

平成 21 年 5 月 28 日現在

研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2007-2008
 課題番号：19591521
 研究課題名（和文） 経産による乳癌抑制に関わる乳腺間質の役割とその分子基盤の解明
 研究課題名（英文） Role of mammary stroma in suppression of parity-induced mammary carcinogenesis and its molecular bases
 研究代表者
 螺良 愛郎 (TSUBURA AIRO)
 関西医科大学・医学部・教授
 研究者番号：90098137

研究成果の概要：ヒトでは若年の満期妊娠は、未産婦に比して生涯にわたる乳癌の発生を抑える。ラットでも若齢妊娠による乳癌抑制は認められ、エストロゲンとプロゲステロン(E/P)の短期(3週;ラットの妊娠期間に相当)投与でも再現される。しかし、その機序は未だ不明である。今回、乳腺間質(脂肪織)の脂肪酸組成の変動に着目し、乳癌抑制効果の機序解明に取り組んだところ、経産乳腺ではリノール酸組成の有意の減少をみた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 19 年度	2,600,000	780,000	3,380,000
平成 20 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：実験病理学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：乳癌、経産、ラット、メチルニトロソ尿素、乳腺、間質、脂肪酸、脂肪酸組成

1. 研究開始当初の背景

MacMahon らによる広範な疫学研究によると (MacMahon B, Cole P, Lin TM, Lowe CR, Mirra AP, Ravnihar B, Salber EJ, Valaoras VG, Yuasa S. Age at first birth and breast cancer risk. Bull World Health Organ 43: 209-221, 1970)、初回満期妊娠が若年齢であると乳癌発症を減少させ、20歳未満で満期妊娠を経験した女性は、未産婦に比して乳癌の生涯発症は1/2である。経産による乳癌の抑制は、ラットにおいても認められ、また短期(3週間;ラットの妊娠期間に相当)のエストロゲンとプロゲステロン(E/P)投与による、妊娠期のホルモン環境の模倣によっても、乳癌抑制は再現される。しかし、経産による

乳癌抑制機序は乳腺の分化説(Russo J, Russo IH. DNA labeling index and structure of the rat mammary gland as determinants of its susceptibility to carcinogenesis. J Natl Cancer Inst 61: 1451-1459, 1978)や体内ホルモンバランス改変説(Thordarson G, Jin E, Guzman RC, Swanson SM, Nandi S, Talamantes F. Refractoriness in parous rats: is it caused by persistent changes in the hormonal environment or permanent biochemical alterations in the mammary epithelia? Carcinogenesis 16: 2847-2853, 1995)など種々の仮説が提唱されているが、妊娠あるいは短期E/P投与による乳癌抑制機構の全貌は未だ明らかではない。我々は近交

系 Lewis ラットの検討により、この現象を再現し (Yang J, Yoshizawa K, Nandi S, Tsubura A. Protective effects of pregnancy and lactation against *N*-methyl-*N*-nitrosourea-induced mammary carcinomas in female Lewis rats. *Carcinogenesis* 20: 623-628, 1999)、網羅的 DNA アレイ解析により、経産乳腺における増殖関連遺伝子の発現抑制と分化関連遺伝子の発現亢進を見るとともに (Uehara N, Unami A, Kiyozuka Y, Shikata N, Oishi Y, Tsubura A. Parous mammary glands exhibit distinct alterations in gene expression and proliferation responsiveness to carcinogenic stimuli in Lewis rats. *Oncol Rep* 15: 903-911, 2006)、発癌刺激に対する経産乳腺の応答性は、経産乳腺における HDAC1/c-Myc/Mnt/Max 複合体形成の関与が示唆された (Matsuoka Y, Fukamachi K, Uehara N, Tsuda H, Tsubura A. Induction of a novel histone deacetylase 1/c-Myc/Mnt/Max complex formation is implicated in parity-induced refractoriness to mammary carcinogenesis. *Cancer Sci* 99: 309-315, 2008.)。しかし、経産による乳癌抑制機序の全貌は未だ明らかでない。

