

平成 30 年 6 月 28 日現在

機関番号：23803

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H02899

研究課題名(和文) 24時間型社会に危惧される疾病に対する食事性フラボノイドの予防的機能に関する研究

研究課題名(英文) Preventive effect of dietary flavonoids on nocturnal light exposure-related diseases

研究代表者

下位 香代子 (SHIMOI, Kayoko)

静岡県立大学・食品栄養科学部・教授

研究者番号：10162728

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,200,000円

研究成果の概要(和文)：24時間型社会の到来により、働き盛りの世代に乳がんや心血管系疾患が増加することが危惧されている。本研究では、これら疾患の増加機序の解明や予防を目的としてマウスを用いて検討し、暗期の光曝露が心臓の血液線溶系および凝固系に影響を与えること、二交代制シフトをモデルとした明暗シフト条件下では、生体リズムが攪乱され、時計遺伝子の発現や血中生化学指標など多様な因子に影響を与えること、動脈硬化の発症・進展には影響がなかったものの、乳がん細胞のリンパ行性転移を促進すること、さらに、食事性フラボノイドであるケルセチンが乳がん転移プロセスにおいて予防効果を示す可能性を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Epidemiological studies indicated that disturbed circadian rhythm caused by night shift work is a potential risk factor for breast cancer and cardiovascular diseases. In this study, we investigated influences of nocturnal light exposure on thrombosis factors in male C3H/He mice and those of light and dark cycle shift on atherosclerosis and breast cancer metastasis using female BALB/c.KOR/StmSLC-ApoEsh1 mice and BALB/c mice injected BJMC3879luc2 breast cancer cells, respectively. And chemopreventive effect of quercetin, a dietary flavonoid, was also studied. Nocturnal light exposure for 3 h affected expression of Pai-1, tPA and TF genes related to thrombogenesis in the heart. Circadian dysfunction did not affect development of atherosclerosis and primary tumor growth, however, increased the number of lymph node with metastasis. 0.1% quercetin diet suppressed expression of genes related to metastasis in the tumor. Effect of quercetin on lymphangiogenesis is under investigation.

研究分野：生体機能学、食品機能学

キーワード：光環境ストレス 明暗シフト 乳がん転移 血栓症 心疾患 リンパ管 フラボノイド 予防

1. 研究開始当初の背景

現代社会は、経済のグローバル化に伴い24時間型社会となり、労働時間や勤務形態の多様化が進み、交代制工場勤務者、医療従事者、航空関連業務者だけでなく、サービス業や小売業においても夜間の照明に曝露されることを余儀なくされる深夜交代勤務従事者の数が増加の一途をたどっている。また、我々の日常生活も夜型化し、夜間でも電力照明によって人工光を浴びることが多くなってきている。我々の体内には、中枢および末梢組織に約24時間周期の体内時計があり、様々な遺伝子の発現リズムが約24時間周期を示し、それとともにホルモン分泌、体温、血圧、脂質代謝など多くの生理機能も約24時間周期の概日リズムを示す。夜間に多くの光を浴びる深夜交代勤務や夜型の生活は、この概日リズムと外界の昼夜リズムの同調を乱れさせ、睡眠障害、慢性的な疲労、精神的ストレス等を引き起こすと言われている (*Occup. Med.*, 61, 78-89, 2011)。

大規模な疫学調査の結果から、看護師だけでなく、国際線航空機の乗務員なども含めこれらの交代制勤務者の乳がんや前立腺がんのリスクが高いことが報告された (*J. Natl. Cancer Inst.*, 93(20), 1557-62, 1563-8, 2001)。2007年には、国際がん研究機関(IARC)がその定める基準の中で、交代制勤務(シフトワーク)をGroup2A(おそらくヒトに対して発がん性がある)に分類し、光環境に伴う概日リズムの乱れと乳がんや前立腺がんとの因果関係が国際的に認識されるようになった。現在のところ、夜間の光曝露がメラトニン分泌を抑制することにより卵巣からの女性ホルモンであるエストロゲンの分泌を亢進するためであることがひとつの理由として考えられている (*Expert Rev. Mol. Med.*, 11, e5, 2009)。一方、深夜のシフトワークは、高血圧、糖尿病、肥満の原因になるという従来の研究報告に加え、2012年に冠動脈心疾患のリスクを高くすることが報告された (*BMJ.*, 345:e4800, 2012)。夜型化した現代のライフスタイルを考えると、働き盛りの世代にこれらの疾患が増加することが危惧され、これらの光環境の変化に伴う疾患増加のメカニズムの解明と予防は現代社会において解決すべき課題であると言える。

