品の開発が進められている。また、2008 年度から実施されているメタボリックシンドロームの概念を取り入れた特定健診・保健指導の義務化など、メタボリックシンドロームに対する社会的関心が高まっている。メタボリックシンドロームの最も大きなリスクファクターは肥満であり、偏った食生活や運動不足などの生活習慣が発症の主な原因となっている。したがって、メタボリックシンドロームの改善および予防においては、食生活をはじめとする生活習慣の改善が重要である。このように、メタボリックシンドロームの予防および改善には長期的な対応が必要であり、長期にわたり摂取可能で体脂肪蓄積抑制作用などの抗メタボリックシンドローム作用を示す安全かつ有

用な機能性食品素材の開発が望まれている。

日本国内で一般的に流通している緑茶品種である「やぶきた」には、緑茶に特徴的な成分である Epigallocatechin-3-*O*-gallate (EGCG) が多く含まれており、抗肥満作用を含めた多様な生理機能が知られている (34, 35)。これまでの研究より、当研究室ではメタボリックプロファイリング法を用いた 43 種の茶品種の成分組成と生理活性の比較により、EGCG の生理作用を高める成分として Eriodictyol が見出されている (14)。そこで本実験では、高脂肪・高ショ糖食摂取によって誘導した肥満モデルマウスに対し、EGCG を多く含む緑茶（やぶきた）抽出物と Eriodictyol の併用により、体重、脂肪重量、肝臓などの各種パラメーターや肥満ならびにコレステロール関連遺伝子の発現レベルに与える影響を検討した。

第2節 材料および方法

第1項 倫理規定

実験動物の飼育、保管および動物実験を実施するため、教育訓練を受講し、動物実験従事者として登録した。実験を行う際は、「動物の保護および管理に関する法律」（昭和48年法律第105号）および「実験動物の飼養及び保管に関する基準」（昭和55年総理府告示第6号）に従って実験を行った。さらに、動物実験を実施する際は動物実験計画書を作成し、九州大学の動物倫理委員会の承認（審査番号：A24-052-3）を受けた上で実験を実施した。

第2項 食餌組成と実験動物の飼育条件

本試験の試験サンプルとして「やぶきた」エキスパウダーは株式会社アサヒ飲料から提供していただいたものを使用した。Eriodictyol はフナコシ株式会社から購入したものをを用いた。

本試験で用いた試験食の組成を Table 1 に示した。高脂肪・高ショ糖飼料はセルロースを別梱包の状態で、オリエンタル酵母工業株式会社（Tokyo, Japan）より購入した。コントロール食として AIN-93G 準拠食を用い、食物繊維であるセルロースを緑茶エキスパウダーに置換して試験食を調製した。

実験動物は九動株式会社 (Saga, Japan) より購入した C57BL/6J 12 週齢雄マウスを用いた。市販の AIN-93G 準拠食を与えて 1 週間の予備摂食をした後、1 群 6 匹の 5 群に分けた。コントロール食として AIN-93G 食を用い、やぶきた抽出エキスパウダーを 0.2% または Eriodictyol を 450 mg/kg diet HF/HS 食に添加した。飼料は 4 g/day で与え、自由飲水で 8 週間飼育した。飼育は、室温 $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、相対湿度 $60 \pm 5\%$ 、12 時間白色蛍光灯照明下で行った。

第 3 項 屠殺

摂食期間終了後、16 時間以上の絶食を行い、イソフルラン(マイラン製薬株式会社, Osaka, Japan)麻酔下で腹部大動脈採血により屠殺した。屠殺後、肝臓、脾臓、腎臓、大腿四頭筋、腎臓周辺脂肪組織、睾丸周辺脂肪組織を採取し、重量を測定した。採血により採取した血液は、 37°C で 2 時間以上静置し凝固させた後、 4°C 、2,000g で 15 分間遠心して血清を採取した。

第 4 項 血清パラメーターの測定

血清中の総コレステロール (Total-chol) レベル、HDL コレステロール、LDL コレステロール/VLDL コレステロール値は和光純薬工業株式会社 (Tokyo,

Japan)より購入した市販のキットを用いて、付属のプロトコルに従い測定した。

第5項 リアルタイム PCR

睾丸周辺脂肪組織、脾臓、肝臓を TRizol に溶解し RNA をクロロホルム、2-プロパノール、75%エタノールを使用して抽出・洗浄後 cDNA を合成し、リアルタイム PCR により各種遺伝子の発現を解析した。詳細については、第2章、第2節、第4項を参照。用いたプライマー配列を以下に示す。

Hmgcs: Forward ; 5'-GCCGTGAACTGGGTCGAA-3'

Reverse ; 5'-GCATATATAGCAATGTCTCCTGCAA-3' (36)

Hmgcr: Forward ; 5'-ATTCTGGCAGTCAGTGGGAACT-3'

Reverse ; 5'-CCTCGTCCTTCGATCCAATTTA-3' (37)

Ldlr: Forward ; 5'-CAGTCCCAGGCAGCGTTAT-3'

Reverse ; 5'-TTGATCTTGGCGGGTGTT-3' (38)

Actb: Forward ; 5'-CATCCGTAAAGACCTCTATGCCAA-3'

Reverse ; 5'-ATGGAGCCACCGATCCACA-3' (22)

第7項 統計解析

結果は、平均値 (Mean) と平均値の標準誤差 (S.E.) で示した。多群間の比較

においては Tukey's test によって検定を行い、*** : $p < 0.001$ 、** : $p < 0.01$ 、* : $p < 0.05$ で示した。統計解析ソフトは GraphPad Prism4 (Graphpad Software 社, CA, USA) を用いて解析した。

第3節 結果および考察

2 カ月間の摂食により control 群と比べて HF/HS 食のどの群においても顕著な体重の増加が認められた。HF/HS 群に対し、Eriodictyol 単独群では体重の変化がなく、やぶきた単独群でも体重が減少する傾向が示されたが有意な差は観察されなかった。一方で、やぶきたと Eriodictyol 併用により有意に体重が減少した (Table. 3)。また、臓器重量においては、有意な差は認められなかったものの、睪丸周辺脂肪組織および腎臓周辺脂肪組織で体重と同様の傾向を示した (Table. 3)。このことから、やぶきたと Eriodictyol の併用により抗肥満作用が增強することが示された。

血清パラメーターにおいて、肝毒性の指標である ALT (Alanine Aminotransferase) および AST (Aspartate Aminotransferase) を測定した結果、AST にはどの群においても差は認められず (Fig. 8D)、ALT では HF/HS 群と比較してやぶきたおよび Eriodictyol の併用群で有意な低下が観察された (Fig. 8E)。また、血清における各コレステロール値について検討したところ、HF/HS 摂食により総コレステロール値、HDL コレステロール値、LDL/VLDL コレステロール値が顕著に上昇した (Fig. 8A-C)。HDL 値において HF/HS 食を摂食した4群で差は認められなかった (Fig. 8B)。一方、総コレステロール値および

LDL/VLDL 値は Eriodictyol 単独群で変化は認められず、やぶきた単独群で低下傾向を示し、やぶきたおよび Eriodictyol の併用群では有意な低下が観察された (Fig. 8A, C)。これらの結果から、やぶきたと Eriodictyol の併用により HF/HS 摂食による血中コレステロールの上昇が改善されることが示された。コレステロールにおいて、LDL コレステロールは体全体へコレステロールを運び、HDL コレステロールは血管壁のコレステロールを肝臓へと回収する。そのため、コレステロール値において HDL および LDL の存在比が重要であり、特に高 LDL 血症は酸化 LDL による動脈硬化の惹起に繋がるため問題視されている。本実験では、HF/HS 摂食によるコレステロール上昇に対して、やぶきたおよび Eriodictyol の併用により HDL 値に変化が認められなかったのに対し、LDL 値において有意に低値を示した。このことから、やぶきたおよび Eriodictyol の併用によるコレステロール低下作用は HDL に影響を与えない点でより有用であると考えられる。

次に、HF/HS による血中コレステロールの上昇がどのようにして減少するのかを検討するため、肝臓におけるコレステロール制御関連遺伝子の発現について評価した。その結果、コレステロール合成酵素である HMG-CoA synthase (HMGCS) の HF/HS 群における遺伝子発現量増加は、やぶきたと Eriodictyol の併用群で有意に抑制された (Fig. 9A)。また、コレステロール合成酵素 HMG-

CoA reductase (HMGCR) においても HF/HS 摂食により有意な発現量上昇が認められ、やぶきたおよび Eriodictyol の併用群において減少する傾向を示した (Fig. 9B)。HMGCR はコレステロール合成における律速酵素であり、一般的な高コレステロール血症の治療薬であるスタチン類の阻害ターゲットとして知られている。スタチン類は HMGCR を阻害する一方で、横紋筋融解症や腎障害等の副作用が問題視されている (39)。そのため、HMGCR の阻害ではなく発現を低下させることによるコレステロールの低下は新たなターゲットになり得る。肝臓における LDL 受容体 (LDLR) は HMGCR によるコレステロール合成の低下により均衡を保つためにその発現レベルが低下することが知られている。実際に、肝臓においてやぶきたおよび Eriodictyol の併用群で LDLR の発現が有意に上昇した。当研究室ではこれまでに、高濃度 EGCG が肝臓における HMGCR の遺伝子発現量を減少させることを見出していることから (40)、EGCG と Eriodictyol の併用によって HMGCR の発現が低下し、コレステロール合成が低下することで血中コレステロールが低下し LDLR の発現が上昇することで血中 LDL が低下したと考えられる。

Table.1 飼料組成 (%)

成分	Control	HF/HS	HF/HS +やぶきた	HF/HS +Eriodictyol	HF/HS +やぶきた +Eriodictyol
ビタミンミックス	1	1	1	1	1
ミネラルミックス	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5
重酒石酸コリン	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
L-シスチン	0.3	0.38	0.38	0.38	0.38
精製大豆油	7	2	2	2	2
第3 ブチルヒドロ キノン	0.001	0.006	0.006	0.006	0.006
グラニュー糖	10	20	20	20	20
ミルクカゼイン	20	25	25	25	25
a 化コーンスターチ	13.2	0	0	0	0
コーンスターチ	39.75	14.87	14.87	14.87	14.87
セルロースパウダー	5	5	4.8	5	4.8
牛脂	0	14	14	14	14
ラード	0	14	14	14	14
やぶきたエクス パウダー	0	0	0.2	0	0.2
Eriodictyol	0	0	0	0.045	0.045
Total	100	100	100	100	100

