

高橋元論文内容の要旨

主論文

The Preventive Effect of Green Tea on the Gap Junction Intercellular Communication in Renal Epithelial Cells Treated with a Renal Carcinogen

Green tea の腎尿細管細胞発癌抑制効果の検討

Hajime Takahashi, Koichiro Nomata, Ken-ichi Mori,
Manabu Matsuo, Taishi Miyaguchi, Mitsuru Noguchi and Hiroshi Kanetake

ANTICANCER RESEARCH 24: 3757-3762, 2004

長崎大学大学院医学研究科外科系専攻
(指導教授： 金武 洋)

論文内容の要旨

(緒言) 緑茶の抗腫瘍効果は主に **green tea polyphenols** によるものである。しかも **Green tea polyphenols** にも抗腫瘍活性があるものは数種類存在し、その中で最も活性が高いものは **Epigallo-catechin gallate (EGCG)** である。**Green tea polyphenols** の腫瘍抑制機序については抗酸化作用やグルタチオントランスフェラーゼ酵素活性の増強効果、プロテインキナーゼ C や細胞増殖の抑制効果、抗炎症作用によるものと言われている。また、ギャップ結合は細胞間結合の一つであり細胞膜に存在し、細胞間シグナル伝達に直接的に関与する。ギャップ結合を構成する半チャンネルをコネクソンといい、コネクソンはコネクシン蛋白によって構成されている。ギャップ結合の機能としては **1.2Kda** 以下の細胞内シグナル伝達物質を隣り合う細胞へ直接輸送する機能を持ち、細胞分化・増殖やホメオスターシスの維持に役立つ。発癌と細胞間コミュニケーションは密接な関係にあると報告されている。一方、腎細胞癌の細胞学的特性としては他臓器の腫瘍とは異なり有効な薬物療法は確立されていないのが現状である。化学療法、放射線療法は効果がなく、唯一、免疫療法がおこなわれているがその治療効果は十分と言えない。今回、我々は緑茶の主要成分であり **EGCG** を用いて腎尿細管細胞の化学発癌抑制効果について細胞間コミュニケーションであるギャップ結合の観点より検討した。

(対象と方法) 腎尿細管細胞は **MDCK** 細胞を使用した。**EGCG** の **MDCK** 細胞に対する培養液中の最大至適濃度を調べるために **LDHassay** 法を用いた。腎発癌因子には **Dimethylnitrosamine(DMN)** を使用した。ギャップ結合の観察には **Scrape loading dye**

transfer 法を用いた。EGCG 投与による DMN 処理 MDCK 細胞のギャップ結合の変化について検討した。同様の細胞処理により腎組織におけるギャップ結合の責任蛋白であるコネキシン 43 蛋白発現変化を観察するため、一次抗体に Anti-Cx43 monoclonal 抗体を二次抗体に FITC conjugated goat anti-mouse IgG を使用し免疫染色および Western blot 解析にて検討した。

(結果) LDH assay を施行し EGCG の培養液中最大至適濃度を $10 \mu\text{g/ml}$ に設定した。Scrape loading dye transfer 法でギャップ結合を観察すると MDCK 細胞間、EGCG 前処理 MDCK 細胞間では正常なギャップ結合を認めた。DMN 処理 MDCK 細胞間では明らかにギャップ結合の抑制がみられた。しかし EGCG 投与により DMN 処理 MDCK 細胞間はギャップ結合抑制の回復を認めた。同様の細胞処理によりコネキシン 43 蛋白を免疫染色すると MDCK 細胞、EGCG 前処理 MDCK 細胞ではコネキシン 43 蛋白の発現を細胞膜に認めたが、DMN 処理 MDCK 細胞ではコネキシン 43 蛋白の発現を認めない。一方、EGCG 投与により DMN 処理 MDCK 細胞はコントロールと同様に細胞膜にコネキシン 43 蛋白の発現を認めた。Western blot 解析においても DMN 処理 MDCK 細胞ではコネキシン 43 蛋白の発現低下を認めるが、EGCG 投与によりコネキシン 43 蛋白の発現低下の抑制を認めた。

(考察) われわれはこれまで腎発癌過程において細胞間接着分子であるギャップ結合がその発癌過程に重要な役割を果たしていることを報告している。つまり発癌と細胞間コミュニケーションは密接な関係にあり、細胞間接着に関わる構造にギャップ結合が存在する。正常細胞間のギャップ結合に比し、一般に多くの癌細胞ではギャップ結合は消失しているが、腎発癌過程または腎癌細胞においてはギャップ結合の責任蛋白であるコネキシン 43 蛋白のリン酸化変化によりギャップ結合は減少もしくは消失している。今回、緑茶の主要成分である EGCG を用いて腎尿細管細胞の化学発癌抑制効果についてギャップ結合の観点では、EGCG には腎尿細管細胞の化学発癌抑制効果の可能性が示唆された。この観点からは EGCG が発癌予防や治療に有用である可能性はある。しかし、*in vitro* で緑茶成分が発癌や癌細胞増殖を抑制しても *in vivo* においては未だ不確かであることも事実であり、今後 *in vivo* での検討も必要と考えている。