

—Regular Articles—

緑茶アミノ酸テアニンの組織分布と Glutamate Transporter 介在性制癌剤効果増強

佐塚泰之,^{*,a} 山下恵代,^a 岸本修一,^b 福島昭二,^b 竹内由和,^b 園部 尚^a**Glutamate Transporter Mediated Increase of Antitumor Activity by Theanine, an Amino Acid in Green Tea**Yasuyuki SADZUKA,^{*,a} Yasuyo YAMASHITA,^a Shuichi KISHIMOTO,^b Shoji FUKUSHIMA,^b Yoshikazu TAKEUCHI,^b and Takashi SONOBE^aUniversity of Shizuoka,^a 52-1 Yada, Shizuoka 422-8526, Japan, and Kobe Gakuin University,^b 518 Arise, Igawadani-cho, Nishi-ku, Kobe 651-2180, Japan

(Received June 27, 2002; Accepted August 26, 2002)

We have confirmed that theanine, a major amino acid in green tea, enhances the antitumor activity of doxorubicin (DOX) without an increase in DOX-induced side effects. We believe that the action of theanine is due to decreases in glutamate uptake via inhibition of the glutamate transporter, intracellular glutathione (GSH) synthesis, GS-DOX conjugate level, and subsequent extracellular transport of GS-DOX by the MRP5/GS-X pump. To increase the clinical usefulness of theanine, we examined its effects on the antitumor activity of cisplatin and irinotecan (CPT-11), which are known to be transported by the efflux system related to MRP. Cisplatin decreased tumor volume in M5076 tumor-bearing mice. Furthermore, the combination of theanine with cisplatin increased the decrease in tumor volume as compared with the cisplatin-alone group. Tumor volume in the CPT-11-alone group did not show a decrease, but the combination of theanine with CPT-11 significantly reduced tumor volume. The concentration of cisplatin in the tumor was significantly increased by combination with theanine, and thus we assume that it correlated with the enhancement on the antitumor activity of theanine. On the other hand, changes in drug concentrations with theanine were not observed in normal tissues, but rather it is indicated that theanine tends to reduce their concentrations. Therefore theanine enhances the antitumor activity not only of DOX but also of cisplatin or CPT-11.

Key words—theanine; cisplatin; CPT-11; biochemical modulation; glutamate transporter; MRP/GS-X pump

緒 言

緑茶の研究は多くの研究者により広範に行われており、多岐にわたる有効性が明らかとなっている。¹⁾ 抗酸化作用、抗菌作用、抗変異原作用がその中心であり、機能性食品としての有用性と共に緑茶含有成分の医薬品としての可能性が期待されている。¹⁾ しかしながら、これら有効性はカテキン類を中心に解明されているにすぎず、従来よりその作用が明らかとなっているカフェインを除けば他の成分の作用はいまだ未検討の部分が多い。緑茶に特有のアミノ酸である theanine (Fig. 1) は緑茶のうま味成分であり、その存在は以前より知られている。しかしながら、theanine の作用はリラックス作用以外

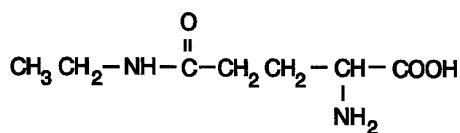


Fig. 1. Structure of Theanine

には栄養学的見地からの検討が行われているのみであり、その他の有用性については不明である。我々は theanine が、抗腫瘍剤 Doxorubicin (DOX) の腫瘍での DOX 濃度を維持することにより DOX の抗腫瘍効果増強（難治性腫瘍への効果増強、転移抑制、耐性腫瘍の克服）をもたらすことを明らかにしてきた。²⁻⁵⁾ さらに、theanine がグルタミン酸誘導体であることより、本作用が glutamate transporter を介することを示し、⁶⁾ theanine が glutamate transporter の isoform である GLAST 及び GLT-1 を阻