※HF/HS ; High fat high sucrose

Table.2 エキスパウダーの組成 (mg/g)

成分名	「やぶきた」 エキスパウダー
ガロカテキン (GC)	27.7
エピガロカテキン (EGC)	68.6
カテキン (C)	13.7
エピカテキン (EC)	20.9
エピガロカテキンガレート (EGCG)	119.0
ガロカテキンガレート (GCG)	27.3
エピカテキンガレート (ECG)	21.6
カテキンガレート (CG)	3.4
カテキン類 8 種	301.9

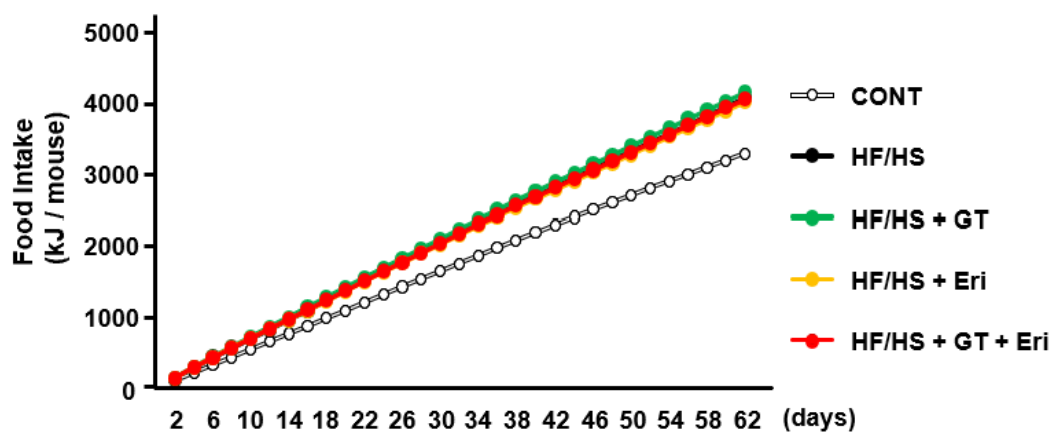


Fig.7 摂食量 (41)

各ケージごとの摂食量を測定し、1 cal = 4.184 J としてカロリー換算した。

GT : やぶきた Eri : Eriodictyol

Table.3 最終体重および臓器重量 (41)

	CONT	HF/HS	HF/HS + GT	HF/HS + Eri	HF/HS + GT + Eri
Final body weight, g	28.28 ± 0.24 ^a	39.90 ± 0.43 ^b	37.83 ± 0.76 ^{bc}	38.82 ± 0.81 ^{bc}	36.63 ± 0.58 ^c
Perirenal fat, g	0.15 ± 0.01 ^a	0.74 ± 0.03 ^b	0.66 ± 0.02 ^b	0.70 ± 0.05 ^b	0.64 ± 0.02 ^b
Epididymal fat, g	0.53 ± 0.04 ^a	2.00 ± 0.09 ^b	1.88 ± 0.06 ^b	1.85 ± 0.12 ^b	1.77 ± 0.04 ^b
Liver, g	0.99 ± 0.02 ^{ab}	1.03 ± 0.01 ^a	0.95 ± 0.01 ^b	0.98 ± 0.02 ^{ab}	0.98 ± 0.02 ^{ab}
Quadriceps Muscle, g	0.45 ± 0.01 ^a	0.45 ± 0.01 ^a	0.44 ± 0.01 ^a	0.46 ± 0.01 ^a	0.45 ± 0.01 ^a

Means ± S.E. (n = 6). Different letters (a, b, and c) indicate significant difference ($p < 0.05$) by Tukey's test.

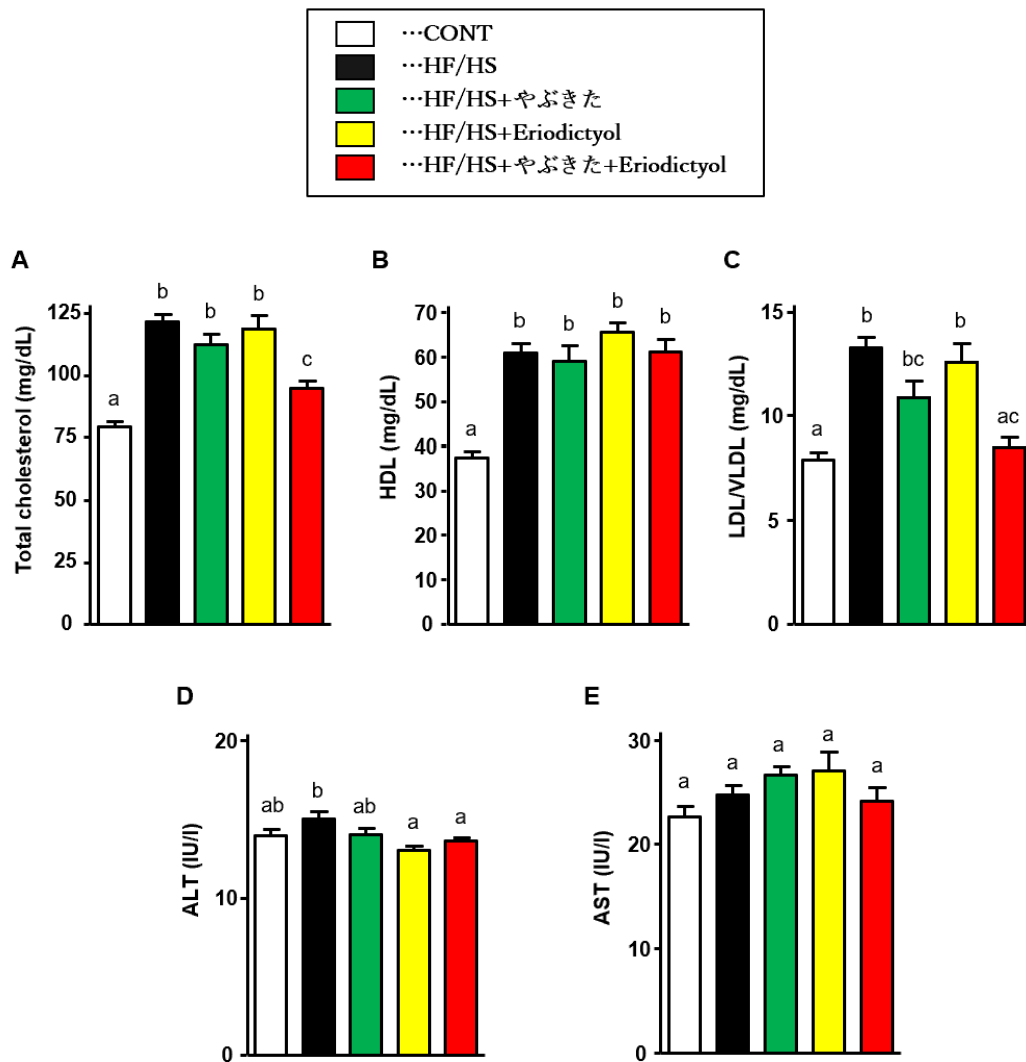


Fig.8 やぶきたおよび Eriodictyol 摂取が血中総コレステロール、HDL コレステロール、LDL/VLDL コレステロール、ALT、AST に及ぼす影響 (41)

屠殺時に回収した血清における総コレステロール(A)、HDL コレステロール (B)、LDL/VLDL コレステロール (C)、ALT (D)、AST (E) 量を測定した。Means $\pm$ SEM (n = 6). Values bearing different lowercase letters (a, b, and c) are significantly different ($p < 0.05$) by Tukey's test.

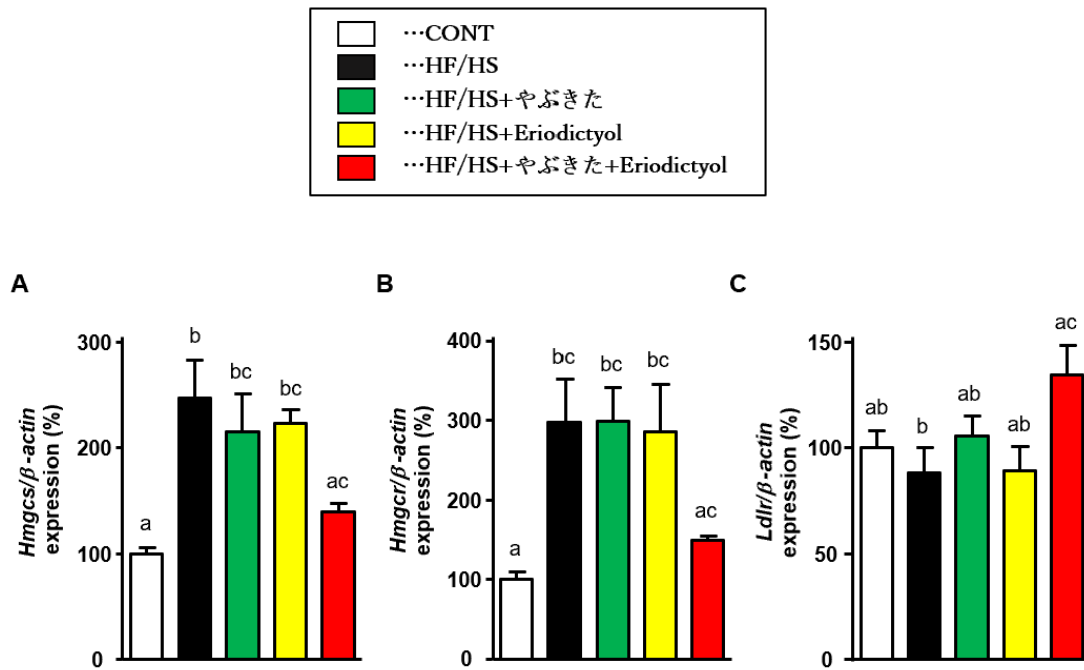


Fig.9 やぶきたおよびEriodictyol摂取が肝臓における HMGCS, HMGCR, LDLR の mRNA 発現量に及ぼす影響 (41)

肝臓における HMGCS (A), HMGCR (B), LDLR (C) の mRNA 発現量を real-time PCR 法によって測定した。

Means $\pm$ SEM (n = 6). Values bearing different lowercase letters (a, b, and c) are significantly different ($p < 0.05$) by Tukey's test.

