

平成 22 年 4 月 1 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19510070

研究課題名（和文）化学的ストレスと社会的ストレスの発癌イニシエーションへの複合影響に関する研究

研究課題名（英文）Combined effects of environmental chemical stress and social stress on initiation of carcinogenesis

研究代表者

下位 香代子（SHIMOI KAYOKO）

静岡県立大学・環境科学研究所・教授

研究者番号：10162728

研究成果の概要： 単独隔離の飼育条件によりマウス（BALB/c、5 週齢）にマイルドなストレスを 30 日間負荷し続けると、肝臓中の脂肪酸合成に関する遺伝子の発現量が上昇、脂肪酸分解に関する遺伝子の発現量が減少し、その結果、脂肪蓄積を伴った肝肥大が誘発されることを明らかにした。一方、BaP を投与すると、ストレス負荷群では、肝臓中の DNA 付加体が減少しにくいことがわかった。これらの結果より、社会的ストレス負荷時に BaP のような脂溶性の高い発がん物質が体内に取り込まれると、肝臓に蓄積して発がんのイニシエーション過程を促進する可能性が示唆された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学、放射線・化学物質影響科学

キーワード：ストレス、環境、ベンツピレン、がん、解毒代謝、脂質代謝

1. 研究開始当初の背景

環境ストレスには、有害性環境化学物質による化学ストレス、熱や放射線などによる物理的ストレス、細菌やウイルスなどによる生物的ストレス、社会的ストレスなどがあり、我々は日常的にこれらのストレス

を複合的に受けている。化学的ストレスによりアレルギーや過敏症などの免疫疾患が誘発されるが、社会的な心理ストレスがこれらの疾患を増悪させることが知られている。また、発がんに関しては、マウスにおける自然発生乳がんの頻度が社会的心理ス

トレスにより増加すること、移植がんに関しても増加することが報告されている。

我々は、数年来マウスの社会的ストレスモデルについて研究してきた。拘束、水浸、電気ショックなどの激しいストレス負荷ではなく、より人間の社会生活に近いモデルとして、単独隔離（1匹/ケージ）、過密（20匹/ケージ）、対面（1:1 匹/ケージ）の3種類の飼育条件により、マウスに軽度な社会的ストレスをかけたところ、ストレスに特徴的な血中コルチコステロンの増加や副腎肥大を認め、本モデルにおいてストレスが負荷されていることを確認した。本ストレスモデルは、7日前後にストレス指標の血清コルチコステロン値が最大となり、30日後にかけて緩やかに減少する。従って、1カ月以上にわたりストレスが持続するので、一過性でない生体の応答を調べることができるのが本ストレスモデルのメリットである。本ストレスモデルにおいて、末梢血細胞中に参加的DNA損傷が増加すること、ビリルビンの酸化代謝物であるバイオピリンが尿中に増加することを見出した（BBRC, 349, 775-780, 2006）。また、ヒトにおいてもストレス負荷が大きいヒトほど血清中の脂質過酸化度が大きいことを報告した（J. Affect Disord., 91, 63-70, 2006）。これらの結果は、社会的ストレスが生体内の酸化を亢進することを示唆している。ところで、化学的ストレスに対する生体の応答として、生体は異物代謝機構を有しているが、最近、拘束ストレスなどの激しいストレスにより CYP1A2 などの代謝酵素が変動することが報告された。これらの結果から、日常的に社会的ストレスの負荷がかかっているときに化学的ストレスを受けたら、生体はどのような応答をするのか、複雑な人間生活を考えると、有害性環境化学物質のヒトの健康への影響を評価する際にこのような複合影響について調べる必要があるのではないかと、また、動物を用いての有害性環境化学物質のリスク評価をする際、飼育ストレスにより結果に影響が出る可能性があり、今迄のこのような観点からの報告はほとんどなかったため、このような基礎的なデータを出しておくことが必要ではないかと考えるに至った。

2. 研究の目的

化学物質による発がんは、イニシエーション、プロモーションなど多段階のプロセスを経て引き起こされることが提唱されている。現在までに、化学的ストレスと社会的ストレスの発がんへの複合影響についてはほとんど報告がない。発がん性のあるベンツ（a）ピレン（BaP）を我々は日常的に微量ではあるが大気、水、食品、煙草煙などから摂取して