2. 研究の目的

本研究では、マウスを用いて光環境ストレス負荷モデルを構築し、血栓関連機能 (PAI-1、血小板凝集能等)、動脈硬化 (ApoE 欠損マウスを使用)、乳がん細胞の増殖・浸潤・転移への影響を検討し、また、以前の研究で、食事性フラボノイドのケルセチンの代謝物である quercetin-3-O-glucuronide が、ストレス負荷時に分泌が増加するノルアドレナリンにより促進される乳がん細胞の浸潤をアドレナリン受容体を介して阻害することを報告しているため (*Arch Biochem Biophys.*

557, 18-27, 2014)、本研究においてもケルセチンの予防的機能について検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 暗期の光曝露が血栓関連機能に与える影響

4週齢の雄性 C3H/He マウスを12時間周期の通常明暗条件下 (ZT0-12: 明期、ZT12-24: 暗期、点灯開始時刻を ZT0 とする。本研究では午前8時)、動物個別飼育装置内で4週間順化した。マウスを ZT14 から3時間、250ルクスの光に曝露した後、経時的に解剖を行い、心臓の血液線溶系、凝固系遺伝子の遺伝子発現量、血漿中コルチコステロン (CORT)、ACTH、PAI-1、カテコールアミン類濃度を測定した。

(2) 12時間明暗シフトモデルの構築

6週齢の雌性 BALB/c マウスを搬入後、運動量計測装置 nano tag[®] (キッセイコムテック) をマウスの頸部皮下に埋め込み、動物個別飼育装置内において通常明暗条件下で1週間馴化させた。馴化期間終了後、通常明暗条件下と二交代制シフトをモデルとした明暗シフト条件下 (週単位で2日毎に明暗を逆転: Fig. 1) で、1ケージ5匹の群飼育を行った。4週間後に nano tag[®] を取り出し、活動量の変化を確認した。また、6週齢の雌性 BALB/c マウスを同様に馴化し、通常明暗条件下と明暗シフト条件下で4週間群飼育後、ZT2、6、11、18、23 に解剖を行い、肝臓、心臓、血液を採取した。時計遺伝子及び血液線溶阻害遺伝子発現量および血中コルチコステロン濃度 (EIA 法) の測定、血液生化学検査 (自動分析装置 (TBA-10FR, (株) 東芝))、血中酵素アイソザイム測定 (全自動電気泳動分析装置)、血中亜鉛濃度 (キレート定量法) の測定を行った。

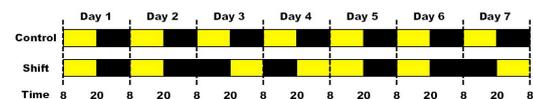


Fig.1 Light and dark cycle conditions

(3) 明暗シフト条件下における動脈硬化への影響

BALB/c. KOR/SLc-apoE^{sh1} マウス (♀、5週齢) を1ケージ3匹に振り分け、1週間順化後、通常明暗条件下と(2)で構築した明暗シフト条件下で4週間(発症期)および8週間(進展期)飼育した。PAI-1の日内変動を考慮し、暗期に入る1~2時間前に解剖時間になるように設定し、体重測定したマウスをイソフルランで麻酔し、心臓から採血後、還流を行った。肝臓摘出後、実体顕微鏡を用いて大動脈、心臓を摘出し、それぞれ重量を測定した。血清、肝臓および心臓は-80℃で保存した。動脈は内側を切り開き、4%パラホルムアルデヒドで固定を行った。固定した動脈は Nile red

法にて血栓である脂質を染色し蛍光顕微鏡で動脈を撮影した後、画像処理ソフト Easy Access を用いて、アテローム面積、発生率、個数を算出した。肝臓・心臓の *Pai-1*、*tPA* の遺伝子発現量、血清中の中性脂肪 (TG)、総コレステロール (T-cho)、グルコース量を測定した。

