

# NEWS LETTER

No.13 Sep 1997

## Japanese Society For Cancer Prevention 日本がん予防研究会

肝細胞がんに対する治療戦略  
—化学予防の導入

神野 健二  
(国立病院四国がんセンター臨床研究部長)

著者らは1983年1月よりSMANCSを懸濁溶解したLipiodolの動注に加え、経カテーテルの動脈塞栓術(TAE)を併用する肝細胞がん(HCC)の治療法(LpTAE療法)を考案し、その治療成績や病理学的な検討を継続している。現在ではLpTAE療法を中心に、手術切除療法、経皮的エタノール注入療法(PEIT)、さらには放射線、温熱療法を加え、各治療法の特徴を理論的に組み合わせ、HCCに対する集学的治療を展開している。一時期には、養子免疫療法を試みたこともある。それなりに、HCC患者の予後の改善に努力を続けてきた所存である。

しかし、1992年初夏にまとめた治療成績をみながら、HCCの予後の不良に啞然とした。stage Iでさえ5年生存率は40%台であった。現在のままでは、HCCの治療は限界であることを痛切に感じた。そのとき、「HCCは一度発生すれば、根治は極めて困難である、それならばHCCに罹患しないようにすれば良いではないか」と、思いついたわけである。臨床家のやむにやまれぬ選択と言ったところで、化学予防に着手した。

がん予防に関しては全くの素人の著者は、その頃、がん予防物質として第一にあげられていたβ-カロテンに注目して、実臨床で使い始めた。今にして思えば、プロトコルは欠点だらけで、研究デザインもコントロール群さえ設定していない、非科学的状態のスタートであった。



周知のようにβ-カロテンは、provitamin Aであり、vitamin Aの肝障害はよく知られていたため、まずは安全性を確かめるために肝機能への影響を1年間みればよいという考えであった。あわよくば発がん予防の瀬踏みができればと言う下心もあった。長期に通院されている慢性肝疾患患者を対象にしたために投与前の肝機能などのデータはあったので、それをコントロールにして投与後と比較すれば良いと単純に考えていた。統計学や臨床試験に疎いものの浅慮であったと思う。

投与前のβ-カロテン濃度を測定しておいた方が良く考え、慢性肝炎(CH)、肝硬変(LC)、HCC患者において、血中濃度を測定したところ、特に男性、LC患者で有意な低下がみられ、HCCが男性に多い事実と符合し強く思った(1)。

臨床家の粗雑な研究であるが、慢性肝疾患に対するβ-カロテン投与のpreliminary studyの結果は、いろいろなところで書かせていただいた。(2、3)。

簡単に述べると、1年間の観察では、肝機能への悪影響は認められないこと、α-fetoprotein (AFP) が次第に低下することであった。AFPがHCC発生の独立した危険因子であることは知られていたため、AFPが低下したことは良い感触で

あった。

その頃、β-カロテンの臨床試験に興味を持たれ、西野輔翼先生(現・京都府立医科大学 生化学教授)が、わざわざ松山まで訪ねて来られた。大変に感激し、鮮明に覚えている。西野先生の誠実なお人柄や、卓抜した着想にふれ、触発されることが大きかった。以来、先生にはご指導を仰ぐことが多く、ご迷惑をおかけしている。比叡山シンポジウムで発表する機会も与えていただいた。先生を通じて、石川秀樹先生らとも知り合いになることができ、発がん予防研究の在り方や方法論について根本的に洗脳されることになった。

HCC化学予防の臨床研究をみつめ直す良い機会がおとずれ、もう一度、慢性肝疾患患者における栄養異常をつぶさに観察することにした。

カゴメ総合研究所との協力により、ヒトが摂取する約14種類程度のカロテノイドのうち、代表的なルテイン/ゼアキサンチン(Lu/Zx)、カンタキサンチン(Cx)、クリプトキサンチン(Cr)、リコピン(Ly)、α-カロテン(α)、β-カロテン(β)、さらに脂溶性ビタミンであるレチノール(VA)、α-トコフェロール(VE)を測定した。さらに中国Rinxianで発がん予防に取り入れられた微量金属selenium (selen)の血中濃度も併せて検討した。

LC患者においては、同じカロテノイドでも、低下の程度に差があり、一定の規則性があることに気づいた。Lu/Zx、Cx、はLC患者では有意な低下はみられず、HCC患者ではむしろ増加する傾向がみられた。Crは高値を示すが、これは愛媛県がミカンの名産地であり、摂取量が多いためであろうが、LC患者で低下

していた。一方、Ly、 $\alpha$ 、 $\beta$ は、LC患者での低下が明らかであった(図1、2)。

カロテノイドは、官能基の有無によりキサントフィル類と炭化水素系に大きく分けられるが、Ly、 $\alpha$ 、 $\beta$ はいずれも官能基を持たず、hydrophobicityが強い炭化水素系に属している。一方、Lu/Zx、Cxには官能基があり、Crはキサントフィル類であるが、官能基は少なく炭化水素系に近い。すなわち、LCでは、hydrophobicな炭化水素系カロテノイドの低下が特徴的であった(4)。

また、LC患者では脂溶性ビタミンであるVA、VEの低下もみられた(図3)。LC患者で、血中亜鉛が低下する事実はよく知られているが、selenの濃度の低下も著しいものであった(図4)。selenは強力な抗酸化能を有す glutathion peroxidaseの活性中心となる微量元素である。

これらの成績から、硬変肝では、 $\beta$ だけではなく、いろいろな栄養素の過不足が生じる異栄養状態に曝されていると考えざるを得ない。カロテノイド、VA、VE、selenなどいずれも抗酸化能を持つ物質が、慢性肝疾患で低下していることが、発がん促進的に作用していることが窺えた。血流が多く代謝の中心である肝臓が、絶え間ない異常栄養環境に曝されることは、多中心性発生と無縁ではないであろうと想像した。