第 8 章 ヒト膵臓がんにおける cGMP 産生の PPAR α

および PDK4 の発現に及ぼす影響

第 1 節 緒言

膵臓がんは先進国における主要ながんの一つであり、米国では男女ともにがん関連死亡の 4 番目に多い原因となっている (42)。中でも大半を占めるのが膵管腺がん (Pancreatic Ductal Adenocarcinoma; PDAC) であり、早期発見が難しく、予後が悪い。5 年全生存期間は、すべての病期で 10% と低いままであり、限局性疾患を呈する患者でさえ、わずか 39% である (42)。この予後不良は、有効なスクリーニングの欠如、遅発性の症状、および高い再発率に起因している (43)。また、大多数の患者は微小転移巣を有するため、全身療法が依然として推奨されており、PDAC 患者の化学療法を改善するために様々な検討が実施されている (44)。

最近の研究では、がん幹細胞 (Cancer Stem Cell; CSC) が化学療法および転移後のがん再発において極めて重要な役割を果たすと考えられていることが示唆されている (45-47)。緑茶の主要なポリフェノールである EGCG は様々ながんに対する抗がん作用が報告されており (15, 16)、特に膵臓がんにおいては、

cGMP を介した CSC に対する抗がん作用を示すこと、また、cGMP を分解するホスホジエステラーゼ (PDE) 阻害剤との併用で、低用量の EGCG で抗がん作用を示すことを当研究室で明らかにしている(17)。

cGMP は、一酸化窒素に応答する sGC およびナトリウム利尿ペプチド受容体-A によって生成されるセカンドメッセンジャーで、血管弛緩や内皮細胞の維持に重要であり、心血管疾患 (48)や勃起不全症 (49)、肺高血圧症 (50)などの血管制御との関与も知られている。近年、当研究室では cGMP が膵臓における CSC 致死作用ならびに CSC 抑制作用を有することを明らかにし、EGCG が膵臓がん細胞においてステロイドホルモン受容体スーパーファミリーに属する核内受容体の一つであるペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 α (PPAR α) の発現を上昇させることを見出した (18)。また、ピルビン酸脱水素酵素キナーゼ 4(PDK4) は TCA サイクル (クエン酸回路) を抑制し、細胞内代謝を糖質から脂質に転換させる酵素で、ヒトやげっ歯類の骨格筋、心臓、膵島、肝臓、腎臓など、さまざまな組織で発現しており、膵島や骨格筋の細胞のエネルギー代謝の調節に関与していることが知られている(51)。我々はこれまでにピルビン酸デヒドロゲナーゼ A1 (PDHA1)が膵臓がんの幹細胞性に関与していることを明らかにしており(19)、PDK4 は PDHA1 の活性を阻害することが知られている。さらに PPAR は PDK4 遺伝子の転写活性化を促進することが報告されていることから(20)、

膵臓がんにおいて PPAR と PDK4 の関連性が高いと考えられる。以上のことから、今回我々は EGCG ならびに cGMP 誘導剤の膵臓がんに対する抗がん作用において、PPAR ならびに PDK4 が関与するか検討を行った。

第 2 節 材料および方法

第 1 項 細胞および細胞培養

ヒト膵臓がん細胞株 Panc-1 は、理研細胞バンク（つくば、日本）から購入し、ペニシリン-ストレプトマイシン（Meiji Seika Pharma、東京）および 10% ウシ胎児血清（FBS）（Bio Source International, USA）添加 DMEM 培地（Cosmobio）で、37°C 水蒸気飽和した 5%CO₂ 条件下で継代、維持した。

第 2 項 試薬および機器

Bay41-2272 は Abcam 社（Cambridge, UK, ab144521）より購入した。これを 5 mM の濃度となるように超純水に懸濁し、-80°C に凍結した。使用する際には適宜解凍して用いた。蛍光免疫染色機器は Keyence 社（Waltham, MA, USA）の BZX700 を使用し、抗 PDK4 抗体（Protein tech, Rosemont, IL, USA, 12949-1-AP）、Alexa Fluor 555（Invitrogen, Waltham, MA, USA, A21428）、Hoechst33342（H3570）を用いて染色した。

第 3 項 cGMP 合成酵素活性化剤処理後の PPAR および PDK、その他膵臓がんマーカーの mRNA 発現量の解析

10% FBS RPMI1640 にて培養していたヒト膵臓がん細胞株 Panc-1 を 12 well plate に 2×10^4 cells/mL となるように播種し、24 時間時間培養した。培地を除去し、Bay41-2272 (0, 5 μ M) 含有 1% FBS RPMI 1640 培地にて交換を行い、24 および 48 時間培養した。その後の詳細は第 2 章第 2 節第 4 項参照。プライマーは以下に示した塩基配列を用いた。

PPAR α : Forward ; 5'- TCCTGAGCCATGCAGAATTTAC -3'

Reverse ; 5'- AGTCTAAGGCCTCGCTGGTG -3'

PPAR δ : Forward ; 5'- ACTGACCCAACTGATCCTGCTC -3'

Reverse ; 5'- GCCTGGCAAACCAGTGTGAA -3'

PPAR γ : Forward ; 5'- AGCTGAACCACCCTGAGTCC -3'

Reverse ; 5'- TCATGTCTGTCTCCGTCTTCTTG -3'

PDK4 : Forward ; 5'- GGAGCATTTCTCGCGCTACA -3'

Reverse ; 5'- ACAGGCAATTCTTGTCGCAAA -3'

Vimentin : Forward ; 5'- TGAGTACCGGAGACAGGTGCAG -3'

Reverse ; 5'- TAGCAGCTTCAACGGCAAAGTTC -3'

WNT7B : Forward ; 5'- GTCAGGGATGTTTGTCCCACTTG -3'

Reverse ; 5'- TCTGGTAGGTCCTTGTGCCACTC -3'

α SMA : Forward ; 5'- ACTGAGCGTGGCTATTCCTCCGTT -3'

Reverse ; 5'- GCAGTGGCCATCTCATTTTCA -3'

LKB1 : Forward ; 5'- AACGGCCTGGACACCTTCT -3'

Reverse ; 5'- CCCTTCCCGATGTTCTCAA -3'

第 4 項 cGMP 合成活性化剤処理後におけるスフェロイド形成能の評価

10%FBS RPMI1640 で培養したヒト膵臓がん細胞株 Panc-1 を 1×10^5 cells/mL となるよう 96 well plate に 200 μ L ずつ播種し 24 時間時間培養した。その後、培地を除去し、1% FBS RPMI 1640 にて培地交換を行い、試薬 (※1) を各 well に 20 μ L ずつ添加した。siRNA は siScr (Sigma Aldrich,USA: Misson_Negative control SIC-001)、siPDK4 (i) (Sigma Aldrich, catalog number: Hs_PDK4_4124)、siPDK4 (ii) (Sigma Aldrich, Hs_PDK4_7897)、siPPAR α (Sigma Aldrich, Hs_PPARG_4005) 、 siPPAR δ (Sigma Aldrich, Hs_PPARG_6946)、siPPAR γ (Sigma Aldrich, Hs_PPARG_6498)を使用した。48 時間培養後、Trypsin で細胞を剥離し RPMI で洗浄・遠心後、細胞を回収した。各ノックダウン細胞を 1×10^3 cells/mL in Spheroid medeum (※2) となるよう Corning Ultra-Low Attachment Surface 24 well-plates に 1 mL ずつ播種し、DMSO もしくは 5 μ M 含有 Bay41-2272 各 well に 10 μ L (500 μ M) ずつ添加し 10 日後のスフェロイドをカウントした。

※1

A : 100 μ L Optimem + 3 μ L RNAimax

B : 100 μ L Optimem + 2 μ L siRNA

A と B を混和し 5 分静置。

※2

- ・ 無血清 RPMI 1640 medium
- ・ Epidermal growth factor (EGF) (20 ng/mL, BD Bioscience),
- ・ Basic fibroblast growth factor (bFGF) (10 ng/mL, BD Bioscience)
- ・ B27 Supplement (1:50 dilution, Invitrogen)

第 5 項 膵臓がん患者のがん組織の免疫組織化学染色

膵臓がん組織サンプルは USBiological 社 (USA, PA807) から購入した。膵臓組織切片を Lemosol (Fuji film, 日本) 中で 3 回脱パラフィンし、エタノールで洗浄した。次にイムノセイバー (日新 EM 社, 東京) 中で 100°C で加熱して洗浄した。次にリン酸緩衝生理食塩水で洗浄後、一次抗体にて 4°C で一晩インキュベートした。抗 PDK4 抗体は 300 倍希釈で使用した。スライドを、100 倍希釈の Alexa Fluor 555 二次抗体で処理し、4°C で 1 時間インキュベートした。スライドを濯ぎ、Hoechst33342 (0.5 mg/mL) を使用して核を染色した。

第 6 項 膵臓がん患者の腫瘍組織マイクロアレイのデータベース解析

膵臓がん患者 45 名における腫瘍組織のマイクロアレイによる包括的遺伝子発現情報に関するデータベース (GSE28735) をもとに膵臓がん患者腫瘍組織における PDK の mRNA 発現の解析を行った。また、PPAR α ならびに PDK4 の発現と膵臓がん患者の予後についてデータ解析を行った。

第 7 項 統計処理

結果は、平均値 (Mean) と平均値の標準誤差 (S.E.) で示した。統計解析は、Student's *t*-test を用いて、*** : $p < 0.001$ 、** : $p < 0.01$ 、* : $p < 0.05$ で示した。生存曲線の統計分析は、KaplaneMeier 曲線のログランク検定を使用した。統計解析は、GraphPad (GraphPad Software, USA) を用いて実行した。

第3節 結果および考察

第1項 cGMP 産生による CSC 特性抑制における PPAR の関与の検討

ヒト膵臓がん細胞株 Panc-1 において cGMP 誘導剤である Bay41-2272 ががん幹細胞性を抑制することが報告されていることから、Bay41-2272 によりがん幹細胞マーカーの発現が抑制されるかを評価した。その結果、Bay41-2272 5 μ M にて vimentin、Wnt Family Member 7B (WNT7B)、alpha smooth muscle actin (α SMA)、liver kinase B1 (LKB1) の mRNA 発現量の減少が認められた (Fig. 10A-C)。

我々はこれまでに Bay41-2272 が PPAR α の遺伝子発現を有意に増加させることを確認しており (18)、本試験でも同様の結果が得られた (Fig. 10E)。また、他の PPAR についても検討したところ、PPAR δ の mRNA の発現上昇は認められたが、PPAR γ においては発現上昇が示されなかった (Fig. 10F, G)。

