

培養ナチュラルキラー細胞系における食品成分の 抗大腸癌作用に関する検討

Anti-cancer activities of food ingredients investigated in the cultured colon cancer
and natural killer system.

吉浦健太

Kenta YOSHIURA

1. はじめに

近年、癌の発生進展に関する遺伝子レベルでの解明など基礎的研究から手術ロボットの開発などの治療法の開発に至るまで癌研究の進展は目覚ましいが、人口の高齢化に伴い癌患者および癌による死亡者数は増加の一途をたどっている。一生のうちに日本人の半数が癌に罹患するといわれるように、癌は決して特殊な病気ではなく、だれにでも起こりうるものと認識されつつある。最近、BRCA1/2 遺伝子の変異を原因とする遺伝性乳癌・卵巣癌症候群が注目されているが、そのような遺伝的要因が確定している癌は比較的少数で、大部分の癌には日常の運動習慣や食事が大きな役割をもつ生活習慣病的な側面が認められる。そこで、癌の発症や進展を抑制する食事の内容を明らかにすることは必須の課題である。これまでの疫学的な研究からは、野菜や果実の積極的な摂取や、豚肉や牛肉の過度の摂取および高脂肪食を避けることが推奨されているが、個々の食品成分の抗癌作用について臨床的に明らかなものは少ない。

食品成分の癌治療効果を探るために、癌に対する直接効果に関する主に *in vitro* および動物

実験は数多くなされてきたが、食品成分の治療薬としての有効性は未だ確立していない。そこで、ヒトが本来持つ抗癌システムを増強する可能性を探る研究に活路が求められる。生体の抗癌免疫システムは、自然免疫系と獲得免疫系に区別されるが、抗原特異的な獲得免疫系が癌治療法としての活用が期待される一方¹⁾²⁾、自然免疫系のナチュラルキラー (NK) 細胞は抗原非特異的で機動力が高いという特質があるため、癌治療のみならず予防において力を発揮することが期待される。生体は日夜、種々のストレスを受けており、紫外線や放射線など変異原性を示す傷害因子により DNA が損傷し、その結果、癌細胞が生まれると想定されている。NK 細胞は体内を循環、監視し、異常な細胞を検知し即座に破壊することで、臨床的な癌の発症を抑えていると考えられる。よって、この NK 細胞の機能を増強する食品成分を特定する研究は、癌予防対策として極めて重要となる。

NK 細胞の機能測定法はすでに確立されているが、本研究では、培養 NK 細胞株を用いて簡便に大腸癌殺傷効果を評価する独自の方法を用いた。既報³⁾の方法に従って、NK 細胞株 KHYG-1 と大腸癌細胞株 DLD-1 を共培養し、24 時間後プレートを洗浄し、底面に付着する

DLD-1 細胞の生存数を測定する実験系を用い、培地に種々の食品成分を加えることで、それらの NK 細胞機能に与える影響を評価した。さらに、なんらかの統計的に有意な影響が認められた成分については、NK 細胞の機能のひとつであるインターフェロン-ガンマ (IFN- γ) の分泌能に与える影響を検討した。

2. 材料と方法

細胞株および培養法

NK 細胞株は KHYG-1 (独立行政法人医薬基盤研究所 JCRB 細胞バンク)、標的となる癌細胞株は大腸癌細胞 DLD-1 (東北大学加齢医学研究所医用細胞資源センター) を用いた。基本培養液は、RPMI-1640 (シグマ) に、10% 牛胎児血清 (FBS)、ペニシリン (100U/ml) / ストレプトマイシン (100 μ g/ml) (ライフテクノロジー) を添加したものとした。KHYG-1 細胞の培養には、基本培養液に 50ng/mL ヒトリコンビナントインターロイキン 2 (hrIL-2; ORF Genetics) を添加した。培養細胞は、大気に二酸化炭素 (5%) を加えた 37°C 恒温槽で培養した。

食品成分

クルクミン、ケルセチン、レスベラトロール、L-アスコルピン酸 (以上、和光純薬)、エピガロカテキンガレート (EGCG; 東京化成工業)、アスタキサンチン (関東化学)、ドコサヘキサエン酸 (DHA)、エイコサペンタエン酸 (EPA; 以上 Cayman chemical) を購入した。

