

## 緑茶抽出物におけるヒト肝ガン細胞の増殖抑制効果に およぼすROS産生の役割

久保田 芳美、湯浅(小島) 明子、湯浅 勲

大阪市立大学大学院生活科学研究科

### Role of intracellular reactive oxygen species in green tea extract-induced inhibition of cell growth in human hepatoma HepG2 cells

Yoshimi Kubota, Akiko Kojima-Yuasa and Isao Matsui-Yuasa

*Graduate School of Human Life Sciences, Osaka City University*

#### Summary

Epidemiological and animal studies have indicated that consumption of green tea is associated with a reduced risk of developing certain forms of cancer. However, the inhibitory mechanism of green tea in carcinogenesis has not been well established. In this study, the involvement of intracellular reactive oxygen species (ROS) in green tea extract (GTE)-induced inhibition of cell growth in human hepatoma HepG2 (HepG2) cells was tested. We found that GTE decreased cell viability and inhibited cell proliferation in HepG2 cells but not in NIH3T3 cells and primary cultured rat hepatocytes used as normal cells. Furthermore, our results demonstrated rapid increase of intracellular ROS and loss of mitochondrial membrane potential. We also showed that HepG2 cells have very low activities of antioxidative enzymes and therefore not able to scavenge ROS formed by GTE. These results suggest that the rapid increase of intracellular ROS levels after addition of GTE triggers off inhibition of cell growth in HepG2 cells.

**Keywords** : 緑茶抽出物 *Green tea extract*, 活性酸素種 *Reactive oxygen species (ROS)*

ヒト肝ガン細胞 *Human hepatoma HepG2 cells*

ミトコンドリア膜電位 *Mitochondrial membrane potential*, 抗酸化系酵素 *Antioxidative enzymes*

#### I. 緒言

緑茶は古くから日本人に親しまれている嗜好品であると同時に、抗酸化作用、抗菌・抗ウイルス作用、血圧上昇抑制効果、肝傷害保護効果など生体調節作用を有する食品であることが知られている<sup>1)</sup>。さらに、緑茶の生理作用のなかで、特に注目されているのが抗ガン作用である。緑茶のガン予防効果が疫学的に報告されて以来<sup>2-9)</sup>、緑茶の抗ガン作用メカニズムについての研究が数多く報告されている。すなわち、緑茶の主要構成成分である緑茶ポリフェノールは、ガン化の第一段階である遺伝子突然変異(イニシエーション)を抑制することが明

らかにされている<sup>10-12)</sup>。また、当研究室ではすでに、緑茶抽出物および緑茶ポリフェノールによるガン細胞増殖抑制効果の作用メカニズムについて、細胞内SH化合物量が減少すること<sup>13)</sup>、シトクロムcの放出とカスパーゼ活性を亢進させることによってアポトーシスを誘導すること、アポトーシスの誘導にはMAPキナーゼおよびカスパーゼカスケードが関係すること<sup>14,15)</sup>、さらに、細胞増殖を制御するRetinoblastoma (Rb) タンパクのリン酸化を抑制すること<sup>16)</sup>を明らかにしている。

発ガンに深く関与する物質として、活性酸素種(reactive oxygen species; ROS)があげられる。ROSには

スーパーオキシド ( $O_2 \cdot^-$ ), ヒドロキシルラジカル ( $\cdot OH$ ), アルコキシラジカル (LOOH), 過酸化水素 ( $H_2O_2$ ) などの種類がある。ROSはその反応性の高さから、レドックスバランスすなわち生体内における分子の酸化還元状態を変化させることが知られている。薬物、金属、虚血、ストレス、喫煙などによって生じた過剰なROSは、連鎖反応を引き起こし、生体に悪性腫瘍をはじめとした様々な疾病や老化などを誘発させる。

一方、好気性生物は生体防御機能としてROS消去システム(抗酸化作用)を有する<sup>17)</sup>。生体内の主な抗酸化系酵素として、細胞質、ミトコンドリアに多く存在するスーパーオキシドジスムターゼ(SOD)やグルタチオンペルオキシダーゼ(GSH-Px)、ペルオキシソームに存在するカタラーゼなどが挙げられる。さらに、GSH-Pxによる $H_2O_2$ の解毒作用に関与するグルタチオンやチオレドキシニンなどのSH化合物は、レドックスバランスに関与する重要な化合物である<sup>18)</sup>。

近年、ROSは組織や細胞内に対して傷害的に作用するだけでなく、増殖・分化へのシグナル伝達として作用するなどの生理的機能を有すると報告されている<sup>19, 20)</sup>。ROSに関する文献は数多く存在するが、ROS産生および生体内に対する作用メカニズムについてはいまだ明らかにされていない。

そこで本研究は、緑茶抽出物のヒト肝ガン細胞に対する増殖抑制作用におよぼす細胞内ROS産生に関与について検討した。

## II. 実験方法

### 1 試料

試料として緑茶熱水抽出物(GTE; 太陽化学(株)より提供)を用いた。GTEの組成をTable 1に示す。

Table 1. Qualitative and quantitative analysis of green tea extract (GTE)