一方、著者らは、HCC発生のサロゲートマーカーを探す目的で、現在、種々の接着因子や細胞増殖因子の異常を検索している(5、6)。ここでは、basic Fibroblast Growth Factor (FGF) と Transforming Growth Factor  $\beta$  1 (TGF) の成績を示す(図5)。いずれも血管新生に関与し、発がん促進的に作用する細胞増殖因子であるが、正常人に比してCH、LC、HCCの順に上昇がみられる。その他のPlatelet-Derived Endothelial Cell Growth FactorやVascular Endothelial Growth FactorはHCCで選択的に上昇していた(投稿中)。これらのことより、LCで上昇するFGF、TGFはサロゲートマーカーの候補になると考えている。また血中に増量した増殖因子も肝がんの多中心性発生に関与していると仮定した。

また、時間共変量解析ではHCC診断6年以上前のトランスアミナーゼの上昇が、HCCの発生と関係し、80U/ml以下に抑えることが発がん抑制につながる可能性を指摘した(投稿準備中)。換言すれば、一般肝機能検査であるGOTやGPTもサロゲートマーカーになると考えられた。

最近では、ATBCやCARET study、Phsi-

図1

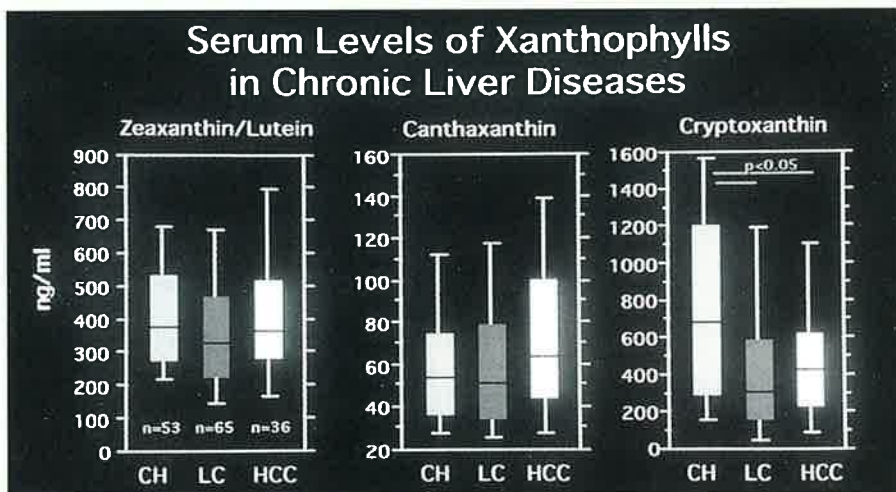


図2

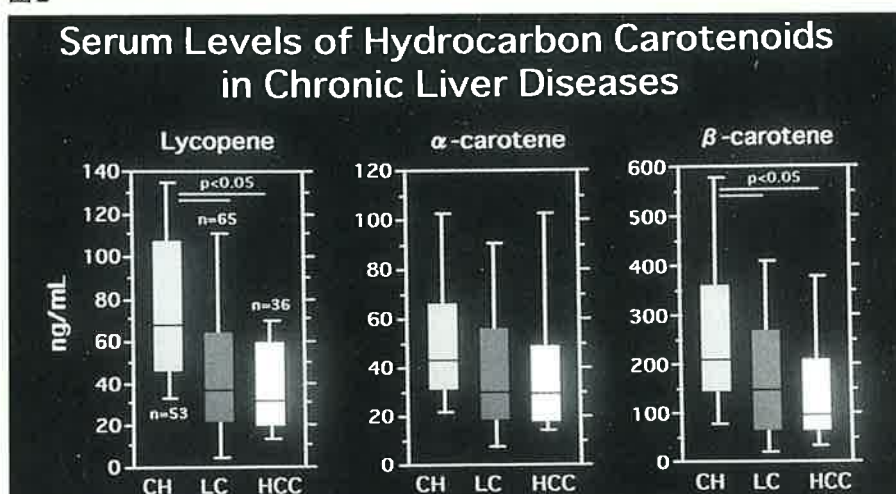
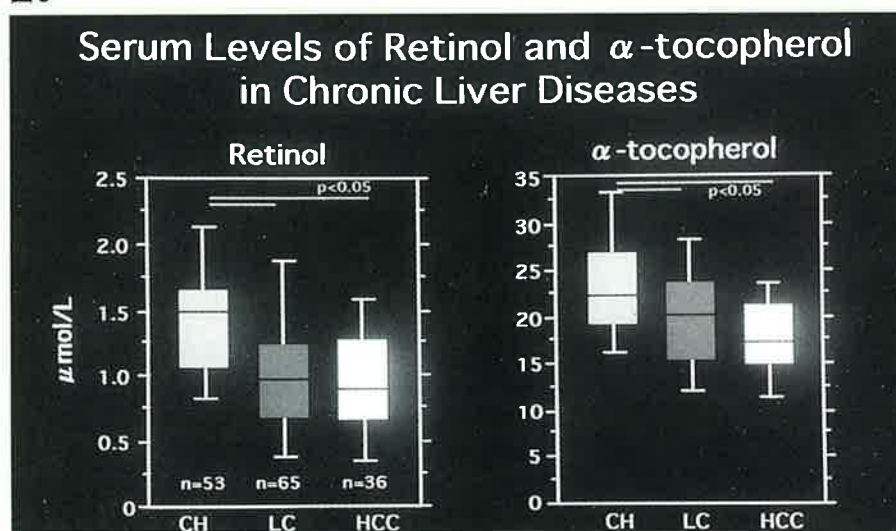