生存細胞数の評価

96 穴プレートに、DLD-1 細胞をウェルあたり 10^4 個播種し、24 時間培養した後、指示された細胞数の KHYG-1 細胞を加え、さらに 24 時間培養した。その後、ウェルをリン酸塩緩衝液 (PBS) で 2 回洗浄し、プレートの底面に付着した生存細胞数を、Cell Counting Kit-8 (CCK-

8; 同仁化学研究所) で測定した。具体的には、洗浄後のウェルに、キット中の WST-8 試薬を含む培地を加え 3 時間培養し、生細胞が産生する NADH の還元活性により生じたホルマザンの吸光度 (450nm; 対照 630nm) を測定した。

培養液中の IFN- γ 測定

24 穴プレートに、DLD-1 細胞をウェルあたり 3.5×10^4 個培養し付着させた後、同数の KHYG-1 細胞 (10^5 個/ml) を加え、15 時間培養後、上清を採取し、ELISA キット (Human IFN gamma ELISA Ready-SET-Go!; アフィメトリクス・ジャパン) で IFN- γ を測定した。具体的には、キット中のキャプチャー抗体を結合したプレート上に検体を入れ、4°C で一夜インキュベートした。補足された IFN- γ に、HRP 二次抗体を結合させた後 TMB 基質を加え反応させた後 2M 硫酸で反応を停止し、発色した検液の吸光度 (450nm) を測定した。キットに付属する標品を用い検量線 (4 ~ 500 pg/ml) を作成し、吸光度を濃度に換算した。

統計処理

多群の平均値の比較は、1 元配置分散分析で解析した。有意に差がある群がある場合は、Dunnett の方法で対照群と有意差のある群を特定した (有意水準 $p=0.05$)。統計ソフトは、SPSS (IBM) を用いた。

3. 結果

NK 細胞株 KHYG-1 による大腸癌細胞株 DLD-1 の生存数低下に及ぼす食品成分の影響

培養プレート底面に DLD-1 細胞を付着させた状態で、KHYG-1 細胞をウェルあたり 625 個または 2500 個を加えると同時に、各濃度の食物成分を添加し、24 時間後に生存しプレート底面に付着する DLD-1 細胞数を、セルカウンティングキットで評価した。KHYG-1 細胞を加えてない場合は、食品成分単独の細胞生存

に与える効果を示す。食品成分の濃度は、単独では細胞生存に有意な影響を与えない比較的低濃度の範囲とした。図 1. A～H に、8 種の食品成分を添加したときの結果を示した。図 1.A はクルクミンの影響を示す。クルクミンは、単独で 24 時間作用させた時、DLD-1 生存細胞数は、10mM 以下では低下傾向ではあるが有意差は認めなかった。DLD-1 と KHYG-1 を共培養したとき、クルクミンを添加しない場合、DLD-1 生存細胞数は、Effector/Target (E/T) 比 1:16 では約 29% の減少、E/T 比 1:4 では約 74% の減少を認めた。E/T 比 1:16 の系でクルクミンを添加したとき、DLD-1 生存細胞数は、10mM 以下では増加傾向ではあるが有意差は認めなかった。しかし、E/T 比 1:4 の系でクルクミンを添加したとき、DLD-1 生存細胞数は、5 μ M および 10mM で、有意に増加した。この結果は、クルクミンによって、DLD-1 に対する KHYG-1 の殺傷効果が抑制されたことを示唆する。

エビガロカテキングレート (EGCG; 図 1B)、ケルセチン (図 1C)、レスベラトロール (図 1D)、アスタキサンチン (図 1E)、ビタミン C (図 1F)、DHA (図 1G)、EPA (図 1H) については、食品成分単独の場合も、DLD-1 と KHYG-1 を E/T 比 1:16 あるいは 1:4 で共培養したときのいずれの系においても、添加した食品成分による DLD-1 生存細胞数の有意な変化は認めなかった。

クルクミンによる KHYG-1 細胞の IFN- γ 分泌能に与える影響

上記実験結果より、クルクミンによって KHYG-1 の DLD-1 に対する殺傷効果が抑制された可能性が示唆されたため、KHYG-1 培養上清の IFN- γ 濃度を ELISA で定量した。図 2 に示すように、KHYG-1 単独では、培養上清中 13pg/ml であるが、DLD-1 との共培養 15 時間の培養上清には 135pg/ml と、DLD-1 に刺激されて IFN- γ を分泌したと考えられる。こ

の系に、クルクミンを添加したとき、濃度依存的に培養上清中の IFN- γ が低下した。なお DLD-1 細胞のみの培養上清中の IFN-g は、検出限界以下であった。