いる。BaPは、そのままの形では変異原性や発がん性を発揮しない。体内に吸収されたBaPは、①アリーール hidrocarbon 受容体（AhR）を介した経路を通じて、第一相薬物代謝系酵素であるシトクローム P450（CYP）1ファミリーの発現を上昇させる。さらに、②BaPは発現したCYP1ファミリー（CYP1A1、1A2、1B1）により代謝され究極発がん物質（主にBaP-7,8-diol-9,10-epoxide: BPDE）へと代謝活性化される。そして、③生成したBPDEは近傍のDNAと付加体（主にBPDE-dG）を形成する。本過程が、BaPの主要な発がんのイニシエーション過程と考えられている。

BaPは、上述したようにCYP酵素により代謝されてから肝臓や肺のDNAに付加体を形成し、遺伝子の突然変異を経て前胃、肺、肝、皮膚にがんを誘発する。そこで、本研究では、BaPを用いて発がんイニシエーションのステップに単独隔離などの社会的ストレスが与える影響をDNA付加体形成、遺伝子発現の点から検討することを目的とした。

3. 研究の方法

本実験は静岡県公立大学法人静岡県立大学動物実験指針に従い実施した。

社会的ストレスのマウスへの負荷方法

Miyashita 等の方法（BBRC, 349, 775-780, 2006）に準じて、5週齢の雄性BALB/cマウスを搬入後、10日間の順化期間を経て単独隔離（1匹）の飼育条件により、マウス（BALB/c、5週齢）にマイルドなストレスを負荷した。マウスは、室温 $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55\pm 2\%$ 、12時間の明暗サイクル（明期：8:00-20:00）の環境化で、水道水と標準動物飼料（MF、オリエンタル酵母）の自由摂取にて飼育した。また、単独隔離群のケージ内の床敷量は、不安回避行動を制限することで孤独感を高めるために、コントロール群（5匹/ケージ）の約20分の1（2g）に減らした。さらに、外界からの刺激を受けにくいように、各ケージを発泡スチロールの箱で覆った（図1）。

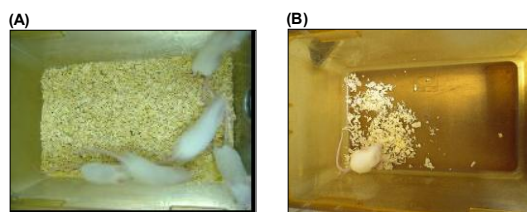


図1. 社会的単独隔離ストレス負荷モデル

肝臓中遺伝子の網羅的解析のための試料採取

30日間の単独隔離ストレス負荷後、15:00に採尿した（バイオピリン測定用）。同日

の 17:00-19:00 にマウスをエーテル麻酔下で開腹し、肝臓を摘出した。速やかに RNAlater に浸し、4°C で一晩静置後、-20°C で以下に示す RNA 抽出まで保存した。

肝臓中の RNA 試料調整

尿中へのバイオピリン排泄量の測定から、顕著なストレス負荷が認められたマウスおよび対象群マウス各 3 匹ずつを選別した。各マウスの RNA later に保存しておいた肝臓から、RNeasy mini kit を用いて Total RNA の精製を行った。

DNA マイクロアレイ解析

DNA マイクロアレイ解析は、Nakai 等の方法に従い実施した。具体的には、抽出した RNA (2 µg) から cDNA を調整し、T7 RNA polymerase を用いてビオチン化 cDNA を合成した。そして、45,000 以上のマウス遺伝子をプローブした Affymetrix Mouse Genome 430 2.0 (Affymetrix, Santa Clara, CA) に供した。解析は、BiNGO 2.0 plug-in software を用いて行った。

リアルタイム RT-PCR を用いた定量的遺伝子発現解析

Prime Script RT reagent kit に添付のプロトコールに従い、Takara PCT Thermal Cycler Dice mini を用いて RNA の逆転写を行った。得られた cDNA を、Applied Biosystems Real Time PCR 7500 System で、各標的遺伝子の Taq Man プライマー・プローブを用いて遺伝子発現を解析した。

社会的ストレスマウスへの BaP 投与

BaP をマウスへの投与直前に、コーンオイルに 25 mg/mL の濃度で溶解した。単独隔離ストレス 7 日間の群へは 100 mg/kg 体重、同 30 日間の群へは 10 mg/kg 体重となるように腹腔内投与した。投与 24、48、96 時間後にマウスを解剖した。