図3



cian's Health Studyなどで合成型 $\beta$ -カロテンの高用量投与で、喫煙者の肺がんの頻度が高まる危険性や、無効であることが報告され、大きな話題となり、日本でも $\beta$ -カロテンの予防試験を中止した施設もある。LC患者における $\beta$ -カロテン平均1日25mgの投与においても血中レベ

ルはbaselineの約10倍程度に上昇する。それを毎日服用するわけであるから、 $\beta$ のみの異常高値が長期間持続するわけで、有害な現象が起り得ると思う。

$\beta$ -カロテンについては、専門家の意見がいろいろなところで書かれているが、著者は、 $\beta$ -カロテンの supplementa-

図4

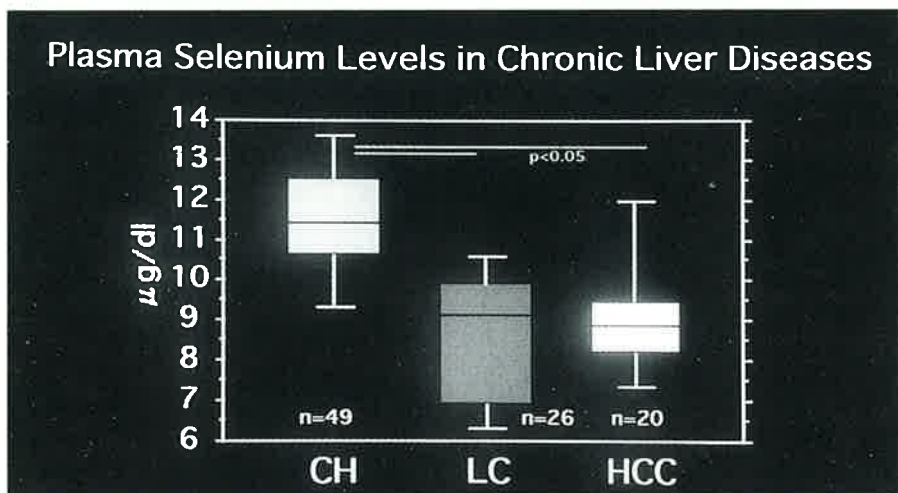


図5

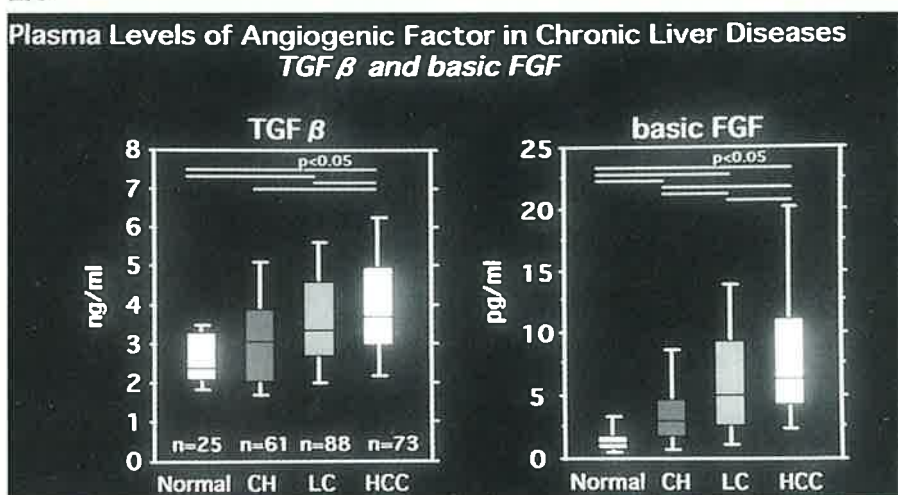


図6

## 肝細胞がんの発生・再発の予防

---

- 1 群 カロテノイド療法
- 2 群 カテキン療法
- 3 群 カロテノイド療法+カテキン療法
- 4 群 食事療法

---

tionは、血中レベルを少なくとも生理的範囲よりやや高いレベルに設定し、不足分のみを補うと考え方がreasonableとされている。用量依存性に発がん抑制が高まると言う、いかにも物質文明に頼るアメリカ流のやり方に追随してはいけないと考えている。過ぎたるは及ばざる、

で、あくまで対象患者の食生活環境を補正すると言う観点で予防計画を進めるべきであると思われる。

現在、著者らはLC患者に対し、血中カロテノイド分析や、欧米のstudyの結果を考慮に入れ、複合カロテノイド療法を開始している(図6)。LC患者で低下

するα、β、Lyのカロテノイド、α-tocopherolを組み合わせた方法で、それぞれ1日量は、約4、6、10、50mgである(Arm 1)。selenは肝障害を増悪する危険性があり、食事指導により補正を試みている。

最近ではカテキン類の発がん抑止効果が多く報告されている。カテキン類も抗酸化能を中心にさまざまな機能を有している。慢性肝炎患者を対象にカテキン類を多量に含む緑茶抽出物(GTE)の用量設定試験を終了した(投稿準備中)。患者の受容性の面から、至適投与量は600mgに設定して、Arm 2として比較群に加えている。Arm3はArm 1+Arm 2としている。Arm 4は石川先生らの方法に準じて食事療法指導群としている。現在、HCC発生子防に約120例、再発予防に70例を無作為登録している。1年毎に中間解析を行い、有意な予防効果を認めれば、良い群と、新たに設けた群との比較検討を行い、より優れた予防物質を探索することを計画している。

HCCは、肝炎ウイルスが端緒となり、慢性肝障害が持続し、その間に炎症に伴うフリーラジカル発生、肝障害による栄養学的異常や細胞増殖因子の異常、さらにホルモン代謝異常、喫煙、飲酒などのさまざまな影響がinitiatorやpromotorとなりHCCが発生してくると仮定される。食事性因子の影響は、その一部に過ぎないが、その異常はpromotorとして発がんに関与しているであろう。

