

機関番号：37109

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20500734

研究課題名(和文) 乳癌および大腸癌の発症における肥満と食成分に関する基礎および臨床疫学的研究

研究課題名(英文) Basic and Epidemiological study for the carcinogenic role of obesity and nutritional factors in breast and colon cancers

研究代表者

中野 修治 (NAKANO SHUJI)

中村学園大学・栄養科学部・教授

研究者番号：40164248

研究成果の概要(和文)：乳癌の発生に内臓脂肪型肥満や大豆などの食事性因子がどのように関与しているかを動物実験、細胞実験、症例対照研究により検討した。EMS 誘導乳癌ラットでの研究では、大豆イソフラボンであるゲニスタイン(GEN)は日本人の標準的 GEN 摂取量にあわせた低投与量から、その数百倍の高投与量でもホルモン依存性乳癌の発症を抑制できなかった。また内臓肥満ラットが乳癌を発症しやすいという結果は得られなかった。さらに女性乳癌患者での食事調査では、閉経後乳がん患者に限定して解析した結果、乳がん患者において、大豆の摂取は関連なく、総食事摂取量、エネルギー摂取量、油脂および植物性脂質過剰摂取が有意に乳がんリスクと関係していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Incidence of breast and colon cancer is increasing recently among Japanese women. As these cancers are considered to be obesity- and diet-linked diseases, we have investigated the association of breast carcinogenesis with visceral fat obesity and dietary factors through in vivo, in vitro, and epidemiological approaches. Model rats for visceral obesity did not produce any tumor 40 weeks after oral administration of ethylmethane sulphonate (EMS), while a control rats produced tumors in 2 rats out of 16 rats. Genistein (GEN), a phytochemical with weak estrogenic activity, did not suppress the incidence of EMS-induced hormone-dependent tumor in WKA rats fed on diets with low to high concentrations of GEN. A case-control study suggests that intakes of oil and plant lipids were associated with elevated risk for breast cancer, but not with Soybean intake in postmenopausal Japanese women. These results suggest that Soybean isoflavone may not reduce the risk of breast cancer for postmenopausal women.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：①乳癌 ②癌の一次予防 ③食事性因子 ④大豆イソフラボン ⑤肥満⑥アディポカイン ⑦シグナル伝達 ⑧症例対照研究

1. 研究開始当初の背景

癌の分子機序の解明とともに癌治療は大きな進歩が見られている。しかし本邦において癌の死亡率は一向に改善がみられず、2020年には二人に一人は癌で死亡すると推測されている。疫学調査によると、食事や生活習慣は癌の発症原因の過半数を占め、このため生活習慣や食生活の改善による癌の一次予防は、癌死を減少させるための21世紀の大きな課題である。とりわけ近年、本邦の女性において増加が著しい乳癌と大腸癌は、ともに肥満及び食生活など生活習慣に密接に関連した癌と考えられており、とくに乳癌に関しては日本人の罹患率は欧米の1/3であり、この原因として大豆イソフラボンが挙げられ、その主成分であるゲニステインが乳癌発症を抑制するのではないかと仮説が疫学研究で示されている。しかし欧米での研究では大豆イソフラボンとの関連はほとんどないことが報告されている。

またメタボリックシンドロームの元凶である内臓脂肪型肥満は冠動脈疾患との関わりがとりわけ脚光を浴びているが、最近の臨床研究において乳癌や大腸癌の患者には、肥満とくに内臓脂肪蓄積型肥満がみられ、アディポカイン濃度も異常をきたしていることが報告されている。しかしアディポカインのこれらの癌細胞に対する詳細な作用機序は明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究では上記の疑問点を解決するため、乳癌や大腸癌が発生するまでの過程で、内臓肥満に関連したサイトカインであるアディポネクチンや、日本人に特有な食事の成分である大豆イソフラボン、とくにゲニステインがどのように関与しているかを中心として、動物実験、細胞実験、疫学研究などにより多角的に解明することが目的である。

とくに肥満における乳癌の発症機序を、肥満モデル動物においてアディポカインや食因子を通して解析し、またヒト株化細胞を使用して、癌細胞制御のメカニズムを分子生物学的にシグナル伝達より解析する。さらに食事性因子と乳癌の関係を調べる疫学研究として、女性乳癌患者と非乳癌女性を対象にした食事調査による症例対照研究を行い、乳癌の発症を促進あるいは抑制する食因子の同定し、これらの癌発症モデル動物にて検証するとともに、乳癌細胞においてその作用機序をシグナル伝達経路から解析することによって癌の一次予防に応用するものである。