血液生化学指標の測定

得られた血清中の血液生化学指標を、TBA-120FR 自動分析装置 (東芝) を用いて測定した。

肝臓中の脂肪含量の測定

凍結保存した肝臓を、凍結乾燥法により、水分を除去後、乳鉢にて粉碎した。ヘキサシジクロロメタン (1:2) の混液で 16 時間のソックスレー抽出を行った。抽出液を濃縮乾固後の重量から脂肪重量を算出した。

肝臓中 BPDE-dG 付加体の測定

単独隔離ストレス負荷 7 日後に、BaP を腹腔内投与 (100 mg/kg 体重)、24、48、96 時

間後にそれぞれエーテル麻酔下で解剖し、肝臓を摘出した。摘出した肝臓は、液体窒素中で急速冷凍後、DNA 付加体抽出操作まで -80°C で保存した。また血液試料を回収し、測定まで同様に -80°C で保存した。

凍結した肝臓 (10 mg) より DNA 画分を得た後、再度、イソプロパノールを添加して、洗浄し、最終的に 500 µL の水に溶解した。

BPDE-dG の測定方法

20 µg の DNA に内部標準 (¹⁵N₅-BPDE-dG) を添加し乾燥後、buffer C (17 mM sodium succinate, 8 mM CaCl₂) を 3 µL 加え、37°C で 3 時間インキュベートした。アルカリフォスファターゼ (3 units) を加えた後、さらに 3 時間インキュベートした。メタノール (100 µL) を添加し、十分に攪拌後、遠心分離した上清を回収した。濃縮乾固した残差に 15 µL の DMSO および 35 µL の水を加えたものを LC/MS/MS へ供した。

得られたデータの解析は、QuantLynx を用いて行い、10⁷ 塩基あたりの付加体量として算出した。

統計処理

体重あたりの臓器重量、血液生化学試験、DNA 付加体量に関するデータは平均値 ± SD で示し、Pharmaco Analyst Ver.2 (ヒューマンライフ社) を用い、t-test による統計処理を行なった。

4. 研究成果

社会的ストレス (単独隔離ストレス; 1 匹/ケージ) を 30 日間負荷したマウスの尿中バイオピリン濃度が、コントロール群 (5 匹/ケージ) と比較して有意な上昇がみられたことから、ストレスが十分に負荷していることを確認した。そこで、環境化学物質の主要な作用部位である肝臓を対象に、社会的ストレス負荷が肝臓に及ぼす影響を明らかにすることを目的として、DNA マイクロアレイによる網羅的な遺伝子発現解析をおこなった。30 日間の単独隔離ストレス負荷により、発現に変化が見られた 420 遺伝子 (発現増加が 202 遺伝子、発現抑制が 218 遺伝子) について BiNGO によるオントロジー解析を行った結果、主に peroxisome proliferator activated receptor alpha (PPARα) などが関与する脂質代謝系の遺伝子発現の抑制、脂質合成系および分泌経路の遺伝子発現の亢進が見られた (表 1、表 2、図 2)。

リアルタイム RT-PCR により脂質代謝系および脂質合成系の遺伝子発現を確認した結果、長期的かつ持続的な社会的ストレス負荷は、PPARα シグナル伝達系を抑制することで脂質代謝 (β酸化系およびω水酸化系) を抑制し、更にエネルギー代謝調節鍵酵素である PDK4

の抑制によってアセチル CoA の合成を促進し、かつ fatty acid synthase の亢進によって脂肪酸の合成を促進して、生体がエネルギー貯蔵の方向に応答していることが明らかとなった (図 3)。

表 1. 30 日間の単独隔離ストレス負荷により有意に上昇した肝臓中 202 遺伝子うち顕著に上昇したもの

GO-ID	GO term	FDR-corrected p-value
0051641	cellular localization	1.25E-02
0051649	establishment of localization in cell	1.25E-02
0046907	intracellular transport	1.25E-02
0006888	ER to Golgi vesicle-mediated transport	1.30E-02
0045184	establishment of protein localization	4.40E-02
0015031	protein transport	3.72E-02
0006629	lipid metabolic process	4.40E-02
0044255	cellular lipid metabolic process	4.40E-02
0008610	lipid biosynthetic process	1.73E-02
0006066	alcohol metabolic process	1.25E-02
0016125	sterol metabolic process	3.75E-02
0008203	cholesterol metabolic process	3.55E-02
0006082	organic acid metabolic process	4.40E-02
0016053	organic acid biosynthetic process	3.06E-02
0046394	carboxylic acid biosynthetic process	3.06E-02
0019752	carboxylic acid metabolic process	4.40E-02
0006983	ER overload response	1.73E-02

* FDR-corrected p-value of the categories appearing in the deepest hierarchy are shadowed.