(4) 明暗シフト条件下における乳がん転移への影響

雌性 BALB/c マウス (8 週齢) の右第 4 乳腺に BJMC3879luc2 (5×10^6 cells/0.1 mL) を移植し、通常明暗サイクル条件下と明暗シフト条件下で 5 週間および 8 週間、1 ケージ 5 匹で群飼育した後、ルシフェラーゼ活性を指標とした IVIS による肺、リンパ節等における腫瘍転移のイメージング解析、IHC による腫瘍内リンパ管の解析、ELISA 法による腫瘍組織中の VEGF-C およびノルアドレナリン (NA) の測定と亜鉛濃度の測定、腫瘍組織における転移関連遺伝子の発現解析等を行い転移への影響を検討した。また、雌性 NOD-SCID マウス (8 週齢) にヒト乳がん細胞 MDA-MB-231 を移植し、明暗シフトの転移への影響について同様に検討した。

(5) 明暗シフト条件下における乳がん転移に対するケルセチンの影響

(4) の結果をもとに、通常または 0.1% ケルセチンを含む MF 混餌を与え乳がん転移に対する予防効果を検討した。

4. 研究成果

(1) 暗期の 3 時間 (ZT14-17) の光曝露は、血漿中 ACTH 濃度、CORT 濃度およびアドレナリン濃度を増加し、HPA 系および SAM 系を活性化させストレス応答を惹起した。心臓の血液線溶系および凝固系遺伝子 (*Pai-1*、*tPA*、*TF*) の遺伝子発現量は光曝露を開始後、ZT16~

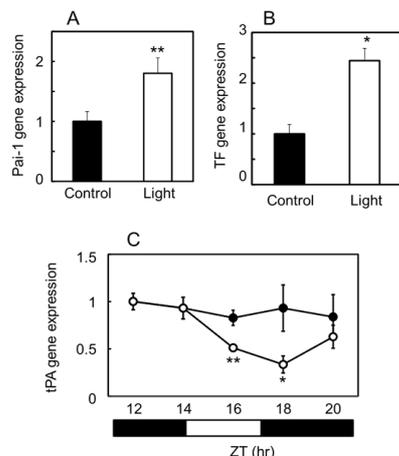


Fig.2A,B,C Effects of nocturnal light exposure on *Pai-1*, *TF* and *tPA* gene expression in the mouse heart.

ZT18 に有意に上昇または低下した (Fig. 2A, B, C)。血漿中の CORT 濃度は ZT20 に最も高くなった。これらの結果や以前の我々の研究結果 (*Exp. Animals*, 63, 331-8, 2014) から、光曝露による心臓の血液線溶系および凝固系遺伝子の発現上昇は、SAM 系の亢進によりアドレナリンを介し生じた可能性が示唆された。また、血中 PAI-1 濃度の上昇は、ストレス負荷により上昇した CORT を介し促進された可能性が考えられた。

(2) マウスの活動量を計測した結果、通常の明暗条件群で確認された明確な活動期、休眠期のリズムが明暗シフト条件群では攪乱されていた (Fig. 3)。また、時計遺伝子の発現解析より肝臓及び心臓の時計遺伝子 (*Per2*) が後退しており、本明暗シフトモデルによる日内リズムの攪乱が確認された。次に、肝臓及び心臓の血液線溶系阻害遺伝子 *Pai-1* の発現を調べた結果、発現が攪乱していることが確認された。コルチコステロンの分泌も後退していた。血液生化学的指標では、TGL などの脂質代謝に関連する指標に影響が見られ、血中亜鉛濃度も影響を受けていた。シフトワークを想定した明暗シフトが体内時計を攪乱させ、多様な因子に影響を与えることがわかった。

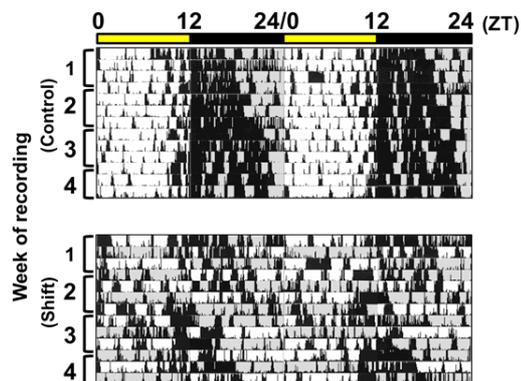


Fig.3 Representative locomotor activity profiles of mice housed under usual light and dark condition and shift condition.