3. 研究の方法

(1) 乳癌発症モデルラット(OLETF)における乳癌発症機序の解析と制御因子の同定

①ヒトのメタボリックシンドロームの特徴

を有するOLETFラットとその対照であるLETOラットを使用して、ラットに乳癌を誘導するエチルメタンサルフォン酸(EMS)を投与して肥満ラットと正常ラット間で発症頻度およびアディポネクチンレベルを測定し、乳癌発生と肥満およびアディポカインとの関連を検討する。

②誘導された乳癌組織のエストロゲン受容体(ER)、プロゲステロン受容体(PR)、Her-2などを測定し肥満と関連した乳癌の生物学的特徴がないか検討する。

(2) EMS誘発性乳癌モデルラットを使用した乳癌発症における食事性因子の作用の解析

①大豆イソフラボンであるゲニステインの乳癌発症予防効果を、EMS誘発性乳癌モデルラットを使用して解析する。

②ウコン由来のクルクミンによる乳癌発症抑制をEMS誘発性乳癌モデルラットを用いて検討する。

(3) 大腸癌、乳癌の細胞株でアディポネクチンと食事性因子による細胞死誘導のシグナル伝達

大腸癌細胞株や乳癌細胞株において、アディポネクチンやゲニステイン、クルクミンの細胞増殖に対する作用をWST-1アッセイで、またアポトーシスをフローサイトメトリー

(FACS)による細胞周期解析とPARPアッセイから解析する。またシグナル伝達のどの部位を抑制しているのかを明らかにするために、PI-3K-Akt経路、Ras-Raf-1-Erk経路、転写因子STAT3、アポトーシス関連因子(Bcl-2やBax)、mTOR(Mammalian Target of Rapamycin)の標的分子であるS6K1や4E-BP1などを介したシグナル経路から解析する。

(4) 乳癌発症の肥満と食事性因子の検討—乳癌患者における症例対照研究

九州がんセンターの乳癌女性患者150名、および福岡近郊の健康女性対照者300名について詳細な食事調査と臨床医学的情報を収集し統計解析を行い、癌発症を制御あるいは促進する食因子を抽出し、Odds比を推定し

(症例対照研究)すでに報告されている食因子との比較を行う。

4. 研究成果

(1) モデルラットにおける内臓脂肪と乳癌発症機序の解析と制御因子の同定

ヒトの内臓脂肪症候群のモデルラットOLETFに生後4週齢から、乳癌発症させる発癌剤であるEMSを12週間飲み水に混ぜて投与し、乳癌発症の経過と血中の種々のサイトカインを測定し、コントロールのLETOラットと比較した。EMS投与量には両群で差はないように前日の飲水量で毎日調整した。途中で死亡したラットを除き、実験開始後40

週までの乳がん発症数は、OLETF ラット 0/16 匹、LETO ラット 2/16 匹であった。LETO の腫瘍は両者とも異型性の強い浸潤性乳管癌であった。このため内臓脂肪ラットが乳癌になりやすいということは証明できなかった。

LETO で発症した乳癌組織のエストロゲンとプロジェステロン受容体、Her-2 などの受容体発現などを免疫組織染色により調べたところ 2 匹の LETO の乳癌組織のひとつは ER(+), PR(+), HER2(-) と、もうひとつは ER(+), PR(+), HER2(+) であった。

(2) EMS 誘発性乳がんモデルラットを使用した乳がん発症における食事性因子の解析

大豆イソフラボンであるゲニステインを、ホルモン依存性乳癌発症する EMS 誘導乳がんモデルラットに経口投与し、その発症速度および癌細胞のエストロゲン受容体、プロジェステロン受容体、Her-2 受容体などのホルモン受容体の発現を調べ、ゲネスタチンの乳がん予防効果の生物学的特性を検討した。飼料はゲニステインフリーの内分泌攪乱物質研究用飼料を使用し、これにゲニステインを低・中・高の三段階に投与量を分け、乳癌発症を比較した。ちなみに低投与量の血中濃度は日本人の標準的なゲニステイン濃度に相当するものである。統計上、発症速度に有意な差は無く、発症時期はほぼ同じであった。また、免疫組織染色により受容体発現を確認したところ、ゲネスタチンを投与中に発症した乳癌はすべてホルモン受容体陽性であった。一部の乳癌は Her-2 陽性を示した。現在、実験匹数を増やし再検中である。