表 2. 30 日間の単独隔離ストレス負荷により有意に減少した肝臓中 218 遺伝子のうちより顕著に減少したもの

GO-ID	GO term	FDR-corrected p-value
0006629	lipid metabolic process	4.56E-03
0044238	primary metabolic process*	
0044262	cellular carbohydrate metabolic process	3.13E-02
0005996	monosaccharide metabolic process	2.06E-03
0019318	hexose metabolic process	2.06E-03
0006006	glucose metabolic process	1.04E-03
0006066	alcohol metabolic process	1.07E-02
0044237	cellular metabolic process	
0006082	organic acid metabolic process	2.09E-02
0019752	carboxylic acid metabolic process	2.09E-02
0006090	pyruvate metabolic process	2.23E-02
0006631	fatty acid metabolic process	2.26E-02
0019395	fatty acid oxidation	4.22E-02
0006635	fatty acid beta-oxidation	2.07E-02
0006637	acyl-CoA metabolic process	9.40E-03
0015908	fatty acid transport	4.23E-03
0015909	long-chain fatty acid transport	3.13E-02
0002520	immune system development	4.36E-02
0048534	hemopoietic or lymphoid organ development	3.88E-02
0007275	multicellular organismal development	3.43E-02
0030154	cell differentiation	1.68E-03
0050789	regulation of biological process	4.36E-02
0050794	regulation of cellular process	1.68E-02
0043086	negative regulation of catalytic activity	1.68E-02
0051348	negative regulation of transferase activity	1.68E-02
0006469	negative regulation of protein kinase activity	1.68E-02
0032147	activation of protein kinase activity	
0000185	activation of MAPKKK activity	1.68E-02
0000186	activation of MAPKK activity	4.98E-02

* GO term with no p-value means not significant. † For shadowed p-value representation, see Table 2.

以上の結果から、長期的かつ持続的な社会的ストレスの負荷は、肝臓中の脂質代謝経路に変化を与え、脂質を蓄積する方向へ生体応答していくことが示唆された (図 4)。

一方、30 日間の単独隔離ストレスの負荷により体重に変化は見られなかったが、有意な肝肥大が惹起された。しかしながら、肝障害の血中バイオマーカーである AST、ALT、ALP には変動が見られなかったことから、30 日間のストレス負荷時に見られる肝臓の肥大は、肝障害を伴うものではないと考えられた。

次に、30 日間のストレス負荷マウスに BaP (100 mg/kg 体重) を腹腔内投与後、24 時間、48 時間および 96 時間後にそれぞれ解剖に供したところ、BaP の投与によりコントロール群の肝臓の肥大が惹起された。ストレス負荷群への BaP 投与では、投与 48 時間後にスト

レス負荷に起因した肝肥大がさらに増幅された。BaP 投与後の血中総コレステロールおよび遊離脂肪酸量を経時的に追跡すると、社会的ストレス未負荷のコントロールマウスへの BaP 投与により、投与後の時間依存的に総コレステロールおよび遊離脂肪酸量が上昇した (図 5)。ところが、30 日間のストレス負荷マウスでは、BaP 投与による両因子の時間依存的な上昇は見られなかった。そこで、96 時間後の肝臓中の脂肪含量をソックスレー法を用いて測定したところ、ストレス負荷+BaP 投与群の含量は BaP のみ投与群の値と比較して有意に高値を示した (図 6)。これは、ストレス負荷群ではコントロール群に比して肝臓中への脂肪蓄積が生じていることを示唆している。

