

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：32625

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24650504

研究課題名(和文) 癌の転移を予防する食生活の探索

研究課題名(英文) Exploration of the preventive effects of diet on cancer metastasis

研究代表者

平石 さゆり (Hiraishi, Sayuri)

女子栄養大学・栄養科学研究所・講師

研究者番号：20150659

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：概日リズムを調節している時計遺伝子の発現は24時間周期の増減がみられるが、マウスを通常休息している昼間に摂食させると、時計遺伝子の発現ピーク時刻がずれ、肺への癌転移数が有意に増加した。また時計遺伝子の機能異常があるclock変異マウスでは野生型より癌転移数が有意に増えたことから、概日リズムが乱れると癌転移が亢進することが分かった。さらに通常とは異なる食事時刻が続くと、マウス肺の接着因子であるP-selectinとVcam-1の発現が亢進した。

以上により、規則正しい食生活が維持できないと時計遺伝子の概日リズムが乱れ、一部の接着因子の発現に影響が及んで、癌転移が亢進する可能性があると考えられた。

研究成果の概要(英文)：The expression of clock genes that modulate circadian rhythms rises and falls over a 24-h period. Feeding mice during the daytime when they normally rest led to a shift in the peak expression time of clock genes and significantly promoted cancer metastasis. Moreover, compared with wild-type mice, the number of metastatic nodules was significantly increased in the lungs of Clock mutant mice with abnormalities in CLOCK protein function, indicating that disruptions in circadian rhythm promoted cancer metastasis. Prolonging abnormal feeding times also appeared to increase the mRNA expression of both P-selectin and Vcam-1 adhesion molecules in the lungs.

These findings suggest that the inability to maintain a regular meal time may disrupt the circadian rhythms of circadian clock genes and affect expression of some adhesion molecules, thereby promoting cancer metastasis.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活

キーワード：栄養学 概日リズム 癌転移 食生活

1. 研究開始当初の背景

1981 年以来、癌は日本人の死亡原因の第 1 位で全死者数の約 30% を占めている。癌を引き起こす環境要因は、放射線、ウイルス、喫煙、食品添加物や PCB などの化学物質などがあるが、高脂肪食、高炭水化物食、高塩分、過度の飲酒など食事の寄与も大きいと言われている。世界がん研究基金・米国がん研究協会が発表した癌の予防項目も、植物性食品中心の食事、肥満を避ける、野菜・果物、穀物・イモ類・豆類の摂取、適度な飲酒、塩分の制限など食事に関する内容が多い。

一方、昼夜シフト制で働く女性に乳癌、男性に前立腺癌の発生率が高いことが疫学的研究から示されている。また、動物実験において明暗と食事のタイミングを同時に変えて概日リズムを混乱させると、発癌が促され、癌の増殖が亢進することが示された。概日リズムは複数の時計遺伝子産物によって調節されている。その時計遺伝子の発現リズムを主に明暗によって同調させて概日リズムを支配しているのは、中枢神経の視床下部視交叉上核(SCN)である。これとは別に組織、細胞も末梢性の概日リズムを有し、この末梢時計は食餌摂取によって影響されることが報告された。したがって、概日リズムを乱すような食生活は癌の発症、転移、再発に影響を与えるものと考えられる。

2. 研究の目的

食事摂取時刻が乱れた生活(ヒトの場合の深夜食など)が癌の転移にどのような影響を及ぼすかを、マウスを用いて検討することを目的とし、以下の検討を行った。

(1) 本申請者はマウスが通常休息する昼(明期)に食餌摂取させると、癌転移が亢進することを見出した。この結果の再現性を確かめた。

(2) 食餌摂取時刻の変化による癌転移の亢進が、概日リズムを介しているかを調べるため、概日リズムを調節している時計遺伝子の発現レベルの変化と日内変動を、正常な食餌摂取時刻のマウスと昼夜逆転させたマウス間で比較検討した。

