

氏名	高橋 淳
博士の専攻分野の名称	博士 (理学)
学位記号番号	博理工甲第 934 号
学位授与年月日	平成 26 年 3 月 24 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	緑茶カテキンと抹茶様香気画分によるヒト慢性疾患に対する医生物学的研究
論文審査委員	委員長 連携教授 菅沼 雅美 委員 教授 坂井 貴文 委員 教授 小林 哲也 委員 教授 森安 裕二

## 論文の内容の要旨

日本は世界でも有数の長寿国であり、更に高齢化が進むと予測されている。このような状況において、単なる寿命の延長ではなく、健康で支障なく日常生活を送れる期間、いわゆる「健康寿命」を伸ばすことが強く望まれている。健康寿命を延長するためには、がん、脳卒中、心臓病や認知症などの慢性疾患に対する予防対策が必要である。緑茶 (*Camellia sinensis*) は日本人が日常的に飲用する飲み物であるが、がんやアルツハイマー病などのいろいろな慢性疾患に対する予防効果が認められており、健康寿命の延長に役立つ飲み物として期待されている。緑茶生産に関わる研究者として、緑茶成分の慢性疾患に対する予防効果を科学的に解明することは重要な課題である。本研究では、緑茶カテキンである (-)-epigallocatechin gallate (EGCG) と緑茶香気成分の 2 つの緑茶成分を用いて、がんとアルツハイマー病を対象とし、下記の 2 つの課題で基礎研究を行った。

### 1. 緑茶カテキンによる肺がん細胞の硬化作用とがん転移抑制機構

緑茶、および、緑茶カテキン (EGCG) のがん予防効果は、基礎研究と臨床第 II 相試験で証明されているが、さらに、がん転移抑制効果を持つことが動物実験で報告されている。EGCG による転移抑制機構を明らかにすることを目的に本研究を行った。最近、がん細胞の弾性はがんの転移に関与する新しい物理学的指標として注目されている。この細胞弾性の解析と分子生物学的アプローチによって、EGCG の転移抑制機構を明らかにできると考えた。肺がんはがんの死因第一位であり、転移率が高いので本研究では肺がん細胞に対する効果を検討した。

始めに肺がん細胞株 6 種類 (腺がん A549, H322、扁平上皮がん H1703, LC-AI、大細胞がん H1299, Lu99) について細胞弾性を原子間力顕微鏡 (AFM) で測定した。細胞弾性を示すヤング率は A549 : 2.71 kPa, H322 : 3.01 kPa, H1703 : 3.18 kPa, LC-AI : 1.44 kPa, H1299 : 1.75 kPa, Lu99 : 1.66 kPa であり、ヤング率が 2.5 kPa 以上の硬い細胞と 1.8 kPa 以下の軟らかい細胞に分類できた。次に、これらの肺がん細胞の運動能を wound healing 法と transwell 法で測定し、小さいヤング率の 3 種の肺がん細胞は、大きいヤング率の 3 種の肺がん細胞に比べ、高い運動能を示すことを見出した。運動能はがん転移能を反映するので、転移能の高い細胞は小さいヤング率、(弱い弾性) を示すことが明らかとなった。次に、EGCG を転移

能の高いH1299とLu99細胞に処理し、細胞弾性の変化と運動能の抑制効果を検討した。おもしろいことに、50  $\mu$ M EGCGは2つの肺がん細胞のヤング率を約2倍増加（細胞を硬化）し、これに伴って、運動能を抑制した。がん転移において、上皮・間葉転換（EMT）が生じてがん細胞が高い運動能を獲得することが報告されている。事実、wound healing法で移動先端にある細胞では、EMT関連タンパク質であるvimentinとSlugの発現が特異的に亢進していた。この時、EGCG処理はこれらのタンパク質発現を抑制した。次に、作用機構を明らかにするため、細胞膜の構成を変化させるmethyl- $\beta$ -cyclodextrin (M $\beta$ CD)を処理し、同様な効果が得られるか検討した。M $\beta$ CD (10 mM)の処理は細胞を硬化し、wound healing法における移動先端の細胞でのEMT関連タンパク質の発現と運動能を抑制した。これらの結果から、EGCGが細胞膜を硬く変化させ、その結果シグナル伝達を抑制してEMT関連タンパク質の発現を抑制することにより、運動能を抑制することが明らかとなった。