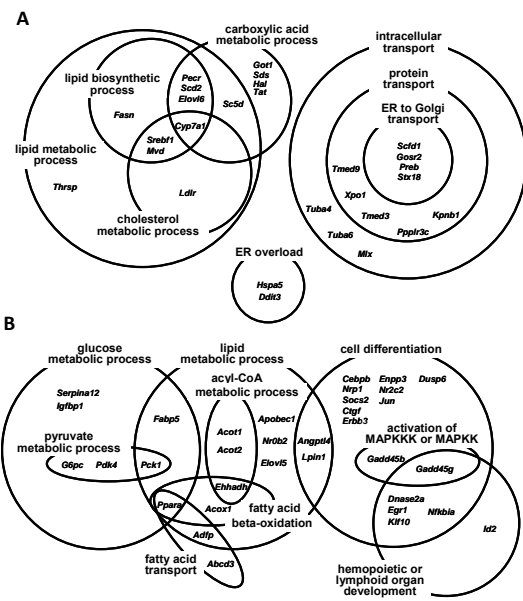


図 2. 社会的ストレス負荷により変動がみられた遺伝子群 (A) 発現が増加した遺伝子群、(B) 発現が低下した遺伝子群

さらに、社会的ストレスおよび BaP の複合的曝露時における AhR や CYP1 ファミリーの発現量を測定したところ、ストレス未負荷群への BaP 投与により、肝臓中 AhR の発現量は、上昇傾向を示したものの (図 7A)、ストレス負荷群への BaP の投与による AhR の発現量に変化は見られなかった。一方、主要な CYP1 ファミリーの一つである CYP1B1 の発現量は、コントロール群への BaP により投与 48 時間まで顕著な上昇がみられ、その後、速やかに定常状態へ回復したが (図 7B)、興味深いことに、ストレス負荷群への BaP 投与群では、このような CYP1B1 の発現変動は見られなかった。

単独隔離ストレス負荷 7 日後に、BaP を腹腔内投与し、肝臓中の BPDE-dG 生成量を LC-MS/MS 法を用いて測定したところ、コントロール群への BaP 投与により、投与の 48

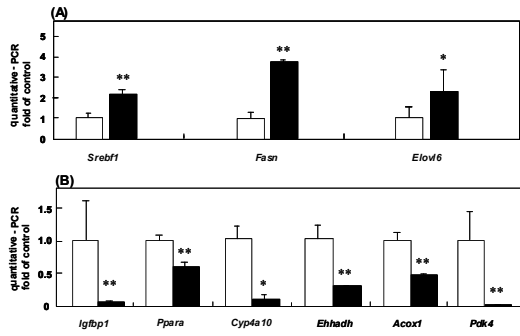


図 3. 社会的ストレス 30 日間負荷時に変動がみられた遺伝子のリアルタイム RT-PCR 測定
 (A) 発現が上昇した遺伝子、(B) 発現が減少した遺伝子。Srebf1, sterol regulatory element binding factors 1; Fas, Elov6, ELOVL family member 6, elongation of long chain fatty acids (yeast); Igfbp1, insulin-like growth factor binding protein-1; Ppara, peroxisome proliferator activated receptors; Cyp4a10, cytochrome P450, family 4, subfamily a, polypeptide 10; Ehhadh, enoyl-coenzyme A, hydratase/3-hydroxyacyl coenzyme A dehydrogenase; Acox1, acyl-Coenzyme A oxidase 1, palmitoyl; Pdk4, pyruvate dehydrogenase kinase, isoenzyme 4.

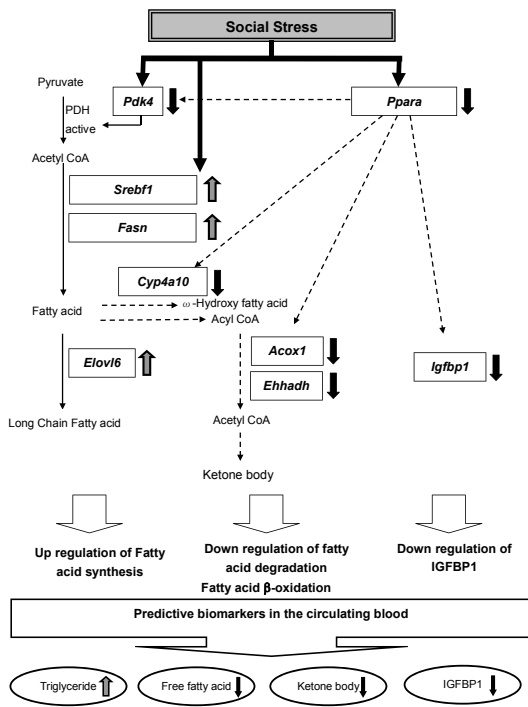


図 4. 本研究から予想される 30 日間の単独隔離ストレス負荷により変化を受ける肝臓中の脂質代謝経路
 各省略形は、図 3 参照。

時間後にわずかな BPDE-dG 生成の上昇がみられたが、その後速やかに減少した (図 8)。一方、ストレス負荷群へ BaP を投与すると投与後 96 時間まで上昇を続けた。特に 96 時間における生成量は、コントロール群の生成量に比して有意に高かった。