^{a)} 静岡県立大学薬学部, ^{b)} 神戸学院大学薬学部
e-mail : sadzuka@u-shizuoka-ken.ac.jp

害, glutamate 取り込み低下による glutamate を基質とする細胞内 GSH 合成減少, DOX の GSH 抱合体である GS-DOX 抱合体量低下, MRP5/GS-X pump を介する細胞外への GS-DOX 抱合体排出低下により腫瘍中の DOX 濃度上昇をもたらすことを明らかにした。⁷⁾しかし, theanine の組織分布性は全く検討されておらず, 有効に腫瘍中に移行しその効果を発揮しているかどうかは不明である。そこで, theanine の腫瘍への分布を検討するとともに, theanine の作用メカニズムに立脚して選択した抗腫瘍剤に対する theanine の有効性を明らかにし, より有効で広範な臨床応用を目指した緑茶摂取の可能性を探った。

実験の部

1. 試薬 Theanine は, 東京化成より購入した。Cisplatin (ランダ注) 及び CPT-11 (トポテシン注) はそれぞれ日本化薬及び第一製薬より購入した。その他の試薬は, 入手できる最も純度の高いものをそのまま使用し, 常法に従って調製して用いた。

2. 実験動物 BDF₁ 系雄性マウス (5 週令, 20–25 g) は, 日本エスエルシー(株)より購入したものを使用した。動物は, 室温 25±1°C, 湿度 55±5 %にて飼育し, 標準実験飼料と水は自由に与えた。

3. Theanine の組織分布 マウスの背部皮下に M5076 ovarian sarcoma (5×10^5 cells/animal) を植え付けて固形腫瘍とした。移植 20 日後の担癌マウスに theanine 10 mg/kg を腹腔内投与し, 投与 1, 4, 8 時間後に腫瘍, 心臓, 肝臓を摘出した。10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.8) にて各組織の 10% ホモジネート液を調製後, 1,200 g にて 15 分間遠心分離し, 上清をメンブランフィルター (0.2 μm) にて濾過した。各組織中の theanine 濃度は, 後藤らの方法⁸⁾に従い, theanine を o- フタルアルデヒド誘導体とした後, HPLC にて分離・測定 (Ex: 340 nm, Em: 450 nm) した。

4. CPT-11 及び Cisplatin の抗腫瘍効果に対する Theanine の影響 脊部皮下に M5076 ovarian sarcoma を 5×10^5 cells/animal 移植し固形腫瘍としたマウスに cisplatin (2.0 mg/kg/day×4 days, i.p.) 若しくは CPT-11 (10 mg/kg/day×4 days, i.p.) を移植 19, 21, 23, 25 日後に, theanine (10 mg/kg/day×4 days, i.p.) を移植 20, 22, 24, 26 日後に投与

した。投与期間中ノギスにて腫瘍の外寸を測定し, 推定腫瘍重量を算出した。移植 27 日目に, 腫瘍, 心臓, 肺, 肝臓, 腎臓を摘出, 湿重量を測定し, 腫瘍重量より cisplatin 及び CPT-11 の抗腫瘍効果と theanine の併用効果を判定すると共に各組織中の cisplatin 及び CPT-11 レベルを原子吸光法及び蛍光光度法にて測定した。

結果

1. Theanine の組織分布 M5076 担癌マウスへの theanine 投与後の腫瘍, 心臓, 肝臓中の theanine 濃度を Fig. 2 に示す。腫瘍中においては theanine は肝臓, 心臓に比べ高濃度存在しており, 測定期間中高値を示した。一方, 心臓においては投与 8 時間後で腫瘍の 11% を示すのみだった。

2. CPT-11 及び Cisplatin の抗腫瘍効果に対する Theanine の影響 M5076 担癌マウスへの cisplatin 若しくは CPT-11 と theanine の反復投与時の外寸腫瘍サイズの経時変化を Fig. 3(A) に示す。腫瘍サイズは経時に増加したが, 解剖時には cisplatin 単独投与群ではコントロール群の 54%, cisplatin+theanine 併用群では 36% に減少した。一方, CPT-11 単独投与群では control 値との差は認められなかったが, theanine 併用により 75% に減