## 2. 抹茶様香気画分による線虫に対するヒト型アミロイド $\beta_{42}$ 毒性の抑制

アルツハイマー病（AD）の患者は、日本ではおよそ200万人いると推定されており、ADの予防や進行遅延のための新しい方法の開発は緊急の課題である。ADはアミロイド $\beta$ ペプチド（A $\beta_{42}$ ）が脳に蓄積し、神経細胞に対して毒性を示し発症すると理解されている。最近、緑茶カテキンがA $\beta_{42}$ の毒性を抑制することが報告され、現在、ドイツでは緑茶カテキンによるアルツハイマー病の臨床介入試験が行われている。

一方、緑茶カテキン以外の機能性成分として緑茶香気成分が注目されている。これまで緑茶香気成分分析は行われているが、その機能性は明らかではない。本研究では、緑茶特有の香気を示す「抹茶様香気画分」を長谷川准教授らとの共同研究で分画し、ヒト型A $\beta_{42}$ 遺伝子を導入した温度感受性線虫CL4176を用い、A $\beta_{42}$ 毒性の抑制効果を検討した。香気画分は次のような手順で得た。茶業研究所で生産した茶葉をhexaneで抽出した「ヘキササン抽出物」を得て、更にクーゲルローア蒸留によって「焙じ香気画分」と「抹茶様香気画分」に分画し、シリカゲルカラムで「抹茶様香気画分」を更に分画したフラクションを得た。A $\beta_{42}$ の毒性抑制は線虫のパラリシス誘導の抑制と寿命期間の延長で評価した。パラリシスはCL4176の3齢幼虫を非許容温度25 $^{\circ}$ Cに移した後20時間後から始まり28時間後にはほぼ100%の線虫で認められる。100  $\mu$ g/mlの「抹茶様香気画分」は有意にパラリシスの発生を遅延し、発生率を抑制した。更にシリカゲルカラム精製により得られた抹茶様香気を有するフラクション10が特異的にパラリシスを抑制した。次に、CL4176のyoung adultを25 $^{\circ}$ Cに移すとパラリシスは生じず、寿命が短縮される。この系で検討した結果、「抹茶様香気画分」のみが、有意な寿命延長効果を示した。

A $\beta_{42}$ 毒性は、A $\beta_{42}$ の凝集によって生じる酸化ストレスが関与することが報告されているので抗酸化能を $\beta$ -carotene退色法で検討した。「抹茶様香気画分」が他の画分に比べて強い抗酸化能を示し、A $\beta_{42}$ 毒性の抑制活性と良く一致した。

緑茶特有の香気成分として「抹茶様香気画分」を分画し、これにA $\beta_{42}$ 毒性を抑制する活性があることを始めて見出した。

以上の結果は、緑茶ががんやアルツハイマー病の進展を予防して健康寿命を延ばす効果的な飲み物であることを支持するものである。

## 論文の審査結果の要旨

高橋淳氏（申請者）の提出した学位論文について、本論文の審査委員会は平成 26 年 2 月 4 日に理学部講義実験棟 2 番教室において公開で発表会を開催し、詳細な質疑を行って審査した。以下に、審査結果の概要を示す。

本論文は、緑茶成分による慢性疾患に対する予防効果に関する 2 つの研究成果、1) 緑茶カテキンによるがん転移抑制機構、と 2) 抹茶様香気画分によるアルツハイマー病の原因であるアミロイド  $\beta$  毒性の抑制効果をまとめたものである。

我々日本人が日常飲用する緑茶 (*Camellia sinensis*) に、がん予防効果を始め、高脂血症、心疾患やアルツハイマー病の予防効果があることはよく知られている。特に緑茶カテキンのがん予防効果は、動物実験だけでなく、疫学調査、さらに、大腸ポリープ再発予防の臨床介入試験で証明されている。その有効成分は (-)-epigallocatechin gallate (EGCG) を代表とする緑茶カテキンによると理解されており、EGCG が多面的効果を持つことが報告されている。EGCG の飲用が、がん転移も抑制することが 1992 年に報告されているが、その作用機構は明らかではない。高橋氏は、EGCG のがん転移抑制機構を解明するため、分子生物学的、細胞生物学的解析に加え、最近がん細胞の新しい特性として注目されている「細胞弾性」の物理学的解析を行い、その新しい知見を第一章にまとめている。次に、近年、痴呆症の治療に香気成分が注目されていることから、高橋氏は緑茶香気成分について研究を行った。緑茶香気の研究は盛んに行われているが、緑茶特有の香気成分は明らかではなく、またその効能も報告されていない。高橋氏は、緑茶葉から緑茶特有の香りを持つ「抹茶様香気画分」を抽出し、この画分に、アルツハイマー病の原因であるアミロイド  $\beta$  の毒性を抑制する活性を初めて見出し、その研究結果を第二章にまとめている。