以上の結果より、マウスへの社会的ストレスの負荷により、肝臓中の脂質代謝に関連する遺伝子の発現が変化し、肝臓中に脂肪が蓄積しやすくなること、さらに社会的ストレス負荷に加えて、生体が BaP のような脂溶性の

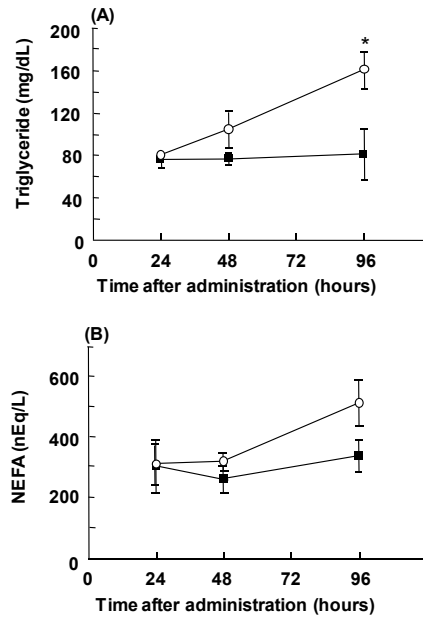


図 5. 社会的ストレス負荷とベンゾ(a)ピレンの複合曝露時の血中トリグリセリドおよび遊離脂肪酸の経時的変動
 (A) トリグリセリド、(B) 遊離脂肪酸 (NEFA)。○、社会的ストレス未負荷群+ベンゾ(a)ピレン (BaP)；■、30 日間の社会的ストレス負荷群+BaP。10 mg/kg 体重のベンゾ(a)ピレンを腹腔内投与した 24、48、96 時間後に採血した。平均値±標準偏差 (n=3)。* $P < 0.05$ vs ストレス未負荷群 (Student's t-test)。

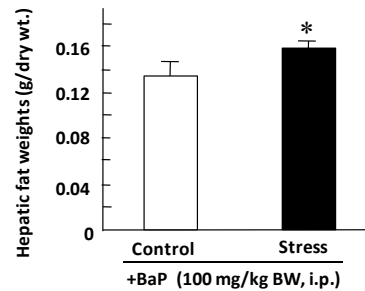


図 6. 30 日間の単独隔離ストレス負荷後の BaP 投与が肝臓中脂肪量に及ぼす影響
 30 日間の単独隔離ストレスを負荷後、BaP (100 mg/kg 体重) を腹腔内投与した。投与の 96 時間後に肝臓を摘出し、ソックスレー抽出法を用いて脂肪重量を測定した。
 Control: 5 匹/ケージ、Stress: 1 匹/ケージ。
 平均値±標準誤差 (n=5) で表示。* $P < 0.05$ vs コントロール群 (Student t-test)。

高い環境化学物質に曝されると、体内に吸収された BaP が肝臓中へ蓄積する可能性があること、ストレス未負荷のときよりも代謝活性化 BaP と DNA の付加体生成量が上昇することが判明した。すなわち、社会的ストレスと BaP への曝露のような化学的ストレスが生体に複合的に作用することにより、発がんイニシエーション過程が増悪する可能性が示唆された。今後、肝臓中の BaP 濃度の測定や解毒酵素、脂質代謝酵素の時間的な変動を検討する必要がある。

