

カテキンによる細胞保護

川瀬 雅也

カテキンは、その持つさまざまな生理活性から、さまざまな方面で研究が行われるようになってきた。その研究結果も書籍としてまとめられ、研究の動向など多くの情報が比較的たやすく入手できるようになってきた。^{1,2)} これまで、カテキンの生理作用について行われてきた多くの研究は、たとえば抗癌作用であったり、抗アレルギー作用であったり、抗菌作用であったりと、どちらかと言えば、カテキンの薬理的作用に注目したものであった。

筆者らは、カテキンに他の可能性を見いだすことができないかと考えて、細胞死に対するカテキンの効果を調べ始めた。本特集では、筆者らのこれまでの研究成果を中心に紹介することとする。

細胞毒による細胞死からの保護³⁾

細胞死にはネクロシスとアポトーシスの2種類がある。それぞれの過程の細胞死に対して、カテキンが果たして保護効果を発揮するのかどうかを、まず調べた。本研究で用いた細胞毒を図1に示す。プロモベンゼン(BB)はネクロシスを、ルブラトキシシンB(RB)はアポトーシスを、それぞれ肝細胞に引き起こすことが知られている。

肝臓は、身体に1つしかない臓器で、そこでは500以上の生命維持に関わる反応が行われている。しかも、少々機能が落ちてでも自覚症状として表れてこない臓器である。健康診断ではじめて肝機能が落ちていると知る場合も多くある。肝臓障害は、他の多くの病気と同じく、臓

器中の細胞がどんどん死んでいくことによるものであり、肝機能が落ち、過度に細胞を失うと死に至る。

一方で、肝臓は非常に再生力が高く、70%切り取られても数週間で元に戻る。現在の肝障害治療の基本的な進め方は、できるだけ病状が進まないようにして、肝臓の自己再生を待つ方法がとられる。この意味からも、肝細胞保護効果を調べる意義の大きいことがうかがえる。

筆者らは、ラットより単離した初代肝細胞を用い、カテキンの細胞保護効果を検討した。細胞毒により肝細胞に障害を与える時間を24時間とし、24時間後に生存している細胞の割合を調べた。実験条件は、結果と共に図2に示した。

この結果より、エピガロカテキンガレート(EGCG)はBB、RBの両毒素から肝細胞を保護することが分かった。すなわち、カテキンはネクロシスとアポトーシスの両細胞死要因から細胞を守ることを示すことができた。

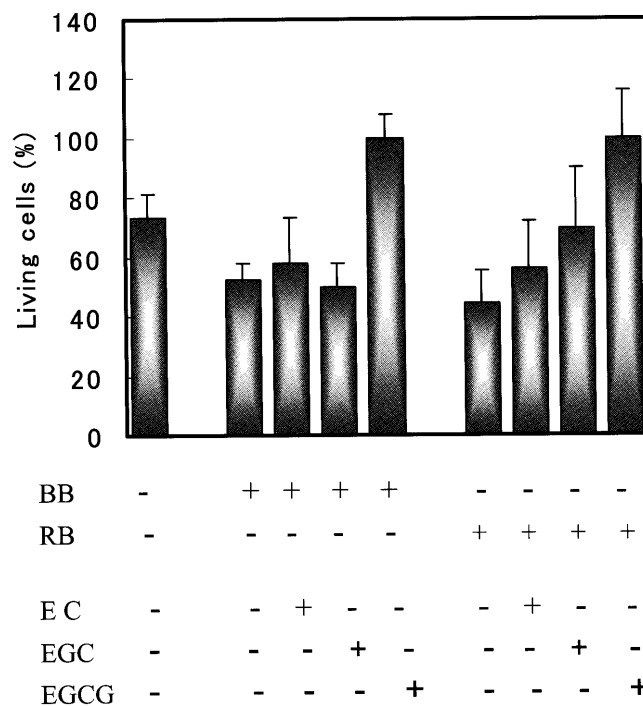
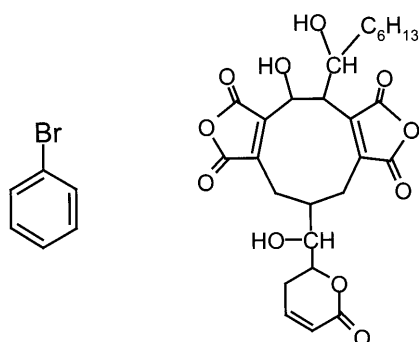