第一章では、「緑茶カテキン EGCG による肺がん細胞の硬化作用とがん転移抑制機構」の研究成果について記述している。高橋氏は、原子間力顕微鏡によって測定した細胞弾性とがん転移能との関連を 6 種の肺がん細胞株を用いて検討し、運動能の高い細胞は小さいヤング率（軟らかい細胞弾性）を持つことを明らかにした。臨床的に転移率の高い大細胞がん細胞 H1299 と Lu99 が軟らかい弾性を示すことに注目し、次に、これらの細胞に対する EGCG の効果を検討した。EGCG 処理は、大細胞がん細胞の弾性を約 2 倍大きく、すなわち、細胞を硬化し、wound healing 法で測定する運動能を抑制することを見出した。がん細胞は、遺伝子発現パターンを上皮細胞様から間葉系細胞様に変化させる、いわゆる、上皮・間葉転換 (EMT) を生じて高い運動能や浸潤能を獲得すると理解されている。高橋氏は、wound healing 法で移動先端にある細胞では間葉系マーカータンパク質である vimentin と Slug の発現が亢進していることを確認した。次にその EMT 誘導を示す遺伝子発現を EGCG が特異的に抑制することを明らかにした。さらに、細胞膜構造を変化させる methyl- $\beta$ -cyclodextrin が、細胞弾性の硬化、EMT と運動能の抑制において、EGCG と同様の作用を示すことから、EGCG は細胞膜を硬化して EMT 誘導のシグナル伝達を抑制すると結論した。この研究成果は、新しいがん転移抑制機構を示すものであり、高く評価できる。

第二章では、「抹茶様香気画分による線虫に対するヒト型アミロイド  $\beta_{42}$  毒性の抑制」の研究成果について記述している。高橋氏は、緑茶葉のヘキサソ抽出物をさらにクーゲルローア蒸留法によって蒸留物と蒸留残渣に分画し、それぞれの香気の特徴から、蒸留物を「焙じ香気画分」、蒸留残渣を「抹茶様香気画分」と命名した。高橋氏は緑茶香気成分によるアルツハイマー病の予防効果を明らかにするため、ヒト型アミロイ

ドβペプチド (Aβ) を遺伝子導入した線虫 CL4176 を用いてこの香気画分の効果を検討している。CL4176 の L3 幼虫を非許容温度に移すと Aβ が筋肉中に過剰発現し、線虫は麻痺を起こす。この実験系で、抹茶様香気画分は、有意に麻痺の誘導時間を遅らせた。さらに、CL4176 の young adult を非許容温度に移した場合、Aβ の毒性は寿命の短縮として観察される。この実験系においても、抹茶様香気画分は、寿命を延長し、Aβ 毒性を抑制することを示した。さらに、抹茶様香気画分をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで分画すると、抹茶様香気を有した画分に麻痺の抑制効果が認められることから、高橋氏は抹茶様香気を示す化合物が、Aβ 毒性の抑制の鍵成分であると結論している。さらに、抹茶様香気画分が香気画分の中で最も強い抗酸化活性を持つことを見出しており、抗酸化効果が Aβ 毒性の抑制機構であると推測している。本研究は、緑茶特有の香気として抹茶様香気画分を分画し、その画分に、アルツハイマー病の一因として考えられている Aβ 毒性の抑制効果があることを初めて明らかにした。本研究成果はアルツハイマー病予防の研究に新しい知見をもたらす意義の高い研究である。

本論文は、がん転移抑制の新しい作用機構を示し、また、アルツハイマー病の予防に役立つ新しい緑茶成分を明らかにしており、慢性疾患の予防研究に新しい展開をもたらすものである。高橋氏は、本論文の第一章の内容を第一著者として査読付き英語論文 *Biochem. Biophys. Res. Commun.* に発表し、第二章の内容は日本農芸化学会誌に投稿し revision を済ませている。以上の結果から、本審査委員会は、本学位論文を博士(理学)の学位を授与するに値するものと判断し、学位論文として合格と判定した。