

(-)-Epigallocatechin-3-gallate suppresses liver
metastasis of human colorectal cancer

((-)-Epigallocatechin-3-gallate は
ヒト大腸癌肝転移を抑制する)

2013

筑波大学大学院博士課程人間総合科学研究科

丸山 岳人

筑 波 大 学

博 士 （ 医 学 ） 学 位 論 文

目次

第 1 章	序論	1
第 2 章	目的	3
第 3 章	実験方法	4
3-1.	EGCG	
3-2.	細胞培養	
3-3.	細胞増殖	
3-4.	アポトーシス	
3-5.	Western blot	
3-6.	RNA の抽出	
3-7.	リアルタイム RT-PCR	
3-8.	実験動物	
3-9.	肝転移モデル	
3-10.	肝転移面積	
3-11.	免疫組織化学法	
3-12.	血清学的検査	
3-13.	統計学的解析	

第4章 結果	11
4-1. EGCG による増殖抑制効果	
4-2. EGCG によるアポトーシス誘導効果	
4-3. EGCG がシグナル伝達に与える影響	
4-4. EGCG がチロシンキナーゼ受容体に与える影響	
4-5. EGCG の肝転移腫瘍に対する効果	
4-6. EGCG がマウスに及ぼす副作用	
第5章 考察	14
第6章 結論	18
謝辞	19
参考文献	20
図・表	26

第 1 章 序論

大腸癌は最も頻度の高い癌の一つであり，世界で全癌死亡者数の約 10 % を占めている¹．肝臓は大腸癌の最も多い遠隔転移部位であり，大腸癌と初めて確定診断された時点ですでに約 15 % の患者に肝転移を認め²，最終的に約半数の患者がその経過中に肝転移を発症すると言われている．大腸癌は固形腫瘍の中では珍しく，肝転移や肺転移などの遠隔転移に対し外科的切除をすることで根治できる可能性がある³．実際に，肝切除は大腸癌肝転移に対する標準治療であり，唯一の根治療法でもある．しかし，肝転移の数，大きさ，位置などから肝転移患者の約 25 % しか肝切除の適応にはならず⁴，根治的肝切除を施行できた患者でも 3 人に 1 人は肝転移が再発してしまう^{5,6}．手術ができない肝転移に対する標準的な治療法は全身化学療法である⁷．全身化学療法での長期生存例は稀ではあるものの，近年の化学療法の進歩により切除不能進行大腸癌の予後は改善してきている⁸．これは，oxaliplatin や bevacizumab などのような新規抗癌剤の登場と単剤化学療法から多剤併用化学療法への転換により切除不能進行大腸癌の予後が改善したためである⁹．これまで臨床では使用されていない有効な新規薬剤を同定し，それを既存の抗癌剤と併用することで，大腸癌患者のさらなる予後の改善が期待できる．

緑茶は世界中で一般的に飲用されており，以前より健康に及ぼす影響が幅広く研究されてきた¹⁰．疫学的研究では，緑茶を 1 日 7 杯以上飲用することで大腸癌に対して潜在的な予防効果を有することが報告されている¹¹．こうした

効果は緑茶に含まれるポリフェノール成分であるカテキンが寄与していると考えられている。カテキンは全部で 8 種類存在し、緑茶には主に (-)-epicatechin (EC), (-)-epicatechin-3-gallate (ECG), (-)-epigallocatechin (EGC), (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) が含まれている¹⁰。特に EGCG は最も含有量が多く、緑茶に含まれるカテキンの約半数を占めている¹²。また、これらのカテキンの中で EGCG が最も強く細胞増殖を抑制することが報告されており¹³、EGCG を中心にこれまで様々な種類の癌細胞株で広く研究が行われてきた¹⁰。最近の研究では、EGCG がチロシンキナーゼ型受容体の活性を調節することで抗腫瘍効果を発揮することや¹⁴、c-Jun N-terminal kinase (JNK) や p38 などのストレス応答 mitogen-activated protein kinase (MAPK) を活性化し、アポトーシスを引き起こすことが報告されている¹⁵。*In vivo* の研究では、EGCG の抗腫瘍効果は主に皮下移植モデルで検討され、腫瘍の増大を抑制することは既に報告されている¹⁶⁻¹⁸。しかし、臨床応用を考えた際に皮下移植モデルの検討だけではなく、臓器特異的な環境を再現しより臨床を反映した同所性モデルでも検討することが必要である¹⁹。大腸癌の最も多い遠隔転移部位は肝臓であるが、これまで肝転移モデルにおいて EGCG の抗腫瘍効果を検討した報告はない。

第 2 章 目的

本研究では, *in vitro* でヒト大腸癌細胞株に対する EGCG の増殖抑制効果の検討に加え, ヒト大腸癌細胞株を用いたマウス肝転移モデルを作製し, 肝転移に対する EGCG の抗腫瘍効果を明らかにすることを目的とした.

第 3 章 実験方法

3-1. EGCG

EGCG は Sigma-Aldrich (St.Louis, MO, USA) より購入した. 細胞に添加するために, EGCG が 1 mg / ml になるように蒸留水に溶解し, -20 °C で保存した. また, マウスへ投与するために, EGCG を 6 mg / ml になるように生理食塩水に溶解し, 4 °C で保存した.

3-2. 細胞培養

ヒト大腸癌細胞株として RKO および HCT116 を用いた. Dulbecco's modified Eagle's medium (D-MEM; Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) に 10 % fetal bovine serum (FBS; Hyclone, Logan, UT, USA) および 1 % penicillin and streptomycin (Invitrogen, Grand Island, NY, USA) を添加した培地で培養した. すべての培養細胞は 37 °C, 5 % CO₂ という条件に設定したインキュベーター内で培養した.

3-3. 細胞増殖

EGCG の大腸癌細胞株に対する細胞増殖抑制効果を評価するため, 細胞生存率に関しては細胞全体の脱水素酵素活性によって還元されるテトラゾリウム塩を測定する WST-8 試験, および, 細胞増殖率に関しては deoxyribonucleic acid (DNA) 合成の指標である 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) 取り込み試験を施行した. 前者は, Cell Counting Kit-8 (Dojindo Laboratories, Kumamoto,

Japan) を用い、後者は、Cell Proliferation ELISA, BrdU colorimetric (Roche Diagnostics, Penzberg, Germany) を用いて検討した。具体的には、大腸癌細胞株を 96 well プレートに 3×10^3 個 / well ずつ播種し、一晚培養した後に EGCG を添加し、24 時間後に細胞生存率と細胞増殖率を測定した。

3-4. アポトーシス

EGCG の大腸癌細胞株に対するアポトーシス誘導効果を検討するため、アポトーシス過程で生じる断片化 DNA を TdT-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) 法により検出する DeadEnd™ Colorimetric TUNEL System (Promega, Madison, WI, USA) を用いて検討した。具体的には、大腸癌細胞株を Lab-Tek II Chamber Slide (Nalge Nunc International, Tokyo, Japan) に 6×10^4 個 / well ずつ播種し、一晚培養した後に EGCG を添加し、4 時間後の細胞を用いた。また、後に示す肝転移モデルマウスから採取した肝臓の切片を用いて、プロトコールに従い実験を施行した。

3-5. Western blot

大腸癌細胞株を 6 cm dish に 3×10^5 個ずつ播種し、48 時間培養した後に EGCG を添加し、12 時間後の細胞からタンパク質を採取した。細胞溶解液を 10 % sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel で電気泳動した後に、nitrocellulose membrane (Millipore, Bedford, MA, USA) に転写した。一次抗体は、生存増殖関連シグナルとして phospho-Akt (Ser473), Akt, ストレス応答シグナルとして phospho-p38, p38, 内在性コントロールとして β -actin を

用いた。二次抗体は、anti-rabbit IgG horseradish peroxidase-conjugated antibody を用いた。抗体はすべて Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA) を用いた。

