

平成 22 年 6 月 21 日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20700601
 研究課題名（和文）生活環境要因がもたらすホルモン依存性癌に対するメトキシフラボノイドの予防効果
 研究課題名（英文）Inhibitory effects of methoxyflavonoid on hormone-dependent cancer related to environmental factor
 研究代表者
 竹村 ひとみ (TAKEMURA HITOMI)
 松本大学・人間健康学部・助手
 研究者番号：60295558

研究成果の概要(和文):ヒト乳癌細胞において、メトキシフラボノイドのクリソエリオールは、環境中に広く存在する benzo[a]pyrene (BaP) が代謝活性化に伴い形成する BPDE-DNA 付加体の形成を有意に抑制した。その作用機序として、受容体 AhR への BaP の結合を阻害し代謝酵素 CYP1 mRNA の発現を抑制することが明らかとなった。クリソエリオールは、BaP 由来の発癌に対し化学予防的に働く可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文): A dietary methoxyflavonoid, chrysoeriol, inhibited the formation of BPDE-DNA adducts in human MCF-7 breast cancer cells, via regulation of the AhR pathway stimulated by benzo[a]pyrene, which is a ubiquitous environmental pollutant.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,200,000	660,000	2,860,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：ホルモン依存性癌、メトキシフラボノイド、Benzo[a]pyrene、CYP、DNA 付加体、アリル炭化水素受容体、エストロゲン代謝、がん化学予防、

1. 研究開始当初の背景

近年、乳癌、子宮内膜症をはじめとするホルモン依存性疾患が増加しており、ライフスタイルの変化に伴う環境因子の影響が示唆されている。内因性の女性ホルモンであるエストロゲンは乳癌の原因の一つであると言われ、ホルモン補充療法に用いられるプレマリンは、更年期症候群の軽減効果が期待される一方で、乳癌、子宮癌発症のリスク因子で

あると考えられている。加えてホルモン療法により肺癌のリスクが2倍以上高まること、喫煙・受動喫煙により乳癌リスクが2倍以上になるとの報告もある。エストラジオール(E₂)は、酸化還元酵素 cytochrome P450 (CYP)1B1 によりカテコールエストロゲン(CE)の一つである 4-OHE₂ に変換され、そのキノン体が DNA 付加体を形成し発癌性を示すことが動物実験において明らかにされている。

乳癌の発症・進展には、エストロゲンの解毒酵素が重要な役割を果たすと考えられる。さらに近年、非喫煙日本人女性において、初潮年齢が早く閉経年齢が遅い女性は、肺癌のリスクが高いこと、卵巣摘出等により人工閉経し、かつホルモン補充療法を受けている女性は、肺癌リスクが高いことが報告された。乳癌のみならず肺癌においてもエストロゲンが深く関与することが示され、エストロゲンの代謝調節を担う CYP1B1 をはじめとする一連の酵素の働きが癌発生に非常に重要であると言える。また、喫煙及び受動喫煙と女性乳がん発生率との関係について、閉経前の女性において、喫煙している（していた）女性と受動喫煙を受けている女性は、乳癌のリスクが各々3.9倍、2.6倍高いとの調査結果が報告されている。

2. 研究の目的

申請者らは、エストロゲンの解毒代謝という角度から CYP1B1 および 4-CEs の生成・解毒代謝に着目し、乳癌の発生・進展を抑制できるのではないかとこの視点から、植物性食品成分メトキシフラボノイドに、CYP1B1 を特異的に阻害するものがあることを明らかにした。そこで本研究では、ホルモン依存性癌予防因子としてメトキシフラボノイドの一つクリソエリオールに焦点を絞り、生活環境因子の中で、喫煙のモデル化合物として多環芳香族炭化水素の一つベンツピレン (BaP) を用い、ヒト乳癌細胞 MCF-7 における影響を検証することを目的とした。DNA 損傷の指標として、BaP が代謝活性化された後形成される BPDE-DNA 付加体の形成に対するメトキシフラボノイドの影響とその作用機序について検討した。

3. 研究の方法

(1) ヒト乳癌細胞 MCF-7 をエストロゲン無添加培地にて培養し、BaP およびクリソエリオールを添加し 24 時間培養後、細胞より DNA を抽出し digest を行った後、LC-MS/MS を用いて BPDE-DNA 付加体を定量した。

(2) MCF-7 細胞を、BaP およびクリソエリオールで一定時間処理した後、EROD アッセイにより CYP1 酵素活性を測定した。また、同条件で培養した細胞を回収し、RNA を抽出し CYP1 mRNA 発現量をリアルタイム PCR 法にて測定した。

(3) AhR-BaP 複合体の形成に対するクリソエリオールの阻害作用について、抗 AhR 複合体抗体を用いた Ah イムノアッセイにより検討を行った。

4. 研究成果

(1) MCF-7 細胞を BaP およびクリソエリオールにて 24 時間処理した後、細胞より DNA を抽出し、LC-MS/MS 分析を実施した。BaP 処理により、3 種のピークが検出された (Peak 1, (+)-trans-BPDE-dG, Peak 2)。10 μ M クリソエリオールは BPDE-DNA 付加体の形成を有意に抑制した (** P < 0.01)。中でも最も主要な付加体である (+)-trans-BPDE-dG の形成を強く抑制した (図 1)。