	Percentage of GTE (w/w)
(+)-Catechin (C)	2.9
(-)-Epicatechin (EC)	6.8
(+)-Gallocatechin (GC)	12.8
(-)-Epigallocatechin (EGC)	16.5
(-)-Epicatechin gallate (ECG)	6.6
(-)-Epigallocatechin gallate (EGCG)	21.3
Caffeine	9.9
Carbohydrate	5.1
Amino acids, peptides	2.7
Ash	0.3
Others	15.1

## 2 細胞の調製

### a) ガン細胞

ガン細胞としてヒト肝ガン細胞(HepG2細胞)を用いた。HepG2細胞は10%牛胎児血清(FBS)を含むDulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)培地で37°C, 5% CO<sub>2</sub>インキュベーター内で3~4日間培養後、細胞数を $2.5 \times 10^5$  cells/mlになるように調整した。本培養として、10% FBSを含むDMEM培地に試料を添加して0~24時間培養後、実験に供した。

試料にはGTEを99%エタノールに溶解したものをを用いた。添加濃度は0~100 µg/mlとした。また、コントロール群には99%エタノールを添加した。

### b) 正常細胞

正常細胞として、ラット初代分離肝細胞およびマウス線維芽細胞(NIH3T3細胞)を用いた。

肝細胞は、7~8週齢のSprague-Dawley系雄性ラットの肝臓をコラゲナーゼ液で灌流した後、低速遠心によって分離した<sup>21)</sup>。分離肝細胞は10% FBSおよびインスリン、デキサメサゾンを含むWilliam's E培地に $2.5 \times 10^5$  cells/mlになるように調整して一晩培養した。本培養として10% FBSおよびインスリン、デキサメサゾンを含むWilliam's E培地に試料を添加して0~24時間培養後、実験に供した。

NIH3T3細胞は10% FBSを含むDMEM培地で37°C, 5% CO<sub>2</sub>インキュベーター内で3~4日間培養後、細胞数を $5.0 \times 10^5$  cells/mlになるように調整した。本培養として、10% FBSを含むDMEM培地に試料を添加して0~24時間培養後、実験に供した。

試料にはGTEを99%エタノールに溶解したものをを用いた。添加濃度は0~100 µg/mlとした。また、コントロール群には99%エタノールを添加した。

## 3 細胞生存率の測定

細胞生存率の測定はNeutral Red法を用いた<sup>22)</sup>。本培養終了後、Neutral Red色素液を添加して、2時間培養した。1%ホルムアルデヒド-1%塩化カルシウム溶液で洗浄した後、脱色液として1%酢酸-50%エタノール溶液を添加した。室温で30分放置後、吸光度計(JASCO V-530)によって波長540nmにおける吸光度を測定した。

細胞生存率はコントロール群の値を100%とし、コントロールに対する割合で求めた。

## 4 DNA合成能の測定

細胞増殖能の指標として、酸不溶性画分に取り込まれ

た $^3\text{H}$ -チミジンの放射活性を測定した<sup>23, 24</sup>。

本培養終了1時間前に $^3\text{H}$ -チミジン (37 kBq/dish) を添加して培養後、細胞内に取り込まれた $^3\text{H}$ -チミジンの放射活性を液体シンチレーションカウンター (Beckman LS6500) によって測定した。

### 5 ミトコンドリア膜電位の測定

ミトコンドリア膜電位の測定はImbertiらの方法<sup>25</sup> に一部改良を加えて行った。

本培養終了30分前にrhodamine-123溶液を添加して培養後、Krebs-Ringer-HEPES bufferで細胞を回収した。遠心分離した後、上清を蛍光光度計 (Shimazu RF-540) によって励起波長505 nm, 蛍光波長525 nmにおける蛍光強度を測定した。

### 6 細胞内ROSの測定

細胞内ROSの測定として、非蛍光のDCFH-DA (2, 7'-dichloro fluorescein diacetate) が $\text{H}_2\text{O}_2$ に反応して蛍光のDCFに変化することから、その蛍光を測定することによって生成された $\text{H}_2\text{O}_2$ 量を求めた<sup>26</sup>。

本培養終了15分前に、DCFH-DA溶液 (最終濃度8  $\mu\text{M}$ ) を添加して培養後、HANKS bufferで細胞を回収した。細胞懸濁液をマルチラベルカウンター (Amersham Pharmacia Biotech, ARVOSx 1420) で励起波長485 nm, 蛍光波長505 nmにおける蛍光強度を測定した。

### 7 細胞内抗酸化系酵素活性の測定

細胞内に存在する主要なROS消去酵素であるグルタチオンペルオキシダーゼ活性<sup>27</sup>、カタラーゼ活性<sup>28</sup> およびスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) 活性<sup>29</sup> の測定を行った。

### 8 有意差検定

有意差検定には分散分析およびポストホックテストとしてFisherのPLSD法を使用し、有意水準は5%および1%とした。また、同一のアルファベット表示は各群間に有意差がないことを示す。