(3) 発症期・進展期の体重と臓器重量は、通常の明暗条件群と明暗シフト群の間に差はなく、動脈のアテローム発生率も発症期・進展期ともに差は見られなかった。

(4) 通常の明暗条件下および明暗シフト条件下で、BJMC3879luc2 担癌マウスを 8 週間飼育した結果、腫瘍体積および腫瘍重量に対する明暗シフトの影響は確認されなかった。しかし、明暗シフトによる生体リズムの攪乱によって遠位リンパ節への転移が有意に増加した (Fig. 4A, B)。しかし、腫瘍内へのリンパ管新生を誘導する VEGFC はタンパク質および遺伝子発現においても発現増加は確認されず、既知のリンパ管新生因子とは異なる因子がリンパ行性転移に影響を与えている

と思われた。本因子については、現在も解析中である。一方、腫瘍組織における NA を測定したところ、担癌 5 週目の明暗シフト群において、腫瘍組織中の NA 濃度が増加する傾向が見られ、NA によって発現が誘導されることが知られている *Mmp2* および *Mmp9* の腫瘍組織での遺伝子発現が、担癌 5 週目の明暗シフト群において増加する傾向が見られた。乳がん初期における亜鉛濃度の高値が予後不良と関連することが報告されているが (*Curr. Med. Chem.*, 18, 5041-5051, 2011)、担癌 5 週目において明暗シフト群の血中の亜鉛濃度は有意に増加し、腫瘍組織中も増加傾向が見られた。亜鉛トランスポーター *Zip6* についても遺伝子発現の有意な増加が認められた。以上の結果から、明暗シフトによって腫瘍内の亜鉛濃度が増加し、リンパ管を介したリンパ行性転移が促進する可能性が示唆された。

ヒト乳がん細胞移植モデルにおいては、マウスの乳がん細胞を移植した場合と同様に 8 週後の腫瘍体積および腫瘍重量に対する明暗シフトの影響は確認されず、通常明暗条件群と明暗シフト群において転移は確認されなかった。しかしながら、血中の亜鉛濃度の増加および亜鉛トランスポーターや *Mmp2* および *Mmp9* の遺伝子発現の増加が確認された。

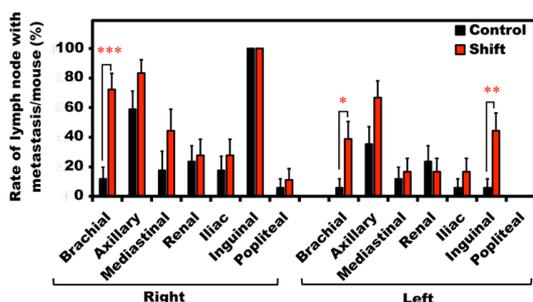
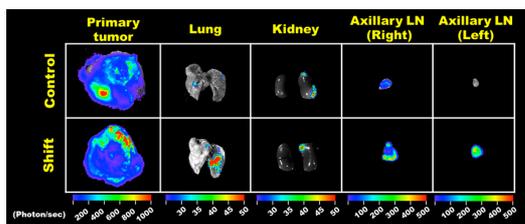


Fig.4A, B Bioluminescence imaging ex vivo and effect of light and dark cycle conditions on lymph node metastasis

(5) ケルセチン混餌群において転移に関連するいくつかの遺伝子の発現量が減少していたことからケルセチンが乳がんの転移プロセスにおいて予防効果がある可能性が示唆されたが、詳細については検討を継続中である。

以上、本研究により、暗期の光曝露が心臓の血液線溶系および凝固系に影響を与える

こと、二交代制シフトをモデルとした明暗シフト条件下では、生体リズムが攪乱され、血中亜鉛濃度など多様な因子に影響を与え、動脈硬化の発症・進展には影響がなかったものの、乳がん細胞のリンパ行性転移を促進することが明らかとなった。さらに、食事性フラボノイドであるケルセチンが乳がんの転移プロセスにおいて予防効果がある可能性が示唆された。24 時間型社会における光環境の変化に伴う生体機能の変化と乳がん転移のメカニズムとその予防についてさらに検討していきたいと考えている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Sakakibara H, Yasuda MT, Shimoi K: Effects of environmental and social stressors on biological rhythms. *J. Phys. Fitness Sports Med.* 2016, 5(2), 143-152
DOI: 10.7600/jpfsm.5.143
- ② Yasuda MT, Sakakibara H, Shimoi K: Estrogen- and stress-induced DNA damage in breast cancer and chemoprevention with dietary flavonoid. *Genes Env.* 2017, 39(10), 1-9
DOI: doi: 10.1186/s41021-016-0071-7
- ③ 榊原啓之、下位香代子: 社会的ストレスに対するフラボノイド含有食品の効果、日本ポリフェノール学会雑誌、2017, 6(1), 11-14
<http://propo.jp/>