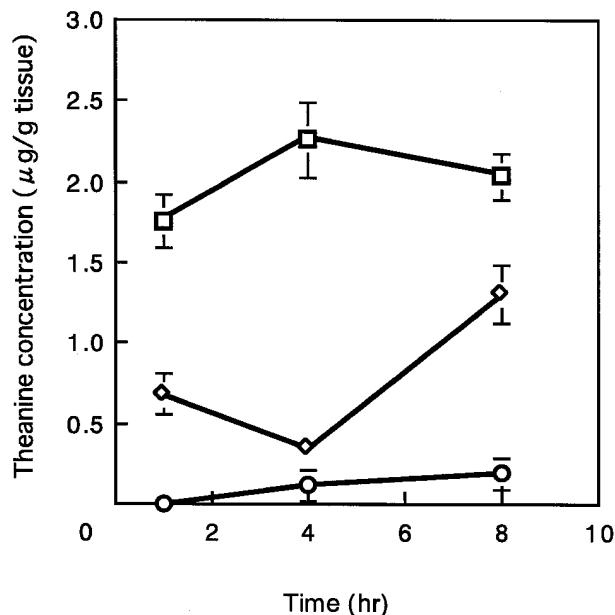


Fig. 2. Theanine Concentration in the Tissues of M5076 Ovarian Sarcoma-Bearing Mice

Theanine (10 mg/kg) are intraperitoneally injected. Each point is the mean±SD of 3–4 mice. □: Tumor, ◇: Liver and ○: Heart.

少した。

Cisplatin 若しくは CPT-11 投与での腫瘍重量減少効果に対する theanine の作用を Fig. 3(B)に示す。Control 群の腫瘍重量は 0.94 ± 0.23 g であったが、cisplatin 単独投与群では 0.58 ± 0.21 g となり減少傾向を示した。これに theanine を併用した群では腫瘍重量は control 群の 23 % ($p < 0.001$ vs control level) に有意に減少し、腫瘍縮小効果は単独投与群の 2.0 倍を示した。一方、CPT-11 単独群では腫瘍縮小効果はほとんど認められなかつたが、theanine の併用により腫瘍重量は control 群の 39% を示した。

腫瘍中薬物濃度を Table 1 に示す。Cisplatin 単独投与群に比べ theanine 併用は cisplatin 濃度を 1.5 倍 ($p < 0.001$) に有意に上昇させた。一方、CPT-11 投与群ではその腫瘍中濃度は theanine 併用により増加傾向を示したが有意ではなかつた。一方、正常組織である肝臓において cisplatin 濃度は theanine 併用による影響は認められなかつたが、腎臓においては有意な減少 ($p < 0.05$) を示した。CPT-11 濃度はいずれの組織においても theanine 併用による変動は認められなかつた。

考 察

Theanine が glutamate transporter 及び MRP/GS-X pump を介して抗腫瘍剤 DOX の抗腫瘍効果を増強することが明らかになっていることより、同様の経路により細胞中よりリリースされる抗腫瘍剤でも theanine の効果が期待できる。そこで高い抗腫瘍性と広い抗腫瘍スペクトルを持つ抗腫瘍剤であり、上記経路で代謝される cisplatin と theanine の併用を試みるとともに、prodrug である CPT-11 と theanine の併用も試み、theanine の有用性拡大とこれら抗腫瘍剤の治療効果増大を試みた。

