

令和 2 年 6 月 23 日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11772

研究課題名(和文) 乳がん発症に及ぼす咀嚼刺激の影響

研究課題名(英文) Effects of chewing on psychological stress-related breast cancer

研究代表者

東 華岳 (AZUMA, Kagaku)

産業医科大学・医学部・教授

研究者番号：20273146

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：乳がん細胞を接種したマウスに対するストレス負荷と咀嚼刺激の影響を検討した。対照群に比べ、ストレス群の乳がん体積が有意に増加した。血中コルチコステロン量と乳がん組織における血管密度、グルココルチコイド受容体、アドレナリン受容体および誘導型NO合成酵素の発現が上昇した。ストレス中に咀嚼刺激を与えると、乳がんの体積が有意に低下した。血中コルチコステロン量と乳がん組織における血管密度、グルココルチコイド受容体、アドレナリン受容体および誘導型NO合成酵素の発現が有意に低下した。これらの結果よりストレス負荷中の咀嚼刺激はストレスホルモンとその受容体を介し乳がんの発症と進行を抑制しているものと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性精神ストレスがストレスホルモンとその受容体を介し、乳がんの発症と進行を促進している。ストレス負荷中の咀嚼刺激がストレスを軽減することにより、乳がんの発症・進行を抑制することができる咀嚼刺激という日常的な行為がストレス関連性乳がんの予防に有効であることを国内外に発信する上で、学術的かつ社会的に大きな意義がある。

研究成果の概要(英文)：We examined effects of chewing on breast cancer growth in mouse exposing to chronic stress. Breast cancer cells were injected into the mammary fat. Stress was induced by placing mice in a ventilated restraint tube for 2 hours a day, for 35 days. Mice in the stress/chewing group were allowed to chew during the restraint period. The tumor volume, vessel density, the plasma corticosterone level and the protein expression of glucocorticoid receptor, adrenergic receptor and inducible nitric oxide synthase were higher in stress mice, compared with the control mice. As compared to stress mice, the tumor growth was inhibited, angiogenesis, corticosterone level, and the protein expression of glucocorticoid receptor, adrenergic receptor and inducible nitric oxide synthase were lower in stress/chewing mice. These findings indicated that chewing could attenuate the enhancing effect of chronic stress on breast cancer progression, partially through regulating stress hormones and their receptors.

研究分野：医歯薬学

キーワード：乳がん ストレス 咀嚼刺激

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 女性の体格向上や社会進出、生活習慣の欧米化、出産の高齢化に伴い、今や乳がんは、がんの中でも、日本女性の罹患率がトップに顕露し(発症率は12人に1人)、2014年の乳がん死亡者数は13,240人に達した(厚労省関連統計データ、2016年)。このため、厚労省は乳がん検診事業を重点的に推進しているも、乳がんの患者数は依然増加の一途を辿っている。

(2) 社会構造や生活形態の急速な変化に伴い、今や人々は慢性的にストレスに曝され、うつ病、心臓神経症、適応障害などのストレス性疾患に罹患する人が急増している観点から(Machado A *et al*, Rev Neurosci 2014)、従業員が50名以上の事業所ではストレスチェックが義務化された(労働安全衛生法)。つい最近、慢性的なストレスが乳がんの発症率を高め、がんの進行や転移を早めることが明らかにされた。持続するストレスは、ストレス関連物質(糖質コルチコイド、ノルアドレナリン、アドレナリンなど)を過剰に分泌し、免疫細胞の活性抑制、がん増殖関連因子発現の亢進、腫瘍組織内部の血管やリンパ管の新生の一連のプロセスを経て、がん細胞の増殖・転移が惹起されることが定説化された。

(3) マウスを用いた先行研究において、我々は拘束ストレス負荷時に爪楊枝を噛ませると、ストレス暴露で上昇した血中コルチコステロン濃度の低下と扁桃体活動が減少されることを明らかにした。そこで本研究では、マウス乳がんモデルを用い、乳がん発症に及ぼす咀嚼刺激の影響を個体レベルで検索すると同時に、図2に示した「ストレス負荷による乳がん細胞の増殖プロセス」において、ストレス負荷時に咀嚼刺激を与えた際、どの素因に影響を及ぼすかを神経内分泌学的、免疫学的、および分子生物学的方法により解明する。