## III. 実験結果

### 1 細胞生存率におよぼすGTEの影響

ガン細胞 (HepG2細胞) および正常細胞 (NIH3T3細胞) の細胞生存率におよぼすGTEの影響を検討したところ、GTEはHepG2細胞の生存率を濃度依存的に低下させたが (Fig. 1), NIH3T3細胞の細胞生存率に影響を与えなかった (Fig. 2)。このことから、GTEはガン細胞に対し

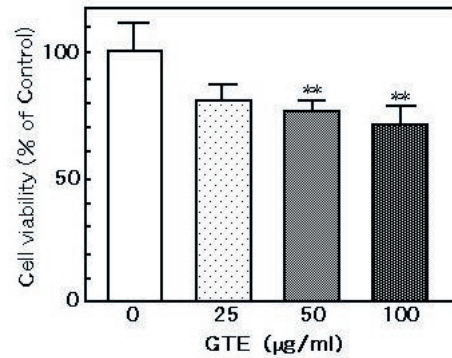


Fig. 1. Effect of GTE on cell viability in HepG2 cells

Cell viability was measured by the Neutral Red method. HepG2 cells were incubated with various concentrations of GTE for 24 hrs. Each bar is the mean ( $\pm$  S.D. ) of three experiments (\*\*  $P < 0.01$  compared with Control; non-GTE-treated cultures).

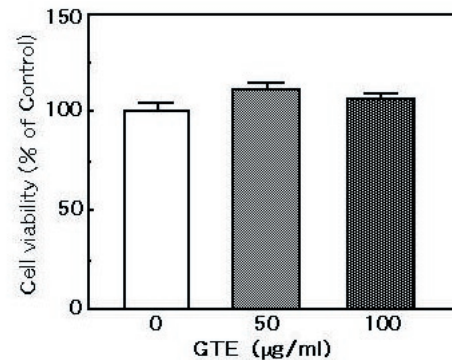


Fig. 2. Effect of GTE on cell viability in NIH3T3 cells

Cell viability was measured by the Neutral Red method. NIH3T3 cells were incubated with various concentrations of GTE for 24 hrs. Each bar is the mean ( $\pm$  S.D. ) of three experiments.

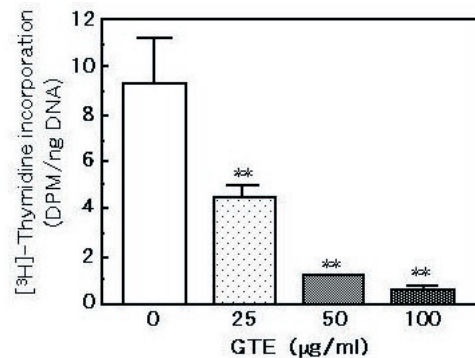


Fig. 3. Effect of GTE on DNA synthesis in HepG2 cells

Cells were incubated with various concentrations of GTE for 24 hrs. Each bar is the mean ( $\pm$  S.D. ) of three experiments (\*\*  $P < 0.01$  compared with Control; non-GTE-treated cultures).

て特異的に細胞生存率を低下させることが示唆された。

### 2 HepG2細胞の細胞増殖能におよぼすGTEの影響

ガン細胞の細胞増殖能におよぼすGTEの影響を調べ

るためにDNA合成能を測定したところ、GTEはHepG2細胞のDNA合成能を濃度依存的に抑制した (Fig. 3)。

### 3 HepG2細胞の細胞増殖能におよぼすGTE曝露時間の影響

GTEによるガン細胞増殖抑制効果は、培養開始後いつから誘導されるのかを検討した。HepG2細胞にGTE (100 µg/ml) を添加し0 ~ 24時間培養後、GTEを含まないDMEM培地に交換した。また、培養時間はすべて24時間とし、その後DNA合成能を測定した。

GTEを30分間曝露させることにより、HepG2細胞のDNA合成能は有意に抑制された (Fig. 4)。このことから、GTE添加後30分以内に細胞増殖能抑制のスイッチが入ったことが示唆された。

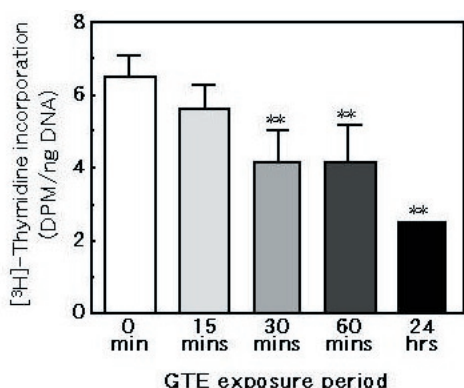


Fig. 4. Effect of exposure period to GTE on HepG2 cells  
Cells were exposed to 100 µg/ml GTE for 15, 30, 60 mins and 24 hrs and incubated again in fresh medium without GTE. Each bar is the mean (± S.D.) of three experiments (\*\* P < 0.01 compared with Control; non-GTE-treated cultures).