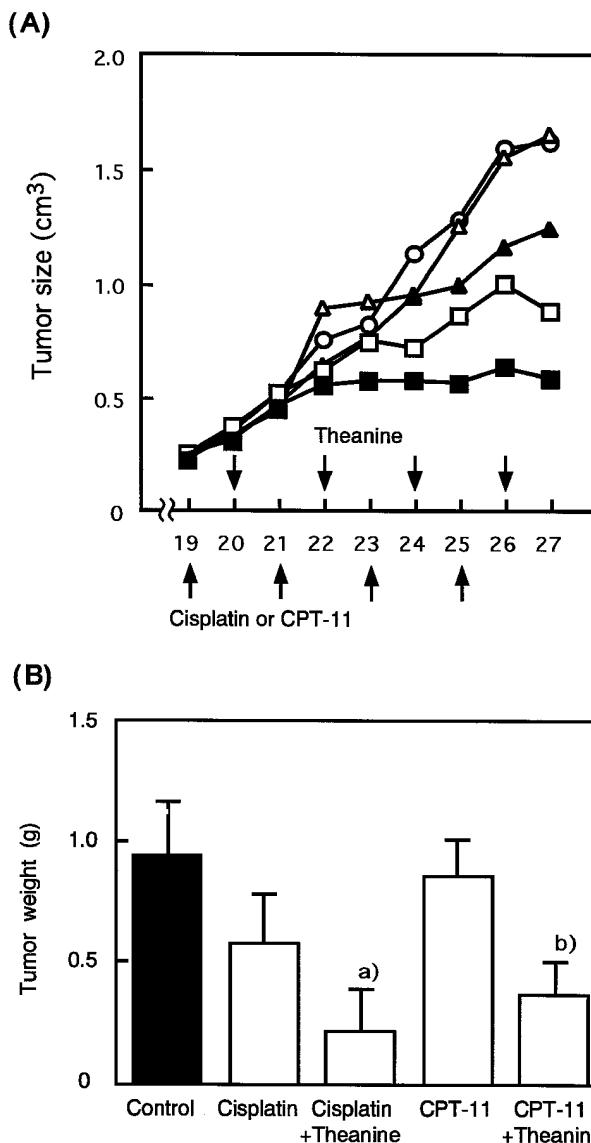


Fig. 3. Effects of Theanine on the Antitumor Activity of Cisplatin and CPT-11 against M5076 Ovarian Sarcoma
Cisplatin (2.0 mg/kg/day) or CPT-11 (10 mg/kg/day), and theanine (10 mg/kg/day) are intraperitoneally injected for 4 days. (A) Tumor size was calculated as $a \times b^2/2$ (a : long diameter, b : short diameter) and expressed in cm^3 . Each point is the mean of 6–8 mice with no more than 10% variation between them. ○: Control, □: Cisplatin, ■: Cisplatin + Theanine, △: CPT-11 and ▲: CPT-11 + Theanine. (B) Each column is the mean \pm SD of 6–8 mice. Significant differences from the level of control are indicated by a) $p < 0.001$ and b) $p < 0.05$.

Table 1. Effects of Theanine on Cisplatin and CPT-11 Concentrations in the Tumor and Normal Tissues of Mice

	Cisplatin or CPT-11 concentrations				
	Tumor	Liver	Kidney	Lung	Heart
Cisplatin	0.34 ± 0.03	1.69 ± 0.17	1.50 ± 0.15		
Cisplatin + theanine	$0.51 \pm 0.07^a)$	1.57 ± 0.18	$1.34 \pm 0.10^b)$		($\mu\text{g/g tissue}$)
CPT-11	0.68 ± 0.56	85.7 ± 27.0	25.3 ± 18.6	2.0 ± 0.8	34.4 ± 19.9
CPT-11 + theanine	1.00 ± 0.62	69.7 ± 24.6	23.2 ± 10.1	1.3 ± 1.8	34.0 ± 20.8 (ng/g tissue)

Each value is the mean \pm SD ($n = 6$ –8). Significant differences from the level of cisplatin-alone group are indicated by a) $p < 0.001$ and b) $p < 0.05$.