## 2. 研究の目的

本研究は、ヒト乳がん細胞を接種したヌードマウス乳がんモデルを作成し、ストレス条件下で咀嚼刺激させたマウスと咀嚼刺激させなかったマウスにおいて、乳がんの大きさを検索すると同時に、乳腺組織の病理組織学的検査、血中ストレスホルモンの測定および乳がん組織におけるストレスホルモン受容体の発現を定量解析することにより、ストレス関連性乳がんの発症・進行に及ぼす咀嚼刺激の有効性を世界に先駆けて系統的に解明する。

## 3. 研究の方法

本研究目的を達成するために、ヒト乳がん細胞を接種した乳がんモデルマウスを作成する。咀嚼刺激グループと咀嚼刺激なしのグループにおいて、ストレスホルモンとその受容体の定量解析、乳がん腫瘍の数・大きさの経時的計測を行い、ストレス負荷による乳がん発症に及ぼす咀嚼刺激の影響を検索する。次いで、がん組織において、がん増殖を促進する微小血管の密度、ストレスホルモン受容体および誘導型NO合成酵素の発現量を分析する。

### (1) ヌードマウス乳がんモデルの作成

7週齢BALB/cヌードマウスを使用する。ヒト乳がん細胞MDA-MB-231(ATCC)を培養し、細胞カウンターを用いて細胞濃度を決定する。2×10<sup>6</sup>細胞をマウス左第4乳房脂肪パットに接種することによりマウス乳がんモデルを作成する。

### (2) ストレス負荷と咀嚼刺激

乳がん細胞接種前5日から開始する。1日3回、1回45分間、長さ10cm、内径4.0cmのプラスチック製チューブにマウスを閉じ込め、拘束ストレスをかけた。これを5週間継続する。咀嚼刺激は上述のストレス負荷中に木製の爪楊枝をマウスの前歯に近づける。マウスは

自ら積極的に噛みつチューイングを始める。

#### (3) 乳がんサイズの経時解析

がん細胞を接種してから、定期的に視診と触診による乳腺腫瘍の数と体積を観察、記録した。実験終了後に、乳がん組織を採取し、その重量を測定した。

#### (4) 乳がん組織の病理組織学的検索

血管内皮細胞のマーカーである CD31 を免疫組織化学法によって検出し、乳がん組織における微小血管の密度の定量解析を行った。

#### (5) 血中コルチコステロンの解析

ストレスが負荷されると血中ストレスホルモンが分泌される。イムノアッセイ法を用いて、マウス血中コルチコステロン濃度を測定した。

#### (6) ストレスホルモン受容体の発現解析

ウエスタンブロット法を用いて、乳がん組織におけるコルチコステロン受容体、 $\beta$ 2アドレナリン受容体、誘導型NO合成酵素の発現量を比較検討した。

### 4. 研究成果

(1) 乳がん細胞接種後に定期的に腫瘍体積を測定した。乳がん細胞接種 2 週間後には、ストレス群の腫瘍体積は対照群より有意に増加した。乳がん細胞接種 5 週間後には、腫瘍体積と腫瘍重量とともに対照群より有意に増加した。咀嚼刺激群の腫瘍体積と腫瘍重量がストレス群より 33% から 34% 減少した。

(2) 乳がんの増殖と進行に深く関わる新生血管を免疫組織化学法により定量解析を行った。対照群に比べ、ストレス群の微小血管の密度が有意に増加した。咀嚼刺激群の微小血管密度がストレス群より有意に低下した。

(3) 血中コルチコステロン濃度はイムノアッセイ法により測定した。対照群に比べ、ストレス群の血中コルチコステロン濃度が有意に上昇した。咀嚼刺激群の血中コルチコステロン濃度はストレス群より有意に低下した。

(4) 乳がん組織におけるコルチコステロン受容体、 $\beta$ 2アドレナリン受容体、誘導型NO合成酵素の発現量をウエスタンブロット法により定量解析を行った。対照群に比べ、ストレス群のコルチコステロン受容体、 $\beta$ 2アドレナリン受容体、誘導型NO合成酵素の発現量が有意に増加した。一方、咀嚼刺激群のコルチコステロン受容体、 $\beta$ 2アドレナリン受容体、誘導型NO合成酵素の発現量がストレス群より有意に低下した。