3-6. RNA の抽出

大腸癌細胞株を 6 cm dish に 3×10^5 個ずつ播種し、48 時間培養した後 EGCG を添加し、2 時間後の細胞から ribonucleic acid (RNA) を採取した。採取には、NucleoSpin® RNA II kit (Macherey-Nagel, Duren, Germany) を用いて、プロトコールに従い実験を施行した。

RNA のクオリティーと濃度を NanoDrop Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA) を用いて評価し、すべての RNA 検体の 260 / 280 nm の吸光度比が 2.0 以上であることを確認した。

逆転写酵素による complimentary DNA の合成は、AMV Reverse Transcriptase (Promega, Madison, WI, USA) と random primers (Takara Bio Inc., Shiga, Japan) を用いて施行した。具体的には、1 mM dNTPs (Fermentas Life Sciences, Burlington, ON, Canada), random primers 0.025 $\mu\text{g} / \text{mL}$, AMV Reverse Transcriptase 0.25 U / mL, 抽出 RNA 500 ng をよく混和し、PCR system 9700 (Applied Biosystems, Foster, CA, USA) を用いて 30 °C で 10 分間、37 °C で 60 分間、95 °C で 5 分間、4 °C で冷却というプロトコールで行い、complimentary DNA は -80 °C で保存した。

3-7. リアルタイム RT-PCT

本実験では, vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2), epidermal growth factor receptor (EGFR), human EGFR-related 2 (HER2) および c-Met の 4 つのチロシンキナーゼ型受容体の発現を検討した. また, 内在性コントロールとして Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を用いた. mRNA の配列は GenBank の web サイトで検索した. プライマーの設計は, Primer Express® software for Real-Time PCR ver. 3.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を用いて行い, 設計したプライマーは Hokkaido System Science (Hokkaido, Japan) より購入した (表 1).

リアルタイム reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) は, SYBR Green Realtime PCR Master Mix-Plus (Toyobo, Osaka, Japan) と 7300 Real-time PCR system (Applied Biosystems) を用いて, 製造業者の示す標準的な手順に従い実験を施行した. サーマルサイクラーの設定は, 95 °C で 1 分間加熱の後, 95 °C で 15 秒間と 60 °C で 1 分間の 1 サイクルを計 40 サイクル繰り返した.

3・8. 実験動物

すべての動物実験は筑波大学動物実験委員会の承認を受けた後, 文部科学省が策定した「研究機関等における実験動物等の実施に関する基本方針」および「筑波大学動物実験取り扱い規定」に基づき人道的な方法で施行した.

すべての動物実験で, 8 週齢で体重 21 ~ 26 g の雄性 severe combined immunodeficiency (SCID) マウス (CLEA Japan, Tokyo, Japan) を使用した. 購入したマウスは 12 時間の明暗周期で温度調整された飼育室の中で管理

され、水分、餌は自由に摂取可能な状況とした。

3-9. 肝転移モデル

イソフルランによる吸入麻酔の後に、腹部正中切開で開腹した。門脈本幹を microclip (Aesculap, Tuttlingen, Germany) でクランプし、1 分間の全肝虚血をした。クランプを解除し 1 分間の再灌流後に、脾下極に 27 ゲージ針で 2×10^6 個の RKO 細胞を注射した。脾腫瘍からの腹腔内播種を予防するため、脾臓を摘出し、腹部を閉創し、手術を終了した。

マウスは未治療の control 群 ($n = 12$) と EGCG を投与した EGCG 群 ($n = 12$) に分けた。EGCG 群では癌細胞移植後 7 日目から 2 週間にわたって 1 日毎に計 7 回 EGCG 30 mg / kg body weight を腹腔内投与し、手術後 21 日目にマウスを犠牲死させ、肝臓を摘出した。

3-10. 肝転移面積

肝転移面積を評価するために、摘出した肝臓の 4 葉をそれぞれ 2 つに分割し、10 % neutral buffered formaldehyde で固定した。パラフィン包埋し、それぞれの標本で最大断面になるように 4 μm に切り出し、hematoxylin-eosin 染色を行った。肝転移面積は得られた 8 切片を観察し、正常肝臓に対する転移腫瘍の面積を画像処理ソフトウェアである WinROOF (Mitani, Fukui, Japan) を用いて計測した。

3-11. 免疫組織化学法

パラフィン包埋された組織切片をキシレンで脱パラフィン処理し、エタノールで再水和させ、内因性ペルオキシダーゼ活性をブロックするために 0.03 % hydrogen peroxidase に浸した。バックグラウンド染色を低減するために 3 % bovine serum albumin (BSA) で前処理した後に、一次抗体として anti-CD31 antibody (Lifespan Bioscience, Seattle, WA, USA) を 3 % BSA で 100 倍に希釈して 1 時間室温で処理した。二次抗体として peroxidase-labeled polymer conjugated to goat anti-rabbit immunoglobulins (Dako Japan, Tokyo, Japan) を 30 分間室温で処理し、発色は diaminobenzidine chromogen (Dako Japan) を用いた。Hematoxylin で対比染色した後に、エタノールで脱水、キシレンで透徹し、Multi Mount 480 (Matsunami Glass, Osaka, Japan) でマウントし、光学顕微鏡で観察した。

3-12. 血清学的検査

マウスを犠牲死させる直前に眼窩静脈叢から採血を施行した。採取した血液は、1,200 *g* で 10 分間遠心した後に上清を回収した。FUJI DRI-CHEM 7000 (Fuji Film, Tokyo, Japan) を用いて、amino aspartate aminotransferase (AST) と alanine aminotransferase (ALT) を測定した。

3-13. 統計学的解析

すべての測定結果を平均値 \pm 標準偏差で表記した。2 群間の検討では

unpaired t-test, 3 群間以上の検討では, one-way analysis of variance with the Bonferroni post-hoc-test を用いた. すべての実験において, $p < 0.05$ を有意差ありとした.

第 4 章 結果

4-1. EGCG による増殖抑制効果

EGCG が大腸癌細胞株の増殖に与える影響を検討した。大腸癌細胞株に EGCG を添加し 24 時間後に、細胞生存率を CCK-8 (図 1A, B) で、細胞増殖率を BrdU (図 2A, B) で評価した。両大腸癌細胞株はともに、EGCG 50 μ M と 100 μ M で有意に細胞生存率と細胞増殖率が低下した。

4-2. EGCG によるアポトーシス誘導効果

EGCG による大腸癌細胞株のアポトーシス誘導効果を確認するために、EGCG 添加し 4 時間後に TUNEL 染色で評価した (図 3, 4)。両大腸癌細胞株はともに、EGCG 0 μ M と 25 μ M ではアポトーシス細胞を認めなかったが、EGCG 50 μ M と 100 μ M ではアポトーシス細胞の出現を認めた。

4-3. EGCG がシグナル伝達に与える影響

EGCG が大腸癌細胞株のシグナル伝達に与える影響を検討するために、様々な濃度の EGCG を添加し 12 時間後にサンプルを採取し、Western blot で検討した。両大腸癌細胞株で、EGCG 25 μ M, 50 μ M および 100 μ M で Akt の脱リン酸化を認めた (図 5)。RKO では EGCG 50 μ M と 100 μ M で p38 のリン酸化を認め、HCT116 では EGCG 100 μ M で p38 のリン酸化を認めた (図 5)。

4-4. EGCG がチロシンキナーゼ型受容体に与える影響

EGCG がチロシンキナーゼ型受容体に与える影響を検討するために、EGCG を添加し 2 時間後にサンプルを採取し、リアルタイム RT-PCR で検討した。検討したチロシンキナーゼ型受容体は、VEGFR2, EGFR, HER2 および c-Met の 4 種類である。EGFR, HER2 および c-Met では EGCG を添加しても mRNA の発現に変化は認めなかったが、VEGFR2 では EGCG 25 μ M, 50 μ M および 100 μ M で有意な発現低下を認めた (図 6)。