次に、スフェロイド形成能は膵臓がん細胞における代表的な CSC 特性であることから、cGMP 産生におけるスフェロイド形成抑制について PPAR α の関与をスフェロイドアッセイにて検討した。その結果、Bay41-2272 は Panc-1 細胞のスフェロイド形成を有意に抑制し、PPAR α のノックダウンによりこの作用は減弱された (Fig. 10H)。この結果から、cGMP 産生のスフェロイド形成抑制には

PPAR α が一部関与していることが示された。一方で、PPAR δ のノックダウンによるスフェロイド形成抑制の低下は認められなかったことから、cGMP 産生誘導剤による PPAR δ の mRNA 発現上昇は cGMP 産生のスフェロイド形成抑制に関与しないことが示唆された。

第 2 項 cGMP 産生による CSC 特性抑制における PDK4 の関与の検討

PPAR α はトリカルボン酸 (TCA) 回路の負の制御因子の一つとして知られる PDK4 の転写因子の 1 つであるため、cGMP の CSC 特性抑制に PPAR α /PDK4 経路が関与しているかを検討した。Panc-1 細胞株において、Bay41-2272 5 μ M 処理により顕著に PDK4 の mRNA 発現量が上昇した (Fig. 11A)。

CSC 特性の cGMP 誘発阻害における PDK4 の関与を確認するために、PDK4 をノックダウンし、Bay41-2272 で処理したところ、PDK4 をノックダウンしていないものと比べて Bay41-2272 のスフェロイド形成抑制は有意に抑制された (Fig. 11B)。

以上の結果より、cGMP が PPAR α /PDK4 の発現上昇を誘導し、Bay41-2272 の CSC 特性抑制作用に関与していることが示唆された。

第 3 項 膵臓がん患者のがん組織における PDK4 の発現の検討

第 2 項より PDK4 の発現が膵臓がん細胞における CSC 特性の抑制に重要であることが示唆された。一方で、膵臓がん患者における PDK4 の発現に関する報告はほとんどないことから、免疫染色にて膵臓がん患者における PDK4 の発現を評価した。その結果、膵臓がん患者のがん組織と正常組織を比較したところ、がん組織では正常組織と比べ顕著に PDK4 の発現量が低下していた (Fig. 12A, B)。

第 4 項 膵臓がん患者の予後とがん組織の PDK4 の発現の関係の検討

膵臓がん患者の予後と PDK4 の発現の関係について、膵臓がん患者 45 人の腫瘍組織のマイクロアレイから得られた遺伝子発現情報データベース (GSE28735) に基づき解析を行ったところ、膵臓がん患者のがん組織において PDK4 の顕著な発現量低下が観察された (Fig. 13A)。また、膵臓がん患者における PDK4 の重要性を検討するため、膵臓がん患者における PDK4 の発現と予後の関連を解析した結果、PDK4 の遺伝子発現が高い膵臓がん患者は発現の低い患者と比べ予後が良好であった (Fig. 13B)。以上のことから、膵臓がん患者においてその予後に PDK4 の発現が関与していることが示唆された。

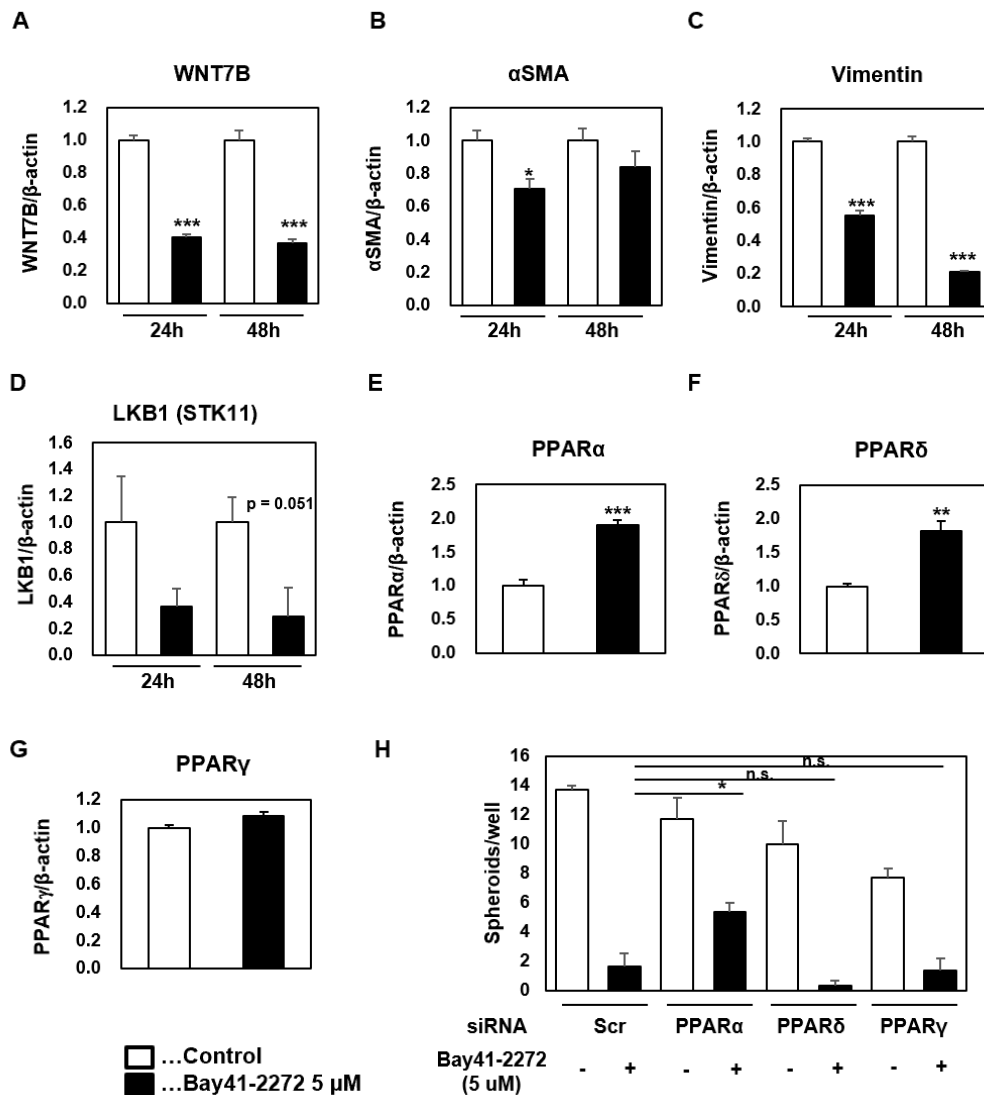


Fig.10 cGMP 産生は膵臓がん細胞においてがん幹細胞マーカーの遺伝子発現を抑制し、cGMP のスフェロイド形成抑制作用には PPAR が一部関与する (52)

ヒトすい臓がん細胞株 Panc-1 に Bay41-2271 を 5 μM となるよう 24 時間および 48 時間供し、real time PCR 法を用いて(A)WNT7B、(B)αSMA、(C)Vimentin、(D)LKB1 の mRNA 発現量を測定した。同様に Bay41-2271 を 5 μM となるよう 48 時間供し、(E)PPARα、(F)PPARδ、(G)PPARγ の mRNA 発現量を測定した。(H)Panc-1 細胞株に PPARα、PPARδ、PPARγ の siRNA を 48 時間処理したあと、Bay41-2271 を 5 μM となるよう供し、Bay41-2271 のスフェロイド形成抑制作用における各遺伝子のノックダウンによる影響を評価した。(A)-(G) n = 4, (H) n = 3, Means ± SEM. Student's *t*-test, *: *p* < 0.05, **: *p* < 0.01, ***: *p* < 0.001.

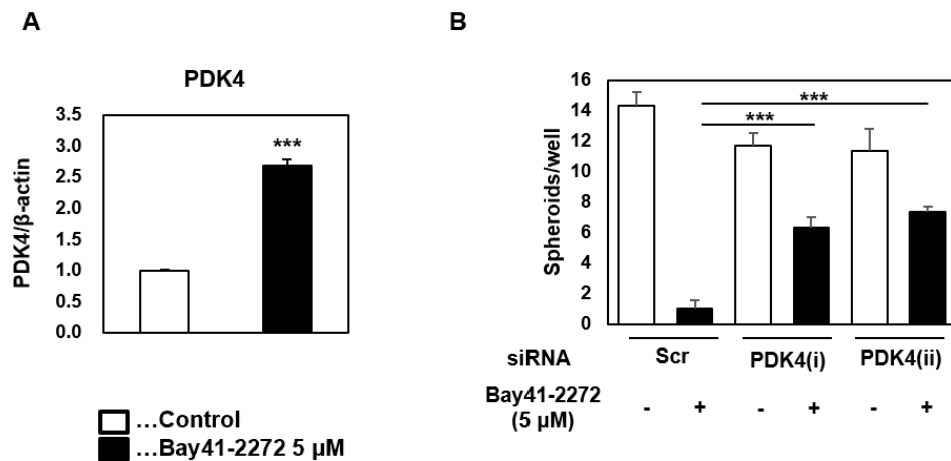


Fig.11 cGMP 産生は PAD4 の mRNA の発現を増加させ、cGMP のスフェロイド形成抑制作用には PDK4 が一部関与する (52)

(A) ヒトすい臓がん細胞株 Panc-1 に Bay41-2271 を 5 μ M となるよう 48 時間供し、の mRNA 発現量を測定した。(B) Panc-1 細胞株に PDK4 の siRNA を 48 時間処理したあと、Bay41-2271 を 5 μ M となるよう供し、Bay41-2271 のスフェロイド形成抑制作用における PDK4 ノックダウンによる影響を評価した。(A) $n = 4$, (B) $n = 3$, Means $\pm$ SEM. Student's t -test, ***: $p < 0.001$.