[学会発表] (計 9 件)

- ① 下位香代子: ストレスと ROS とがん- β_2 -アドレナリン受容体を介した応答-(招待講演)、日本酸化ストレス学会と東海支部第 3 回学術集会 (名古屋)、2015 年 2 月
- ② Kayoko Shimoi, Shunsuke Yamazaki, Noriyuki Miyoshi, Kyuichi Kawabata, Michiko Yasuda: Stress, breast cancer and flavonoids - A role of quercetin conjugate as a β_2 -adrenergic receptor antagonist, 7th International Conference on Polyphenols and Health, Tours, France, October 28, 2015 (Invited)
- ③ 渡辺悠人、保田倫子、下位香代子: 光環境の変化が血栓症の発症リスクに与える影響、第 2 回時間栄養科学研究会/第 10 回 NutriRhythm (ニュートリズム) 検討会~時間栄養学の橋渡し研究~ (東京)、P-17、2015 年 9 月
- ④ 渡辺悠人、鈴木敬明、保田倫子、下位香代子: 光曝露ストレスが線溶阻害因子 PAI-1 の発現に与える影響、BMB2015 (第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会) (神戸)、3P0573、2015 年 12 月

- ⑤ 保田倫子、渡辺悠人、鈴木敬明、榊原啓之、下位香代子：暗期の光曝露ストレスが血栓関連因子に及ぼす影響、日本農芸化学会（札幌）、4G012、2016年3月
- ⑥ 保田倫子、伊藤圭一、渡辺悠人、益森勝志、鈴木敬明、榊原啓之、下位香代子：動物飼育における光環境の影響、第43回日本毒性学会学術年会（名古屋）、P-165、2016年6月
- ⑦ 下位香代子：フラボノイドの機能性に関する研究をふりかえって、フードサイエンスフォーラム第23回学術集会（宮崎）、2017年9月
- ⑧ Kayoko Shimoi, Minoru Numata, Michiko T Yasuda : Breast cancer and flavonoids, 7th International Conference on Polyphenols and Health (8th ICPH), Quebec, Canada, 2017, October 3-6.
- ⑨ Minoru Numata, Michiko Yasuda, Nobuhiko Miura, Kazutoshi Sayama, Shibata M, Song F, Tomohiro Asai, Naoto Oku, Kayoko Shimoi: Effect of biorhythm disruption caused by light/dark shift on the progression of breast cancer in mice, ConBio2017 (第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学会大会 合同大会) (神戸)、3P0963、2017年12月

〔図書〕(計 1 件)

榊原啓之、下位香代子(分担執筆)：機能性食品開発のための初期評価試験プロトコール集、第14章 抗ストレス作用、監修/山本(前田)万里、シーエムシー出版、東京、pp216-226 (2017).

〔その他〕

- ① 渡辺悠人、保田倫子、鈴木敬明、下位香代子：夜に光を浴びると体はどうなる？、富士山麓アカデミック&サイエンスフェア2015（沼津）、C-05、2015年12月
- ② Kayoko Shimoi : Environmental and social stress, and breast cancer - β 2-AR mediated chemopreventive effect of quercetin-3-*O*-glucuronide-, International Symposium on Dietary Antioxidants and Oxidative Stress in Health (DAOSH), Hyogo, Japan, August 31, 2015. (Invited)
- ③ Michiko Yasuda, Yuto Watanabe, Taka-aki Suzuki and Kayoko Shimoi : Effects of nocturnal light exposure on biological responses in C3H/He mice、第21回静岡 健康・長寿学術フォーラム（静岡）、No. 45、2016年11月
- ④ 沼田実、保田倫子、下位香代子：光ストレスは乳がんの進展に影響するのか？、富士山麓アカデミック&サイエンスフェア2016（富士）、C-3、2016年12月
- ⑤ 山本幸佳、沼田 実、保田倫子、三浦信彦、高橋統一、平野明伽音、下位香代子：

明暗シフトは生体機能にどんな影響を与えるか？、富士山麓アカデミック&サイエンスフェア2017（沼津）、C-4、2017年11月

6. 研究組織

(1) 研究代表者

下位 香代子 (SHIMOI Kayoko)
静岡県立大学・食品栄養科学部・教授
研究者番号：10162728

(2) 研究分担者

保田 倫子 (Yasuda Michiko)
椋山女学園大学・生活科学部・講師
研究者番号：00707036