2. 研究の目的

乳腺上皮は脂肪細胞や線維芽細胞といった間質細胞や細胞外基質 (ECM) のなかで育まれており、これら間質成分は上皮細胞に対する栄養補給に加うるに、形態形成や増殖・分化の制御に重要な役割を担っている。しかし、経産による乳癌抑制機序の解析において、間質を視野に入れた解析は未だなされていない。一般に高脂肪食は乳癌を促進するが、脂肪の量のみならず脂肪の質が注目されている。すなわち、リノール酸 (LA, 18:2n-6) といった n-6 系多価不飽和脂肪酸 (n-6 PUFA) は乳癌の促進に働くが、イコサペンタエン酸 (EPA; 20:5n-3) やドコサヘキサエン酸 (DHA; 22:6n-3) といった n-3 PUFA は乳癌を抑制する。異なる 10% 脂肪酸 (LA, EPA, DHA, パルミチン酸 PA; 16:0) 含有食を給餌したラットでは、飽和脂肪酸 (PA) 食投与ラットに比して、LA 食は乳癌を促進し、EPA や DHA 食では抑制をみる。なお、これらの食餌脂肪酸は血清ならびに乳腺の脂肪酸組成に忠実に反映されている (Moriguchi K, Yuri T, Yoshizawa K, Kiuchi K, Takada H, Inoue Y, Hada T, Matsumura M, Tsubura A. Dietary docosahexaenoic acid protects against *N*-methyl-*N*-nitrosourea-induced retinal degeneration in rats. *Exp Eye Res* 77: 167-173, 2003.)。一方、同一の食餌を摂取した妊娠マウスと同一齢の処女マウスの乳腺脂肪織における脂肪酸組成を比較すると、

妊娠乳腺ではリノール酸組成の減少をみとめ (Bandyopadhyay GK, Lee LY, Guzman RC, Nandi S. Effect of reproductive states on lipid mobilization and linoleic acid metabolism in mammary glands. *Lipids* 30: 155-162, 1995)、n-6/n-3 比の低下をみる (Liu YE, Pu W, Wang J, Kang JX, Shi YE. Activation of Stat5 and induction of a pregnancy-like mammary gland differentiation by eicosapentaenoic and docosapentaenoic omega-3 fatty acids. *FEBS J* 274: 3351-3362, 2007)。よって、妊娠による体内ホルモン環境の変化は脂肪代謝に影響をおよぼし、妊娠による乳癌抑制機序のひとつとして乳腺間質の脂肪酸組成の変換が考えられる。以上のデータを基として、経産ならびに同日齢の MNU 誘発 Lewis ラット乳腺の脂肪織組成につき比較し、経産による乳癌抑制機序解明の一助とすることを研究の目的としている。

3. 研究の方法

(1) 実験プロトコール

4 週齢雌 Lewis ラットに 50mg/kg MNU を腹腔内投与し、1 群: 6 週齢にて 3 週間有効な徐放性 E/P 錠剤 (Innovative Research of America, Sarasota, FL, USA) を皮下に埋没; 2 群: E/P 非埋没; あるいは 3 群: 無処置ラットの 3 群 (各 5 匹) を作製し、13 週齢にて屠殺して片側腰部乳腺は HE 標本、対側の腰部乳腺はガスクロマトグラフィーにより乳腺脂肪酸組成を分析し、重量%で表示して群間を比較した。また 1, 2 群ラット (各 27 匹) は乳腺発癌を比較するため長期飼育し、 ≥ 1 cm 乳腺腫瘍をみれば屠殺し、40 週齢にて実験を終了した。なお、実験期間中ラットは各群 CMF (オリエンタル酵母, 千葉) と水を自由摂取させた。

(2) 乳腺組織からの脂肪酸組成の解析法

採取後直ちに -20°C に凍結した乳腺組織を解凍してホモゲナイズした。脂肪は Bligh と Dyer 法により脂肪層からクロロホルム:メタノール (2:1, vol/vol) を用いて抽出した。乳腺組織の脂肪酸組成はガスクロマトグラフィーにより分析した。脂肪はメタノールに溶解したカリウムメトキシド (関東化学, 東京) によりエステル結合転移反応を行い、次いで n-ヘキサン (和光純薬, 大阪) とワコーゲル C200 (和光純薬) を通じて溶出した。ヘキサンで溶出したメチルエステルはヘリウムガス (30ml/min) を担体として水素炎イオン検出器 (FID) (Shimazu ADC-17, 京都) とキャピラリーカラム (Omegawax 250, Supelco, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) を装備したガスクロマトグラフィー (Shimazu GC-17A) にて分析した。インジェクションポートと FID は各の 240°C と 260°C で操作した。最初のオ

ーブンの温度 80°C、1 分間を毎分 6°C ずつ 210°C まで上昇させ、45 分間保ち、さらに毎分 20°C ずつ 250°C まで上昇させた。構成成分のピークは標準の脂肪酸メチルエステルとデータ処理装置 (Shimazu, C-R7A) を用いて比較した。