Theanine の薬理作用は神経系を中心に行われている⁹⁻¹¹⁾が、その他の組織に対する作用は著者らが詳細に検討しているにすぎない。²⁻⁷⁾ その組織分布性は緑茶摂取時を想定しているため、経口投与時の正常検体での分布に限られており、¹²⁾ 特に腫瘍での分布は全く検討されていない。抗腫瘍剤の効果増強を検討する上で、効果増強薬である theanine の腫瘍での分布は必須であり、有用性を裏付ける点においても重要である。Figure 2 に示したように投与後 8 時間以内において腫瘍中 theanine レベルは肝臓中、心臓中に比べ高値を示した。M5076 腫瘍に発現している glutamate transporter isoform は GLAST と GLT-1 であり、theanine はこの isoform に対する阻害作用が強いことが示唆されている。⁶⁾ Theanine は glutamate 誘導体であるため、この阻害は競合的阻害であると考えられる。すなわち、theanine は GLAST と GLT-1 に親和性が高く、これら transporter により細胞内に輸送されることとなる。⁶⁾ 一般に腫瘍組織の細胞間スペースは正常組織より大きく、腫瘍細胞内に theanine が移行しなくても見かけ上の腫瘍細胞移行性が高くなることがある。しかしながら、上述のように theanine は腫瘍細胞に移行することが *in vitro* において示されており、抗腫瘍剤の効果増強といった効果からも有効に腫瘍細胞に移行したものと考えられる。一方、肝臓、心臓といった正常組織に分布している glutamate transporter isoform は EAAC1 と EAAT4 である。Theanine による glutamate 輸送阻害が正常組織ではほとんど生じないことより、theanine のこれら isoform への親和性は低く、細胞内への theanine の輸送も少ないと考えられ、これら発現 isoform の違いにより腫瘍中 theanine 濃度が高くなつたと推測できる。一般的に特定の組織への標的性のある薬物以外は代謝組織である肝臓に相対的に集積する傾向にあり、DOX, cisplatin, CPT-11 といった抗腫瘍剤も同様である。すなわち、抗腫瘍剤と言えども腫瘍中に比べ肝臓中の薬物濃度が数倍から十数倍高い。Theanine の組織分布性がこれとは全く異なっていることは DOX の副作用増強を伴わない抗腫瘍効果増強を発揮する上で優位であると言える。Theanine は腫瘍細胞からの DOX の流出を抑制する。この作用は組織中での DOX 濃度に対する theanine 濃度が大きい方がより有効に発現すると考

えられ、上記現象より正常組織より腫瘍中において大きいことは明らかであるとともに、抗腫瘍剤の副作用を theanine が増強しない一因であると考えられる。

このように有効に腫瘍中に分布した theanine は、DOX 以外の抗腫瘍剤においても有効性を示した。*In vivo* において、theanine 併用群は外寸腫瘍サイズが cisplatin 単独投与群に対して減少すると共に、腫瘍重量も 23% ($p < 0.001$) にまで有意に減少した。Cisplatin 単独投与群の腫瘍中 cisplatin 濃度が theanine 併用により有意に上昇したことから、theanine が腫瘍中の cisplatin 濃度を上昇させることにより cisplatin の抗腫瘍効果を増強したと考えられた。Cisplatin は MRP/GS-X pump を介して細胞から排出されることが知られており、theanine の併用により上記現象が確認されたことは、theanine の作用メカニズムに立脚した効果的な抗腫瘍効果が現れたものと思われた。一方、CPT-11 単独投与群では腫瘍重量が減少しなかったのに対し、theanine 併用群では外寸腫瘍サイズが減少するとともに、腫瘍重量が CPT-11 単独投与群の 39% ($p < 0.01$) にまで有意に減少した。CPT-11 は prodrug であり、抗腫瘍性は活性本体である SN-38 に依存する。SN-38 の動態は CPT-11 の動態を反映しており、¹³⁾ 今回は代謝ではなく薬物輸送に対する theanine の作用を確認するため、CPT-11 濃度を測定した。Theanine 併用により抗腫瘍効果増強が果たせたにもかかわらず CPT-11 の動態が上昇傾向を示したもののが cisplatin のように有意な組織濃度上昇を示さなかつたことより、今後、代謝物をも含めた総合的な評価が必要であると考えられるが、MRP/GS-X pump を介さない CPT-11 との併用においても抗腫瘍効果の増強が theanine でもたらされたことはその有用性拡大を示すものと思われる。以上のように theanine による抗腫瘍剤の効果増強は DOX に限られたものではなく、同様の経路により細胞よりリリースされる抗腫瘍剤を代表に広範に適応できる可能性が示唆された。