病理形態学的には、腺腫様過形成が前癌性病変であることが指摘され、高分化型を経て中・低分化へと次第に悪性度を高める多段階的過程が推定されている。従い、腺腫様過形成の時期は、可逆的な時期であるかも知れない。また、肝硬変の再生結節は、肝臓全体にあり、臓器全体が、発がんの場(Field Cancerization)である。何よりもHCCは、LCと言う高危険群が明らかであり、発がん予防の対照群を絞り込みやすい。これらは、HCCが、発がん予防に適した悪性腫瘍であることを示している。

しかし、LCは、一般人を対象とした発がん予防(primary cancer prevention)と異なり、有病患者を対象とするclinical cancer chemopreventionであることを十分に念頭に置かねばならない。従い、肝機能障害や合併症に十分な配慮が必要である。直観的な言い方になるが、肝機能を増悪させる物質は、発がん予防物質とはなり得ない。他方、肝機能検査を指標に、発がん予防物質を第1-2相試験的に

選別することが可能ではないかと考えている。

現時点では、最も優れたHCC予防は、肝炎ウイルスを駆除しCHを治すことである。インターフェロン（IFN）で、C型CHが根治すれば、発がんは起こらない。ウイルスが消失しないまでも、肝機能が正常化すれば、少なくとも発がん時期は遅延する。HCCの真の予防は、CHの時期から行うのが、正しいと思われる。IFNは発がん予防物質として最優先され、その有効性について研究されている。しかし、IFNが、C型肝炎ウイルスの量や亜型、あるいは遺伝子により規定され、効かない症例も多い。IFN無効のCH患者に対しどのような対策をとるか、今後の大きな課題である。LCでは、小柴胡湯の発がん抑制効果、HCC患者では非環式レチノイドの再発予防効果も報告されているが、HCCの化学予防は、まだ端緒についたばかりである。基礎的、臨床的に種々の角度からアプローチしたいと計画をしている。特に動物モデルを用いて発がん予防物質の作用機序の一端でも明らかにしたい。

がんは治す時代から予防する時代に明らかに変わりつつあると思う。予防法の確立は、焦眉の研究課題である。大規模なclinical studyも大切であり、がん予防研究会が中心となり、projectを組めないだろうかと期待している。

著者らが、現在行っているHCC化学予防法に至る経過や現状を中心に紹介させていただき、HCC予防法の現況なども簡単に述べた。会員諸賢の批判を是非仰ぎたいと願っている。

#### 〔文献〕

1. K.Jinno, Y.Okada, et al: Decreased serum levels of beta-carotene in patients with hepatocellular carcinoma. *International Hepatology communications* 2: 43, 1994.
2. 神野健二：肝細胞癌診療の問題点と化学予防。 *Molecular Medicine* 33: 386, 1996
3. 神野健二、谷水正人、他：カロテノイドによる肝細胞癌発生の化学予防。肝臓—診断と治療（沖田極、市田隆文；編集）、日本メデイカルセンター、東京、1997。
4. 神野健二、谷水正人、他：肝細胞癌発症予防のための介入試験—現状と問題点。 *臨床化学* 33: 952, 1997。
5. I.Hyodo, K.Jinno, et al.: Detection of circulating intercellular adhesion molecule-1 in hepatocellular carcinoma. *Int. J.Cancer.* 55: 775, 1993.
6. K Jinno, M Tanimizu, et al: The plasma level of basic fibroblast growth factor increases with progression of chronic liver disease. *J Gastroenterol*, 32: 119, 1997

山根 哲郎

(松下記念病院外科部長)



#### はじめに

がん予防の研究に関わっている部門は多岐にわたっており、生化学、公衆衛生、病理、薬理などの基礎医学のみならず、薬学、農学などにおいても基礎的研究がなされていますが、これらの基礎部門と、それを応用する臨床部門とが有機的に連携して、この問題に取り組む必要があります。また、われわれの消化器外科においても、以前より胃切除術後の残胃癌発生の問題、家族性大腸腺腫症に対する大腸全摘術後の残存直腸ポリープの発癌の問題、肝臓術後の残肝発癌など多くの問題がある。このような観点から消化器外科領域にとっても、がん予防は大きな問題であると考えます。

そこで、一消化器外科医ががん予防の研究に関わるようになった経緯と、現在のがん予防に関する私見を述べてみたいと思います。

#### がん予防との関わり

私のがん予防に取り組んだきっかけは、もともとは腫瘍免疫の研究を京都府立医科大学第1外科の大学院で行っていましたところ。先代教授の間島 進名誉教授より、老人にがんが好発するのは何か宿主の免疫能が低下することに起因しているのではないかと考えられるので、この方面の研究をするようにと指示されました。突然の方向転換で、今までリンパ球やマクロファージを相手にしていたものが、化学発癌剤を使って実験するはめになりました。腫瘍免疫ではほとんどが純系のマウスを使用していましたが、化学発癌の実験では純系とは言い難い、ラットを使用することが多く、このようなラットで免疫が関与するかなどと研究するのは不可能と考えましたが、やっとの思いで文献を探し、ENNGによるマウ

ス十二指腸発癌のモデルを選択することになりました。さて、宿主の免疫を高めるにはどうすれば良いかと考え、その当時の、微生物学教室の岸田綱太郎教授にお願いしてマウスのインターフェロンを使用することになりました。実験の結果は有意にインターフェロン投与によって発癌は抑制されました。しかし、そこで考えたのですが、このようなことは臨床で可能であろうかということです。マウス1匹あたり週3回50,000単位のインターフェロンの注射による投与はヒトに置き換えて考えると、まさに机上の空論でした。今でも恥ずかしく思うのですが、まさによい結果を得るための実験ではないかと痛感しました。そして、考え直して、経口摂取が可能で副作用の少ないインターフェロン・インデューサーであるグリチルリチンを使用してみましたが、結果はなかなかそう都合よくいくものではありませんでした。