図2. カテキンの細胞毒からの細胞の保護効果。播種細胞数を100%とした時の、24時間培養後の肝細胞の生存率。カテキン類は全て0.2 mMを加えた。BBとRBはそれぞれ1 mM, 77.1 μ Mで処理に用いた。EC, エピカテキン; EGC, エピガロカテキン; EGCG, エピガロカテキン。



Bromobenzene (BB)

Rubratoxin B (RB)

図1. 本研究で用いた細胞毒

他に検討したカテキンは、保護作用が弱いものであった。

さらに、通常、肝細胞の培養では、培養中に肝細胞がどんどん死んでいくが、EGCGを添加し培養することで、この細胞の自然死からも細胞が守られ、コントロール(細胞毒もカテキンも添加していないもの)が24時間培養後、70%強の生存率であるのに対して、EGCG添加では、ほぼ100%の細胞が生存していた。このように、カテキンは細胞を毒素より守るだけではなく、自然死を抑え、細胞の寿命を延ばすことが分かった。

EGCGが、どのようなメカニズムで細胞毒や自然死より細胞を守っているのかについて検討してみた。BBは、そのp450による代謝過程で、高反応性物質に変換され、生体内の高分子(遺伝子やタンパク質)と結合し、その機能を消失させることでネクロシスを誘導することが報告されている。BBの代謝に関わる酵素に対してのカテキンの効果を検討することで、EGCGをはじめとするカテキン類は、その非常に高い抗酸化性により、上記高反応性物質を消去し、BBの毒性を軽減していることを突き止めた。また、RBに関しては、RBのアポトーシス誘導機構も十分わかっていないため、まず、いくつかあるアポトーシス経路の多くに関与しているCaspase 3の活性化に対するEGCGの効果から調べた。

図3に示すように、RBによりCaspase 3の活性が誘導されており、この活性化をEGCGが見事に抑制していた。また、筆者が以前より検討してきた、茶葉中に微量しか

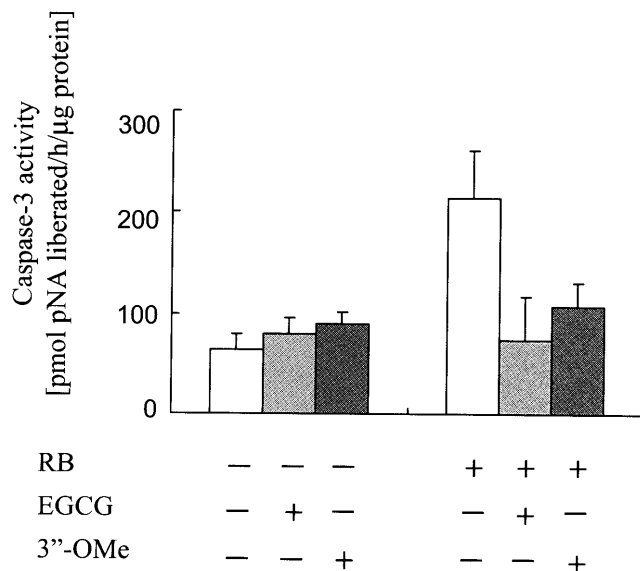


図3. カテキンのCaspase 3活性化に対する影響. RBおよびEGCGの添加量は図2と同じ。EGCG, エピガロカテキン; 3''-OMe, 3''-O-メチルエピガロカテキンガレート。