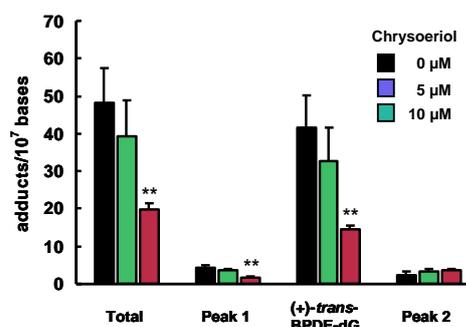


図 1. BPDE-dG アダクト形成に対するクリソエリオールの抑制効果

(2) MCF-7 細胞を BaP およびクリソエリオールにて 48 時間処理した後、EROD 活性を測定したところ、5, 10 μ M クリソエリオールは、BaP による EROD 活性を有意に抑制した (* P < 0.05, ** P < 0.01) (図 2)。

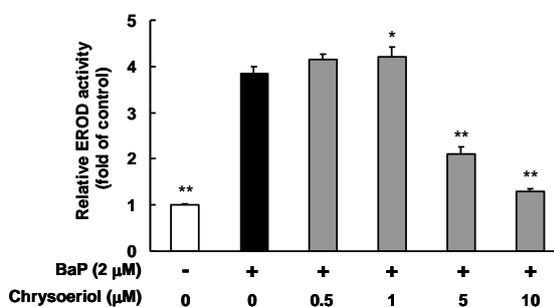


図 2. EROD 活性に対するクリソエリオールの影響

(3) MCF-7 細胞を BaP およびクリソエリオールにて 12 時間処理した後、細胞より RNA を抽出し、CYP1A1/CYP1A2/CYP1B1 の mRNA 発現について定量的 RT-PCR 法により検討したところ、5, 10 μ M クリソエリオールは全ての CYP1 mRNA の発現を有意に抑制した (* P < 0.05, ** P < 0.01) (図 3)。

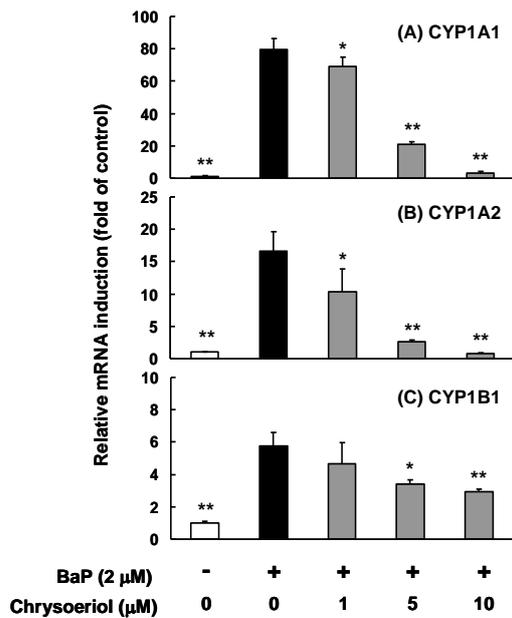


図 3. CYP1 mRNA 発現に対するクリソエリオールの影響

(4) Ah イムノアッセイにより、BaP 0.1 μM、クリソエリオール 0.1~10 μM において、AhR-BaP 複合体の形成は有意に抑制された (***P* < 0.01) (図 4)。

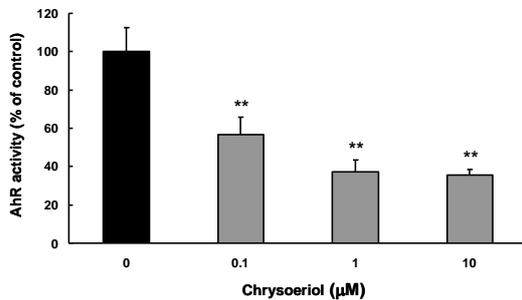


図 4. AhR-BaP 複合体形成に対するクリソエリオールの影響

以上の結果より、クリソエリオールはBaPのAhRへの結合を阻害することにより、CYP1 mRNAの発現を抑制、さらにはBPDE-DNA付加体の形成を抑制することが明らかとなった。クリソエリオールは、BaP由来の発癌に対し化学予防的に働く可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Takemura H, Nagayoshi H, Matsuda T,

Sakakibara H, Morita M, Matsui A, Ohura T and Shimoi K.

Inhibitory effects of chrysoeriol on DNA adduct formation with benzo[*a*]pyrene in MCF-7 breast cancer cells.

Toxicology, in press,

doi:10.1016/j.tox.2010.05.009. 査読有

- ② Takemura H, Uchiyama H, Ohura T, Sakakibara H, Kuruto R, Amagai T and Shimoi K.

A methoxyflavonoid, chrysoeriol, selectively inhibits the formation of a carcinogenic estrogen metabolite in MCF-7 breast cancer cells.

J. Steroid Biochem. Mol. Biol., 118, 70-76. (2010) 査読有

[学会発表] (計 3 件)

- ① Takemura H.

Inhibitory selectivity of flavonoids on human CYP1A1, 1A2 and 1B1 enzymes: molecular modeling and docking study. 4th International Conference on Polyphenols and Health.

2009年12月8日

Harrogate International Centre (Harrogate, UK)

- ② 竹村ひとみ

ヒト CYP1 酵素活性に対するフラボノイドの選択的阻害～モデリング・ドッキング解析による検証～

第14回日本フードファクター学会学術集会

2009年11月16日

神戸大学百年記念館 (兵庫県)

- ③ 竹村ひとみ

Benzo[*a*]pyrene-DNA 付加体形成に対する chrysoeriol の抑制効果

日本環境変異原学会 37 回大会

2008年12月4日

沖縄コンベンションセンター (沖縄県)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹村 ひとみ (TAKEMURA HITOMI)
松本大学・人間健康学部・助手
研究者番号：60295558

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：