### 4 HepG2細胞のミトコンドリア膜電位におよぼすGTEの影響

ミトコンドリアはエネルギー物質であるATPを産生

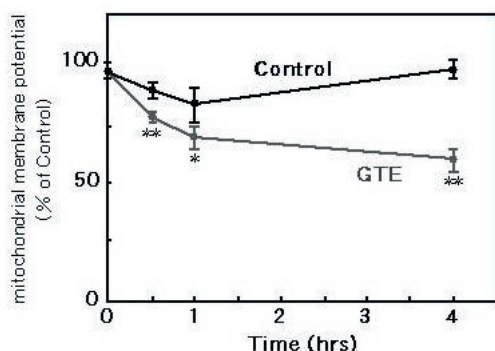


Fig. 5. Effect of GTE on mitochondrial membrane potential in HepG2 cells  
Cells were incubated with or without GTE (100 µg/ml). Each bar is the mean (± S.D.) of three experiments (\* P < 0.05, \*\* P < 0.01 compared with Control; non-GTE-treated cultures).

しており、細胞の機能に対して重要な役割を果たす。GTEは、ガン細胞に対して培養開始初期からすでに不可逆的な細胞増殖能の低下を引き起こしたため、同様にミトコンドリアにも影響をおよぼしていることが推察される。そこで、GTEのミトコンドリア膜電位におよぼす影響を調べた。

GTE (100 µg/ml) 添加群のミトコンドリア膜電位は、時間依存的に低下した。また、培養開始30分後におけるミトコンドリア膜電位は、すでにコントロール群に比べて有意に低下した (Fig. 5)。

### 5 細胞内活性酸素種 (ROS) におよぼすGTEの影響

GTEによるガン細胞増殖抑制効果にROSが関与するかを検討したところ、GTE (100 µg/ml) 添加群では培養開始15分後に細胞内ROSの顕著な増加が認められた (Fig. 6)。さらに、このROSの増加が正常細胞においても認められるかどうかを検討するため、初代分離肝細胞を用いて同様の実験を行った。その結果、肝細胞にGTEを添加するとROSがコントロール群に比べて増加

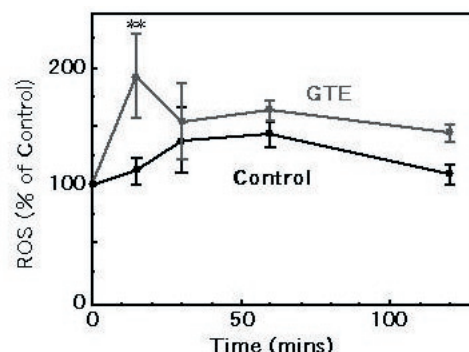


Fig. 6. Effect of GTE on intracellular reactive oxygen species (ROS) levels in HepG2 cells  
Cells were incubated with or without GTE (100 µg/ml). Each bar is the mean (± S.D.) of three experiments (\*\* P < 0.01 compared with Control; non-GTE-treated cultures).

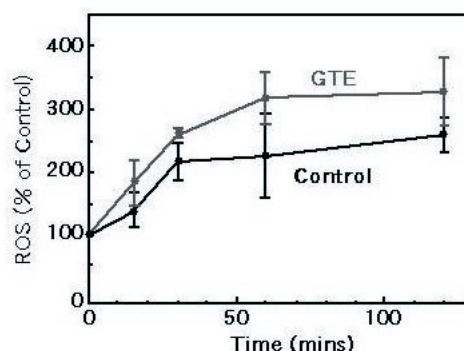


Fig. 7. Effect of GTE on intracellular reactive oxygen species (ROS) levels in hepatocytes  
Cells were incubated with or without GTE (100 µg/ml). Each bar is the mean (± S.D.) of three experiments.



したが、有意な差は認められなかった (Fig. 7)。

## 6 ガン細胞と正常細胞における抗酸化系酵素活性の比較

ガン化した細胞における抗酸化系酵素活性は、正常細胞に比べて低値を示すことが報告されている<sup>30)</sup>。そこで、HepG2細胞と初代分離肝細胞の主要な抗酸化系酵素活性を比較した。その結果、HepG2細胞におけるSOD活性、カタラーゼ活性およびグルタチオンペルオキシダーゼ活性は、肝細胞と比較して有意に低値を示した (Fig. 8)。

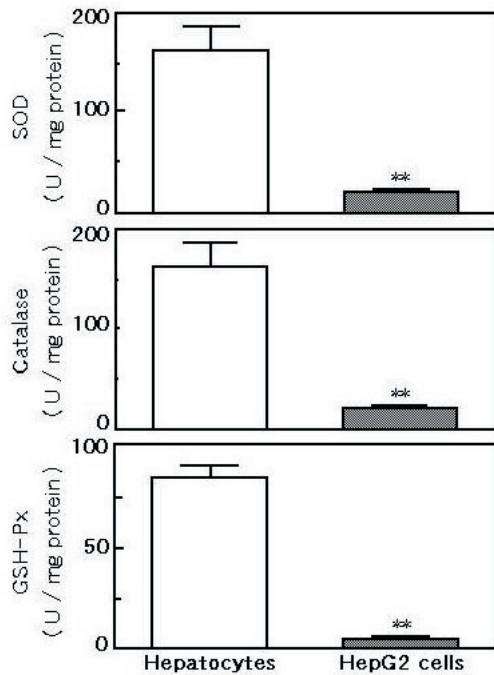


Fig. 8. Activities of antioxidative enzymes of hepatocytes and HepG2 cells

Each bar is the mean ( $\pm$ S.D.) of three experiments (\*\*  $P < 0.01$  compared with hepatocytes).