4. 研究成果

(1) リノール酸組成は MNU 処置 E/P 暴露乳腺では E/P 非暴露乳腺に比して 85.1% (34.03/39.97)、無処置対照乳腺に比して 88.0% (34.03/38.65) と有意に減少をみた。なお、n-6/n-3 比は、(リノール酸+アラキドン酸) / (イコサペタンエン酸+ドコサペタンエン酸+ドコサヘキサエン酸) で算出すると、MNU 処置 E/P 暴露乳腺、E/P 非暴露乳腺、無処置対照乳腺では各の 10.90±0.15, 10.87±0.19, 10.04±1.26 となり、有意差はみなかった (Table 1)。

Table 1. Fatty acid composition of mammary tissues of MNU-exposed and estrogen/progesterone-treated and-untreated rats, and mammary tissues of control rats.

Fatty acid	Numerical symbol	Common name	50mg/kg-MNU		Control
			E/P (+)	E/P (-)	
12:0		lauric acid	0.53±0.25	0.51±0.09	0.61±0.09
14:0		myristic acid	1.61±0.18	1.47±0.12	1.55±0.11
16:0		palmitic acid	21.46±0.70	19.42±0.30	19.23±0.60
16:1 n-7		palmitoleic acid	3.14±0.47	2.04±0.15	2.07±0.16
18:0		stearic acid	3.76±0.22	3.83±0.17	4.44±0.63
18:1 n-9		oleic acid	26.92±0.40	26.04±0.31	25.85±0.54
18:2 n-6		linoleic acid	34.03±2.07	39.97±0.53	38.65±0.46
18:3 n-6		γ -linolenic acid	0.25±0.02	0.19±0.01	0.19±0.01
18:3 n-3		α -linolenic acid	1.69±0.22	2.36±0.12	2.40±0.34
20:0		arachidic acid	0.14±0.01	0.12±0.01	0.11±0.01
20:1 n-9		eicosenoic acid	0.51±0.09	0.37±0.02	0.37±0.01
20:2 n-6		eicosadienoic acid	0.64±0.21	0.30±0.02	0.33±0.01
20:3 n-9		mead acid	0.05±0.02	0.03±0.00	0.03±0.00
20:3 n-6		dihomo- γ -linolenic acid	0.52±0.17	0.24±0.02	0.24±0.02
20:4 n-6		arachidonic acid	2.05±0.62	1.22±0.08	1.28±0.03
20:5 n-3		eicosapentaenoic acid	0.21±0.02	0.24±0.06	0.25±0.07
22:0		behenic acid	0.08±0.01	0.06±0.00	0.05±0.01
22:1 n-9		erucic acid	0.04±0.01	0.03±0.00	0.02±0.01
22:4 n-6		adrenic acid	0.88±0.39	0.34±0.05	0.33±0.04
22:5 n-3		docosapentaenoic acid	0.53±0.09	0.39±0.04	0.43±0.02
24:0		lignoceric acid	0.06±0.01	0.03±0.01	0.03±0.00
22:6 n-3		docosahexaenoic acid	0.88±0.08	0.82±0.05	0.94±0.06
24:1 n-9		nervonic acid	0.04±0.02	0.02±0.00	0.02±0.00

Results are presented as the weight % (mean±SD) of five rats.

(2) E/P 処置により 1 群の ≥ 1 cm 乳癌発生率は有意に減少した。但し、乳癌発生までの期間あるいはラット当りの乳癌個数には差はみなかった (Table 2)。

Table 2. Effects of MNU exposure and estrogen and progesterone treatment of female Lewis rats on mammary carcinogenesis.

Group	E/P treatment	No. of rats examined	No. of rats with carcinomas ≥ 1 cm (%)	Carcinomas of any size per rat	Weeks after MNU injection
1	+	27	20 (74)*	5.6 ± 0.9	25.1 ± 1.3
2	-	27	26 (96)	5.2 ± 0.4	26.8 ± 1.4

Carcinogen: 50 mg/kg MNU ip at 4 weeks of age.

E/P: subQ insertion of 21-day releasing pellet containing 0.5 mg 17 β -estradiol and 32.5 mg progesterone at 6 weeks of age.

Termination: End at 40 weeks of age.

*P < 0.05, compared with Group 2.