4. 考察

癌の予防における食品成分の役割は広く知られており、特に野菜や果物に含まれるポリフェノールなどが注目されている。今回の研究で使用した 8 種の食品成分を、表にまとめた。クルクミン、エビガロカテキングレート (EGCG)、レスベラトロール、ケルセチンはポリフェノールであり、共通して抗酸化作用を有するほか、癌細胞に対する効果が、細胞レベルあるいは動物実験で数多く報告されている。

クルクミンはインド原産のウコン (ターメリック) の黄色色素で、抗炎症作用、抗菌作用などが認められている。クルクミンの大腸癌に対する効果については、細胞レベルで、細胞周期における G2/M アレスト、アポトーシス誘導作用など示されている⁴⁾。ただし大腸癌患者に対する経口投与の臨床試験では、血中濃度が *in vitro* の実験で使用する濃度に及ばなかったとされる⁵⁾。一方で、次のような臨床試験の成果が報告されている。1 日 500mg、3 か月間の投与で膀胱癌の組織像が 2 例中 1 例で改善⁶⁾、また 1 日 8g、1 か月の投与で、膀胱癌 21 例中、進行停止および縮小を各 1 例認めたという⁷⁾。

エビガロカテキングレート (EGCG) は、緑茶カテキンのなかで最も含量が高い主要なポリフェノール成分である。広範な研究により、細胞増殖抑制効果、遺伝子変異抑制効果、抗菌、抗ウイルス効果、発癌抑制効果などが明らかにされている。癌細胞を用いた実験では、JAK/STAT、MAPK、PI3K/AKT、Wnt、Notch、NF- κ B、AP-1 等の細胞内情報伝達経路を阻害することが示されている⁸⁾。また近年、発癌における遺伝子変異によらないメカニズムとして、癌の発生、進行に関わる遺伝子がプロモ-