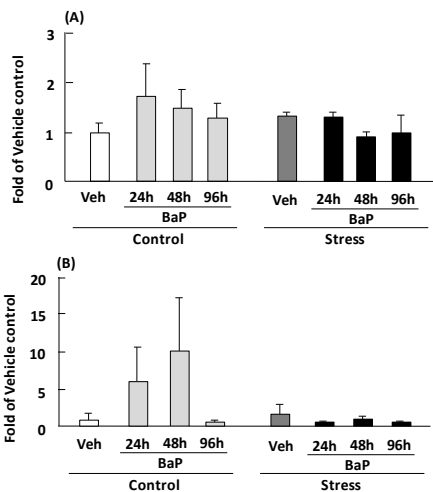


図7. 社会的ストレス負荷とベンゾ(a)ピレンの複合曝露時の肝臓中遺伝子発現の変化
社会的ストレスを未負荷群 (Control) と30日間の社会的ストレス負荷群 (Stress) に100 mg/kg体重のベンゾ(a)ピレン (BaP)を腹腔内投与後、経時的に肝臓中の遺伝子発現をリアルタイム RT-PCR法を用いて測定した。(A) *Ahr* (B) *Cyp1b1*. 平均値±標準偏差 (n=3)で表示。*P<0.05 vs ストレス未負荷群 (Student's t-test)。

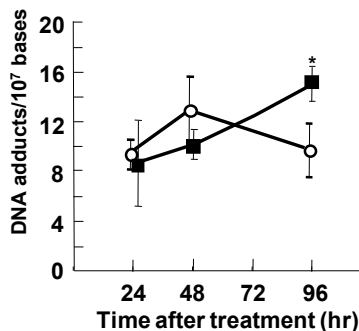


図8. 社会的ストレス負荷とベンゾ(a)ピレンの複合曝露時の肝臓中BPDE-dG付加体形成量の経時変化
社会的ストレスを未負荷群 (○) と7日間の社会的ストレス負荷群 (■) に100 mg/kg体重のベンゾ(a)ピレン (BaP)を腹腔内投与後、経時的に肝臓中の代謝物 (BPDE) とDNAの付加体形成量をLC/MS/MSを用いて測定した。平均値±標準偏差 (n=3)で表示。*P<0.05 vs ストレス未負荷群 (Student's t-test)。

5. 主な発表論文等

(研究代表者及び研究分担者には下線)
[雑誌論文] (計1件)

- Motoyama K., Nakai Y., Miyashita T., Fukui Y., Morita M., Sanmiya K., Sakakibara H., Matsumoto I., Abe K., Yagabe T., Yajima N., and Shimoi K. Isolation stress for 30 days alters hepatic gene expression profiles, especially with reference to lipid metabolism in mice, *Physiological Genomics*, **37**, 79-87 (2009) 査読あり

[学会発表] (計5件)

- Motoyama K., Nakai Y., Miyashita T., Fukui Y., Morita M., Kobayashi A.,

Sanmiya K., Sakakibara H., Matsumoto K., Abe K., Yagabe A., Yajima N., Shimoi K., Social Stress Alters Gene Expression of Lipid Metabolism in Mice, *Biochemistry and Molecular Biology* 2008, 2008年12月9-12日、神戸ポートアイランド

- Motoyama K., Suzuki A., Sakakibara H., Lee C.Y., Kobayashi A., Matsui A., Koyanagi A., Ling L., Kinae N., Shimoi K., Social stress alters hepatic gene expression with reference to lipid metabolism and induces obesity in mice, 1st International Conference on Health and Longevity Sciences, 2008/12/18-19, Shizuoka, Japan
- 本山径子、中井雄治、三宮一幸、松本一朗、阿部啓子、福井雄一郎、矢賀部隆史、矢嶋信浩、鈴木敦美、榊原啓之、下位香代子:社会的ストレスは肝遺伝子発現を変化させ、肥満を誘発する、2009年度日本農芸化学会、2009年3月27-29日、福岡
- 松井朝子、小林章男、林凌、小柳顯陽、榊原啓之、下位香代子、社会的ストレスとベンゾ[a]ピレンのマウスにおける複合影響、日本環境変異原学会第38回大会、2009年11月26-27日、静岡
- 松井朝子、小林章男、林凌、小柳顯陽、榊原啓之、下位香代子、社会的ストレスが環境発がん物質の代謝遺伝子発現に及ぼす影響、富士山麓アカデミック&サイエンスフェア2009、2009年12月16日、静岡

6. 研究組織

(1)研究代表者

下位 香代子 (SHIMOI KAYOKO)
静岡県立大学・環境科学研究所・教授
研究者番号: 10162728

(2)研究分担者

榊原 啓之 (SAKAKIBARA HIROYUKI)
静岡県立大学・環境科学研究所・助教
研究者番号: 20403701