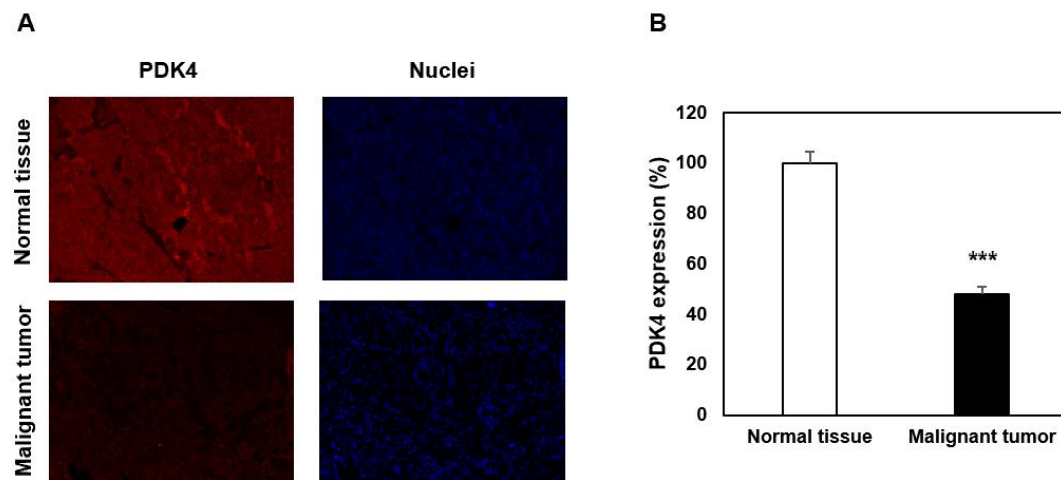


Fig.12 PDAC 患者のがん組織において PDK4 の発現は低い (52)

(A) (B) PDAC 患者のすい臓組織 (正常組織、 $n = 20$; 悪性腫瘍、 $n = 14$) の PDK4 の発現量を免疫染色法によって測定した。 Means $\pm$ SEM. Student's t -test , ***: $p < 0.001$.

Dataset GSE28735

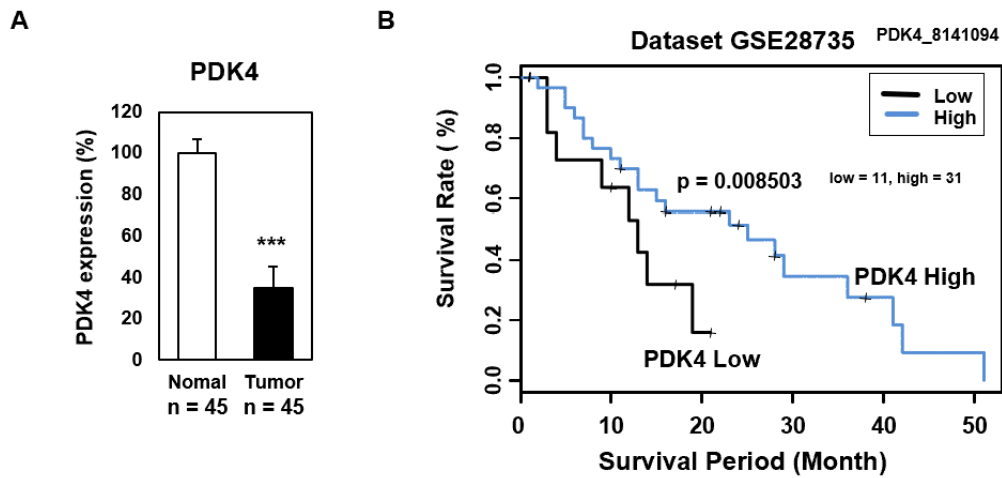


Fig.13 PDK4 高発現の PDAC 患者は予後がいい (52)

(A) GSE28735 データセットを用いて PDAC 患者の正常および腫瘍組織における PDK4 の遺伝子発現を評価した。(B) GSE28735 データセットを用いて PDAC 患者の予後における PDK4 の発現の影響を評価した。(A) Means $\pm$ SEM. $n = 4$, Student's t -test, ***: $p < 0.001$. (B) Differences in the overall survival were analyzed using the KaplanMeier survival model with a log-rank test.

第9章 総括

近年、健康寿命を延ばすため健康への自助努力が推奨され、機能性表示食品の浸透など機能性食品成分への関心が高まりつつある。一方で、その機能性に対する感受性には医薬品同様に個人差がある。その差が何に起因するのかが明らかでないことが多く、その要因の一つとして、食品成分の研究対象として依然、何に効果があるかという出口に焦点が当てられる点にある。機能性表示食品の届出にも作用機序の記載が義務付けられているが、比較的作用出口に紐づく評価が多く、どういった分子メカニズムに起因するかを明らかにしていないものが多い。機能性食品を適切かつ安全に摂取するためには、そもそもなぜ効くのかという作用機構の解明が必要不可欠である。

当研究室では、これまでに EGCG の細胞膜上受容体として 67LR を同定し、生理的低濃度で EGCG が 67LR を介して TLR4 のリガンドである LPS によって誘導される炎症応答を抑制すること、またその活性に TLR4 シグナル抑制分子である Tollip が関与していることを明らかにしている。しかし、その詳細なメカニズムは未だ不明であることから、本研究では EGCG の Tollip 発現制御機構について検討を行った。

まず、ヒト単球細胞株 THP-1 において E74-Like Factor 1 (Elf1) がリン酸化と糖修飾を受けることで 80 kDa から 98 kDa となって核移行し、Tollip の転写を抑制することが報告されていることから、EGCG が Elf-1 の核内発現を抑制して Tollip の発現量を増加していると仮定し検討したところ、マウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 において、EGCG 2.5 μ M において顕著な Elf-1 核内発現量低下が見られた。さらに、RAW264.7 細胞株における Elf-1 の Tollip 発現抑制作用は報告されていないため、THP-1 細胞株と同様に RAW264.7 細胞株においても Elf-1 が Tollip の発現を抑制しているか Elf-1 をノックダウンし検討したところ、Elf-1 ノックダウン細胞において Tollip のタンパク質発現量が増加した。このことから、RAW264.7 細胞株においても Elf-1 が Tollip のタンパク質発現を負に制御していることが確認された。これらの結果より RAW264.7 細胞株において、EGCG は Elf-1 の核内発現量を低下させることで Tollip の mRNA の発現量を増加させることが示唆された。

次に、全身性エリテマトーデス患者の T 細胞において PP2A が Elf-1 の脱リン酸化を行い、98/80 kDa Elf-1 の発現割合を低下させること、脱リン酸化された 98 kDa Elf-1 は細胞質でプロテアソーム経路によって分解されることが報告されていることから、RAW264.7 細胞株において、EGCG が PP2A を活性化して Elf-1 の脱リン酸化を行いその核内発現量を低下させ、Tollip の発現量を増加

しているのではないかと仮定し検討したところ、RAW264.7 細胞株において PP2A 阻害剤である okadaic acid 添加によって Elf-1 の核内発現量が有意に増加した。このことから、RAW264.7 細胞株における Elf-1 のダウンレギュレーションに PP2A が関与すると考えられた。また、okadaic acid 添加により EGCG の Tollip の mRNA 発現促進作用が抑制されたことから、EGCG による Tollip 発現量増加作用に PP2A が関与していることが示された。さらに、EGCG 添加により PP2A 活性化レベルの上昇が見られた。以上のことから、EGCG が PP2A を活性化させることで Elf-1 の核内発現量を減少させ、Tollip の転写を促し、発現量を増加させることが明らかとなった。

当研究室ではこれまでに、EGCG が多発性骨髄腫において sGC/cGMP を介して抗がん作用を示すことを見出してきた。また、心筋細胞における心保護作用において cGMP が PP2A を活性化させることが報告されていることから、sGC/cGMP と EGCG の Tollip 発現上昇作用機構との関与について検討した。その結果、RAW264.7 細胞株において EGCG は cGMP 量を増加させ、sGC 活性化は Tollip の発現量を上昇させる一方で、sGC 阻害剤を処理した細胞では EGCG の Tollip 発現上昇作用がキャンセルされた。このことから、マクロファージにおいて cGMP が Tollip の発現を制御しており、EGCG が cGMP 産生を介して Tollip の発現を上昇させることが示された。また、sGC 活性化剤は EGCG

同様 Elf-1 の発現低下および Tollip 発現上昇を誘導し、PP2A の活性化レベルを上昇させた。以上のことから、EGCG は sGC/cGMP を介した PP2A の活性化により Elf-1 の発現低下および Tollip の発現上昇を誘導することが示唆された。

さらに、EGCG の 67LR を介した抗がん作用において Akt の活性化および eNOS のリン酸化による cGMP 産生が重要であることを見出しているため、Akt および eNOS と EGCG の Tollip 発現上昇作用機構との関与を検討した。その結果、EGCG によって Akt が活性化され、eNOS の Ser1777 のリン酸化が上昇した一方で、Akt 阻害剤および eNOS 阻害剤により EGCG の Tollip 発現上昇作用はキャンセルされた。以上のことから、マクロファージにおいて EGCG は Akt/eNOS/sGC/cGMP/PP2A/Elf-1 経路を介して Tollip の発現を上昇させることが示唆された。

Tollip 遺伝子の発現制御については未だ明らかになっていないことが多い一方で、その発現と炎症性疾患との関与が数多く報告されている (53-55)。本研究によってマクロファージにおける Tollip の発現制御機構が示され、これらの因子が新たな炎症性疾患との相関に対する指標や標的となる可能性が見出された。先行研究により EGCG が 67LR を介して Tollip の発現量を増加させることで抗炎症作用を誘導することはすでに明らかになっているが、Akt/eNOS/sGC/cGMP/PP2A/Elf-1 経路に関しては 67LR が関与しているかは

不明である。そのため、これらのシグナル伝達全てが 67LR を介しているかは今後検討する必要がある。

TLR4 の炎症シグナル伝達には、主に Myeloid differentiation primary response 88 (MyD88) 依存の経路と MyD88 非依存の経路が存在する (56)。まず MyD88 依存経路では LPS が TLR4 に認識されると TLR の内側にある Toll/IL-1 receptor (TIR) ドメインにアダプター分子である MyD88 が結合する。MyD88 は デスドメインを介して IL-1 receptor-associated kinase (IRAK) に結合して活性化し、TNF receptor-associated factor 6 (TRAF6) をリン酸化する。この TRAF6 が MAPKKK である TAK1 を活性化するため、MAP キナーゼ経路の活性化や NF- κ B の活性化を導く。MyD88 非依存経路では LPS が TLR4 に結合後、TIR ドメインを介して TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β (TRIF) を活性化しインターフェロンの制御因子である interferon regulatory factor 3 (IRF3) を活性化することで Interferon β (IFN- β) の転写を促進させ抗ウイルス作用を誘発させる。MyD88 依存の経路では即時的に、MyD88 非依存の経路では遅発的にシグナル伝達が起こる。このように、NF- κ B や AP-1 などの転写因子を活性化することで、活性型マクロファージなどは IFN- γ や TNF- α といった炎症性サイトカインを分泌する。一方、TLR4 シグナル抑制分子である Tollip は IRAK と複合体を形成することで TRAF6 の活性化を抑制する。すな