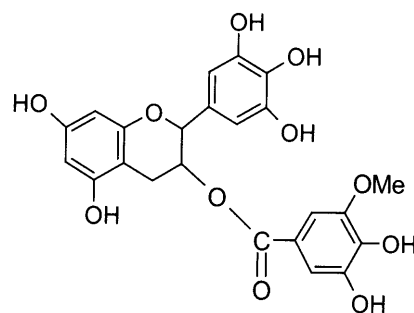


図4. EGCG-3''OMeの構造

含まれない稀少カテキン 3''-O-メチルエピガロカテキンガレート (3''-OMe)^{4,5)}にもEGCGと同様にCaspase 3の活性化を抑えることを見いだした。この構造を図4に示す。

この稀少カテキンが、EGCGと同程度の細胞保護効果を持つことも見いだしている。このように、EGCGや3''-OMeはCaspase 3の活性化を直接あるいは間接に抑えることで、アポトーシスから肝細胞を守っていることが分かった。現在、より詳細な機構解明を進めており、EGCGがCaspase 3のかかなり上流にも作用していることを見いだしている。

カテキンによる肝細胞の低温保存⁶⁾

重篤な肝疾患の究極の治療法は肝臓移植であるとされている。しかし、肝臓移植のためのドナー肝は非常に少なく、移植待機患者だけが増えているのも現状である。このため、肝臓ではなく、高い機能を有したフレッシュな肝細胞を移植することで、ある程度、患者の肝機能を補う肝細胞移植の研究がなされている。また、肝細胞を用いた薬物代謝の研究も、医薬品開発上、必要不可欠であり、機能を保持したヒト初代肝細胞の入手が必要であるとされている。

いずれの場合においても、多くの場合、細胞の保存・細胞の移送が必要となるケースがほとんどであることが推察される。特に薬品開発の場合、研究にかかる前に、所定の機関より細胞を譲り受ける研究所まで移送して行くケースがほとんどである。そのため、移送中に細胞を凍結するのではなく、低温保存して運ぶ方がコスト・設備の面から有利となる。そのため細胞の低温保存技術の開発が急務となっている。

また、この技術は、発展させることにより臓器の低温保存技術にもつながるものである。これまで多くの細胞保存液に関する研究がなされてきた。その多くが株化細胞の凍結保存を対象としており、その手法をそのまま

低温保存に使うことができない。

筆者らは、先にも述べたようにカテキンが細胞のアポトーシスを抑制する点に着目し、カテキンが細胞の低温保存に用いることができると考えた。

京都のある企業が、EGCGを添加した細胞保存液に関しての特許を出願していたが、EGCGの添加効果について調べたもので、メカニズムなどに関しては触れられていなかった。そこで筆者らは、本当にカテキンが細胞の低温保存に有効かを調べ、さらにその作用機構を調べるために研究を行った。

単離直後の初代肝細胞を落ち着かせるために6時間程度培養した後、回収し、4°Cで24時間保存した。保存後、1時間加温した後、MTT法により生存細胞数を測定した。この結果を図5に示す。

コントロールは通常の培地で保存したもの。DMSOは細胞を低温障害より守るとされており、比較対象として用いた。図5に示されるように、コントロールあるいはDMSO添加では、保存後の細胞生存率が20%以下であったのに対して、3"-OMeを添加した場合は、生存率が40%近くあった。EGCGについても同様の検討を加えたが、3"-OMe添加とほぼ同じ結果を得た。

入手可能な細胞保存液セルバンカーを用いても検討を行ってみた。セルバンカーは本来、株化細胞の凍結保存用に開発されたものであり、低温保存にはあまり向かないと考えられたが、上記条件ではカテキン類に匹敵する程度の効果を示した。