(3) 乳癌の細胞株でアディポネクチンと食事性因子による細胞死誘導のシグナル伝達

①ホルモン依存性乳癌細胞株(MCF-7)および Her-2 増幅乳癌(SK-BR3)においてアディポネクチンの細胞増殖に対する作用や PARP(PolyADP Ribose Polymerase) 断片化アッセイによるアポトーシスを解析している。その結果、アディポネクチンはこれらの乳がん細胞の増殖抑制に関与している可能性が示されたが、有意な差は出なかった。またアディポネクチンによる Akt および Erk のリン酸化(活性化)や mTOR の基質である S6K1 と 4EBP-1 のリン酸化にはほとんど影響は見られなかった。同様の研究を大腸癌株化細胞である(SW48, DLD-1)でも行っている。

(4) クルクミンによる細胞死誘導とシグナル伝達の解析

ウコンに含まれるポリフェノールであるクルクミンを、受容体タイプの異なる乳がん細

胞 5 種 (MCF-7, SKBR-3, BT474, T47D, MDA-MB-361) に添加し増殖阻害効果を見たところ、ER, PR のホルモン受容体や HER-2 に関係なく殺細胞効果を示し、アポトーシスを誘導することが明らかとなった。このためクルクミンはホルモンレセプターや HER-2 の下流のシグナル蛋白の活性化を抑制していることが考えられ、現在その標的蛋白をウエスタンブローディングにより探索中である。

また活性化 Ras および活性化 Src 導入細胞 (HAG/Ras および HAG/Src) におけるクルクミンの殺細胞効果を検討したところ、Ras, Src の活性化はなんらクルクミンの抵抗性を誘導しなかった。このことは、クルクミンはこれらの下流のシグナル経路である Ras-Raf-1-Erk 経路、PI3K-Akt 経路、転写因子 STAT3 などは標的分子ではないことが示唆された。

(5) 乳癌発症の食事性因子の検討—乳癌患者における症例対照研究

本大学と九州がんセンターとの共同で、乳癌発症における肥満因子と食事性因子の探索についての症例対照研究を平成 20 年度から開始しているが、この中で乳癌発症と肥満の関連、また癌発症を抑制あるいは促進する食事性因子を解析した。肥満との関係は発症直後 BMI、既往最大体重を指標にして解析した。食生活との関係は中村式食物摂取頻度調査を用いて調査した。九州がんセンター通院中の乳癌患者 146 名、対象として福岡県内の正常女性 162 名について詳細な食事調査と臨床医学的情報を収集できた。この中で閉経後乳がん患者に限定して解析した結果、乳がん患者において有意に総食事摂取量、エネルギー摂取量ともに多く(ともに $p < 0.001$) 油脂 ($p < 0.001$) および植物性脂質 ($p = 0.018$) の過剰摂取は有意に乳がんリスクを高め、今回の対象者において閉経後乳癌の発症には油脂および植物性脂質の過剰摂取量が関係していることが明らかになった(第 69 回日本癌学会)。今回の研究一施設で行ったため症例が少なく、なかばパイロット研究であったので、現在、九州乳癌研究会参加施設 20 機関の協力を得、2000 例の食事調査を開始している。

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 12 件)

- ① Baba E, Esaki T, Ariyama H, Mitsugi K, Morikita T, Fujishima H, Kusaba H, Nakano S, Akashi K. Phase II Study of Sequential Treatment with S-1 and Cisplatin for Metastatic Gastric Cancer.