わち、Tollip は急性炎症による敗血症や慢性炎症による糖尿病等の主な原因となる MyD88 依存経路の比較的上流において TLR4 シグナルを阻害することで網羅的に TLR4 シグナルを抑制すると考えられる。現在、TLR4 をターゲットとした敗血症などの炎症性疾患に対し満足できる結果を奏する化学療法剤は未だ開発されておらず、TLR4 シグナルの下流分子や症状に対してステロイド剤、抗炎症剤、血小板凝集抑制剤、血管拡張剤、抗生物質等が対症療法的に適用されているに過ぎない。これらの炎症性疾患は重篤な症状を呈する場合が多く、その治療のために効果的で且つ副作用が弱い安全な治療剤の開発が望まれている。また、重篤な敗血症が発症する主な原因は手術時における感染症によるものである。そういった点で、本研究で見出した経路は 1 時間という短時間において TLR4 シグナル抑制因子である Tollip の発現を上昇させることで、TLR4 の上流シグナルを制御するというものである。実際に、臨床試験において手術 1 時間前に cGMP 誘導剤を投与することにより、手術による TLR4 依存的な炎症を抑制することが報告されていることから (57)、今回見出した cGMP 産生を介した Tollip 発現制御がその機構の一端を担っており、新たな治療用法の提案に繋がる可能性が見出された。

TLR4 と比較的類似したシグナル伝達機構を持つ TLR2 においても、同様に EGCG が TLR2 を介して Tollip の発現量を増加させることで炎症性サイトカイ

ンの産生を抑制するという報告があることから (58)、MyD88 依存の IRAK を介する TLR シグナルを持つものに同様の効果が得られる可能性が期待される。MyD88 依存の IRAK を介する TLR シグナルを持つものとして、TLR1、TLR2、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9 および IL-1 β R が知られているため (59)、これらに対する EGCG の影響についても検討する必要がある。

今回検討した EGCG の抗炎症作用は EGCG を処理後、LPS を添加し炎症を誘導しているためあくまで予防としての抗炎症作用である。実際に TLR4 リガンドを添加後に誘発される炎症に対して EGCG が Tollip の発現を上昇させ抗炎症作用を示すか、すなわち治療としての抗炎症作用があるかは更なる検討が必要であると考えられる。

また、近年の社会問題として食生活の欧米化に伴う高カロリー食摂取や運動不足による肥満を起因とした糖尿病や高脂血症などのメタボリックシンドロームの罹患率増大があげられている。そのため、脂肪の燃焼促進や腸管からの脂質の吸収を抑える機能を有する食品成分を配合した、特定保健用食品や機能性表示食品の開発が数多く進められている。また、長期にわたり摂取可能で体脂肪蓄積抑制作用などの抗メタボリックシンドローム作用を示す安全かつ有用な機能性食品素材の開発が望まれる。そこで、我々は日本人の多くが普段の食事と一緒に摂取でき、かつ肥満作用が期待されている緑茶に注目した。緑茶に含まれるカ

テキソンの 1 種である EGCG には抗肥満作用、LDL コレステロール低下作用、抗がん作用など様々な生理作用が報告されている。しかしながら、EGCG の吸収率は摂取量の 1000 分の 1 程度と非常に低いため大量にかつ頻繁に摂取しなければその作用は得にくい。そのため、EGCG の作用を高めることができれば日常的な摂取からその機能を得やすくなると考えられる。

これまでの研究より、メタボリックプロファイリング法を用いた 43 種の茶品種の比較により EGCG の作用を高める成分として Eriodictyol が見出されている。実際に、EGCG の抗がん作用および筋萎縮抑制作用において EGCG と Eriodictyol の併用効果を明らかとしている。そこで本実験では、高脂肪・高ショ糖食摂食によって誘導した肥満モデルマウスに対し、EGCG を多く含むやぶきたと Eriodictyol の併用により、体重、脂肪重量、肝臓・血中の TG などの各種パラメーターや肥満関連遺伝子の発現影響を与えるか検討した。その結果、やぶきたや Eriodictyol 単独群では変化がなかったが、やぶきたと Eriodictyol の併用により有意に体重が減少し、また、臓器重量においては有意な差は認められなかったものの、睾丸周辺脂肪組織および腎臓周辺脂肪組織で体重と同様の傾向が見られた。また、やぶきたと Eriodictyol の併用で血漿コレステロール値や LDL 値を低下させた。LDL は酸化されると、酸化 LDL としてアテローム性動脈硬化症の発症の大きく寄与していることが知られている (60, 61)。酸化 LDL はス

カベンジャー受容体を介してマクロファージに取り込まれ泡沫細胞を形成し動脈硬化を助長させるため、血漿中の LDL 値を制御することが重要である。また、この組み合わせによるコレステロール低下作用について関与因子を検討するため、コレステロール関連酵素の発現について評価した。その結果、コレステロール合成酵素である HMGCR および HMGCS の遺伝子発現が低下していた。過去に、0.2%緑茶抽出物ではコレステロール低下作用は見られず、1%緑茶抽出物では HF/HS 食による肝臓の HMGCR および HMGCS 発現上昇が低下したことが報告されており (40)、今回の結果では 0.2%やぶきた単独もしくは Eriodictyol 単独摂取ではその効果は認められず、Eriodictyol 併用においてのみ HMGCR および HMGCS 発現上昇の抑制が観察されたことから、併用によりこの効果が増強されたと考えられる。また、やぶきたの主要なカテキンである EGCG について、ヒト肝がん由来細胞株 HepG2 で 50-200 μ M において LDLR の発現を増加させることが示されている (62, 63)。一方で、EGCG の血漿濃度を考慮すると、やぶきた単独摂取ではこの効果は限定的と考えられ、実際に今回の試験でもやぶきた単独群ではその作用は認められず併用群においてのみ LDLR の mRNA 発現が増加していた。

以上のように、緑茶抽出物単独のコレステロール低下作用には限界があり、これまでその効果を増幅させる手法がなかったが、新たに Eriodictyol との併用に

よる効果が見出された。これまでの研究で、Eriodictyol が EGCG の抗がん作用における Akt 活性を増強することが明らかになっていることから、今回のコレステロール低下作用においても Akt 活性が緑茶抽出物に対する複合効果に關与している可能性がある。また、第 2～6 章で見出したマクロファージにおける EGCG の抗炎症作用メカニズムにおいても Akt 活性が重要であることから、同様に Eriodictyol が増強作用を示す可能性が示唆された。

HMGR の阻害剤であるスタチンは世界中で高コレステロール血症患者に使用されているが、肝機能障害や横紋筋融解症などの重篤な副作用を引き起こすことがある (39)。また、緑茶は昔から世界中で飲用されており、通常の摂取量においてはその安全性が報告されており (64-66)、ラットやマウスで肝毒性を誘発するには非常に高用量の摂取が必要となる (67)。さらに、柑橘類の皮に豊富に含まれている Eriodictyol の血中安定性や安全性も知られている (68)。今回の結果では肝毒性の指標である ALT および AST において、どの群においても有意差は認められなかったことから、今回の用量において緑茶と Eriodictyol の組み合わせにおいて、肝毒性が誘発される可能性は低いと考えられる。

以上のことから、緑茶抽出物および Eriodictyol を組み合わせることで、より安全なコレステロール低下作用を有する機能性食品の開発に繋がることが示唆された。Eriodictyol は配糖体である Eriocitrin の形でレモンに多く含まれる成分

であり、近年では、Eriodictyol-6-C-glucoside として機能性表示食品にも使用されている。食品素材レベルにおいても、レモン緑茶といった形で緑茶と柑橘を組み合わせた飲料が数多く販売されていることから、機能性表示食品への開発にも親和性が高いと考えられる。また、臨床試験において、Eriocitrin の類縁体である Hesperidin と緑茶の組み合わせで高肥満作用や LDL/HDL 比が低下することが報告されていることから (69)、本研究結果においてもヒトでの有効性の可能性があると考えられる。

さらに、PDAC は予後不良のがんとして知られており、PDAC 患者の多くに微小転移があることから効果的なアプローチが緊急の課題である (70, 71)。近年の研究では、一部のがん細胞が抗がん剤に対する耐性を獲得し、薬剤耐性と再発を引き起こすことが報告されており、CSC が再発および転移の主な原因であると考えられている。CSC は薬剤耐性を示し、CSC の生存により化学療法後に一部の種類のがんの再発が誘発される (49-51)。したがって、CSC を標的とした治療法を確立することで、再発・転移のリスクが低いがん治療に繋がること期待される。また、抗がん剤は人体において正常細胞に対しても毒性があることが課題とされているが (72, 73)、我々が着目したのは食品成分である EGCG を介した抗がん作用であり、特にその作用点として cGMP を起点としたメカニズムである。cGMP はホスホジエステラーゼの薬理的阻害とその生成機構の直

接活性化等により、勃起不全や肺高血圧症などの複数の疾患の治療に長年使用されている。よって、これらのメカニズムを解明することで、膵臓がん幹細胞に対するより安全な治療開発に繋がる可能性がある。

近年、当研究室では cGMP の CSC 阻害効果を明らかにし、PDAC のミトコンドリア機能を抑制することによる PDAC の特性ならびに PPAR α の発現が cGMP によって上方することを示した (18)。PDK4 は TCA サイクルの阻害因子の 1 つであり、PPAR α は PDK4 発現の主要な転写因子であるため、本研究では PDAC の CSC 特性に対する cGMP の阻害作用における PPAR α /PDK4 の役割を検討した。

ヒト膵臓がん細胞株 Panc-1 において、cGMP 産生促進剤 (Bay41-2272) 5 μ M において CSC 特性に関わる遺伝子発現を低下させ、PPAR α および PDK4 の遺伝子発現を上昇させた。また、PPAR α および PDK4 のノックダウンにより CSC 特性に対する cGMP の抑制作用が減弱された。このことから、PPAR α /PDK4 がヒト膵臓がん細胞において cGMP 産生によるがん幹細胞性の抑制に関与していることが示された。また、膵臓がん患者の組織切片では正常組織と比較してがん組織の PDK4 発現が顕著に低下しており、PDK4 の発現レベルと PDAC 患者の予後良好と関連していた。これらの結果は、PDK4 が PDAC 患者の膵臓がんの進行抑制に重要な役割を果たしていることを示唆している。

また、がん細胞でよく見られるワールブルグ効果には解糖系が関与している (74)。ワールブルグ効果は解糖を促進し、ミトコンドリアの機能不全を補うが、いくつかの報告ではミトコンドリア機能が膵臓がんの CSC 特性に不可欠であることが示されていることから (75, 76)、PDK4 が膵臓がんにおける CSC 特性の阻害において重要な役割を果たしていることが推察される。

本研究では、膵臓がんにおける EGCG の抗がん作用の作用点として cGMP を起点に検討したことから、EGCG においても同様に PPAR α /PDK4 経路の発現を制御するか、さらには、EGCG の抗がん作用を増強させる Eriodictyol との併用効果が見出されるか等についても検討が必要である。

参考文献

- (1) Gouwy M, Struyf S, Proost P, Van Damme J. Synergy in cytokine and chemokine networks amplifies the inflammatory response. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2005;16:561-580.
- (2) Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr. A human homologue of *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*, 1997;388:394-397.
- (3) Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol.* 1997;21:335-376.
- (4) Lester SN, Li K. Toll-like receptors in antiviral innate immunity. *J Mol Biol.* 2014;426(6):1246-64.
- (5) Kern P.A, Ranganathan S, Li C, Wood L, Ranganathan G. Adipose tissue tumor necrosis factor and interleukin-6 expression in human obesity and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2001;280:745-751.
- (6) Dandona P, Weinstock R, Thusu K, Abdel-Rahman E, Aljada A, Wadden T. Tumor necrosis factor- α in sera of obese patients: fall with weight loss. *J Clin Endocrinol Metab*, 1998;83:2907-2910.