## 7 細胞内活性酸素種 (ROS) および細胞増殖抑制効果におよぼすカタラーゼの影響

ROSのなかでも $H_2O_2$ は膜透過性が高く、かつ易移動性であること、さらに $\cdot OH$ に変化しやすいため、細胞に多くの作用を誘導することが報告されている<sup>31)</sup>。そこで、 $H_2O_2$ を特異的に分解するカタラーゼを用いてGTE添加によって産生されるROSの消去を検討するため、HepG2細胞の培地にカタラーゼ (50 U/ml) を添加して5分間前培養後、本培養としてGTE (100  $\mu g/ml$ ) を添加し、本培養開始30分後の細胞内ROS量を測定した。その結果、カタラーゼはGTEによって引き起こされた細胞内ROSの増加を有意に抑制した (Fig. 9)。

さらに、GTEによるHepG2細胞の細胞増殖抑制効果

に対してカタラーゼが影響するかを検討するため、カタラーゼ (50 U/ml) を本培養開始5分前に添加した群と本培養開始30分後に添加した群におけるDNA合成能を測定した。

本培養開始5分前にカタラーゼを添加した群は、GTEによるDNA合成能抑制が有意に軽減されたが、本培養開始30分後にカタラーゼを添加した群は、GTEによるDNA合成能抑制効果に影響をおよぼさなかった (Fig. 10)。

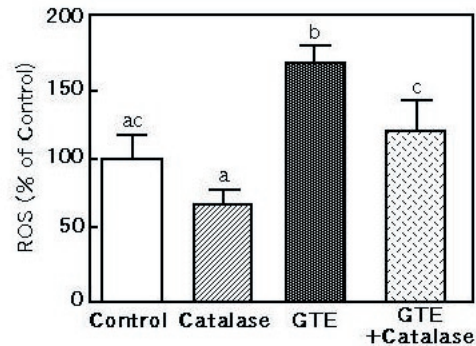


Fig. 9. Effect of exogenous catalase on GTE-induced generation of intracellular ROS in HepG2 cells

Catalase (50 U/ml) was added at 5 mins after the addition of GTE (100  $\mu g/ml$ ). Cells were harvested at 30mins after the addition of GTE and measured intracellular ROS.

Data not sharing common alphabet are significantly different ( $P < 0.01$ ) using Fisher's test.

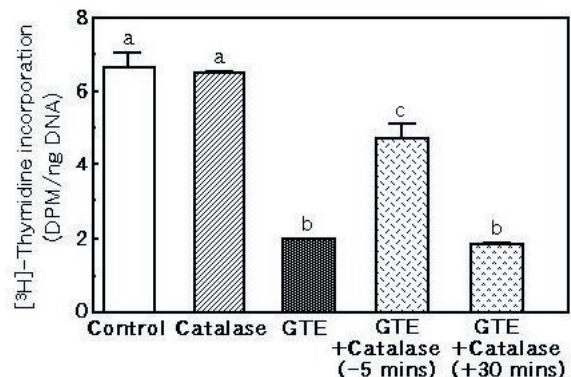


Fig. 10. Effect of exogenous catalase on GTE-induced DNA synthesis in HepG2 cells.

Catalase (50 U/ml) was added at 5 mins before or 30 mins after the addition of GTE (100  $\mu g/ml$ ). Data not sharing common alphabet are significantly different ( $P < 0.01$ ) using Fisher's test.

## IV. 考察

細胞内活性酸素種 (ROS) は、ガン、動脈硬化などの生活習慣病や老化に関与することが明らかにされており、そのメカニズムとして、ROSは細胞内レドックスバランスを変化させ、細胞内の構造や機能に対して様々な現象を誘導する引き金として作用することが示唆され

ている。特にROSのアポトーシスへの関与についての研究は、数多く報告されている<sup>32-36</sup>。近年、ROSがポリフェノールなどの植物中成分の生理作用に深く関与していることが報告されているが、ROS産生および生体内に対する作用メカニズムについてはいまだ明らかにされていない。

緑茶抽出物および緑茶ポリフェノールは、ガン細胞増殖抑制効果を有することがすでに明らかにされているが、ROSとの関係についての報告はほとんど見当たらない。そこで本研究は、緑茶抽出物のヒト肝ガン細胞に対する増殖抑制作用におよぼす細胞内ROS産生の関与について検討した。

ガン細胞にGTEを添加すると、培養初期よりミトコンドリア膜電位の低下と培養開始15分後に細胞内ROS量の顕著な増加が認められた。これらの現象はガン細胞に特異的であったことから、GTEのガン細胞増殖抑制作用には、ROSが関与していることが示唆された。