4-5. EGCG の肝転移腫瘍に対する効果

EGCG がヒト大腸癌細胞株の肝転移腫瘍に与える影響を検討するために、RKO による肝転移モデルを作製した。control 群では未治療とし、EGCG 群では癌細胞移植 1 週間後から 2 週間にわたり 1 日毎に計 7 回 EGCG 30 mg / kg body weight を腹腔内投与した。図 7A は両群の肉眼像、図 7B は hematoxylin-eosin 染色による病理組織像であるが、EGCG 群で肝転移腫瘍の増大の抑制が見られた。図 8 は両群での肝転移面積を比較したもので、EGCG 群で有意に肝転移面積の減少を認めた。肝転移腫瘍内の TUNEL 染色では EGCG 群でアポトーシス細胞が多く見られた (図 9A)。さらに、EGCG による腫瘍内の血管新生に与える影響を調べるため anti-CD31 antibody で血管内皮細胞を免疫染色すると、EGCG 群で新生血管の減少を認めた (図 9B)。

4-6. EGCG がマウスに及ぼす副作用

EGCG がマウスに及ぼす副作用として、体重変化、および、肝機能障害を検

討した. 両群間で体重変化に有意差は認めなかった (図 10A). また, 血清 AST, ALT 値も両群間で有意な差は認めず (図 10B, C), 肝機能障害も認めなかった.

第 5 章 考察

ヒト癌細胞を免疫不全マウスへ移植し作製される異種移植モデルは癌基礎研究や前臨床試験として幅広く利用されている。異種移植モデルには大きく分けて 2 つあり、1 つは移植する癌細胞が発生、転移する臓器に移植する同所性移植モデルと、もう 1 つは癌細胞が発生する臓器以外に移植する異所性移植モデルである。異所性移植モデルの中でも数多く使用されている方法は、皮下移植モデルである。このモデルは手技が簡便で再現性があること、腫瘍サイズの測定が容易であり、薬効を客観的に評価できるなどの利点がある¹⁹。これまでに EGCG は大腸癌細胞株を用いた皮下移植モデルで検討され、その抗腫瘍効果が報告されてきた¹⁶⁻¹⁸。しかし、doxorubicin や 5-FU などの抗癌剤が大腸癌細胞株の皮下移植モデルに対して抗腫瘍効果を発揮したものの、同じ細胞を用いた肝転移モデルに対しては十分な抗腫瘍効果が得られなかったという報告がある²⁰。これは、同じ腫瘍細胞でも皮下移植モデルと肝転移モデルでは周囲環境の違いによって腫瘍細胞の挙動が変化し、抗癌剤に対する感受性に違いが生じたためと考えられる¹⁹。このため、異所性移植モデルでの検討に加え、本来癌が発生、転移する臓器に腫瘍細胞を移植する同所性移植モデルでの薬剤感受性の追加検討が必要となる。大腸癌で最も多い遠隔転移臓器は肝臓であるものの、これまで大腸癌肝転移モデルでの EGCG の抗腫瘍効果を検討した報告はなかった。そこで我々はヒト大腸癌肝転移モデルを作製し、EGCG がヒト大腸癌細胞株の肝転移腫瘍を抑制することを本研究で初めて明らかにした。しかし、今回の我々のモデルでは腹腔内にある肝転移腫瘍を直接観察することができず、

経時的な観察ができなかった．今後は腹腔内腫瘍を可視化できるルシフェラーゼ遺伝子を導入した腫瘍細胞を用いた動物モデルを作製し²¹，治療効果を経時的に検討する必要がある．

血管新生とは既存の血管より新規の血管が形成される現象である．固形腫瘍の増殖において酸素や栄養を供給し，老廃物を排出する血管は必須であり，血管新生が行われないと固形腫瘍はある程度の大きさ以上には増殖できない²²．

このため，腫瘍細胞自身が **vascular endothelial growth factor (VEGF)** を分泌し，その受容体である **VEGFR** が活性化されることで自らの周囲に血管新生を誘導している²²．また，これらの新生血管を介して遠隔臓器への転移を引き起こすと考えられている．このように，固形腫瘍の増殖や転移などと血管新生は密接な関係にある．**VEGF** のモノクローナル抗体である **bevacizumab** のように血管新生を阻害する薬剤が，固形腫瘍の治療に有効であることが報告されている²³．また，**VEGF** の働きを阻害することと同様に，その受容体である **VEGFR** の発現を抑えることは，血管新生や腫瘍の増殖や転移を抑制するのに有効であると考えられる．我々の *in vitro* の実験結果から，**EGCG** は **VEGF** の主要な受容体である **VEGFR2** の発現を低下させ，その下流シグナル伝達経路で細胞生存，増殖などに深く関与している **Akt** 経路の活性を低下させ，腫瘍細胞の増殖が抑制されたと考えられる．今回の我々の研究ではヒト大腸癌細胞株でしか検討していないが，**EGCG** には血管内皮細胞の毛細管形成や遊走を抑制したり，**VEGFR2** の発現を低下させたりする作用があることが報告されている^{24,25}．肝転移腫瘍内の新生血管が少なかった結果を考慮すると，**EGCG** は癌

細胞に対する直接的な作用だけではなく、周囲の血管内皮細胞に作用し血管新生を抑制することで腫瘍の増大を抑制した可能性がある。今後は癌細胞と血管内皮細胞との共存下での EGCG の作用を検討し、より詳細なメカニズムを明らかにしていく必要がある。

p38 は extracellular signal-regulated kinase (ERK) や JNK とともに MAPK ファミリーを形成しており、この一群のキナーゼは、増殖、分化、アポトーシスなどで重要な役割を担っている²⁶。特に、p38 と JNK は、高浸透圧、炎症性サイトカイン、酸化、熱ショック、紫外線などの細胞外からの刺激によって活性化することからストレス応答 MAPK として知られている²⁷。細胞外ストレスによって p38 が活性化すると、様々な基質が相互作用し、炎症反応、細胞分化、細胞周期停止、老化、アポトーシスなどを引き起こすことが知られている²⁸。Irinotecan や oxaliplatin などの DNA をターゲットにしている抗癌剤が p38 を介してアポトーシスを引き起こすことが報告されており^{29,30}、EGCG においても p38 や JNK を介してアポトーシスが誘導されることが報告されている¹⁵。今回の我々の *in vitro* の検討でも、EGCG 投与によって p38 が活性化しており、これによってアポトーシスが誘導されたと考えられる。

近年、緑茶成分を含むサプリメントの服用で肝障害を引き起こした症例や³¹、*in vivo* で EGCG の多量投与により肝障害が惹起されたという報告があり³²、EGCG が肝臓に与える影響が懸念されている。*In vivo* で肝障害を惹起した EGCG 投与量は、腹腔内投与では 100 mg / kg / day、経口投与では 500 ～

1,500 mg / kg / day であり³²⁻³⁴、我々が今回使用した EGCG 投与量と比較してかなり多量である。また、EGCG は正常ヒト肝細胞と比較して、ヒト肝細胞癌に対してより強く増殖を阻害することが報告されている³⁵。今後は EGCG が肝臓に与える影響を詳細に検討する必要があるが、今回我々が投与したような適切な用量の EGCG を投与することで、副作用のリスクを最小限に抑え、腫瘍の増殖を抑えることができると考えられる。

近年の大腸癌の化学療法の主流は多剤併用化学療法で、5-FU, oxaliplatin, irinotecan, bevacizumab などを併用することで予後が改善してきた⁹。我々は今回の *in vivo* の検討で EGCG がヒト大腸癌肝転移の増大を抑制することを明らかにした。また、大腸癌細胞ではないものの、EGCG に 5-FU や oxaliplatin を併用投与することで相乗効果を発揮することが *in vitro* で報告されている^{36,37}。今後、大腸癌細胞における EGCG と既存の抗癌剤との相乗効果を *in vitro* および *in vivo* で検討して行く必要があるが、EGCG との併用療法により予後の改善などの上乗せ効果が期待できると考えられる。