- (7) Vozarova B, Weyer C, Hanson K, Tataranni P.A, Bogardus C, Pratley R.E. Circulating interleukin-6 in relation to adiposity, insulin action, and insulin secretion. *Obes Res*, 2001;9:414-417.
- (8) Tsukumo DM, Carvalho-Filho MA, Carvalheira JB, Prada PO, Hirabara SM, Schenka AA, Araújo EP, Vassallo J, Curi R, Velloso LA, Saad MJ. Loss-of-function mutation in Toll-like receptor 4 prevents diet-induced obesity and insulin resistance. *Diabetes*, 2007;56(8):1986-98.
- (9) Cabrera C, Artacho R, Giménez R. Beneficial effects of green tea--a review. *J Amer Coll Nutr*. 2006; 25(2):79–99.
- (10) 松林敬一郎・小国伊太郎・伊勢村護・杉村公男・山田（前田）万里. 茶の機能-生体機能の新たな機能性- 2002
- (11) Tachibana H, Koga K, Fujimura Y, Yamada K. A receptor for green tea polyphenol EGCG. *Nat Struct Mol Biol*, 2004;11:380-381.
- (12) Fujimura Y, Umeda D, Yamada K, Tachibana H. The impact of the 67 kDa laminin receptor on both cell-surface binding and anti-allegic action of tea catechins. *Arch Biochem Biophys*, 2008;476:133-138.

- (13) Hong Byun E, Fujimura Y, Yamada K, Tachibana H. TLR4 signaling inhibitory pathway induced by green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate through 67-kDa laminin receptor. *J Immunol*, 2010;185:33-45.
- (14) Kumazoe M, Fujimura Y, Hidaka S, Kim Y, Murayama K, Takai M, Huang Y, Yamashita S, Murata M, Miura D, Wariishi H, Maeda-Yamamoto M, Tachibana H. Metabolic Profiling-based Data-mining for an Effective Chemical Combination to Induce Apoptosis of Cancer Cells. *Scientific Reports*, 2015;5:9474.
- (15) Masood A. S, Paola N, Hemanta K. Ramesh B. B, Robert C. B, Vidit M, Rao P, Mariateresa F, Yu tzu T, Steven P. T, Raj K. G, Kenneth C. A, and Nikhil C. M. Specific killing of multiple myeloma cells by (-)-epigallocatechin-3-gallate extracted from green tea: biologic activity and therapeutic implications. *Blood*, 2006; 108(8): 2804–2810.
- (16) Kumazoe M, Kim Y, Bae J, Takai M, Murata M, Suemasu Y, Sugihara K, Yamashita S, Tsukamoto S, Huang Y, Nakahara K, Yamada K, Tachibana H. Phosphodiesterase 5 inhibitor acts as a potent agent sensitizing acute myeloid leukemia cells to 67-kDa laminin receptor-dependent apoptosis. *FEBS Lett*, 2013; 587:3052-7.

- (17) Kumazoe M, Takai M, Hiroi S, Takeuchi C, Yamanouchi M, Nojiri T, Onda H, Bae J, Huang Y, Takamatsu K, Yamashita S, Yamada S, Kangawa K, Takahashi T, Tanaka H, Tachibana H. PDE3 inhibitor and EGCG combination treatment suppress cancer stem cell properties in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Sci Rep*, 2017;7(1):1917.
- (18) Kumazoe M, Takai M, Bae J, Hiroi S, Huang Y, Takamatsu K, Won Y, Yamashita M, Hidaka S, Yamashita S, Yamada S, Murata M, Tsukamoto S, Tachibana H. FOXO3 is essential for CD44 expression in pancreatic cancer cells. *Oncogene*, 2017;36(19):2643-2654.
- (19) Kumazoe M, Takai M, Hiroi S, Takeuchi C, Kadomatsu M, Nojiri T, Onda H, Bae J, Huang Y, Takamatsu K, Yamashita S, Kangawa K, Tachibana H. The FOXO3/PGC-1 β signaling axis is essential for cancer stem cell properties of pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Biol Chem*, 2017;292(26):10813-10823.
- (20) Sugden M. C , Holness M. J. Therapeutic potential of the mammalian pyruvate dehydrogenase kinases in the prevention of hyperglycaemia. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord*, 2002;2(2):151-65.
- (21) Sugi Y, Takahashi K, Nakano K, Hosono A, Kaminogawa S. Transcription of the Tollip gene is elevated in intestinal epithelial cells through impaired O-

- GlcNAcylation-dependent nuclear translocation of the negative regulator Elf-1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2011;412:704-709.
- (22) Shuntaro T, Yuhui H, Daisuke U, Shuhei Y, Shuya Y, Motofumi K, Yoonhee K, Motoki M, Koji Y and Hirofumi T. 67-kDa Laminin Receptor-dependent Protein Phosphatase 2A (PP2A) Activation Elicits Melanoma-specific Antitumor Activity Overcoming Drug Resistance. *J Bio Chem*, 2014;289:32671-32681.
- (23) Yung-Taung J, Elena E, Solomou, Barbara R, George C.T. Phosphorylation and O-linked Glycosylation of Elf-1 Leads to Its Translocation to the Nucleus and Binding to the Promoter of the TCR ζ - Chain. *J Immunol*, 2002;168:2865-2871.
- (24) Yung-Taung J, Ying W, Guisen J, Hai-Bin P, Sukran E, Michelle F, Abigail M, Vasileios C.K, George C.T. PP2A dephosphorylates Elf-1 and determines the expression of CD3 ζ and FcR γ in human systemic lupus erythematosus T cells. *J Immunol*, 2008;181(5):3658-3664.
- (25) Kumazoe M, Yamashita M, Nakamura Y, Takamatsu K, Bar J, Yamashita S, Yamada S, Onda H, Nojiri T, Kangawa K, Tachibana H. Green tea

- polyphenol EGCG upregulates Tollip expression by suppressing Elf-1 expression. *J Immunol.* 2017;199:3261-3269.
- (26) Kobayashi Y, Mercado N, Barnes PJ, Ito K. Defects of Protein Phosphatase 2A Causes Corticosteroid Insensitivity in Severe Asthma. *PLoS ONE.* 2011; 6(12):e27627.
- (27) Zhelong X, SungRyul L, Jin H. Dual role of cyclic GMP in cardiac cell survival. *Int J Biochem Cell Biol*, 2013;45(8):1577-1584.
- (28) Kumazoe M, Sugihara K, Tsukamoto S, Huang Y, Tsurudome Y, Suzuki T, Suemasu Y, Ueda N, Yamashita S, Kim Y, Yamada K and Tachibana H. 67-kDa laminin receptor increases cGMP to induce cancer-selective apoptosis. *J Clin Invest.* 2013;123(2):787-799.
- (29) Zhang X, Goncalves R, Mosser MD. The Isolation and Characterization of Murine Macrophages. *Curr Protoc Immunol.* 2008;83:14.1.1-14.
- (30) Kruman I, Guo Q, Mattson PM. Calcium and reactive oxygen species mediate staurosporine-induced mitochondrial dysfunction and apoptosis in PC12 cells. *J Neurosci Res.* 1998;51(3):293-308.

- (31) Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science*, 2005;307(5712):1098-1101.
- (32) Lin YX, Lin K, Kang DZ, Liu XX, Wang XF, Zheng SF, Yu LH, Lin ZY. Similar PDK1-AKT-mTOR pathway activation in balloon cells and dysmorphic neurons of type II focal cortical dysplasia with refractory epilepsy. *Epilepsy Res*, 2015;112:137-149.
- (33) 厚生労働省 健康日本 21（総論）
- (34) Chan EC, Tie PP, Soh EY, Law YP. Antioxidant and antibacterial properties of green, black, and herbal teas of *camellia sinensis*. *Pharmacogn Res*, 2011;3:266–272.
- (35) Sae-tan S, Grove K. A, Joshua D Lambert. Weight control and prevention of metabolic syndrome by green tea. *Pharmacol Res*, 2011;64(2):146-54.
- (36) McDaniel LA, Alger MA, Sawyer KJ, Kelley LK, Kock DN, Brown JM, Temel ER, Rudel LL. Phytosterol feeding causes toxicity in ABCG5/G8 knockout mice. *Am J Pathol*. 2013;182(4):1131-8.

- (37) Wang HH, Afdhal HN, Wang Q-H D. Overexpression of estrogen receptor alpha increases hepatic cholesterologenesis, leading to biliary hypersecretion in mice. *J Lipid Res.* 2006;47(4):778-86.
- (38) Liu HY, Xiang NZ, Chen C, Wan SL, Chen CJ. Hypolipidemic and Hepatoprotective Effects of Polysaccharides Extracted from *Liriope spicata* Var. *Prolifera* in C57BL/6J Mice with High-Fat Diet-Induced Hyperlipidemia. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2020;2020:8013189.
- (39) 廣高史. スタチン. *日大医誌* 2014;73 (2): 81–84.
- (40) Suzuki T, Kumazoe M, Kim Y, Yamashita S, Nakahara K, Tsukamoto S, Sasaki M, Hagihara T, Tsurudome Y, Huang Y, Maeda-Yamamoto M, Shinoda Y, Yamaguchi W, Yamada K, Tachibana H. Green tea extract containing a highly absorbent catechin prevents diet-induced lipid metabolism disorder. *Sci Rep*, 2013;3:2749.
- (41) Yamashita M, Kumazoe M, Nakamura Y, Won SY, Bae J, Yamashita S, Tachibana H. The combination of green tea extract and eriodictyol inhibited high-fat/high-sucrose diet-induced cholesterol upregulation is accompanied by suppression of cholesterol synthesis enzymes. *J Nutr Sci Vitaminol.* 2016;62(4):249-256.