(3) 以上、若年期での妊娠、あるいはエストロゲンとプロゲステロン暴露により妊娠を模倣するホルモン環境を妊娠に相応する期間作出すると、乳癌の抑制をみた。E/P 錠剤除去 4 週後に乳腺脂肪組成を E/P 非処置群と比較すると、E/P 処置によりリノール酸組成の減少をみたが、n-6/n-3 比に差はみなかつ

た。

(4) ヒトの担癌乳腺と非担癌乳腺の脂肪酸組成をみると (Maillard V, Bounoux P, Ferrari P, Jourdan ML, Pinault M, Lavillonnière F, Body G, Le Floch O, Chajès V. N-3 and N-6 fatty acids in breast adipose tissue and relative risk of breast cancer in a case-control study in Tours, France. Int J Cancer 98: 78-83, 2002.), 非担癌乳腺ではリノール酸組成と n-6/n-3 比の有意の減少をみる。MNU 処置 E/P 暴露、MNU 処置 E/P 非暴露、ならびに無処置対照の各乳腺の脂肪酸組成を短期 E/P 暴露を終了後 4 週目 (乳腺の退縮後) に比較したところ、E/P 暴露乳腺において n-6 系 PUFA であるリノール酸組成の有意の低下をみたが、n-6/n-3 比に差はみなかった。n-6/n-3 比でみると、我々の祖先は 1/1~2/1 比の食事を食していた。今日、日本では 4/1 比であり、英国では 15/1 比である (Bounoux P, Maillard V, Chajès V. Omega-6/omega-3 polyunsaturated fatty acids ratio and breast cancer. World Rev Nutr Diet 94: 158-165, 2005)。今回の実験食 (CMF, オリエンタル酵母社) は 8.5% の脂肪を含有し、n-6/n-3 (リノール酸/ α -リノレン酸+イコサペンタエン酸+ドコサヘキサエン酸) 比は 7.7/1 であった。よって、E/P 暴露により n-6/n-3 比の減少 (n-3PUFA の増加) がみられなかったのは、与えた食餌の n-3 系 PUFA の不足も考えられる。あとひとつは、マウス妊娠乳腺では対照処女乳腺に比して n-6/n-3 比の減少をみるが、我々はホルモン刺激後の退縮乳腺 (E/P 除去後 4 週目) を検索対照とした。我々の実験系においてもホルモン刺激時の乳腺を検討する必要がある。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 9 件)

- ① 頼彦長, 坂貴司, 兼松清果, 桑田満喜, 螺良愛郎. 若年と高齢での妊娠を模倣する短期エストロゲンとプロゲステロン処置による乳癌発生への影響と乳腺脂肪織の役割 乳癌基礎研 (印刷中) 査読無し。
- ② Lai Y-C, Yuri T, Uehara N, Matsuoka Y, Kanematsu S, Tsubura A. Biphasic effect of short-term pregnancy hormone treatment on *N*-methyl-*N*-nitrosourea-induced mammary carcinogenesis in young and old rats. Mol Med Rep 2 (2): 213-220, 2009.
- ③ Tsubura A, Yuri T, Yoshizawa K, Uehara N, Takada H. Role of fatty acids in malignancy and visual impairment: Epidemiological evidence and experimental studies. Histol