EGCG は緑茶に含まれているため、すでに日常的に飲用されている。我々が使用した投与経路である腹腔内投与だけではなく、EGCG の経口投与でもヒト大腸癌細胞の皮下移植モデルにおいて腫瘍の増大が抑制されたという報告がある^{16,18}。また、臨床研究の *pilot study* で緑茶サプリメントを服用することで内視鏡的大腸腺腫摘出後の異時性大腸腺腫を予防できたという報告もあり³⁸、アジュバント療法として EGCG を内服することで大腸癌術後の再発を予防できる可能性がある。

第 6 章 結論

EGCG は VEGF 受容体の抑制を介して Akt の活性を低下させ、また p38 を活性化させることによりヒト大腸癌細胞の増殖を抑制し、アポトーシスを誘導した。EGCG はヒト大腸癌肝転移腫瘍内のアポトーシスを誘導することによって有意に肝転移腫瘍の増大を抑制した。

謝辞

本研究を終えるにあたり，貴重な研究を行う機会を与えてくださった大河内信弘教授に深い敬意と感謝を申し上げます．さらに，日々の研究の中でご指導をいただいた村田聡一郎准教授をはじめ消化器外科研究室の皆様に感謝いたします．

参考文献

1. Ferlay J, Shin HR, Bray F, et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*. 2010;127:2893-917.
2. Manfredi S, Lepage C, Hatem C, et al. Epidemiology and management of liver metastases from colorectal cancer. *Ann Surgery*. 2006;244:254-9.
3. Hughes KS, Rosenstein RB, Songhorabodi S, et al. Resection of the liver for colorectal carcinoma metastases. A multi-institutional study of long-term survivors. *Dis Colon Rectum*. 1988;31:1-4.
4. Scheele J, Stang R, Altendorf-Hofmann A, et al. Resection of colorectal liver metastases. *World J Surgery*. 1995;19:59-71.
5. Yamada H, Kato H, Kondo S, et al. Repeat hepatectomy for recurrent hepatic metastases from colorectal cancer. *Hepatogastroenterology*. 2001;48:828-30.
6. Kato T, Yasui K, Hirai T, et al. Therapeutic results for hepatic metastasis of colorectal cancer with special reference to effectiveness of hepatectomy: analysis of prognostic factors for 763 cases recorded at 18 institutions. *Dis Colon Rectum*. 2003;46:S22-31.
7. Scheer MG, Sloots CE, Wilt GJ, et al. Management of patients with asymptomatic colorectal cancer and synchronous irresectable metastases. *Ann Oncol*. 2008;19:1829-35.
8. Dy GK, Hobday TJ, Nelson G, et al. Long-term survivors of metastatic

- colorectal cancer treated with systemic chemotherapy alone: a North Central Cancer Treatment Group review of 3811 patients, N0144. *Clin Colorectal Cancer*. 2009;8:88-93.
9. Venook A. Critical evaluation of current treatments in metastatic colorectal cancer. *Oncologist*. 2005;10:250-61.
 10. Cabrera C, Artacho R, Gimenez R. Beneficial effects of green tea--a review. *J Am Coll Nutr*. 2006;25:79-99.
 11. Suzuki E, Yorifuji T, Takao S, et al. Green tea consumption and mortality among Japanese elderly people: the prospective Shizuoka elderly cohort. *Ann Epidemiol*. 2009;19:732-9.
 12. Khokhar S, Venema D, Hollman PC, et al. A RP-HPLC method for the determination of tea catechins. *Cancer Lett*. 1997;114:171-2.
 13. Du GJ, Zhang Z, Wen XD, et al. Epigallocatechin Gallate (EGCG) is the most effective cancer chemopreventive polyphenol in green tea. *Nutrients*. 2012;4:1679-91.
 14. Shimizu M, Adachi S, Masuda M, et al. Cancer chemoprevention with green tea catechins by targeting receptor tyrosine kinases. *Mol Nutr Food Res*. 2011;55:832-43.
 15. Chen C, Shen G, Hebbar V, et al. Epigallocatechin-3-gallate-induced stress signals in HT-29 human colon adenocarcinoma cells. *Carcinogenesis*. 2003;24:1369-78.
 16. Shimizu M, Shirakami Y, Sakai H, et al. (-)-Epigallocatechin gallate

- inhibits growth and activation of the VEGF/VEGFR axis in human colorectal cancer cells. *Chem Biol Interact.* 2010;185:247-52.
17. Tran PL, Kim SA, Choi HS, et al. Epigallocatechin-3-gallate suppresses the expression of HSP70 and HSP90 and exhibits anti-tumor activity in vitro and in vivo. *BMC cancer* 2010;10:276.
 18. Jin H, Gong W, Zhang C, et al. Epigallocatechin gallate inhibits the proliferation of colorectal cancer cells by regulating Notch signaling. *Onco Targets Ther.* 2013;6:145-53.
 19. Hoffman RM. Orthotopic metastatic mouse models for anticancer drug discovery and evaluation: a bridge to the clinic. *Invest New Drugs.* 1999;17:343-59.
 20. Wilmanns C, Fan D, Obrian C, et al. Modulation of Doxorubicin sensitivity and level of p-glycoprotein expression in human colon-carcinoma cells by ectopic and orthotopic environments in nude-mice. *Int J Oncol.* 1993;3:413-22.
 21. Sweeney TJ, Mailander V, Tucker AA, et al. Visualizing the kinetics of tumor-cell clearance in living animals. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96:12044-9.
 22. Nishida N, Yano H, Nishida T, et al. Angiogenesis in cancer. *Vasc Health Risk Manag.* 2006;2:213-9.
 23. Shih T, Lindley C. Bevacizumab: an angiogenesis inhibitor for the treatment of solid malignancies. *Clin Ther.* 2006;28:1779-802.

24. Shankar S, Ganapathy S, Hingorani SR, et al. EGCG inhibits growth, invasion, angiogenesis and metastasis of pancreatic cancer. *Front Biosci.* 2008;13:440-52.
25. Xu H, Becker CM, Lui WT, et al. Green tea epigallocatechin-3-gallate inhibits angiogenesis and suppresses vascular endothelial growth factor C/vascular endothelial growth factor receptor 2 expression and signaling in experimental endometriosis in vivo. *Fertil Steril.* 2011;96:1021-8.
26. Johnson GL, Lapadat R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science.* 2002;298:1911-2.
27. Zarubin T, Han J. Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell Res.* 2005;15:11-8.
28. Shi Y, Gaestel M. In the cellular garden of forking paths: how p38 MAPKs signal for downstream assistance. *Biol Chem.* 2002;383:1519-36.
29. Liu HF, Hu HC, Chao JI. Oxaliplatin down-regulates survivin by p38 MAP kinase and proteasome in human colon cancer cells. *Chem Biol Interact.* 2010;188:535-45.
30. Rudolf E, Kralova V, Rudolf K, et al. The role of p38 in irinotecan-induced DNA damage and apoptosis of colon cancer cells. *Mutat Res.* 2013;741-742:27-34.
31. Mazzanti G, Menniti-Ippolito F, Moro PA, et al. Hepatotoxicity from green tea: a review of the literature and two unpublished cases. *Eur J*

- Clin Pharmacol. 2009;65:331-41.
32. Lambert JD, Kennett MJ, Sang S, et al. Hepatotoxicity of high oral dose (-)-epigallocatechin-3-gallate in mice. Food Chem Toxicol. 2010;48:409-16.
33. Galati G, Lin A, Sultan AM, et al. Cellular and in vivo hepatotoxicity caused by green tea phenolic acids and catechins. Free Radic Biol Med. 2006;40:570-80.
34. Isbrucker RA, Edwards JA, Wolz E, et al. Safety studies on epigallocatechin gallate (EGCG) preparations. Part 2: dermal, acute and short-term toxicity studies. Food Chem Toxicol. 2006;44:636-50.
35. Shimizu M, Shirakami Y, Sakai H, et al. EGCG inhibits activation of the insulin-like growth factor (IGF)/IGF-1 receptor axis in human hepatocellular carcinoma cells. Cancer Lett. 2008;262:10-8.
36. Yunos NM, Beale P, Yu JQ, et al. Synergism from the combination of oxaliplatin with selected phytochemicals in human ovarian cancer cell lines. Anticancer Res. 2011;31:4283-9.
37. Yang XW, Wang XL, Cao LQ, et al. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate enhances 5-fluorouracil-induced cell growth inhibition of hepatocellular carcinoma cells. Hepatol Res. 2012;42:494-501.
38. Shimizu M, Fukutomi Y, Ninomiya M, et al. Green tea extracts for the prevention of metachronous colorectal adenomas: a pilot study. Cancer

Epidemiol Biomarkers Preve. 2008;17:3020-5.