(3) 食餌摂取時刻の変化による癌転移の亢進がどのような癌転移関連因子の発現変動に基づくのかを検討した。癌転移関連因子として、癌の血行性転移に不可欠な、血管内皮細胞膜上に発現する P-selectin や VCAM-1 などの接着因子、間質の繊維芽細胞などから分泌され基底膜成分を分解するマトリクスメタロプロテアーゼ(MMP)について検討した。

(4) 高脂肪食をマウスに与えたときに、普通食に比べて、食餌摂取時刻の変化による時計遺伝子の変化にどのような影響を及ぼすかを検討した。

3. 研究の方法

(1) マウス飼育方法

マウスは ICR 雄性の野生型マウス、および概日リズムを正常に刻まない時計遺伝子 Clock の変異マウスを用いた。飼育室の明期は午前 8:00 ~ 午後 20:00、暗期は午後 20:00 ~ 午前 8:00 とした。各々のマウスを 2 群に分け、食餌摂取時間帯を以下の 2 種類とした。

a) 夜給餌群: 暗期摂食(午後 20:00 ~ 午前 8:00 に給餌)

b) 昼給餌群: 明期摂食(午前 11:00 ~ 午後 17:00 に給餌)

飼料は、普通食として通常使用される飼育繁殖用の餌(CE-2、日本クレア社)あるいは、35% (60 kcal%) 脂肪(主にラード)を含む高脂肪食(D12492、リサーチダイエツト社)を与えた。飼育期間中、普通食および高脂肪食摂取群共に、昼給餌群の摂取量と同量の餌を夜給餌群に与えた。

(2) マウスメラノーマ癌細胞の肺への転移実験

(1) の条件で普通食を 6 週間与えたマウスの尾静脈内にマウスメラノーマ細胞 B16BL6 を投与し、さらに同条件で 2 週間飼育した。飼育後解剖して、肺を摘出し、転移癌結節数を実体顕微鏡下で計数した。

(3) 肺組織中の時計遺伝子、癌転移関連因子の発現量の測定

(1) の条件で普通食あるいは高脂肪食を 8 週間与えたマウスから 6 時間毎に肺を摘出し、総 RNA を回収した。単離回収した総 RNA から PrimeScript RT reagent kit (TaKaRa) を用いて cDNA を調製した。調製した cDNA をテンプレートとし、目的の DNA を特異的なプライマーを用いて、SYBER Green を用いた Real-Time PCR で増幅し、時計遺伝子、接着因子、細胞外マトリクス分解酵素の各遺伝子の発現量を調べた。

4. 研究成果

(1) マウスメラノーマ癌細胞の肺転移に及ぼす食餌摂取時刻の影響

転移癌結節数は、野生型マウスでは夜給餌群より昼給餌群の方が有意に多かった。Clock 変異マウスの昼夜両群の転移癌結節数は野生型マウスの夜給餌群に比べて多く、昼給餌群と夜群にほとんど差が無かった(図 1)。Clock 変異マウスは時計遺伝子の Clock の変異により、CLOCK タンパクの機能が損なわれているため、正常な概日リズムを刻んでいないことが報告されている。したがって概日リズムが正常でないと癌の転移が亢進することが分かった。このことから、野生型マウスの昼給餌群では、通常休息している時間帯に摂食をすることで末梢組織の概日リズムが乱れることが想定され、その結果として癌の転移結