その頃、厚生省班研究で国立がんセンター研究所の藤木博太先生（現、埼玉県立がんセンター研究所）の発癌抑制の研究班に入れていただき、藤木先生より緑茶ポリフェノールの一つであるエピガロカテキン・ガレート（EGCG）が抗プロモーション活性が強いので、一度動物実験をしてみてもとの話がありました。その当時、あの強力なインターフェロンを大量に投与して、やっと少し抑制が認められたのに、われわれが日常飲んでいる緑茶の成分で抑制が認められるはずがないと確信していました。ところが、結果はインターフェロンの時より強い抑制が認められたのには驚きとともに、何か実験方法や結果が間違っていたのではないかということでした。これをすぐさま発表するには不安があったので、再度同じ実験をすることにしました。その結果は前回の実験結果と全く同様に、強い抑制が認められたのでした。そこでの教訓ですが、自分の固定観念にとらわれて実験し、結果を判断してはならないということでした。

#### そこで緑茶によるがん予防

緑茶は不思議な飲料です。誰とはなく、約5000年前の中国より飲み始められましたが、誰がこれを飲み物として広めたのでしょうか。緑茶の材料である茶の木（*Camellia sinensis*）はツバキ科の常緑樹であり、ツバキやサザンカ（山茶花）の仲間ですが、ツバキやサザンカと異なって大量のカテキン類を有しています。なぜ、ヒトは見かけは全く同じ様な木の葉の中から茶の木を発見し、これを

飲用するようになったのかと考えると不思議なことです。また、多量のカフェインを含有していることも不思議なことです。茶は古来より東洋では単なる飲料ではなく、といて何かに薬効のある薬でもなく、しいて言えば“不老長寿の仙薬”であったと伝えられています。このように緑茶の歴史をひもといて見て行かなかで現代社会においてこの緑茶が、がん予防物質の一つとして注目されるようになって来たのは当然のことであったのかもしれませんが。

緑茶によるがん予防は臨床医にとって誠に都合な条件を多く満たしています。昨今の健康食品ブームは誰もが“健康やかに老いる”ことを希望しており、誰もががんの予防をしたいと考える中で、万人がその効果を享受できることが、何よりよい点ではないかと考えます。しかし、このブームに乗って不十分なデータで結論付けることは、サイエンスにはならないのです。しっかりとした地道な基礎的研究がさらに必要であると痛感しています。

## がん予防は何時から始めればよいのか？

がんの予防はいつから始めればよいかと言うことは、誰もが思うことです。胃癌の自然史をみると、臨床的に診断される程度のものになるまでには、約20—30年かかることを考えると、がんの好発年齢が50—60歳代であるので30歳頃より、予防を始める必要があるのではないのでしょうか。しかし、この年代の人々に将来発生するかもしれないがんを今から予防しましょうと言っても、現実のものとしてとらえられない可能性が高い。そうなる和生活習慣によって、子供の時からがん予防の食生活や習慣を植え付けておくことも、今後のがん予防の臨床には必要ではないかと考えます。お茶の産地では子供の頃からお茶を飲むことが習慣になっていると聞きます。副作用が強かったり、高価ながん予防薬を飲んだり、まずいものを無理に摂取したりする

のでは、子供や若者は目を向けてくれないうでしょう。十分にイニシエーションやプロモーションが完了した中高年者を対象として臨床研究がなされたとしても、満足すべき効果は認められないのではないのでしょうか。

## あちら立てれば、こちらが立たず

すべての癌に対してがん予防は有効でしょうか。例えば化学療法剤のように感受性の高いものと低いものがあるように、がん予防物質においても同様なことがあてはまるのでしょうか。タモキシフェンの例のように、乳癌は減ったが子宮癌が増えたのでは何もならないのです。大腸癌に対してがん予防効果があったとしても、胃癌には効果が無かったのであれば、それぞれの癌に対する予防薬や予防物質を組み合わせる必要が生じます。がん予防の十二箇条では、かたよった食事や習慣である種の癌が増加するのを防ぐために、好き嫌い無くバランスよく食品を摂取することをすすめています。あくまで消極的であり、積極的に癌にならないためには、これとこれを多く摂取しなさいと唱っているのは緑黄色野菜のみです。もっとはっきりした研究結果が出てくれば積極的な指針が打ち出されるでしょうが、このような指針というものは、現時点ではまだまだ多くの問題があると考えます。

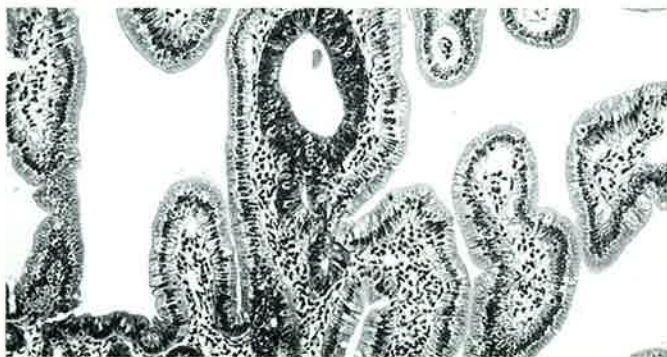
## がん予防のメカニズム

がん予防の臨床を行う上では、そのメカニズムや代謝経路が明確に示される必要があります。それが明確に示されることは、逆にその効果をはっきりとすることになります。また、前述のすべてのがんに対して有効となるためには、作用機序の異なった薬剤や物質を組み合わせ、さらに効果を増強したり、適応を拡大することが可能になります。しかし、あまりに理論が優先しすぎると、いつまでたっても臨床応用にまで至らず、実験室レベルのがん予防に終わってしまいます。