ミトコンドリア内膜には電子伝達系が存在し、ATP産生の際に常にスーパーオキシド ( $O_2\cdot^-$ ) が生成している。さらに過酸化水素 ( $H_2O_2$ ) が生じると、2価鉄イオンが豊富に存在するために、フェントン反応により容易にヒドロキシルラジカル ( $\cdot OH$ ) が生成し、脂質過酸化物、リン脂質ヒドロペルオキシドを生成する。これらのことから、ミトコンドリアはROSの発生源であると同時に最もROSの影響を受けやすい部位であると考えられる。

次に、GTEを添加した時に生成されたROSがカタラーゼなどの抗酸化系酵素によって消去されると、ガン細胞に対するGTEの効果は軽減された。しかし、GTEを30分間曝露させることにより、HepG2細胞のDNA合成能は有意に抑制されたことから、GTE添加後30分以内に細胞増殖能抑制のスイッチが入ったことが示唆された。これに引き続いて、細胞内ROSの増加と不可逆的なミトコンドリア膜電位の低下が誘導されたことから、ガン細胞の増殖が抑制されたことが明らかとなった。

そこで、GTEがROS ( $H_2O_2$ ) の増加を引き起こした理由として、次のようなことが推察される。植物成分の各種ポリフェノールは、一般的にオキシダント作用を有することが知られているが、一方、プロオキシダント作用も有するという報告がなされている<sup>37</sup>。3価鉄、 $O_2$ とポリフェノールを反応させると、ヒドロキシル ( $OH$ ) 基が金属イオンをキレートすることにより、ポリフェノール自身は酸化され、スーパーオキシド ( $O_2\cdot^-$ ) を産生し、さらにヒドロキシルラジカル ( $\cdot OH$ ) が生成される<sup>38</sup>。これらのことより、反応性の高いポリフェノールは、条件によって抗酸化と酸化促進の両方の作用をおよぼすと考えられる。このことから、本実験においてGTEによって生成された $H_2O_2$ は、SODによって生成されたものではなく、プロオキシダント作用によるものと推察される。

さらに、GTEによって生成された細胞内 $H_2O_2$ がアポトーシスを誘導するメカニズムとして、レドックスバランスの変化を受けてチオレドキシニンから遊離したASK (apoptosis regulating kinase) 1がシグナル伝達の重要な役割を果たすMAPキナーゼカスケードを活性化し<sup>14</sup>、細胞増殖にかかわるタンパクのチロシン残基のリン酸化<sup>13</sup>や、細胞増殖抑制に関与するRbタンパクの脱リン酸化の誘導<sup>16</sup>が挙げられる。

以上の結果から、ガン細胞はミトコンドリアなどに存在する抗酸化系酵素の活性が低いために、GTEによって生じた $H_2O_2$ を消去できず、レドックスバランスに変化を生じ、さらに細胞の重要な部位であるミトコンドリアの機能の低下とそれに引き続くシグナル伝達によって、細胞死および増殖抑制へと誘導されることが示唆された。

欧米でも緑茶はガン予防の可能性のある食品の1つに取り上げられており、緑茶によるガン予防の臨床試験が期待されている。ガン予防の臨床を行う上で重要なことは、そのメカニズムや代謝経路が明確に示される必要がある。実際に緑茶を飲用した時の血中濃度は正確には測定されておらず、また各臓器への蓄積量についても明らかにされていない。そのためGTEの抗ガン作用についてヒトに対する臨床応用する場合には、さらなる検討が必要であると考えられる。

欧米でも緑茶はガン予防の可能性のある食品の1つに取り上げられており、緑茶によるガン予防の臨床試験が期待されている。ガン予防の臨床を行う上で重要なことは、そのメカニズムや代謝経路が明確に示される必要がある。実際に緑茶を飲用した時の血中濃度は正確には測定されておらず、また各臓器への蓄積量についても明らかにされていない。そのためGTEの抗ガン作用についてヒトに対する臨床応用する場合には、さらなる検討が必要であると考えられる。

## V. 要約

緑茶抽出物 (GTE) のヒト肝ガン細胞に対する増殖抑制作用におよぼす細胞内ROS産生の関与について検討した結果、以下のことが明らかになった。

1. GTEはガン細胞に対して特異的に細胞生存率および細胞増殖能を抑制した。
2. GTEを30分間曝露させることによって、ガン細胞のDNA合成能は有意に抑制されたことから、GTE添加後30分以内に細胞増殖能抑制のスイッチが入ったことが示唆された。
3. これに引き続いて、細胞内ROSの増加と不可逆的なミトコンドリア膜電位の低下が誘導されたことから、ガン細胞の増殖が抑制されたことが明らかとなった。
4. ガン細胞の抗酸化系酵素の活性は正常細胞と比較して低値であった。

以上の結果から、ガン細胞はミトコンドリアなどに存在する抗酸化系酵素の活性が低いために、GTEによって生じたROSを消去できず、レドックスバランスに変化を生じ、さらに細胞の重要な部位であるミトコンドリアの機能の低下とそれに引き続くシグナル伝達によって、細胞死および増殖抑制へと誘導されることが示唆された。