(5) 以上の結果から、ストレス負荷中の咀嚼刺激はストレスホルモンとその受容体を介し乳がんの発症と進行を抑制する可能性が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Kubo KY, Kotachi M, Suzuki A, Iinuma M, Azuma K.	4. 巻 15
2. 論文標題 Chewing during prenatal stress prevents prenatal stress-induced suppression of neurogenesis, anxiety-like behavior and learning deficits in mouse offspring.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Int J Med Sci	6. 最初と最後の頁 849-858
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7150/ijms.25281	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Azuma K, Zhou Q, Kubo KY.	4. 巻 51
2. 論文標題 Morphological and molecular characterization of the senile osteoporosis in senescence-accelerated mouse prone 6 (SAMP6).	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Med Mol Morphol	6. 最初と最後の頁 139-146
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00795-018-0188-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Azuma K, Toyama T, Katano M, Kajimoto K, Hayashi S, Suzuki A, Tsugane H, Iinuma M, Kubo KY.	4. 巻 41
2. 論文標題 Yokukansan ameliorates hippocampus-dependent learning impairment in senescence-accelerated mouse.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biol Pharm Bull.	6. 最初と最後の頁 1593-1599
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b18-00359	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kizaki K, Uchida S, Yamashita F, Tsukamoto M, Azuma K	4. 巻 37
2. 論文標題 Microstructure of osteophytes in medial knee osteoarthritis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Clin Rheumatol.	6. 最初と最後の頁 2893-2896
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10067-018-4262-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tsukamoto M, Wang KY, Tasaki T, Murata Y, Okada Y, Yamanaka Y, Nakamura E, Yamada S, Izumi H, Zhou Q, Azuma K, Sasaguri Y, Kohno K, Sakai A	4. 巻 120
2. 論文標題 Findings as a starting point to unravel the underlying mechanisms of in vivo interactions involving Wnt10a in bone, fat and muscle.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bone	6. 最初と最後の頁 75-84
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bone.2018.10.009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kubo KY, Suzuki A, Iinuma M, Sato Y, Nagashio R, Ohta E, Azuma K.	4. 巻 97
2. 論文標題 Vulnerability to stress in mouse offspring is ameliorated when pregnant dams are provided a chewing stick during prenatal stress.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Arch Oral Biol	6. 最初と最後の頁 150-155
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.archoralbio.2018.10.014	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Azuma K, Zhou Q, Niwa M, Kubo KY	4. 巻 18
2. 論文標題 Association between mastication, the hippocampus, and the HPA axis: a comprehensive review.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci	6. 最初と最後の頁 1867
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms18081687	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kondo H, Uchida M, Ichihashi Y, Suzuki A, Hayashi S, Iinuma M, Azuma K, Kubo KY	4. 巻 27
2. 論文標題 Maternal occlusal disharmony during pregnancy induces spatial memory deficits associated with the suppression of hippocampal neurogenesis in adult mouse offspring	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Pediatric Dental J	6. 最初と最後の頁 49-55
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.1016/j.pdj.2016.12.002">https://doi.org/10.1016/j.pdj.2016.12.002</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 東 華岳, 久保金弥	4. 巻 52
2. 論文標題 骨の老化と加齢性骨粗鬆症の形態学的解析	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 顕微鏡	6. 最初と最後の頁 29-34
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Azuma K, Zhou Q, Kubo KY	4. 巻 51
2. 論文標題 Morphological and molecular characterization of the senile osteoporosis in senescence-accelerated mouse prone 6 (SAMP6).	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Med Mol Morphol	6. 最初と最後の頁 139-146
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) org/10.1007/s00795-018-0188-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計17件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 東 華岳, 安達泰弘, 林春樹, Qian Zhou, 久保金弥
2. 発表標題 歯の早期喪失がSAMP8マウスにおける海馬神経細胞の微細構造に及ぼす影響
3. 学会等名 第123回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Marong Fang, Xiaoxue Du, Zhiying Hu, Kagaku Azuma
2. 発表標題 MiR-124 regulates BACE 1 and alters autophagy in transgenic AD mice
3. 学会等名 第123回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kajimoto K, Kondo H, Suzuki A, Hayashi S, Katano M, Iinuma M, Azuma K, Kubo KY.
2. 発表標題 Maternal chewing during prenatal stress in mice ameliorates stress-induced impairment of serotonergic system in the adult offspring.
3. 学会等名 第41回日本神経科学大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hayashi S, Kondo H, Suzuki A, Kajimoto K, Katano M, Yamada K, Sato Y, Iinuma M, Azuma K, Kubo KY.
2. 発表標題 Maternal chewing during prenatal stress ameliorates stress-induced diabetes in adult offspring.
3. 学会等名 第41回日本神経科学大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 梶本京子、近藤裕子、鈴木あゆみ、林 櫻子、片野雅久、飯沼光生、東 華岳、久保金弥
2. 発表標題 妊娠ストレス中のチューイングはSAMP6仔の骨代謝に及ぼす影響.
3. 学会等名 第33回老化促進モデルマウス(SAM)学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 近藤裕子、久田智詠、吉川英里、梶本京子、片野雅久、鈴木あゆみ、飯沼光生、東 華岳、久保金弥
2. 発表標題 歯の早期喪失が海馬におけるミクログリアの発現に及ぼす影響.
3. 学会等名 第56回日本小児歯科学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 梶本京子、外山達也、西英光、林櫻子、越智鈴子、近藤裕子、飯沼光生、山田久美子、東 華岳、久保金弥
2. 発表標題 抑肝散による認知機能障害抑制効果の検討
3. 学会等名 第56回日本小児歯科学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ayumi Suzuki, Hiroko Kondo, Mitsuo Iinuma, Kagaku Azuma, Kin-ya Kubo.
2. 発表標題 Maternal chewing ameliorates prenatal stress-induced hippocampal impairment in adult offspring
3. 学会等名 96th general session & exhibition of the International Association for Dental Research (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hiroko Kondo, Ayumi Suzuki, Sakurako Hayashi, Kyoko Kajimoto, Masahisa Katano, Mitsuo Iinuma, Kagaku Azuma, Kin-ya Kubo
2. 発表標題 Tooth loss induces morphological changes in hippocampal glial cells
3. 学会等名 96th general session & exhibition of the International Association for Dental Research (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Marong Fang, Yang Yang, Zhiying Hu, Kagaku Azuma
2. 発表標題 CUMS depression model rat hippocampus induced autophagic and apoptosis are reversed by miR16 and Fluoxetine
3. 学会等名 第122回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2017年