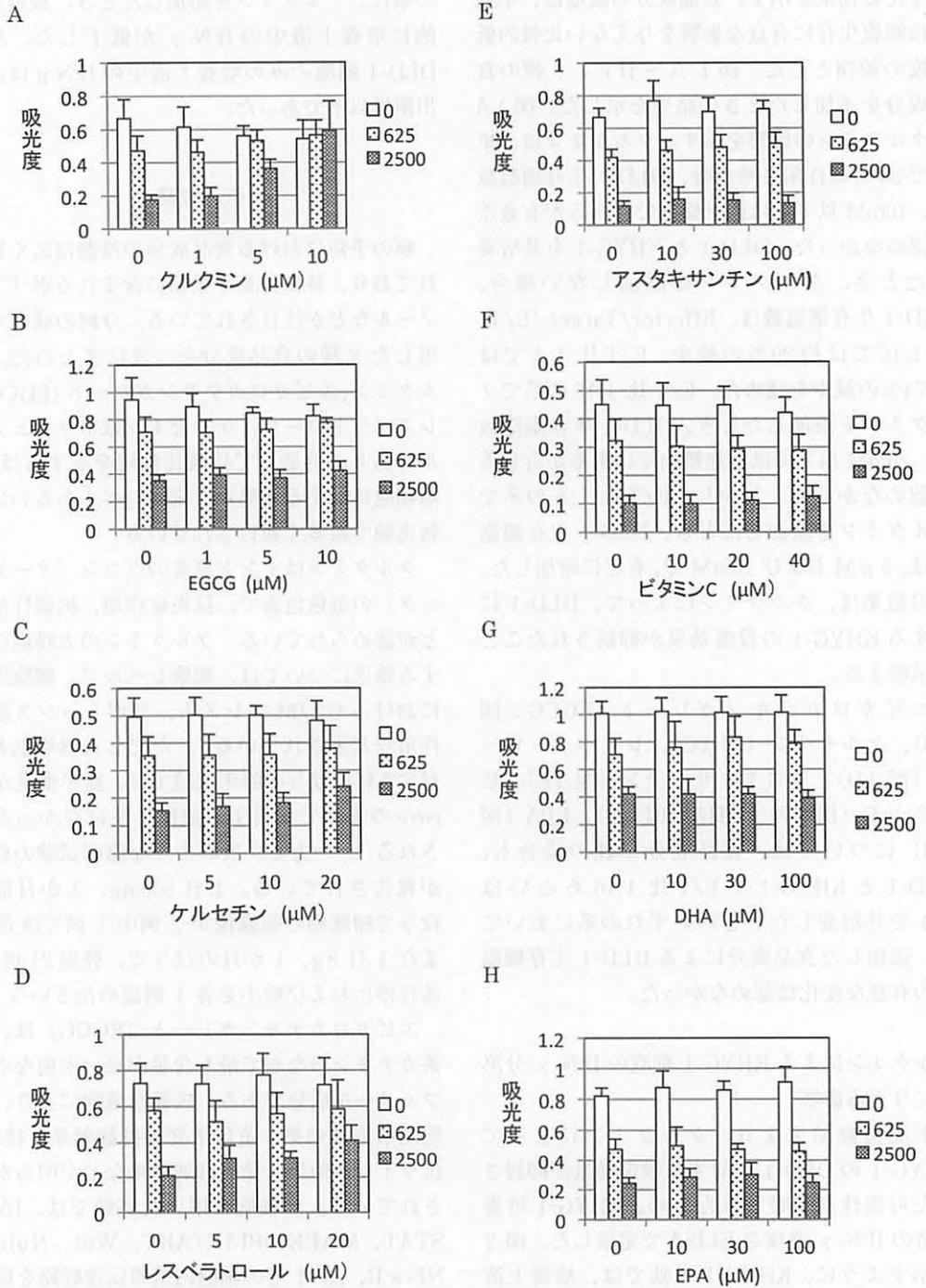


図 1 A～H: 各薬剤を添加したときの KHYG-1 と DLD-1 細胞の共培養 24 時間後の生存 DLD-1 細胞数を吸光度で示した。DLD-1 細胞は 10000 個播種した。0: DLD-1 単独培養、625: KHYG-1 細胞を 625 個加えて共培養、2500: KHYG-1 細胞を 2500 個加えて共培養した。

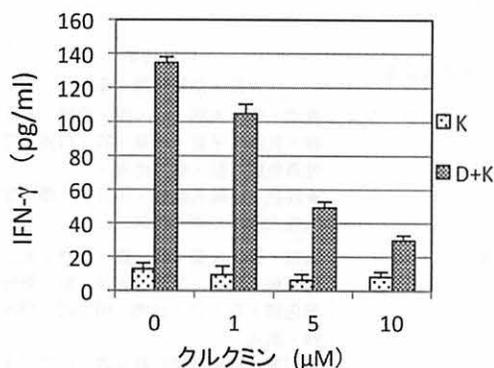


図2 クルクミン添加時の培地中のIFN- γ 濃度。K: KHYG-1 単独培養、D+K: DLD-1 と KHYG-1 を共培養した。

ター領域の高メチル化等により不活性化するメカニズムがエピジェネティクス機構として注目されている⁹⁾¹⁰⁾。そしてEGCGはDNAメチル基転移酵素を抑制すること等によりエピジェネティクス機構に関与することが示された¹¹⁾。またマイクロRNAの発現を促進することによって癌細胞のアポトーシスを誘導するメカニズムも報告された¹²⁾。臨床試験も活発に行われている。前立腺上皮内癌の患者における二重盲検試験で、1日600mgの緑茶カテキンを1年間摂取させたところ、癌が進行した患者の比率が、対照群30%に対し摂取群は3%であった¹³⁾。そのほか緑茶摂取により、前立腺癌や口腔癌の進行抑制や、食道癌、大腸癌、膵癌の予防効果などが示唆されている¹⁴⁾。

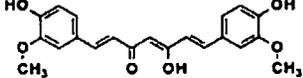
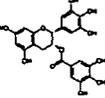
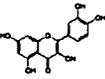
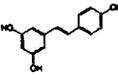
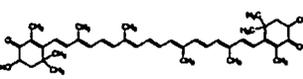
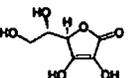
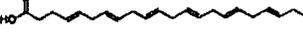
ケルセチンは、蕎麦、りんご、玉ねぎなどに含まれるフラボノイドで、活性酸素消去作用などによる種々の健康効果が期待されている。動物実験では、肥満の改善、脂質代謝の改善、高血圧など心血管系病変のリスク軽減など抗動脈硬化作用が示されている¹⁵⁾。活性酸素はDNAを傷害し発癌をもたらすことから、ケルセチンによる活性酸素の消去は発癌抑制につながると考えられている。細胞レベルでは、大腸癌をはじめ種々の癌細胞に対して、細胞周期における