## 引用文献

- 1) 村松敬一郎, 小國伊太郎, 伊勢村護, 杉山公男, 山本(前田)万里編：『茶の機能』学会出版センター, 東京, (2002)
- 2) Okuda, T., Kimura, Y., Yoshida, T. Hatano, T., Okuda, H. and Arichi, S.: Studies on the activities of tannins and related-compounds from medical-plants and drugs. 1. Inhibitory effects on lipid-peroxidation in mitochondria and microsomes of liver, Chem. Pharm Bull., 31: 1625-1631 (1983)
- 3) Agarwal, R., Katiyar, SK., Zaidi, SIA. and Mukhtar, H.: Inhibition of skin tumor promoter-caused induction of epidermal ornithinedecarboxylase in sencar mice by polyphenolic fraction isolated from green tea and its individual epicatechin derivatives, Cancer Res., 52: 3582-3588 (1992)
- 4) Takayama, S. and Kuwabara, N.: Long-term study on the effect of caffeine in Wistar rats, Jpn. J. Cancer Res., 73: 365-371 (1982)
- 5) 村松敬一郎編：『茶の科学』朝倉書店, 東京, 154-167 (1991)
- 6) Henry, JP. and Stephemslarson, P.: Reaction of chronic psychosocial hypertension in mice by decaffeninated tea, Hypertension, 6: 437-444 (1984)
- 7) Swiercz, R., Skrzypczak-Jankun, E., Merrell, MM., Selman, SH. and Jankun, J. :Angiostatic activity of synthetic inhibitor of urokinase type plasminogen activator, Oncol. Rep., 6: 523-526 (1999)
- 8) Cao, YH. and Cao, RH.: Angiogenesis inhibited by drinking tea, Nature 398: 381 (1999)
- 9) Garbisa, S., Biggin, S., Cavallarin, N., Sartor, L., Benelli, R. and Albini, A.: Tumor invasion, molecular shears blunted by green tea, Nature Medicine, 5: 1216 (1999)
- 10) Kuroda, Y. and Hara, Y.: Antimutagenic and anticarcinogenic activity of tea polyphenols, Mutat. Res.-Rev. Mutat., 436: 69-97 (1999)
- 11) 黒田行昭, 原 征彦:環境変異原研究, 21: 1 (1999)
- 12) 黒田行昭, 原 征彦:環境変異原研究, 21: 85 (1999)
- 13) Kennedy, DO., Matsumoto, M., Kojima, A. and Matsui-Yuasa, I.: Cellular thiols status and cell death in the effect of green tea polyphenols in Ehrlich ascites tumor cells, Chem.-Biol. Interactions, 122: 59-71 (1999)
- 14) Kennedy, DO., Kojima, A., Hasuma, T., Yano, Y., Otani, S. and Matsui-Yuasa, I.: Growth inhibitory effect of green tea extract and (-)-epigallocatechin in Ehrlich ascites tumor cells involves a cellular thiol-dependent activation of mitogenic-activated protein kinases, Chem.-Biol. Interactions 134: 113-133 (2001)
- 15) Kennedy, DO., Kojima, A., Yano, Y., Hasuma, T., Otani, S. and Matsui-Yuasa, I.: Growth inhibitory effect of green tea in Ehrlich ascites tumor cells involves cytochrome c release and caspase activation, Cancer Lett., 166: 9-15 (2001)
- 16) Kennedy, DO., Kojima, A., Moffatt, J., Yamagiwa, H., Yano, Y., Hasuma, T., Otani, S. and Matsui-Yuasa, I.: Cellular thiol status-dependent inhibition of tumor cell growth via modulation of Retinoblastoma protein phosphorylation by (-)-epigallocatechin, Cancer Lett., 179: 25-32 (2002)
- 17) 二木鋭雄, 島崎弘幸編：『抗酸化物質 フリーラジカルと生体防御』学会出版センター, 東京, (1994)
- 18) 谷口直之, 淀井淳司編：『酸化ストレス・レドックスの生化学』共立出版, 東京, (2000)
- 19) Sundaresan, M., Yu, ZX., Ferrans, VJ., Irani, K. and Finkel, T.: Requirement for generation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for platelet-derived growth-factor signal transduction, Science, 270: 296-299 (1995)
- 20) Bae, YS., Kang, SW., Seo, MS., Baines, IC., Tekle, E., Chock, PB. and Rhee, SG.: Epidermal Growth Factor (EGF)-induced generation of hydrogen peroxide -Role in EGF receptor-mediated tyrosine phosphorylation-, J. Biol. Chem., 272: 217-221 (1997)
- 21) 中村敏一：『初代培養肝細胞実験法』学会出版センター, 東京, (1987)
- 22) Hansen, MB., Nielsen, SE. and Berg, K.: Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell-growth cell kill, J. Immunol. Methods, 119: 203-210 (1989)
- 23) Omura, T., Yano, Y., Hasuma, T., Kinoshita, H., Matsui-Yuasa, I. And Otani, S.: Involvement of polyamines in retinoblastoma protein phosphorylation, Biochem.