わが国はどちらかと言うと慎重派で代謝やメカニズムがはっきりしないものを臨床応用することに関しては否定的意見が多く、逆に、欧米では少しぐらい代謝やメカニズムがはっきりしなくても、実験的效果がはっきりしていれば、直ちに臨床に応用しようとする傾向が強いように思えます。これは日本におけるがん予防研究の弱点であり、またある意味では長所といえるでしょう。欧米の臨床応用の研究は、経費がかかり、研究の最終目標の結果の善し悪しははっきりとしたクリヤーカットな研究は、曖昧、うやむや、“お茶をにごす”ことを得意とする日本の現状には相入れられないものがあるのではないのでしょうか。その意味でも今後はさらに基礎研究者と臨床医が緊密に連携をとって、大きなプロジェクトをたてて研究を行う必要があることを痛感します。

## 実用的な物質の選択

がん予防のための物質として最も実用的かつ実践的な物質はおそらく食品であろうと考えます。抗炎症剤などは安全性や副作用の面で予防的投与には不向きと考えます。発癌高リスク疾患に対しては、少しの副作用の発生は許される面もあると考えます。がん予防物質としての条件は、効果が明らかなもの、長期服用にても副作用が無いこと、大量生産が可能であることなどが挙げられます。これらの条件をすべて満たすことは、なかなか難しいと思われれます。副作用が無いといっても、数十年にわたり長期間服用するとなれば、何らかの副作用が出現する可能性も考えておく必要があります。また、万人がこの恩恵にこうむるためには大量生産が可能で、安価である必要があります。数千年前のお茶が高貴薬として扱われたような時代のことがあってはならないと考えます。最近ではフードデザインの概念が導入され食品の組み合わせや組成の変化を行うことによって、その効



ENNG マウス十二指腸発癌病理組織像



ENNG マウス十二指腸発癌実体顕微鏡像

果を増強するという考え方があります。しかし、これも一步間違えば大変な結果を招いてしまうことになります。私たちは最初に緑茶成分のエピガロカテキンガレートを用いて抑制実験を行いました。が、前述の条件を考えて臨床応用するために、緑茶の粗抽出物がより条件を満たすと考えてこれを用いました。しかし、長期間の摂取や副作用のことを考えると脱カフェインが必要ではないかと考えました。しかし、脱カフェインによって緑茶抽出物の組成が少し変わってしまいました。このことは、今後さらに適応や効果について、詳細な検討が必要だと考えます。やはり、最終的には通常われわれが飲用している緑茶を今までよりも少し多めに飲むことによって、がん予防が達成されることが理想ではないかと考えています。がん予防の十二箇条に“緑茶を

すすんで多く飲みましょう”という第十三箇条目が付け加えられるようになる日を待っています。

### おわりに

とりとめなく、がん予防について、一臨床医としての意見と希望を述べました。私が今までに行ってきた緑茶によるがん予防の臨床応用の研究も、緑茶がサイエンスの舞台上で登場して、当初は場違いな印象をいだかれた方も多いとおもいます。最近ではNatureにEGCGが登場し、ウロキナーゼ阻害作用があると報告され、少しは見直されるようになったのではないかと印象を持ちました。さらに今後も積極的にがん予防の臨床応用についての研究を続けて行きたいと考えています。

### がん予防医薬品、食品の開発への挑戦

三村 精男

(山梨大学工学部化学学生物工学科教授)



### 1. はじめに

私がこれまで「発癌抑制」や「老化防止」につながるコンセプトに立った新しい食品や化粧品、更にはその将来の課題として予防医薬品が高齢化社会における大きな課題となってくることを期待し、企業の研究としては若干早すぎるくらいもあったが、古くから健康に良いと云われている食品素材(黒ゴマ、海藻類、大豆などの穀類醗酵生産物等)、樹木や草本植物、更には光合成微生物等を対象にして、活性酸素消去性物質の大量生産の基礎研究を始めたのが1987年であった。

当時、抗酸化性物質の探索研究は一部の先駆的な学者しか興味を持っていなかったもので、究極の幸せである病気の予防、がん予防の医学的研究が進展するにつれて、動物実験に必要な量の生理活性物質(我々はこうした物質をタマと呼ぶ)が求められるから、このときには医学者との緊密な共同研究が可能になる、と言った期待感を持って、物質の探索と効率的な生産技術の研究を始めた。

これまで、実験動物を用いた発がん抑制の研究には、比較的大量なタマが必要になっていることから、こうした実験ではタマの入手の可能な物質しか供試されていないようであった。多くの生理活性物質が天然物から抽出され、化学構造と生理活性が解明されても、動物実験に進むことが出来ないで、そのまま消えてしまったタマも多く見かけられている。動物実験に供試出来る量のタマを我々が作れば、更にがん予防の医学的研究が進むと思っている。企業にとっては、評価のはっきりしないタマを大量生産して動物実験に供試するためには、疾病予防に関する領域で商売が出来るという見通しが必要であるが、一面では、こうした予防医学の分野に興味を持った、「タマ屋」

## Why drinking green tea could prevent cancer

Epidemiological studies suggest that the consumption of green tea may help prevent cancers in humans; also, breast and prostate cancers in animal models are reduced by green, but not black, tea<sup>1</sup>. Here we offer a possible explanation. We have inferred (using molecular modelling) and subsequently demonstrated that one of the major ingredients of green tea inhibits urokinase, an enzyme crucial for cancer growth.

Tea is drunk in three forms: black (78%), green (20%) and oolong (2%). Green tea contains many polyphenols known as catechins, including epigallocatechin-3 gallate (EGCG), epigallocatechin (EGC) and epicatechin-3 gallate (ECG). The brewing of black tea oxidizes

the catechins, destroying any beneficial effects<sup>2</sup>. Several mechanisms of anticancer activity of catechins have been postulated, but none seems universal for all cancers<sup>3,4</sup>.