1. 発表者名 東 華岳、久保金弥
2. 発表標題 老化促進モデルマウスSAMP8に対する抑肝散の効果：空間学習記憶と海馬微細構造の解析
3. 学会等名 第122回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Hayashi S, Suzuki A, Kondo H, Katano M, Kajimoto K, Iinuma M, Azuma K, Kubo KY.
2. 発表標題 Molar tooth loss early in life affects the hippocampal neuronal ultrastructure in SAMP8 mice.
3. 学会等名 第40回日本神経科学大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Suzuki A, Hayashi S, Kondo H, Katano M, Kajimoto K, Iinuma M, Azuma K, Kubo KY
2. 発表標題 Maternal chewing during prenatal stress ameliorates stress-induced HPA axis disturbance in adult offspring.
3. 学会等名 第40回日本神経科学大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 林 櫻子、片野雅久、梶本京子、鈴木あゆみ、近藤裕子、飯沼光生、東 華岳、久保金弥
2. 発表標題 加齢に伴う海馬機能の低下に対する抑肝散の影響：SAMP8を用いた検討
3. 学会等名 第32回老化促進モデルマウス（SAM）学会学術大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 東 華岳
2. 発表標題 老化促進モデルマウスSAMP6を用いた骨粗鬆症の分子形態学的解析
3. 学会等名 第49回日本臨床分子形態学会総会・学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 東 華岳、安達泰弘、林春樹、Qian Zhou,久保金弥
2. 発表標題 歯の早期喪失がSAMP8マウスにおける海馬神経細胞の微細構造に及ぼす影響
3. 学会等名 第123回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 arong Fang, Xiaoxue Du, Zhiying Hu, Kagaku Azuma
2. 発表標題 MiR-124 regulates BACE 1 and alters autophagy in transgenic AD mice
3. 学会等名 第123回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<https://www.uoeh-u.ac.jp/University/dept/medicine/1kaibou/1kaibou-kenkyugyouseki.html>

## 6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	久保 金弥  (KUBO Kin-ya)  (00329492)	名古屋女子大学・健康科学部・教授    (33915)	
研究分担者	飯沼 光生  (IINUMA Mitsuo)  (70184364)	朝日大学・歯学部・教授    (33703)	
研究分担者	小野塚 実  (ONOZUKA Minoru)  (90084780)	神奈川歯科大学・歯学部・名誉教授    (32703)	