G2/M アレスト、アポトーシス誘導作用が認められている¹⁶⁾。家族性大腸ポリポーシスの患者に対する臨床試験では、クルクミン480mg、ケルセチン20mgを1日3回投与したところ、半年後、5例全例でポリープの減少および縮小を認めたと報告されている¹⁷⁾。

レスベラトロールは、ブドウの皮などに含まれる赤紫色のポリフェノールで、抗酸化作用をはじめ種々の健康効果が示唆されている。フランス人は動物性脂肪の摂取が多いにもかかわらず心疾患が比較的少ない事実があり、フレンチパラドックスといわれているが、その一因として赤ワインの摂取が多いので、赤ワインに含まれるレスベラトロールが動脈硬化を抑制するのではないかという説がある。またレスベラトロールには長寿遺伝子とされるサーチュインを活性化する働きも見いだされているが、ヒトでの長寿効果は明らかでない¹⁸⁾。抗癌効果に関しては、*in vitro*では多種類の癌で増殖抑制、アポトーシス誘導、浸潤・転移の抑制、発癌予防などが示されている¹⁹⁾。ただし、経口摂取によるレスベラトロールの血清濃度は0.1mMから1mMとの報告があり、*in vitro*での細胞傷害濃度には達しにくいとの問題がある²⁰⁾。大腸癌患者における臨床試験では、レスベラトロールの投与により正常大腸粘膜細胞におけるWnt経路の阻害を認めた²¹⁾。これは癌細胞への直接効果ではないが、発癌予防効果を期待させる結果である。また大腸癌患者においてレスベラトロールの投与により肝臓に転移した癌細胞のアポトーシスの増加が報告されている²²⁾。

アスタキサンチンは、甲殻類や鮭、鱒に含まれる赤色のキサントフィルである。強力な抗酸化能を有するため、それを活用した健康効果が期待されている。さらに最近、癌細胞に対する増殖抑制、アポトーシス誘導効果が発見され、JAK/STAT-3、NF- κ B、ERK、AKT、JNK、p38、PPAR γ 、Nrf2などの分子標的が明らかにされているが²³⁾、癌に対する応用は緒についたばかりである。

表 使用した食品成分

名前と化学構造	属性	含有食品等	抗癌効果 ★臨床効果に関するもの
クルクミン 	ポリフェノール >クルクミノイド	ターメリック (ウコン)	食道・胃・大腸・肝・膵・膀胱・前立腺・乳腺・子宮・卵巣・肺・口腔・悪性黒色腫・脳・骨・血液 ★膀胱・小腸異型性・子宮頸・膵・家族性大腸ポリポーシス
エピガロカテキンガレート (EGCG) 	ポリフェノール >フラバノール	緑茶	食道・胃・大腸・肝・膵・膀胱・前立腺・脳・乳腺・子宮・卵巣・肺・悪性黒色腫・脳・骨・筋肉・頭頸部・甲状腺・血液 ★【進行抑制効果】前立腺・口腔【予防】食道・大腸・膵
ケルセチン 	ポリフェノール >フラボノール	蕎麦、リンゴ、玉ねぎ	食道・大腸・肝・膵・前立腺・乳腺・子宮・肺・悪性黒色腫・神経 ★家族性大腸ポリポーシス
レスベラトロール 	ポリフェノール >スチルベノイド	ブドウの皮、ピーナッツの皮	食道・胃・大腸・肝・膵・膀胱・前立腺・脳・乳腺・子宮・卵巣・肺・悪性黒色腫・脳・骨・筋肉・頭頸部・甲状腺・血液 ★大腸・大腸癌肝転移
アスタキサンチン 	カロテノイド >キサントフィル	甲殻類(エビ・カニ)、鮭、鱒	大腸・肝・口腔・肺・乳・膀胱・血液
L-アスコルビン酸 (ビタミン C) 	水溶性ビタミン	野菜、柑橘類	結腸・肝・膵・肺・前立腺・卵巣・グリオブラストーマ・悪性中皮腫
ドコサヘキサエン酸 (DHA) 	n-3 系不飽和脂肪酸 (22:6)	サンマ、イワシ、ブリ	食道・胃・大腸・乳・前立腺・神経芽腫
エイコサペンタエン酸 (EPA) 	n-3 系不飽和脂肪酸 (20:5)	イワシ、サンマ、ウナギ	