抗腫瘍効果の増強を目的とした biochemical modulationにおいて、抗腫瘍剤の濃度が腫瘍細胞のみならず、正常組織においても上昇した場合、抗腫瘍剤の副作用が増強される危険性がある。しかしながら、前報のように DOX との併用において、

theanine はその副作用をむしろ軽減させる可能性が示された。²⁾ 今回、 theanine との併用を試みた cisplatin では腎障害、 CPT-11 では肝障害や消化器障害などの副作用が問題となっている。 Cisplatin と theanine を併用した際、腎臓中の cisplatin 濃度は減少し、 theanine が cisplatin の腎毒性を軽減できる可能性が期待できた。このように、腫瘍と異なり正常組織において theanine が抗腫瘍剤濃度を上昇せず、一部低下作用を示したことも前述の glutamate transporter の発現 isoform の違いより論ずることが出来る。 Glutamate transporter 阻害剤には isoform 特異性があり、 theanine は M5076 細胞に発現している GLAST, GLT-1 に親和性が高い。一方、親和性が低い isoform に対しては低濃度の阻害剤の存在はむしろ glutamate 輸送を亢進することがあることが示唆されており、¹⁴⁾ この現象が theanine 併用時の正常組織中で生じた可能性が考えられた。また、 CPT-11 においても、肝臓をはじめとした測定組織中で単独投与群と theanine 併用群の CPT-11 濃度有意差はなく、 theanine 併用により副作用が増強される危険性はないと思われた。

以上より、 theanine は正常組織中の cisplatin, CPT-11 濃度は上昇させず、腫瘍中の抗腫瘍剤濃度のみを上昇させることで、抗腫瘍効果を増強しながらも副作用は増強せず、むしろ軽減する傾向があることが明らかとなった。すなわち、DOX の場合と同様に theanine は cisplatin, CPT-11 に対しても有用な modulator であることが示唆された。 Theanine は緑茶中に特異的に含まれるアミノ酸であり、経口摂取によってもその効果が十分に期待できる。緑茶乾燥重量に対し theanine は約 2% 含まれており、一回の飲用に 10 g 程度使用するので、摂取量は 200 mg となる。1 日 3 回の飲用で 600 mg, 10 mg/kg を摂取することとなり、今回の投与量となる。嗜好品摂取による抗腫瘍剤効果増強は服用医薬品数の増大を伴わない Quality of Life を十分に考

慮した治療を可能とするものであり、臨床現場における応用が待たれる。

REFERENCES

- 1) Muramatsu K., Oguni I., Isemura M., Sugiyama K., Yamamoto B. (ed.), "Cha no Kinou," Gakkai Shuppan Center, Tokyo, 2002, pp. 1–416.
- 2) Sadzuka Y., Sugiyama T., Miyagishima A., Nozawa Y., Hirota, S., *Cancer Lett.*, **105**, 203–209 (1996).
- 3) Sadzuka Y., Sugiyama T., Hirota S., *Clin. Cancer Res.*, **4**, 153–156 (1998).
- 4) Sugiyama T., Sadzuka Y., *Clin. Cancer Res.*, **5**, 413–416 (1999).
- 5) Sadzuka Y., Sugiyama T., Sonobe T., *Toxicol. Lett.*, **114**, 155–162 (2000).
- 6) Sugiyama T., Sadzuka Y., Tanaka K., Sonobe T., *Toxicol. Lett.*, **121**, 89–96 (2001).
- 7) Sadzuka Y., Sugiyama T., Suzuki T., Sonobe T., *Toxicol. Lett.*, **123**, 159–167 (2001).
- 8) Goto S., Horie H., Mukai T., "Chagyo Kenkyu Hokoku," **77**, 29 (1993).
- 9) Kimura R., Murata T., *Chem. Pharm. Bull.*, **19**, 1257–1261 (1971).
- 10) Yokogoshi H., Kato Y., Sagesaka M., Matsuura T., Kakuda T., Takeuchi N., *Biosci. Biotech. Biochem.*, **59**, 615–618 (1995).
- 11) Kobayashi K., Nagato Y., Aoi N., Juneja L. R., Kim M., Yamamoto T., Sugimoto S., *Nippon Nogeikagaku Kaishi*, **72**, 153–157 (1998).
- 12) Unno T., Suzuki Y., Kakuda T., Hayakawa T., Tsuge H., *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 1593–1596 (1999).
- 13) Sadzuka Y., Hirotsu S., Hirota S., *Cancer.*, **127**, 99–106 (1998).
- 14) Sadzuka Y., Yamashita Y., Sonobe T., *Clin. Cancer Res.*, in press.