節数が増加した可能性が考えられた。

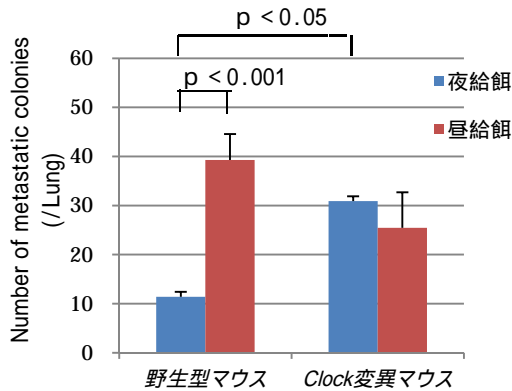


図1 マウスメラノーマ癌細胞の肺転移に及ぼす食餌摂取時刻の影響

(2) 肺組織中の時計遺伝子の発現に及ぼす食餌摂取時刻の影響

時計遺伝子である Per-2、Bmal-1 の発現は 24 時間周期の増減を示し、負の制御因子である Per-2 と正の制御因子の Bmal-1 は発現リズムがほぼ 12 時間ずれることが報告されており、夜給餌群においてそのことが再現できた (図2)。Per-2 と Bmal-1 は共に夜給餌群と昼給餌群で発現のピーク時刻が異なっており、夜給餌群に比べ昼給餌群の位相が両者とも約 6 時間前進した (図2)。

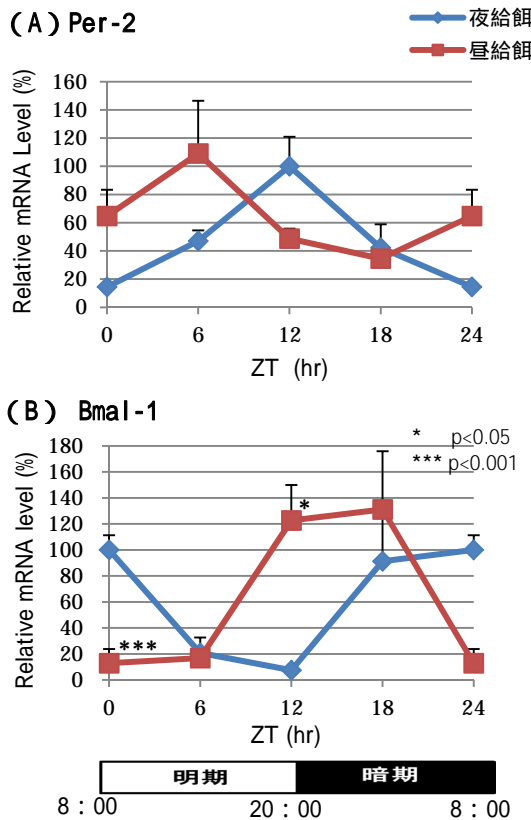


図2 時計遺伝子の発現に及ぼす食餌摂取時刻の影響

このことから、餌摂取時刻を変化させると、概日リズムが乱れることがわかった。したがって、夜給餌群に比べ昼給餌群で癌の転移が亢進したという結果は、明期、暗期は同じでも昼間に餌を摂取することにより肺の時計遺伝子の概日リズムの位相がずれ、概日リズムが乱れたことによると考えられた。

(3) 肺組織中の癌転移関連因子の遺伝子発現に及ぼす食餌摂取時刻の影響

夜給餌群の肺組織中の接着因子 P-selectin の mRNA 発現は、振幅が小さいがリズムがみられた。しかし、昼給餌群ではほとんどリズムはなく、夜給餌群よりも発現量が増加した (図3)。また、接着因子の Vcam-1 の発現にはリズムはみられなかったが、昼給餌群の発現量は夜給餌群より増加した (図3)。時計遺伝子の Per-2、Cry や時計遺伝子以外の一部の遺伝子上流には E-box と呼ばれる塩基配列が存在し、時計遺伝子産物の BMAL/CLOCK ヘテロダイマーによる転写調節を受けているため、24 時間周期の概日リズムを刻んでいる。P-selectin と Vcam-1 の遺伝子上流には E-Box は存在しないが、NF- κ B、AP-1 結合配列などがあり、時計遺伝子の支配を受けている転写因子がこれらの結合部位を介して、P-selectin と Vcam-1 の発現を調節している可能性がある。そのため、昼給餌による時計遺伝子の発現異常が両者の発現に影響を及ぼしたことが考えられるが、この点に関しては、さらに検討が必要と思われる。