ビタミン C は、野菜、柑橘類に含まれる水溶性ビタミンである。コラーゲンの合成における水酸化反応の補酵素として必須であり、不足すると壊血病を発症する。一方で、還元剤として活性酸素種の除去作用があるため、多様な健康効果が示されている²⁴⁾。癌については、血清

ビタミン C 濃度が高いほうが胃癌のリスクが低いという中国での報告がある²⁵⁾。実験的にはマウスにおいて薬理量の血液内投与が有効であり、そのメカニズムはビタミン C がプロオキシダントとして癌組織で活性酸素を生じることによることが示された²⁶⁾。この理論をヒトに

用し高用量ビタミンCの点滴治療が開発されたが、効果は不確実である。ただし、副作用が少ないこともあり、日本では自由診療でおこなっている施設が増えている。

ドコサヘキサエン酸 (DHA)、エイコサペンタエン酸 (EPA) は共に n-3 系多価不飽和脂肪酸であり、青魚に豊富に含まれる。DHA および EPA は同じく n-3 系多価不飽和脂肪酸である α リノレン酸からも変換されるが、 α リノレン酸はヒトでは合成できないため、いずれも必須脂肪酸とみなされる。DHA は網膜や神経細胞の発達、維持に重要であるほか、脂質代謝の改善、血小板凝集抑制など抗動脈硬化作用が知られている。EPA にも、脂質代謝の改善、血小板凝集抑制など抗動脈硬化作用が知られている。近年の日本人の青魚摂取の低下と動脈硬化性疾患など成人病の増加が関連付けられ、新鮮な野菜の摂取とともに、n-3/n-6 脂肪酸摂取比率のアップが、日本人の食生活改善の大きな柱となっている。DHA および EPA の抗癌効果については、神経芽腫における細胞周期 G0/G1 期アレストによる増殖抑制効果のほか²⁷⁾、食道、胃、大腸など消化器癌²⁸⁾ や、乳癌²⁹⁾、前立腺癌³⁰⁾ の予防効果が示唆されている。

以上、食品成分の直接的抗癌効果は広く探索されているが、概して、経口摂取により吸収されたあとの血中濃度が、実験的に抗癌効果を示す濃度に達していないとの指摘がされている。よって血中に達しうる比較的低濃度で、ヒトに本来備わる抗癌システムを介する効果を検証する意義は大きいと考えられる。ナチュラルキラー (NK) 細胞の機能を増強する成分の発見として、マウス脾臓由来 NK 細胞において、生薬であるシソ科のヒキオコシ (*Isodon japonicus*) のエタノール抽出液が IFN- γ および TNF- α の分泌を亢進し抗癌作用を増強したとされる³¹⁾。またマウスの実験で、わけぎ (*bunching onion*) が分泌する粘液が NK 細胞の機能を増強したとの報告がみられる³²⁾。

本研究では、NK 細胞株 KHYG-1 細胞の大

腸癌殺傷モデルを用いて、一般的な食生活で摂取される 8 種の食品成分の影響を検討した。用いた 8 種の成分は、上記のように、細胞レベルで単独で抗癌効果を持つことが知られているが、本研究では、単独では有意な抗癌効果を発揮しない比較的低濃度を用いた。結果は、クルクミンにおいて、KHYG-1 細胞による大腸癌細胞の殺傷効果を抑制した可能性が示唆された。同時に、KHYG-1 細胞の IFN- γ 分泌能の低下が観察された。クルクミンの NK 機能に対する影響については、亢進、抑制両方の報告がある。乳癌において癌細胞が放出するエクソゾームが NK を抑制するが、クルクミンはエクソゾームの NK 抑制作用を抑制することで、NK 機能を回復させるという³³⁾。一方、NKG2D 受容体は NK 細胞表面に発現し標的細胞上の対応するリガンドと結合し細胞傷害を惹起する分子であるが、この遺伝子がクルクミンによる低アセチル化で発現が低下し細胞傷害性が低減するという報告もある。またメラノーマを標的とした実験で、クルクミンは NK 細胞の IFN- γ 分泌能を抑制している³⁴⁾。しかし、クルクミンアナログ FLLL32 は、NK 細胞の IFN- γ 分泌能を抑制しないという³⁵⁾。また膀胱癌細胞を標的とした実験では、クルクミンにより NK 細胞の IFN- γ 分泌能は抑制されるが、n-3 系不飽和脂肪酸と抗酸化剤、または脂質メディエーター resolvin D1 の併用により NK 細胞機能が維持される可能性が示唆されている³⁶⁾。