- Biophys. Res. Commun., 250: 731-734 (1998)
- 24) Schneider, WC., Colowich, SA. and Kalplan, NO.: Determination of nucleic acids in tissues by pentose analysis, *Method Enzymol.*, 3: 680-684 (1957)
- 25) Imbertir, R., Nieminen, AL., Herman, B. and Lemasters JJ.: Mitochondrial and glycolytic dysfunction in lethal injury to hepatocytes by t-butylhydroperoxide-protection by fructose, cyclosporine-A and trifluoperazine, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 265: 392-400 (1993)
- 26) Cathcart, R., Schwiers, E. and Ames, BN.: Detection of picomole levels of hydroperoxides using a fluorescent dichlorofluorescein assay, *Anal. Biochem.*, 134: 111-116 (1983)
- 27) Lebel, CP. and Bondy, SC.: Sensitive and rapid quantitation of oxygen reactive species formation in rat synaptosomes, *Neurochem. Inter.*, 17: 435-440 (1990)
- 28) Curtin, JF., Donovan, M. and Cotter, TG.: Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis, *J. Immunol. Methods.*, 265: 49-72 (2002)
- 29) Park, SK., Boulton, RB. and Noble, AC.: Automated HPLC analysis of glutathione and thiol-containing compounds in grape juice and wine using pre-column derivatization with fluorescence detection, *Food Chem.*, 68: 475-480 (2000)
- 30) Bozzi, A., Mavelli, I., Finazziagro, A., Strom, R., Wolf, AM., Mondovi, B. and Rotilio, G.: Enzyme defense against reactive oxygen derivatives. 2. Erythrocytes and tumor-cells, *Mol. Cell Biochem.*, 10: 11-16 (1976)
- 31) Yang, GY., Liao, J., Kim, K., Yurkow, EJ. and Yang, CS.: Inhibition of growth and induction of apoptosis in human cancer cell lines by tea polyphenols, *Carcinogenesis*, 19: 611-616 (1998)
- 32) Yamauchi, N., Kuriyama, H., Watanabe, N., Neda H., Maeda, M. and Niitsu, Y.: Intracellular hydroxyl radical production induced by recombinant human-tumor necrosis factor and its implication in the killing of tumor-cells in vitro, *Cancer Res.*, 49: 1671-1675 (1989)
- 33) Buttke, TM. and Sandstrom, PA.: Oxidative stress as a mediator of apoptosis, *Immunol. Today*, 15: 7-10 (1994)
- 34) Mayer, M. and Noble, M.: N-acetyl-L-cysteine is a pluripotent protector against cell-death and enhancer of trophic factor-mediated cell-survival in vitro, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 7496-7500 (1994)
- 35) Jacobson, MD.: Reactive oxygen species and programmed cell death, *Trends Biochem. Sci.* 21: 83-86 (1996)
- 36) Saitoh, M., Nishitoh, H., Fujii, M., Takeda, K., Tobiume, K., Sawada, Y., Kawabata, M., Miyazono, K. and Ichijo, H.: Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1, *EMBO J.*, 17: 2596-2606 (1998)
- 37) Long, LH., Clement, MV. and Halliwell, B.: Artifacts in cell culture: Rapid generation of hydrogen peroxide on addition of (-)-epigallocatechin, (-)-epigallocatechin gallate, (+)-catechin, and quercetin to commonly used cell culture media, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 273: 50-53 (2000)
- 38) Laughton, MJ., Halliwell, B., Evans, PJ. And Hoult, JRS.: Antioxidant and pro-oxidant actions of the plant phenolics quercetin, gossypol and myricetin-effects on lipid-peroxidation, hydroxyl radical generation and bleomycin-dependent damage to DNA, *Biochem. Pharmacol.*, 38: 2859-2865 (1989)

## 緑茶抽出物におけるヒト肝ガン細胞の増殖抑制効果におよぼすROS産生の役割

久保田 芳美、湯浅(小島) 明子、湯浅 勲

**要旨**：緑茶抽出物 (GTE) のヒト肝ガン細胞に対する増殖抑制作用におよぼす細胞内ROS産生の関与について検討した。その結果、GTEはガン細胞に対して特異的に細胞生存率および細胞増殖能を抑制したこと、さらに、GTEを30分間曝露させることによって、ガン細胞におけるDNA合成能の有意な抑制とこれに引き続いて細胞内ROSの増加



と不可逆的なミトコンドリア膜電位の低下が誘導されたことから、GTE添加後30分以内に細胞増殖能抑制のスイッチが入り、ガン細胞の増殖が抑制されたことが明らかとなった。また、ガン細胞の抗酸化系酵素の活性は正常細胞と比較して低値であった。これらのことから、ガン細胞はミトコンドリアなどに存在する抗酸化系酵素の活性が低いために、GTEによって生じたROSを消去できず、レドックスバランスに変化を生じ、さらに細胞の重要な部位であるミトコンドリアの機能の