保存後の加温時間を24時間とすると、コントロール・DMSO・セルバンカーは細胞生存率が10%程度にまで落ち込んだが、カテキン類を添加したものは1時間加温し

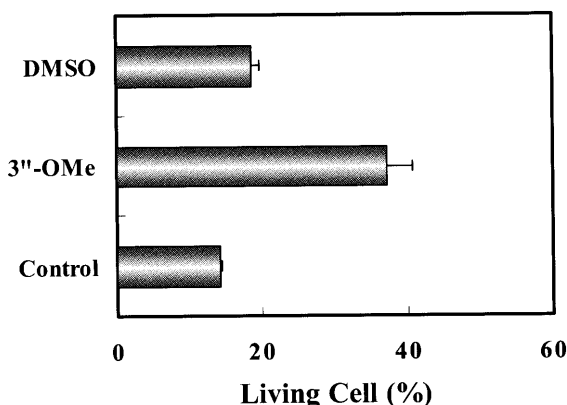


図5. 3"-O-メチルエピガロカテキンガレートによる肝細胞の低温障害からの保護。播種細胞数を100とし、24時間4°Cで保存後の、生存肝細胞数を示す。3"-OMeは3"-O-メチルエピガロカテキンガレートを0.4 mM、DMSOはジメチルスルホキシドを10%加え保存したことを示す。

たときとほぼ同等の生存率であった。この結果は、セルバンカーは、保存中の細胞の生存をある程度確保するが、保存後その細胞を使用する場合、急速に細胞死が起こるのに対し、カテキンは保存中も保存後も、ある程度細胞死を抑制することを意味しており、肝細胞を医薬品開発に利用する場合、カテキンが有利であることが示唆された。

カテキンは、どのようにして細胞を低温障害より守っているのかについても検討を加えた。カテキンは先に述べたように、アポトーシス・ネクローシスを抑制することも一因であることが考えられる。細胞内の活性酸素種を取り除くこともメカニズムの一つであると考えてよい。これ以外の作用はないのかについて検討を行った。

低温保存後の肝細胞機能（今回は尿素合成能）について調べてみると、カテキンで保存した場合、保存終了後1時間の加温では、肝特異的機能の一つである尿素合成能が非常に低く、加温を24時間行った場合に尿素合成能が回復する傾向にあることから、カテキン添加培地中では保存中、細胞の尿素合成能などの代謝が非常に低レベルに抑制されていることが分かった。このことは、細胞の代謝を抑えることでエネルギーのロスを防がれ、また有害な活性酸素種の発生も抑えられるため、カテキンのラジカルスカベンジャー能が有効に活用され、細胞の低温保存に見られたような結果を得たと考えている。

しかし、カテキンの作用はまだ十分でないことも確かであり、今後は今回の知見を基にして、より細胞保存率の高く細胞機能も損なわれない細胞保存法の開発を目指したいと考えている。また、今回の知見は臓器保存に役立つと考えられる。

カテキン機能の強化⁷⁾

これまで見てきたようにカテキン、特に緑茶カテキンの主成分であるEGCGは細胞死抑制・毒素よりの細胞保護・細胞の低温保存において有効であった。しかし、その効果は必ずしも十分なものであるとは言い難い面もある。そこで、筆者らはEGCGの機能強化を試みた。カテキン類は良好な金属キレーターであることもよく知られており、この点を生かし、EGCGの機能強化を行うことができないかと考えて、種々の金属イオンの添加効果を調べた。

その結果、亜鉛（Zn）をEGCGと共に添加することで、図2の10分の1のEGCG濃度で、図2と同様の結果を得ることができた。つまり、Zn添加によりEGCGの機能向上が見られたことになる。

スペクトル測定などの結果より、EGCGはZnと錯体

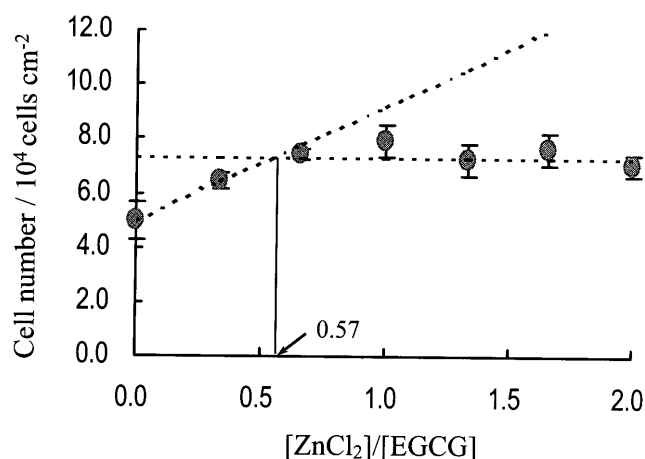


図6. 亜鉛-EGCG錯体の構造解析

を形成していることがわかった。図6は亜鉛とEGCGの比を変えてBBに対しての細胞保護効果を見たもので、Zn-EGCGの効果が横ばいとなる量比が、ZnとEGCGの錯体での構成比となる。すなわち、この錯体はZn(EGCG)₂という構造を持っていることが判明した。