他の成分については、本研究の範囲では、NK 細胞に与える影響が明らかなのは認めなかったが、添加濃度を上げれば NK 細胞に対し抑制的に作用する可能性があり、成分そのものの抗癌作用が増強する一方で、NK 細胞を介する抗癌効果が減弱するおそれがある。ただし、腫瘍細胞である KHYG-1 細胞は、正常な NK 細胞と機能が同じとは限らないため、正常 NK 細胞での実験が必要である。

一般的に天然の食品成分は安全性が高いとされ、健康効果を期待して過量に摂取される可能

性がある。しかし、生体のいろいろな機能のある面に対してはマイナスに働くこともあり得るため、特定の食品成分を積極的に摂取する場合は、広い視野で慎重に検討する姿勢が求められる。

5. 結び

ナチュラルキラー細胞株 KHYG-1 と大腸癌細胞株 DLD-1 の共培養による NK 細胞活性評価系を利用して、クルクミンなど 8 種の食品成分の影響を、単独では明らかな細胞傷害を及ぼさない比較的低濃度を用いて検討した。クルクミンを添加したとき、KHYG-1 細胞による大腸癌細胞の死滅が抑制され、同時に KHYG-1 細胞の IFN- γ の分泌が抑制された。クルクミンは一般に抗癌作用を持つ食品成分として有用と考えられているが、本研究では NK 細胞株 KHYG-1 の癌細胞殺傷作用を抑制する可能性が示唆された。クルクミンはじめ食品成分の抗癌作用については、NK 細胞機能に与える影響などさらなる検討が必要である。

文献

- 1) K. Yoshiura, T. Nakaoka, T. Nishishita, K. Sato, A. Yamamoto, S. Shimada, T. Saida, Y. Kawakami, T.A. Takahashi, H. Fukuda, S. Imajoh-Ohmi, N. Oyaizu, and N. Yamashita : Clin Cancer Res, 11, 8201-7 (2005)
- 2) K. Yoshiura, T. Nishishita, T. Nakaoka, N. Yamashita, and N. Yamashita : J Exp Clin Cancer Res, 28, 13 (2009)
- 3) 吉浦健太 : 共立女子大学家政学部紀要, 61, 109-14 (2015)
- 4) P. Anand, C. Sundaram, S. Jhurani, A.B. Kunnumakkara, and B.B. Aggarwal : Cancer Lett, 267, 133-64 (2008)
- 5) R.A. Sharma, S.A. Euden, S.L. Platton, D.N. Cooke, A. Shafayat, H.R. Hewitt, T.H. Marczylo, B. Morgan, D. Hemingway, S.M. Plummer, M. Pirmohamed, A.J. Gescher, and W.P. Steward : Clin Cancer Res, 10, 6847-54 (2004)
- 6) A.L. Cheng, C.H. Hsu, J.K. Lin, M.M. Hsu, Y.F. Ho, T.S. Shen, J.Y. Ko, J.T. Lin, B.R. Lin, W. Ming-Shiang, H.S. Yu, S.H. Jee, G.S. Chen, T.M. Chen, C.A. Chen, M.K. Lai, Y.S. Pu, M.H. Pan, Y.J. Wang, C.C. Tsai, and C.Y. Hsieh : Anticancer Res, 21, 2895-900 (2001)
- 7) N. Dhillon, B.B. Aggarwal, R.A. Newman, R.A. Wolff, A.B. Kunnumakkara, J.L. Abbruzzese, C.S. Ng, V. Badmaev, and R. Kurzrock : Clin Cancer Res, 14, 4491-9 (2008)
- 8) A.H. Rahmani, F.M. Al Shabrmi, K.S. Allemailem, S.M. Aly, and M.A. Khan : Biomed Res Int, 2015, 925640 (2015)
- 9) K.S. Bishop and L.R. Ferguson : Nutrients, 7, 922-47 (2015)
- 10) K. Yoshiura, Y. Kanai, A. Ochiai, Y. Shimoyama, T. Sugimura, and S. Hirohashi : Proc Natl Acad Sci U S A, 92, 7416-9 (1995)
- 11) L. Schramm : J Carcinog Mutagen, 4, 1000142 (2013)
- 12) W.P. Tsang and T.T. Kwok : J Nutr Biochem, 21, 140-6 (2010)
- 13) S. Bettuzzi, M. Brausi, F. Rizzi, G. Castagnetti, G. Peracchia, and A. Corti : Cancer Res, 66, 1234-40 (2006)
- 14) A. Hosseini and A. Ghorbani : Avicenna J Phytomed, 5, 84-97 (2015)
- 15) S. Salvamani, B. Gunasekaran, N.A. Shaharuddin, S.A. Ahmad, and M.Y. Shukor : Biomed Res Int, 2014, 480258 (2014)