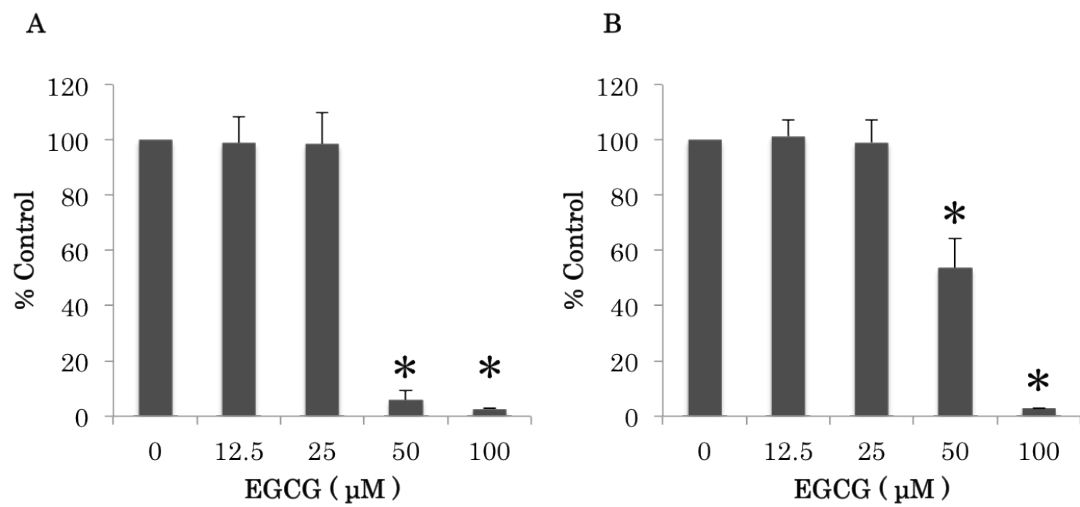


図 1. EGCG の増殖抑制効果

大腸癌細胞株に対する EGCG の増殖抑制効果を生存細胞数を測定する cell counting kit-8 を用いて検討した。

(A) RKO に EGCG を添加し 24 時間後に測定した。

(B) HCT116 に EGCG を添加し 24 時間後に測定した。

n = 8, グラフは, 平均値 ± 標準偏差で表示。

* $p < 0.01$ versus EGCG 0 μM.

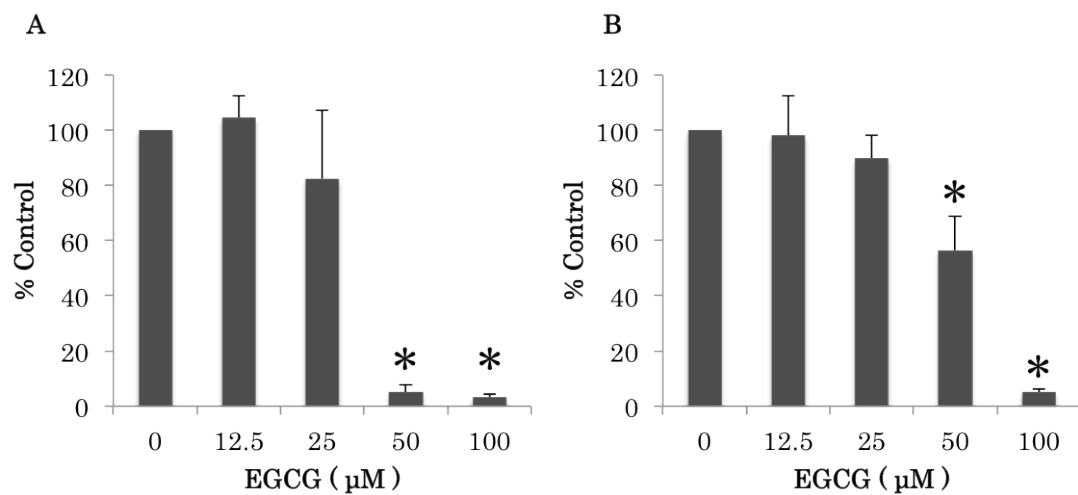


図 2. EGCG の増殖抑制効果

大腸癌細胞株に対する EGCG の増殖抑制効果を DNA 合成の指標である BrdU を用いて検討した.

(A) RKO に EGCG を添加し 24 時間後に測定した.

(B) HCT116 に EGCG を添加し 24 時間後に測定した.

n = 8, グラフは, 平均値 ± 標準偏差で表示.

* p < 0.01 versus EGCG 0 μM.

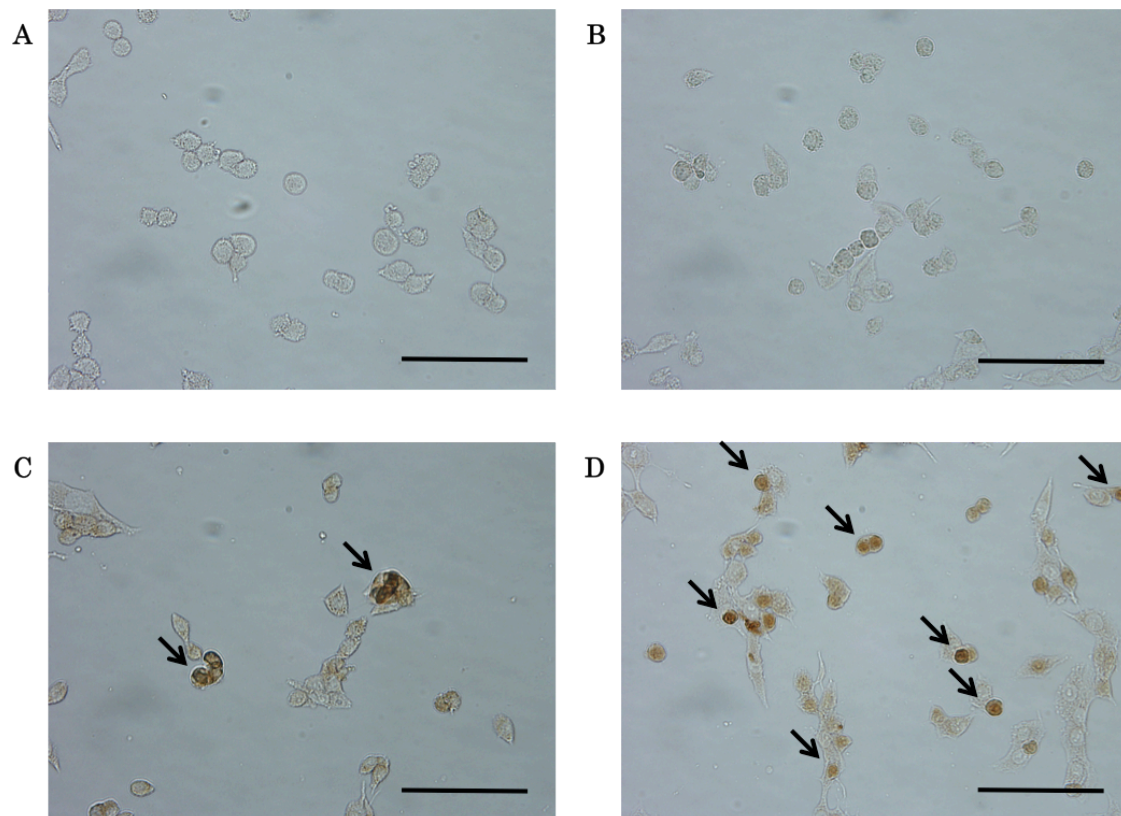


図 3. EGCG のアポトーシス誘導効果

EGCG のアポトーシス誘導効果をアポトーシス過程で生じる断片化 DNA を検出する TUNEL 法を用いて検討した. RKO に EGCG を添加し, 4 時間後に測定した.