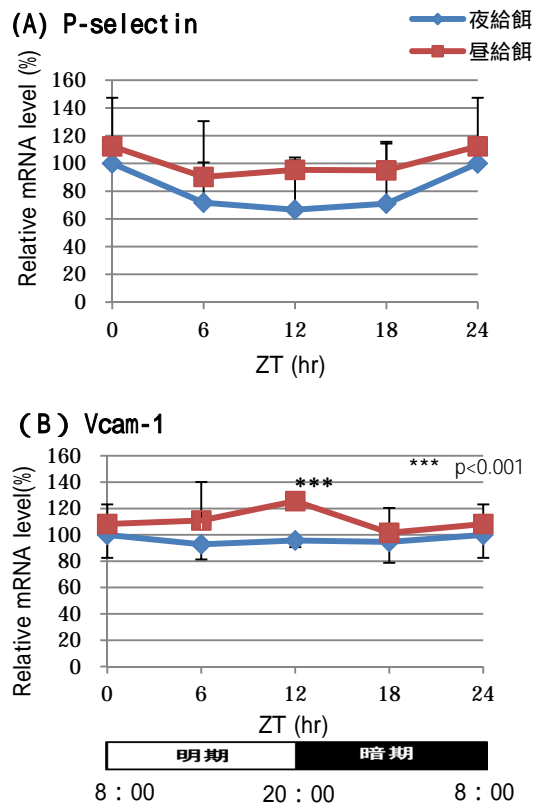


図3 肺組織中の接着因子の遺伝子発現に及ぼす食餌摂取時刻の影響

一方、細胞外マトリックス分解酵素のMmp-2のmRNA発現量には概日リズムはみられず、夜、昼給餌群間の発現量にもほとんど差が見られなかった(図示せず)。

(4) 食餌摂取時刻の変化による時計遺伝子発現変化に及ぼす高脂肪食の影響

高脂肪食摂取群の1日の平均エネルギー摂取量は、飼育期間中普通食群とほとんど同じであった。昼給餌群の摂取量を夜給餌群に与えたため、1日平均エネルギー摂取量は普通食群、高脂肪食群の昼および夜給餌群の4群ともほぼ同じであった。

高脂肪食摂取マウスのPer-2とBmal-1のピーク時刻は、夜、昼給餌群ともに普通食摂取のマウスの各々の群と同じで、高脂肪食摂取においても夜給餌群に比べ昼給餌群では両者の位相は約6時間前進した(図4)。

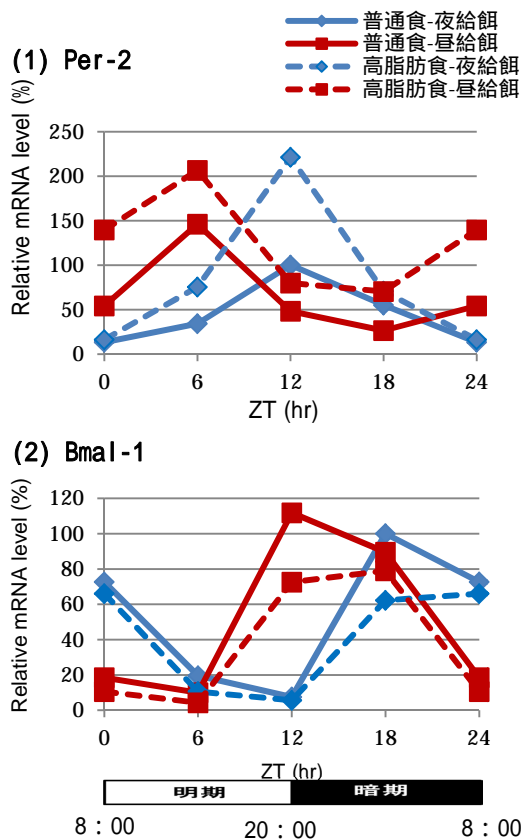


図4 時計遺伝子発現に及ぼす高脂肪食の影響

また、昼給餌を夜給餌に変えて2日後の普通食摂取マウスのPer-2とBmal-1のピーク時刻は、昼給餌群と夜給餌群のピーク時刻の間、すなわち昼給餌群に比べて約3時間位相が後退し夜給餌群に近づいた。昼給餌を夜給餌に変えた高脂肪食摂取マウスでもほぼ同様の結果が得られた(図5)。