Human cancers need proteolytic enzymes to invade cells and form metastases. One of these enzymes is urokinase (uPA). Inhibition of uPA can decrease tumour size or even cause complete remission of cancers in mice<sup>5,6</sup>. The known uPA inhibitors are unlikely to be used in anticancer therapy because of their weak inhibitory activity or high toxicity.

We have searched for new uPA inhibitors by computer modelling using the active site of uPA as a template. Coordinates of human uPA were kindly provided by C. Phillips<sup>7</sup>, National Cancer Institute,

MayBridge, and Merck 3D databases of 190,000 compounds were used to select inhibitors by Biosym LUDI and DOCKING programs. In these calculations, the relative position of inhibitor and receptor (uPA) with the minimum potential energy represents the most probable way of binding. Polyphenols, among other compounds, showed good inhibitory potential. One of them, EGCG (a component of green tea), binds to uPA, blocking His 57 and Ser 195 of the uPA catalytic triad and extending towards Arg 35 from a positively charged loop of uPA (Fig. 1a). Such localization of EGCG would interfere with the ability of uPA to recognize its substrates and inhibit enzyme activity<sup>8</sup>.

We have verified our computer calculations using an amidolytic assay of uPA activity in the presence of different concentrations of EGCG. The uPA activity was quantified spectroscopically using Spectrozyme, which releases a chromogen on specific cleavage by uPA. EGCG from two different suppliers showed almost identical rates of uPA inhibition.

We have compared the ability of EGCG to inhibit uPA with that of a well-known inhibitor, amiloride, and a control sample where no inhibitors were used (Fig. 1b). EGCG is a weaker inhibitor than amiloride, but can be consumed in much higher doses without any toxicological effects. Amiloride is administered in a maximum dose of 20 mg per day, whereas a single cup of tea contains 150 mg EGCG, and some tea lovers consume up to 10 cups a day<sup>9</sup>.

Such high levels of a uPA inhibitor are likely to have a physiological effect and could reduce incidence of cancer in humans or the size of cancers already formed. Theoretically, EGCG might inhibit cancer formation in many different ways; however, we postulate that the well-known anticancer activity of green tea is driven by inhibition of uPA, one of the most frequently overexpressed enzymes in human cancers.

Jerzy Jankun  
Steven H. Selman  
Rafal Swiercz\*  
Department of Urology, and \*Department of Physiology and Molecular Medicine, Medical College of Ohio, Toledo, Ohio 43699-0008, USA  
e-mail: jzjzy@solon.cc.ohio.edu  
Ewa Słrzygczak-Jankun  
Department of Chemistry, The University of Toledo, Toledo, Ohio 43606-3390, USA

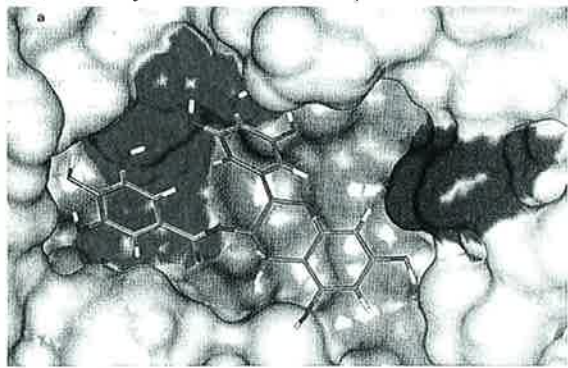
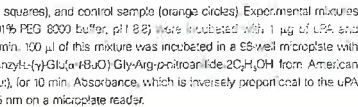


Figure 1a, Connolly surface of uPA showing the catalytic triad His57, Asp102 and Ser195 (red) at the bottom, and Arg35, Arg37 (blue) at the rim of the cavity. EGCG, well fitted into this cavity, is shown as a stick model in green (C), red (O) and white (H). The calculated energy of intermolecular interaction between EGCG and uPA is  $-119.81$  kcal mol<sup>-1</sup>; LUDI score, 498; calculated  $K_i$ ,  $1.04 \times 10^{-5}$  M. b, Cleavage of Spectrozyme by uPA in the presence of EGCG (inset) from Sigma (blue triangles), and from MayBridge (UK (purple diamonds), amiloride (green squares), and control sample (orange circles). Experimental mixtures (50 nM) with 0.01% Tween 80, 0.01% PEG 8000 buffer, pH 8.2) were incubated with 1 µg of uPA and decreasing amounts of inhibitor for 15 min. 100 µl of this mixture was incubated in a 96-well microplate with 50 µl (2.5 mM) Spectrozyme (carbobenzyl-(γ)-Glu-(α)-H-D-Gly-Arg-pyrrolicanilide-2C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>OH from American Diagnostic Inc., Greenwich, Connecticut), for 10 min. Absorbance, which is inversely proportional to the uPA inhibitory activity<sup>8</sup>, was measured at 406 nm on a microplate reader.



1. Wang, C. S. et al. *J. Med. Genet.* **30**, 1039-1049 (1993).
2. Shao, C. D. et al. *Anticancer Res.* **13**, 1089-1090 (1993).
3. Fujita, H. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90**, 509-510 (1993).
4. Herzig, L. H. et al. *Chem. Eng. Progress*, **41**, 43-49 (1993).
5. Jankun, J., Kozl, R. W., Słrzygczak-Jankun, E. & Selman, S. *Cancer Res.* **55**, 559-563 (1995).
6. Swiercz, R. et al. *Structure*, **3**, 645-651 (1995).
7. Phillips, A. et al. *Cancer Res.* **54**, 2375-2381 (1994).