(A) EGCG 0 μ M, (B) EGCG 25 μ M, (C) EGCG 50 μ M, (D) EGCG 100 μ M.

矢印はアポトーシスを起こした細胞を示している.

Scale bar 100 μ m. 倍率 400 倍.

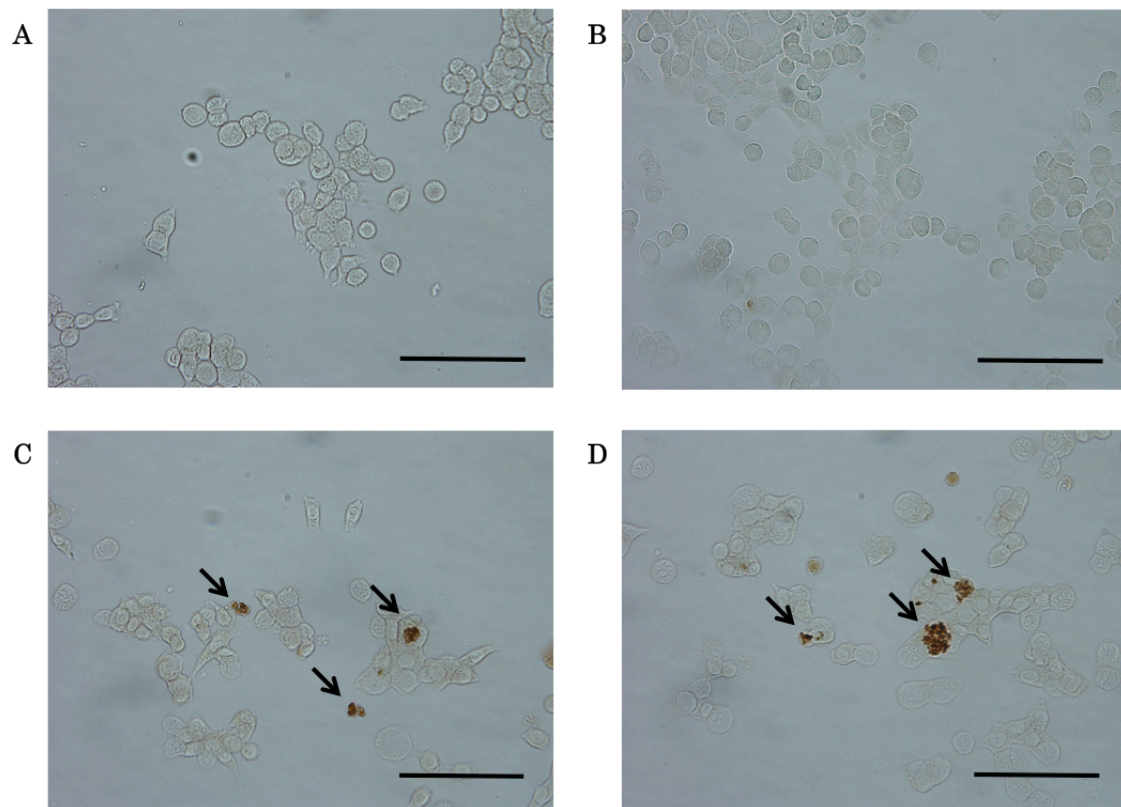


図 4. EGCG のアポトーシス誘導効果

EGCG のアポトーシス誘導効果をアポトーシス過程で生じる断片化 DNA を検出する TUNEL 法を用いて検討した. HCT116 に EGCG を添加し, 4 時間後に測定した.

(A) EGCG 0 μ M, (B) EGCG 25 μ M, (C) EGCG 50 μ M, (D) EGCG 100 μ M.

矢印はアポトーシスを起こした細胞を示している.

Scale bar 100 μ m. 倍率 400 倍.