- 16) L. Gibellini, M. Pinti, M. Nasi, J.P. Montagna, S. De Biasi, E. Roat, L. Bertoncetti, E.L. Cooper, and A. Cossarizza : *Evid Based Complement Alternat Med*, 2011, 591356 (2011)
- 17) M. Cruz-Correa, D.A. Shoskes, P. Sanchez, R. Zhao, L.M. Hyland, S.D. Wexner, and F.M. Giardiello : *Clin Gastroenterol Hepatol*, 4, 1035-8 (2006)
- 18) D.S. Mohar and S. Malik : *J Clin Exp Cardiol*, 3, (2012)
- 19) B.B. Aggarwal, A. Bhardwaj, R.S. Aggarwal, N.P. Seeram, S. Shishodia, and Y. Takada : *Anticancer Res*, 24, 2783-840 (2004)
- 20) S.I. Rizvi and K.B. Pandey : *Pharmacol Rep*, 62, 726-32 (2010)
- 21) A.V. Nguyen, M. Martinez, M.J. Stamos, M.P. Moyer, K. Planutis, C. Hope, and R.F. Holcombe : *Cancer Manag Res*, 1, 25-37 (2009)
- 22) L.M. Howells, D.P. Berry, P.J. Elliott, E.W. Jacobson, E. Hoffmann, B. Hegarty, K. Brown, W.P. Steward, and A.J. Gescher : *Cancer Prev Res (Phila)*, 4, 1419-25 (2011)
- 23) L. Zhang and H. Wang : *Mar Drugs*, 13, 4310-30 (2015)
- 24) B. Frei, L. England, and B.N. Ames : *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86, 6377-81 (1989)
- 25) T.K. Lam, N.D. Freedman, J.H. Fan, Y.L. Qiao, S.M. Dawsey, P.R. Taylor, and C.C. Abnet : *Am J Clin Nutr*, 98, 1289-97 (2013)
- 26) Q. Chen, M.G. Espey, A.Y. Sun, C. Pooput, K.L. Kirk, M.C. Krishna, D.B. Khosh, J. Drisko, and M. Levine : *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 11105-9 (2008)
- 27) W.W. So, W.N. Liu, and K.N. Leung : *Nutrients*, 7, 6956-73 (2015)
- 28) J.M. Park, S.H. Kwon, Y.M. Han, K.B. Hahm, and E.H. Kim : *J Cancer Prev*, 18, 201-8 (2013)
- 29) C.J. Fabian, B.F. Kimler, and S.D. Hursting : *Breast Cancer Res*, 17, 62 (2015)
- 30) W. Friedrichs, S.B. Ruparel, R.A. Marciniak, and L. Degraffenried : *Nutr Cancer*, 63, 771-7 (2011)
- 31) Y.J. Hwang, J. Kim, D.S. Park, and K.A. Hwang : *Int J Mol Sci*, 13, 4880-8 (2012)
- 32) H. Ueda, A. Takeuchi, and T. Wako : *Biosci Biotechnol Biochem*, 77, 1809-13 (2013)
- 33) H.G. Zhang, H. Kim, C. Liu, S. Yu, J. Wang, W.E. Grizzle, R.P. Kimberly, and S. Barnes : *Biochim Biophys Acta*, 1773, 1116-23 (2007)
- 34) M.A. Bill, C. Bakan, D.M. Benson, Jr., J. Fuchs, G. Young, and G.B. Lesinski : *Mol Cancer Ther*, 8, 2726-35 (2009)
- 35) M.A. Bill, J.R. Fuchs, C. Li, J. Yui, C. Bakan, D.M. Benson, Jr., E.B. Schwartz, D. Abdelhamid, J. Lin, D.G. Hoyt, S.L. Fossey, G.S. Young, W.E. Carson, 3rd, P.K. Li, and G.B. Lesinski : *Mol Cancer*, 9, 165 (2010)
- 36) R.C. Halder, A. Almasi, B. Sagong, J. Leung, A. Jewett, and M. Fiala : *Front Physiol*, 6, 129 (2015)