- (42) Siegel RL, Miller KD, Jemal A, Cancer statistics, CA cancer, J. Clin, 2015;64:5e29.
- (43) Georgios G, Vincent PG, Jun Y, Ding D, Jonathan AT, Ammar AJ, Laura DW, Richard AB, John LC, Martin AM, Matthew JW, Jin H, Christopher L Wolfgang . Circulating Tumor Cells Dynamics in Pancreatic Adenocarcinoma Correlate With Disease Status: Results of the Prospective CLUSTER Study. Ann Surg, 2018 Sep;268(3):408-420.
- (44) Margaret AT, Mokenge PM, Mahmoud Al-H, Stephen WB, Al BB, Dana BC, E Gabriela C, Vincent C, Brian C, Marco DC, Mary D, Timothy RD, Efrat D, Cristina RF, Christos F, Jeffrey H, William GH, Kelsey K, Andrew HK, John WK, Noelle L, Andrew ML, Cassadie M, Eric KN, Amol KN, Jorge O, Patricio MP, Sushanth R, Marsha R, Courtney S, Jeanne S, Charles V, Robert A W, Brian M W, Beth L, Giby VG. Pancreatic Adenocarcinoma, Version 2.2021, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. J Natl Compr Canc Netw, 2021;19(4):439-457.
- (45) Hermann PC, Huber SL, Herrler T, Aicher A, Ellwart JW, Guba M, Bruns CJ, Heeschen C. Distinct populations of cancer stem cells determine tumor

- growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. *Cell Stem Cell*, 2007;1(3):313-323.
- (46) Penchev VR, Rasheed ZA, Maitra A, Matsui W, Heterogeneity and targeting of pancreatic cancer stem cells. *Clin Cancer Res*, 2012;18(16):4277-4284.
- (47) Sergeant G, Vankelecom H, Gremeaux L, Topal B, Role of cancer stem cells in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Nat Rev Clin Oncol*, 2009;6:580-586.
- (48) Takimoto E, Champion HC, Li M, Belardi D, Ren S, Rodriguez ER, Bedja D, Gabrielson KL, Wang Y, Kass DA. Chronic inhibition of cyclic GMP phosphodiesterase 5A prevents and reverses cardiac hypertrophy. *Nat Med*, 2005, 11: 214-222.
- (49) Arthur L Burnett. The role of nitric oxide in erectile dysfunction: implications for medical therapy. *J Clin Hypertens (Greenwich)*, 2006;8(12 Suppl 4):53-62.
- (50) Steiner MK, Preston IR, Klinger JR, Hill NS. Pulmonary hypertension: inhaled nitric oxide, sildenafil and natriuretic peptides. *Curr Opin Pharmacol*, 2005;(3):245-50.

- (51) Holness MJ, Sugden MC. Regulation of pyruvate dehydrogenase complex activity by reversible phosphorylation. *Biochem Soc Trans*, 2003;31(Pt 6):1143-51.
- (52) Yamashita M, Kumazoe M, Onda H, Hiroi S, Shimada Y, Fujimura Y, Tachibana H. PPAR/PDK4 pathway is involved in the anticancer effects of cGMP in pancreatic cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 2023;672:154-160.
- (53) Shah JA, Vary JC, Chau TT, Bang ND, Yen NT, Farrar JJ, Dunstan SJ, Hawn TR. Human TOLLIP regulates TLR2 and TLR4 signaling and its polymorphisms are associated with susceptibility to tuberculosis. *J Immunol*, 2012;189(4):1737-1746.
- (54) Justin MO, Shwu-Fan M, Fernando JM, Kevin JA, Ganesh R, David AS, Eleanor V, Leah W, Cathryn L, Rekha V, Yong H, Mary ES, and Imre N. TOLLIP, MUC5B, and the Response to N-Acetylcysteine among Individuals with Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2015;192(12):1475-1482.
- (55) Ryan JC, Wu Q, Shoemaker RC. Transcriptomic signatures in whole blood of patients who acquire a chronic inflammatory response syndrome (CIRS)

following an exposure to the marine toxin ciguatoxin. BMC Med Genomics, 2015;8:15.

(56) Lord K.A, Hoffman-Liebermann B, Liebermann D.A. Nucleotide sequence and expression of a cDNA encoding MyD88, a novel myeloid differentiation primary response gene induced by IL6. Oncogene, 1990;5(7):1095-7.

(57) Nojiri T, Hosoda H, Tokudome T, Miura K, Ishikane S, Otani K, Kishimoto I, Shintani Y, Inoue Masayoshi, Kimura T, Sawabata N, Minami N, Nakagiri T, Funaki S, Takeuchi Y, Maeda H, Kidoya H, Kiyonari H, Shioi G, Arai Y, Hasegawa T, Takakura N, Hori M, Ohno Y, Miyazato M, Mochizuki N, Okumura M, and Kangawa K. Atrial natriuretic peptide prevents cancer metastasis through vascular endothelial cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2015;112(13):4086-4091.

(58) Byun E, Toshinori O, Koji Y, Hirofumi T. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate inhibits TLR2 signaling induces by peptidoglycan through the polyphenol sensing molecule 67-kDa laminin receptor. FEBS Letters, 2011;585:814-820.

- (59) Josias B.F, Paolo R.E, Antonio C.N. Toll-Like Receptors' Pathway Disturbances are Associated with Increased Susceptibility to Infections in Humans. *Arch Immunol Ther Exp*, 2013;61:427-443.
- (60) Witztum JL, Steinberg D. Role of oxidized low-density lipoprotein in atherogenesis. *J Clin Invest*, 1991;88:1785-1792.
- (61) Yla-Herttuala S, Palinski W, Rosenfeld ME, Parthasarathy S, Carew TE, Butler S, Witztum JL, Steinberg D. Evidence for the presence of oxidatively modified low density lipoprotein in atherosclerotic lesions of rabbit and man. *J Clin Invest*, 1989;84:1086-1095.
- (62) Kuhin DJ, Burns AC, Kazi A, Dou QP. Direct inhibition of the ubiquitin-proteasome pathway by esterbond-containing green tea polyphenols is associated with increased expression of sterol regulatory element-binding protein 2 and LDL receptor. *Biochem Biophys Acta*, 2004;1682:1-10.
- (63) Bursill CA, Roach PD. Modulation of cholesterol metabolism by the green tea polyphenol (-)-epigallocatechin gallate in cultured human liver (HepG2) cells. *J Agric Food Chem*, 2006;54:1621-1626.

- (64) Sarma DN, Barrett ML, Chavez ML, Gardiner P, Ko R, Mahady GB, Marles RJ, Pellicore LS, Giancaspro GI, Low DT. Safety of green tea extracts: a systematic review by the US Pharmacopeia. *Drug Saf*, 2008;31:469-484.
- (65) Choe HH, Cai Y, Hakim IA, Crowell JA, Shahi F, Brooks CA, Corr RT, Hara Y, Alberts DS. Pharmacokinetics and safety of green tea polyphenols after multipledose administration of epigallocatechin gallate and polyphenon E in healthy individuals. *Clin Cancer Res*, 2003;9:3312-3319.
- (66) Hara Y. Influence of tea catechins on the digestive tract. *J Cell Biochem Suppl*, 1997;27:52-58.
- (67) Chan PC, Ramot Y, Malarkey DE, Blackshear P, Kissling GE, Travlos G, Nyska A. Fourteen-week toxicity study of green tea extract in rats and mice. *Toxicol Pathol*, 2010;38:1070-1084.
- (68) Miyake Y, Salurai C, Usuda M, Fukumoto S, Hiramitsu M, Sakaida K, Osawa T, Kondo K. Difference in plasma metabolite concentration after ingestion of lemon flavonoids and their aglycones in humans. *J Nutr Sci Vitaminol*, 2006;52:54-60.
- (69) Yoshitomi R, Yamamoto M, Kumazoe M, Fujimura Y, Yonekura M, Shimamoto Y, Nakasone A, Kondo S, Hattori H, Haseda A, Nishihira J,

- Tachibana H. The combined effect of green tea and α -glucosyl hesperidin in preventing obesity: a randomized placebo-controlled clinical trial. *Sci Rep*. 2021;11(1):19067.
- (70) Zheng X, Carstens JL, Kim J, Scheible M, Kaye J, Sugimoto H, Wu C, LeBleu VS, Kalluri R, Epithelial-to-mesenchymal transition is dispensable for metastasis but induces chemoresistance in pancreatic cancer, *Nature*, 2015;527(7579):525-530.
- (71) Hotz B, Arndt M, Dullat S, Bhargava S, Buhr HJ, Hotz HG, Epithelial to mesenchymal transition: expression of the regulators snail, slug, and twist in pancreatic cancer. *Clin Cancer Res*, 2007;13(16):4769-4776.
- (72) Sugden MC, Holness MJ. Mechanisms underlying regulation of the expression and activities of the mammalian pyruvate dehydrogenase kinases. *Arch Physiol Biochem*. 2006;112(2006): 139-149.
- (73) Kahn M. Can we safely target the WNT pathway? *Nat Rev Drug Discov*, 2014;13:513-532.
- (74) Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science*, 1956;123(3191):309-314.

- (75) Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*, 2009;324(5930):1029-1033.
- (76) Gough NR. Rewiring the metabolism of cancer cells. *Sci Signal*, 2014;7(347).

謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました九州大学大学院農学研究院食糧化学分野の立花宏文教授に感謝し厚く御礼申し上げます。

本論文の作成にあたり、副査としてご助言賜りました栄養化学分野の佐藤匡央教授、食糧化学分野の藤村由紀准教授に心から感謝致します。

また、日々研究を進めるにあたり、御指導、御協力を賜りました食糧化学分野の熊添基文助教に深謝の意を表します。

実験の実施にあたり御協力賜りました恩田弘明氏に深く感謝致します。

食糧化学研究室の皆様には、本研究の遂行にあたり多大な御助言、御協力頂きました。ここに感謝の意を表します。

最後に、これまで温かく応援してくれた家族に心から感謝致します。