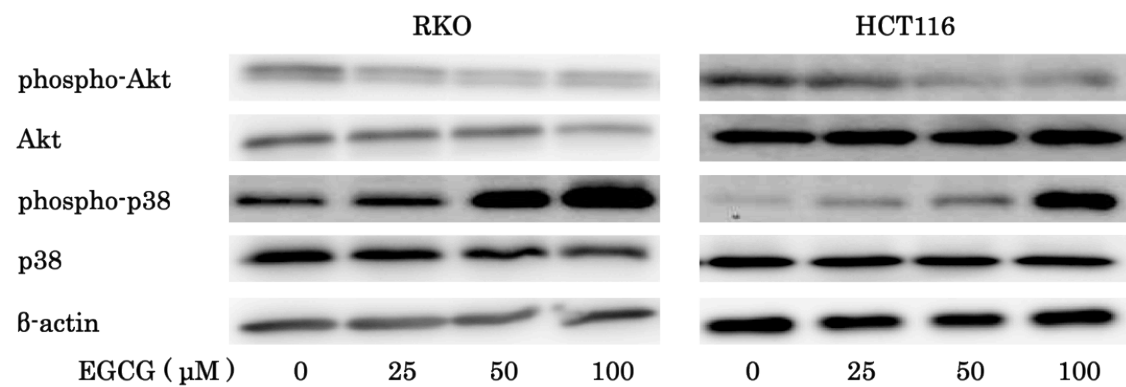


図 5. EGCG がシグナル伝達に与える影響

大腸癌細胞株に EGCG を添加し、12 時間後にサンプルを採取した。

phospho-Akt, Akt, phospho-p38, p38, β-actin を Western blot で検討した。

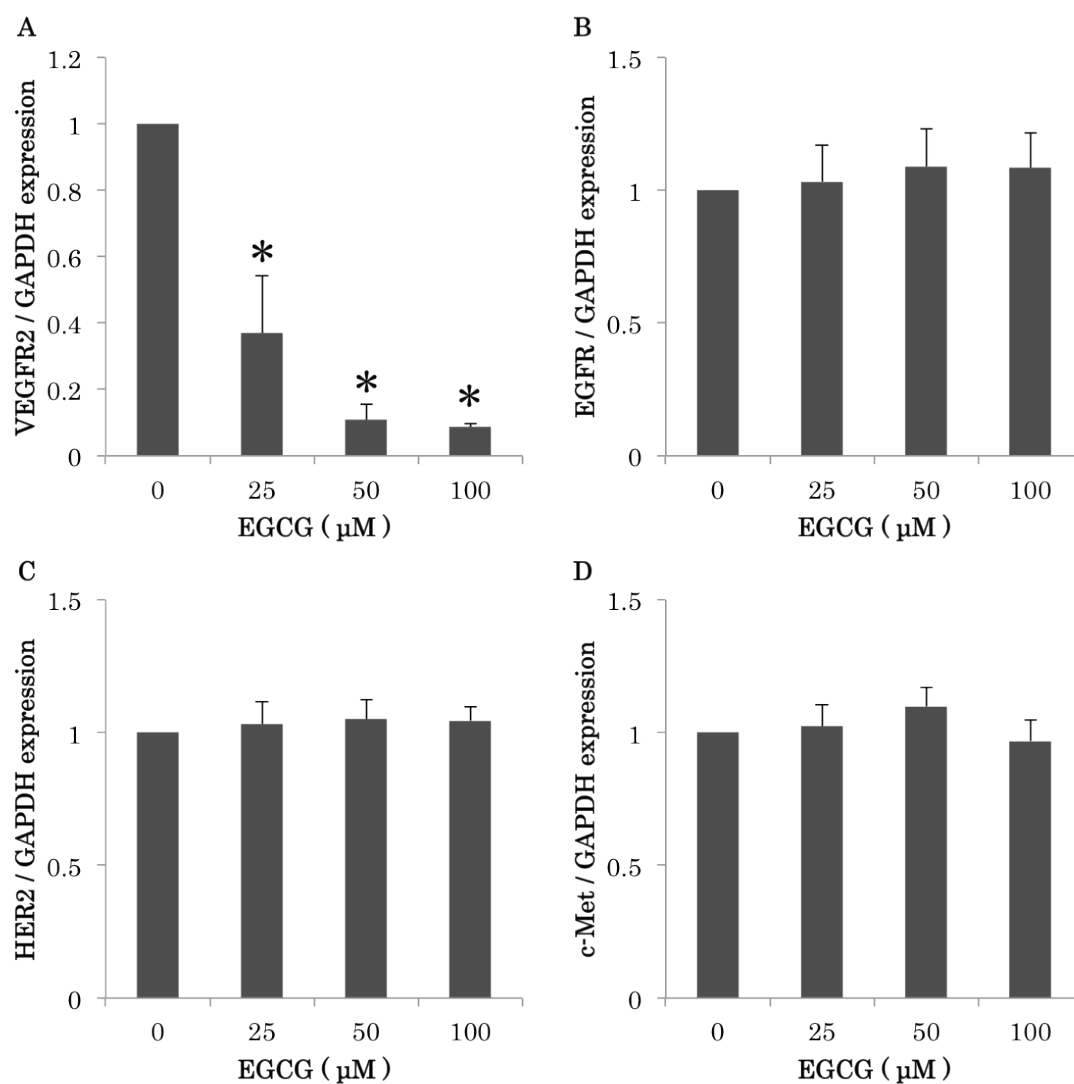


図 6. EGCG がチロシンキナーゼ受容体に与える影響

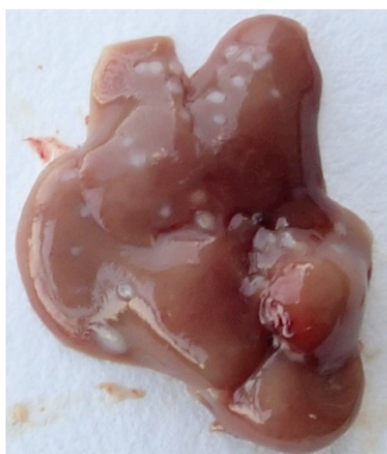
RKO に EGCG を添加し、2 時間後にサンプルを採取し、リアルタイム RT-PCR で検討した。

(A) VEGFR2, (B) EGFR, (C) HER2, (D) c-Met.

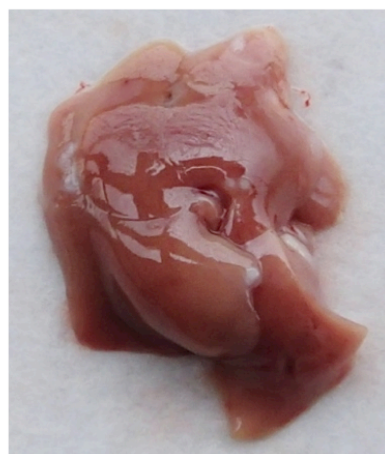
n = 4, グラフは、平均値 ± 標準偏差で表示。

* p < 0.01 versus EGCG 0 μM.

A

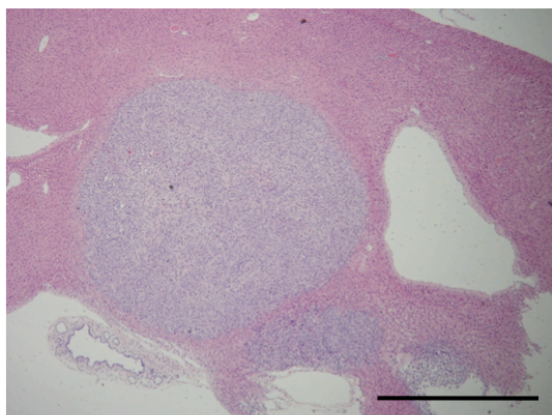


control 群



EGCG 群

B



control 群



EGCG 群

図 7. EGCG の肝転移腫瘍に対する効果

RKO によるヒト大腸癌肝転移腫瘍モデルを作製し，EGCG の抗腫瘍効果を検討した．

(A) control 群（左），EGCG 群（右）の肉眼像

(B) control 群（左），EGCG 群（右）の病理組織像

Hematoxylin-eosin 染色． Scale bar 1 mm． 倍率 40 倍．

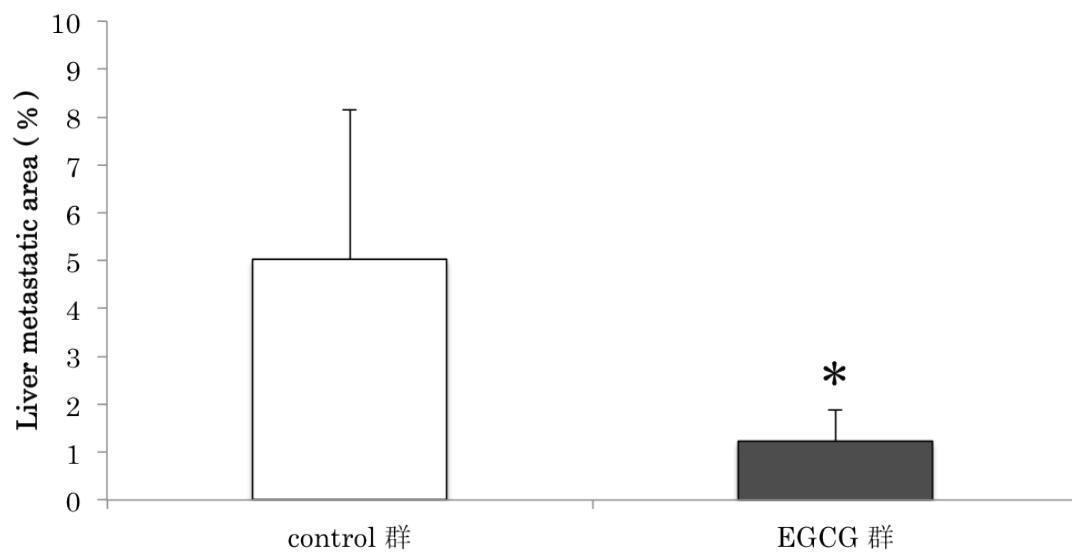


図 8. EGCG の肝転移腫瘍に対する効果

摘出した肝臓で正常肝臓に対する転移腫瘍の面積を計測した.

n = 12, グラフは, 平均値 \pm 標準偏差で表示.

* $p < 0.05$ versus control 群.