これらの結果から、末梢組織の概日リズムに及ぼす高脂肪食摂取の影響は普通食摂取と大きな差はなく、また、高脂肪食摂取が昼給餌によって変化した概日リズムを通常のリズムに戻しにくくするという影響もない

ことが示された。

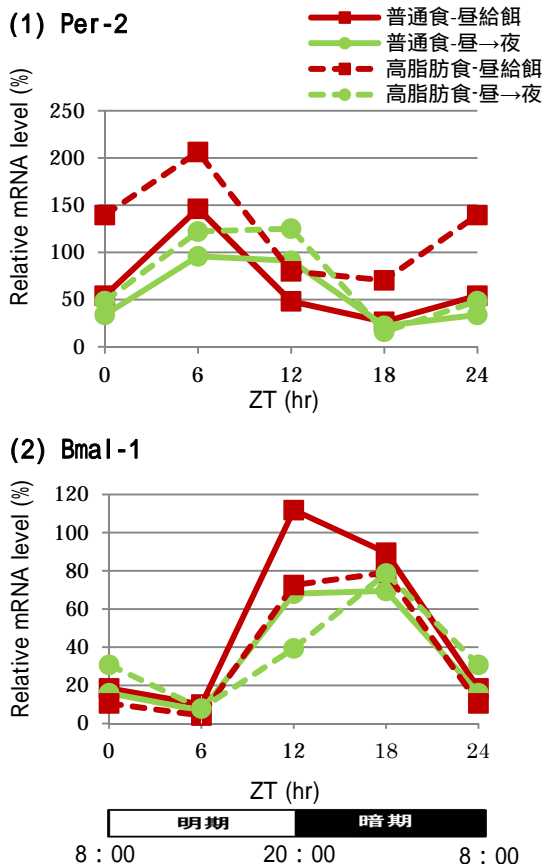


図5 昼給餌から夜給餌に変えて2日後の時計遺伝子発現変化

以上、本研究成果より、休息時刻に摂食することによって末梢組織の概日リズムが乱れ、その結果、一部の接着因子の発現が高まり、さらに、それらが原因となり、癌の転移が起こりやすくなることが示唆された。すなわち、ヒトでは真夜中の食事を避け、規則正しい時刻に食事をするという食生活を送ることによって、癌転移が予防できるものと考えられる。これまでに明暗の時刻を変化させて発癌や癌増殖が増悪するという報告はなされているが、食餌摂取時刻の違いのみによって癌の転移に關与する因子の発現が変化すること、この変化が癌増殖や転移を増強することを明確に証明した報告はない。従って、食事内容のみでなく、適切な食事時刻によって、癌の予防、あるいは抗癌剤の使用量を最低限に出来るという治療面に対して、有益な情報が得られたと考える。

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0件)

〔学会発表〕(計4件)

平石さゆり、香川靖雄、大石勝隆、堀江修一、食餌摂取時刻がマウスの血栓関連因子の概日リズムに及ぼす影響、第36回日本血栓止血学会、2014年5月31日、大阪

平石さゆり、香川靖雄、大石勝隆、堀江修一、マウスの血栓関連因子の概日リズムに及ぼす食餌摂取時刻の影響、日本薬学会第134年会、2014年3月30日、熊本

堀江修一、平石さゆり、紀室悠理、平岡真実、大石勝隆、時間栄養学からみたマウスにおける抗血栓機能の変動、第13回Pharmaco-Hematology シンポジウム、2012年6月15日、東京

平石さゆり、香川靖雄、堀江修一、メラノーマ癌細胞のマウス肺転移に及ぼす食餌摂取時刻の影響、日本薬学会第132年会、2012年3月29日、札幌

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平石 さゆり (HIRAISHI Sayuri)

女子栄養大学 栄養科学研究所・講師

研究者番号：20150659