EGCGをZnで錯体化することは、上記の細胞保護において有効であるばかりでなく、細胞の低温保存においてもEGCGの機能を強化するとの結果も得ている。

では、なぜEGCGをZnで錯体化することでEGCGの機能が強化されるのかについて検討を行った。まず、最初に考えられたのは錯体のラジカルスカベンジャー能が高まっていることであつた。しかしながら、EGCG錯体のラジカルスカベンジャー能を測定してみると、錯体はEGCGと同程度のラジカルスカベンジャー能しかもっておらず、機能強化機構はラジカルスカベンジャー能の強化ではないことが判明した。次に、抗酸化能の向上が考えられた。そこで、錯体とEGCGとの間に酸化されやすさにおいて差が見られるかどうかを、サイクリックボルタンメトリーにより評価した。その結果を図7に示す。

サイクリックボルタンメトリーにおいても両者に違いは見られなかった。以上から、Zn錯体形成によりEGCGの物性的な変化は起こらないことが推察された。

ではなぜ、錯体となった場合、先に見られたような機

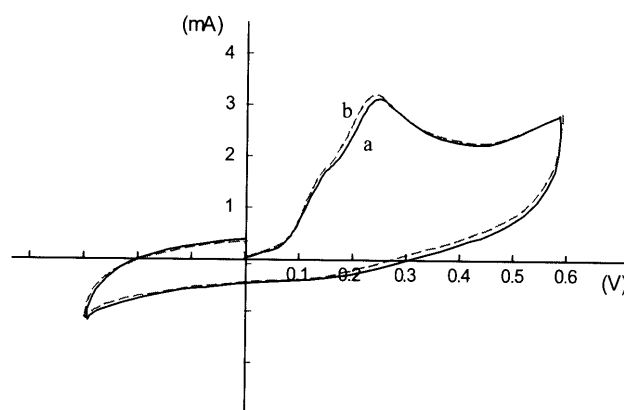


図7. EGCGおよびそのZn錯体のサイクリックボルタンモグラム。a, EGCG; b, Zn-EGCG。作用極、対極、参照極はそれぞれグラッシーカーボン、白金、Ag/AgCl電解液はメタノールと0.1 Mリン酸緩衝液 (pH 7.4) とメタノールを等量混合したもの。

能強化が生じたか、その機構は、カテキンは非常に酸化を受けやすい物質であり、最初に酸化される部位はZnと錯体を作る箇所である。このことは吉岡らにより報告されているCuとEGCGの錯体のESRによる研究から推察することができる。⁸⁾つまり、錯体を作ることで自動酸化が抑えられ、その効果の持続時間が長くなったのが理由と考えられる。また、錯体を作ることで細胞への取り込みや代謝も遅くなり、効果の持続時間が延びる可能性もあり、上記のいくつかの要因が複合して、今回紹介した結果を生んでいると考えている。

今後、さらに研究を進め錯体化による機能強化のメカニズムを明らかにしていきたいと考えている。

文 献

- 1) 村松敬一郎：茶の機能，学会出版センター (2002)。
- 2) Hara, Y.: *Green Tea*, Marcel Dekker (2001)。
- 3) Kagaya, N. *et al.*: *Eur. J. Pharm.*, **450**, 231 (2002)。
- 4) Sijo, R.: *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 1969 (1982)。
- 5) Kawase, M. *et al.*: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **64**, 2218 (2000)。
- 6) Kagaya, N. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **96**, 537 (2003)。
- 7) Kagaya, N. *et al.*: *Biol. Pharm. Bull.*, **25**, 1156 (2002)。
- 8) Yoshioka, H. *et al.*: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **65**, 1697 (2001)。