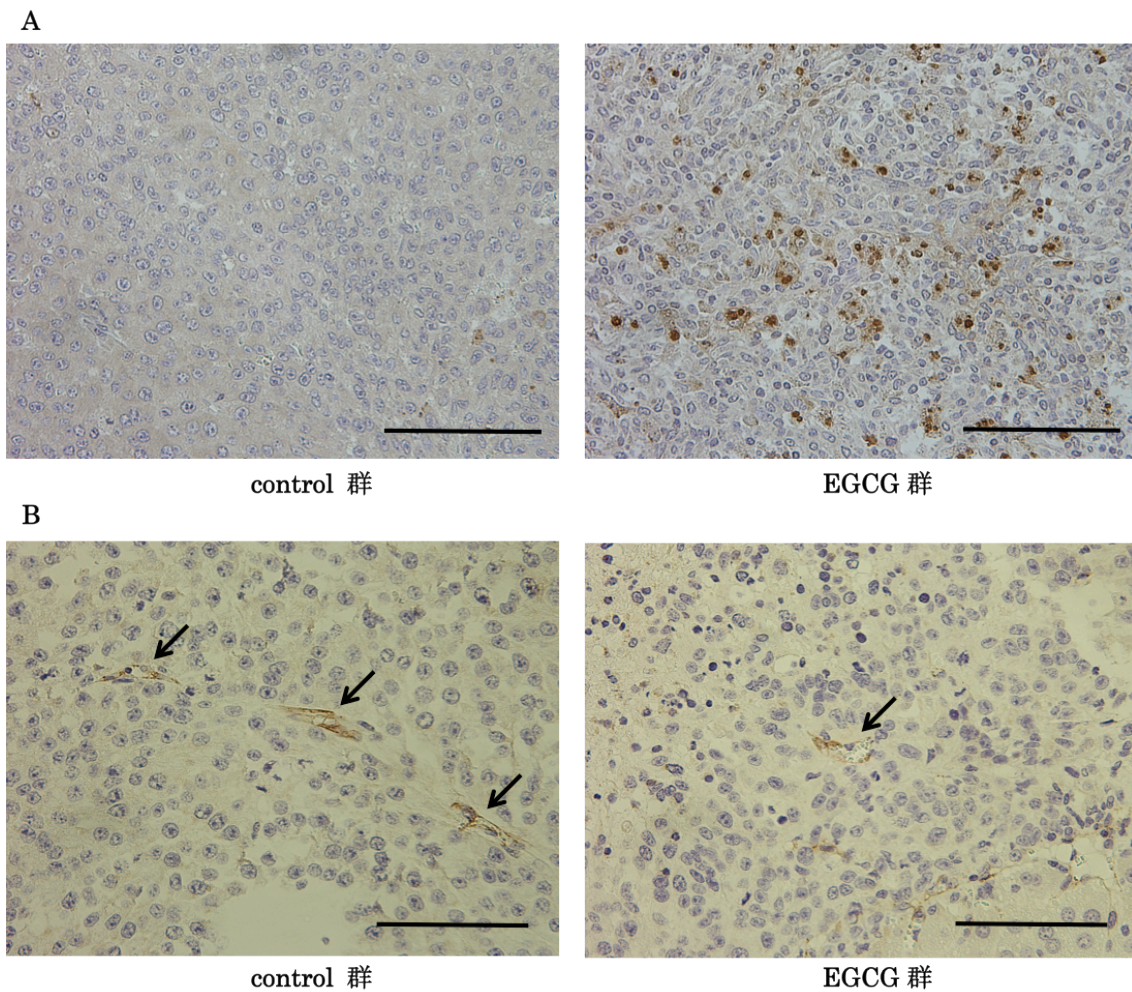


図 9. 肝転移腫瘍内のアポトーシスと血管新生

(A) control 群 (左), EGCG 群 (右) の TUNEL 染色像.

(B) control 群 (左), EGCG 群 (右) の anti-CD31 antibody による免疫染色像.

Scale bar 100 μ m. 倍率 400 倍.

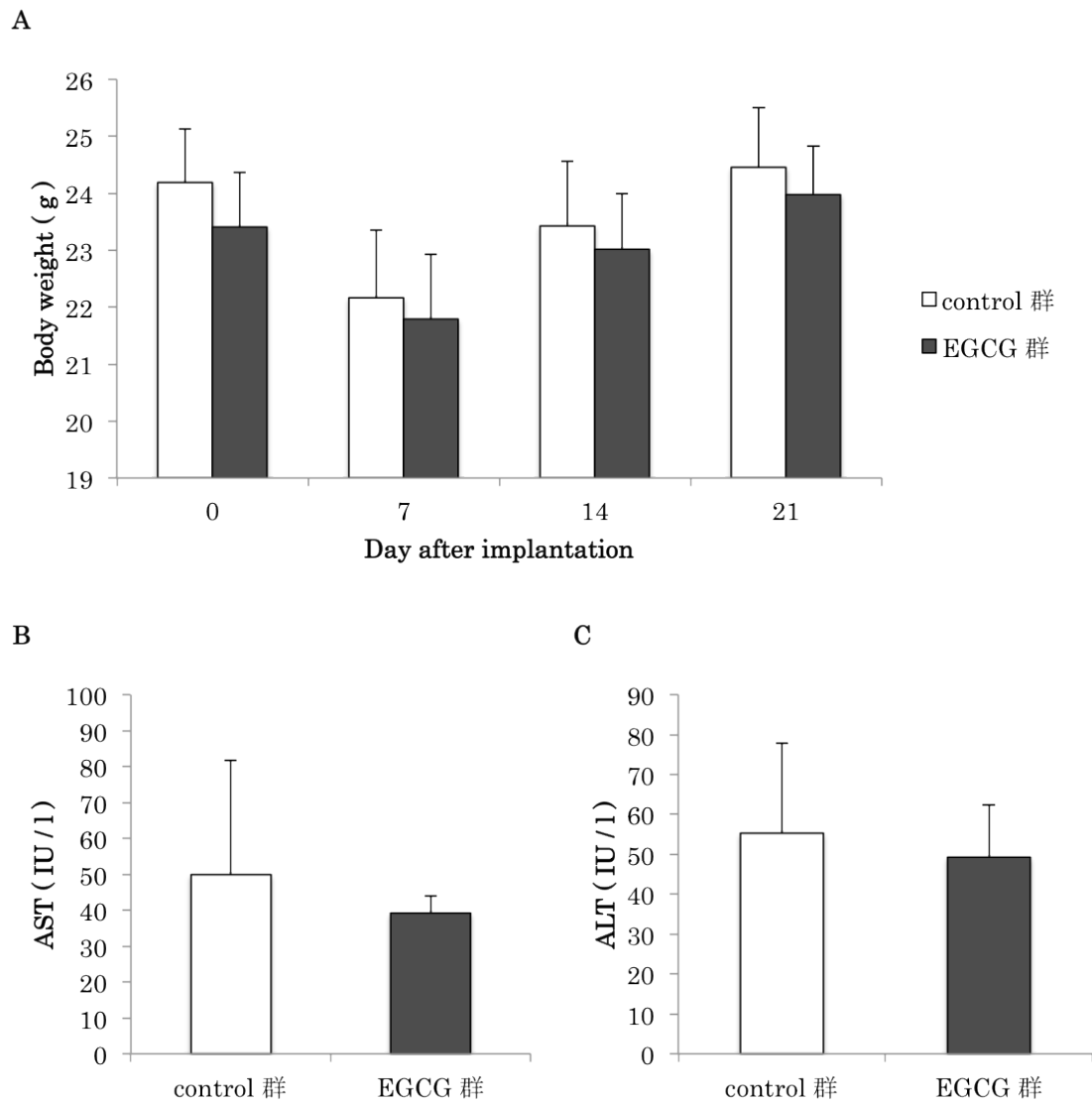


図 10. EGCG がマウスに及ぼす副作用

副作用として、体重変化、血清 AST、ALT 値を検討した。

(A) 体重変化.

(B) 血清 AST 値.

(C) 血清 ALT 値.

n = 12, グラフは、平均値 ± 標準偏差で表示.

表 1 . プライマーリスト

Gene name	Forward (5' to 3')	Reverse (5' to 3')
VEGFR2	TTGCCCTTGTTCTGTCCTTTTT	GTCATTGTTCCCAGCATTTTAC
EGFR	GGCTGCCTCCTGGACTATGT	AGTTCATGCCCTTTGCGATCT
HER2	TCCCCCAAAGCCAACAAAG	CCGTGGATGTCAGGCAGAT
c-Met	CTCTCTGCCCCACCCTTTG	TGTCCCGCTCAGGCATTC
GAPDH	GGAGTCCACTGGCGTCTTCA	TTCACACCCATGACGAACATG