が少ないことにもよると思っている。

こうした事を考えて、会社のトップの理解を得て予防医学への「タマ探し」、「タマ作り」の研究をしてきたが、3年前に山梨大学工学部に赴任してからもこの夢を追って実験している。タマ造りの方法が出来たら興味のある企業に協力をお願いして、医学者と一緒に基礎的予防医学の研究を進展させていきたいと夢をふくらませている。

これが、一人の工学者が、ガン予防を目指した医学者の集まりである日本がん予防研究会の末席を汚している所以であ

る。以下に、これまで私がこの目標で多くの共同研究者と研究してきた経過についてレビューして、「タマ探し」、「タマ作り」屋の魂を披露したい。

## 2. 黒ゴマ培養細胞の物質

ゴマは古くから健康に良い植物として重用されており、既に紀元前3000年ごろの「神農本草経」や後漢時代の「傷寒論」に薬としての使用が記載されている。現在、主としてアジアの国々の料理では、ゴマ種子、ゴマ油の持っている抗酸化作用に注目し、香味のみならず、健

康食品としても推奨されている。これまで、ゴマ植物の生成する抗酸化性物質の研究は名古屋大学の一派によって深く研究されてきた。我々は、タマの大量生産を先ず考慮し、植物細胞培養法によって生成する物の中から生理活性物質を探すことにした。黒ゴマのもしから増殖性の細胞を誘導し、35度Cという高温度で良く増殖する培養条件を確立した(ゴマは熱帯植物で紫外線の強いサバンナが原産地)。培養した細胞の中から、合成抗酸化剤BHA(ブチルヒドロキシアニソール)に匹敵する抗酸化活性を持つポリフェノール配糖体を二種類見いだした(図1)。これらは強い抗発がんプロモーター活性(EBV法: Epstein-Barr Virus 初期抗原発現抑制を見る)を持っていることが観察された。動物実験ではマウスによるDMBA-TPA皮膚化学発がん系でパピローマの発生を抑制した。これらのポリフェノールはグルコースに結合したカフェ酸のオルト水酸基が抗酸化活性をもたらし、配糖体の親水性によって緩やかな生理作用が期待された。しかし、抗酸化活性と発がん抑制活性の関係は解明されていない。配糖体の一つはアクテオサイドとしてすでに様々な生薬の成分として報告されている。黒ゴマ培養細胞には比較的多量に含まれているので、医学的立場から興味ある実験が可能ではないかと考えている。

抗発がんプロモーター活性を指標にして、黒ゴマ培養細胞の成分を更に探索していく研究から、脂溶性の成分としてレチノイン酸に匹敵する、強い抗発がんプロモーター活性を持ったトリテルペン化合物が二種類見いだされた(図2)。これらの物質はマタタビから分離されているが、発がん抑制作用は知られていなかったものである。黒ゴマの培養細胞には微量しか含まれていないため、動物実験のサンプルを供給することは難儀であった。23kgの生細胞から化合物1(esculentic acid)は102mg、化合物2はさらに微量で11mgを純品として取得した。

図1 Phenolic Glycosides with Potent Antioxidative Activity found in Cells of *Sesamum indicum* L

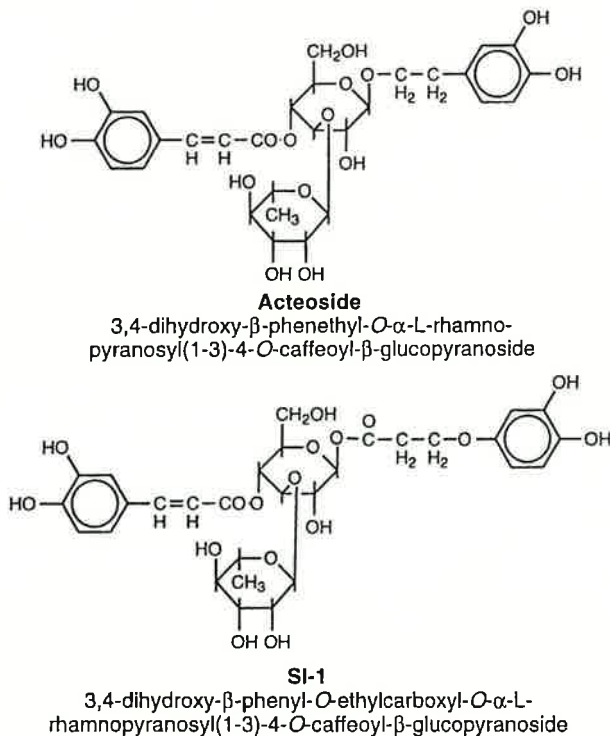
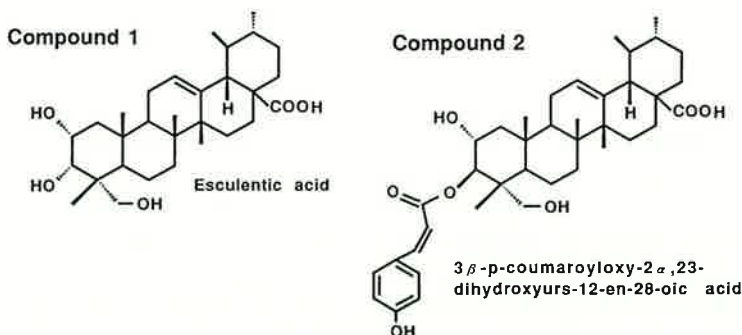


図2 Chemical Structure of Anti-Tumor Promoting Compounds Produced by Cells Culture of *Sesamum indicum* L.



## 3. 黒ゴマ培養細胞のトリテルペンの発がん抑制作用

培養細胞から分離した強い発がんプロモーター活性を持つ esculentic acid とそのクマール酸誘導体は極性の低い画分に含まれているので、これらの中間精製物を用いて、マウスによる発がん抑制実験を行なった。

DMBA-TPA 皮膚化学発がん系において TPA の 50 倍量の黒ゴマトリテルペン化合物の塗布によって 60% のパピロー