- Histopathol 24 (2): 223-224, 2009. 査読有り。
- ④ Matsuoka Y, Fukamachi K, Uehara N, Tsuda H, Tsubura A. Induction of a novel histone deacetylase 1/c-Myc/Mnt/Max complex formation is implicated in parity-induced refractoriness to mammary carcinogenesis. *Cancer Sci* 99 (2): 309-315, 2008. 査読有り。
- ⑤ Tsubura A, Uehara N, Matsuoka Y, Yoshizawa K, Yuri T. Estrogen and progesterone treatment mimicking pregnancy for protection from breast cancer. *In Vivo* 22 (2): 191-201, 2008. 査読有り。
- ⑥ Uehara N, Matsuoka Y, Tsubura A. Mesothelin promotes anchorage-independent growth and prevents anoikis via ERK signaling pathway in human breast cancer cells. *Mol Cancer Res* 6 (2): 186-193, 2008. 査読有り。
- ⑦ 頼 彦長, 塚本麗子, 三木克朗, 螺良愛郎. 高齢雌Lewisラットへの妊娠期ホルモン環境を模倣した短期エストロゲンとプロゲステロン処置による *N*-methyl-*N*-nitrosourea 誘発乳癌への影響. *乳癌基礎研* 17: 11-15, 2008. 査読無し。
- ⑧ Tsukamoto R, Mikami T, Miki K, Uehara N, Yuri T, Matsuoka Y, Okazaki K, Tsubura A. *N*-methyl-*N*-nitrosourea-induced mammary carcinogenesis promoted by short-term treatment with estrogen and progesterone mimicking pregnancy in aged female Lewis rats. *Oncol Rep* 18 (2): 337-342, 2007. 査読有り。
- ⑨ 松岡洋一郎, 上原範久, 垾 貴司, 塚本麗子, 螺良愛郎. 経産乳腺の発癌刺激低感受性に関する研究. *乳癌基礎研* 16: 23-26, 2007. 査読無し。
- [学会発表] (計 12 件)
- ① Lai Y-C, Yuri T, Uehara N, Matsuoka Y, Kanematsu S, Tsubura A. Effects of short-term treatment with estrogen and progesterone mimicking pregnancy on development of MNU-induced mammary carcinomas in aged female Lewis rats. (*Breast Cancer* 15 Suppl 1: 18-19, 2008) The 26th IABCR, Kurashiki, Japan, Sep, 2008.
- ② Matsuoka Y, Uehara N, Yuri T, Tsubura A. Induction of a novel histone deacetylase 1/c-Myc/Mnt/Max complex formation is implicated in parity-induced refractoriness to mammary carcinogenesis. (*Breast Cancer* 15 Suppl 1: 39-40, 2008) The 26th IABCR, Kurashiki, Japan, Sep, 2008.
- ③ Tsubura A. Protective/risk factors of breast cancers and its biological roles. Workshop on Radiation Risk of Breast Cancer: what can/should we do in the future? Radiation Effects Research Foundation, Hiroshima, Japan, Oct, 2008.
- ④ 頼 彦長, 垾 貴司, 上原範久, 松岡洋一郎, 螺良愛郎. 若年期短期エストロゲン/プロゲステロン処置によるラット乳腺脂肪酸組成の変動. (*日病会誌* 97: 326, 2008) 第 97 回日本病理学会 金沢 5 月, 2008.
- ⑤ 垾 貴司, 兼松清果, 頼 彦長, 螺良愛郎. MNU 誘発ラット乳癌前癌病変の短期エストロゲン投与による修飾作用. (*日病会誌* 97: 326, 2008) 第 97 回日本病理学会 金沢 5 月, 2008.
- ⑥ 松岡洋一郎, 上原範久, 垾 貴司, 螺良愛郎. 経産乳腺の発癌刺激低感受性に関する研究. (*日病会誌* 97: 326, 2008) 第 97 回日本病理学会 金沢 5 月, 2008.
- ⑦ 頼 彦長, 垾 貴司, 兼松清果, 桑田満喜, 螺良愛郎. 高齢期での妊娠を模倣する短期エストロゲン/プロゲステロン処置による乳癌発生への影響. (*脂質栄養* 17: 146, 2008) 第 18 回乳癌基礎研究会 福島 7 月, 2008.
- ⑧ 螺良愛郎. 脂肪酸の腫瘍や視覚におよぼす影響の実験的検証. (*脂質栄養* 17: 117, 2008) 第 17 回日本脂質栄養学会 大阪 9 月, 2008.
- ⑨ 四方伸明, 頼 彦長, 螺良愛郎. 妊娠期を模倣する短期エストロゲン/プロゲステロン処置によるラット乳腺脂肪酸組成の変動. (*脂質栄養* 17: 146, 2008) 第 17 回日本脂質栄養学会 大阪 9 月, 2008.
- ⑩ 松岡洋一郎, 深町勝巳, 上原範久, 垾 貴司, 津田洋幸, 螺良愛郎. 妊娠・出産による乳腺発癌抑制についての基礎的研究. (*日病会誌* 96: 209, 2007) 第 96 回日本病理学会 大阪 3 月, 2007.
- ⑪ 垾 貴司, 塚本麗子, 上原範久, 松岡洋一郎, 螺良愛郎. エストロゲン・プロゲステロン投与による乳腺上皮におけるホルモン受容体の発現変化と乳腺発癌への影響. (*日病会誌* 96: 333, 2007) 第 96 回日本病理学会 大阪 3 月, 2007.
- ⑫ 頼 彦長, 塚本麗子, 三木克朗, 螺良

愛郎. 高齢雌Lewisラットへの妊娠期ホルモン環境を模倣した短期エストロゲンとプロゲステロン処置による*N*-methyl-*N*-nitrosourea 誘発乳癌への影響. 第17回乳癌基礎研究会 高槻 7月, 2007.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

螺良 愛郎 (TSUBURA AIRO)
関西医科大学・医学部・教授
研究者番号：90098137

(2) 研究分担者

松岡 洋一郎 (MATSUOKA YOICHIRO)
関西医科大学・医学部・准教授
研究者番号：60219409

上原 範久 (UEHARA NORIHISA)
関西医科大学・医学部・講師
研究者番号：30368211

坂 貴司 (YURI TAKASHI)
関西医科大学・医学部・講師
研究者番号：50330212

(3) 連携研究者

なし