- 査読有, *Cancer Chemother Pharmacol.* 2011, in press.
- ② Shibata Y, Baba E, Ariyama H, Arita S, Isobe T, Kusaba H, Mitsugi K, Nakano S, Akashi K. Irinotecan-based Combination Chemotherapy for Metastatic Small Intestinal Adenocarcinoma. 査読有, *Oncology Letters* 1: 423-426, 2010.
- ③ Kusaba H, Esaki T, Futami K, Tanaka S, Fujishima H, Mitsugi K, Sakai K, Ariyama H, Tanaka R, Kinugawa N, Ueki T, Mibu R, Baba E, Nakano S, Akashi K. Phase I/II study of a 3-week cycle of irinotecan and S-1 in patients with advanced colorectal cancer. 査読有, *Cancer Sci.* 101(12):2591-2595, 2010
- ④ Baba E, Fujishima H, Kusaba H, Esaki T, Ariyama H, Kato K, Tanaka R, Mitsugi K, Shibata Y, Harada M, Nakano S. Phase I study of the sequential administration of S-1 and Cisplatin for metastatic gastric cancer. 査読有, *Anticancer Res.* 29(5): 1727-1732, 2009
- ⑤ Makiyama A, Qin B, Uchino K, Shibata Y, Arita S, Isobe T, Hirano G, Kusaba H, Baba E, Akashi K, Nakano S. Synergistic Interaction between Gemcitabine and Oxaliplatin in Human Gallbladder Adenocarcinoma Cell Lines. 査読有, *Anti-Cancer Drugs, Anticancer Drugs.* 20(2):123-130, 2009.
- ⑥ Abe Y, Ito T, Baba E, Nagafuji K, Kawabe K, Choi I, Arita Y, Miyamoto T, Teshima T, Nakano S, Harada M. Nonmyeloablative Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation as Immunotherapy for Pancreatic Cancer. 査読有, *Pancreas* 38(7):815-819, 2009
- ⑦ Shibata Y, Ariyama H, Baba E, Takii Y, Esaki T, Mitsugi K, Tsuchiya T, Kusaba H, Akashi K, Nakano S. Oxaliplatin-induced allergic reaction in patients with colorectal cancer in Japan. 査読有, *Int J Clin Oncol.* 14(5):397-401, 2009
- ⑧ 牧山明資、草場仁志、中野修治。RASのシグナル伝達機構と阻害剤。査読有, *Mebio* Vol.26 No.5, 106-116, 2009
- ⑨ Arita S, Baba E, Shibata Y, Niuro H, Shimoda S, Isobe T, Kusaba H, Nakano S, Harada M. B cell activation regulates exosomal HLA production. 査読有, *Eur J Immunol.* 38(5): 1423-1434, 2008.
- ⑩ Kusaba H, Fujihara M, Nagashima R, Kaji Y, Baba E, Nakano S. Systemic chemotherapy of TS-1 and cisplatin for gastric signet-ring cell carcinoma presenting as cardiac tamponade. 査読有, *Medical Oncology* 25(2):241-244, 2008
- ⑪ Moriyama K, Ando C, Tashiro K, Kuhara S, Okamura S, Nakano S, Takagi Y, Miki T, Nakashima Y and Hirakawa H. Polymerase chain reaction detection of bacterial 16S rRNA gene in human blood. 査読有, *Microbiol Immunol* 52: 373-380, 2008
- ⑫ Nakajo A, Hokita S, Ishigami S, Miyazono F, Etoh T, Hamanoue M, Maenohara S, Iwashita T, Komatsu H, Satoh K, Aridome K, Morita S, Natsugoe S, Takiuchi H, Nakano S, Maehara Y, Sakamoto J, Aikou T; Kyushu Taxol, TS-1, Study Group (KTT-SG). A multicenter phase II study of biweekly paclitaxel and S-1 combination chemotherapy for unresectable or recurrent gastric cancer. 査読有, *Cancer Chemother Pharmacol.* 62:1103-9, 2008
- [学会発表] (計 9 件)
- ① 小野美咲, 脂質代謝異常のない成人における鶏卵摂取後の脂質代謝反応, 第 14 回日本病態栄養学会年次学術集会, 2011 年 1 月 15 日, パシフィコ横浜 (神奈川県)
- ② 上野宏美, グラフ化体重日記を用いた高度肥満症患者の治療, 第 14 回日本病態栄養学会, 2011 年 1 月 15 日, パシフィコ横浜 (神奈川県)
- ③ 宮崎瞳, ポリメトキシフラボンが脂肪細胞の分化成熟に及ぼす影響, 日本農芸化学 2011 年度大会, 2011 年 3 月 8 日, 京都国際会館 (京都)
- ④ 小野美咲, 閉経後女性における乳癌発症に関する食事性因子の検討—食物摂取頻度調査を用いた症例対照研究—, 第 57 回日本栄養改善学会学術総会, 2010 年 9 月 11 日 女子栄養大学 (東京)
- ⑤ 小野美咲, Dietary factors associated with a risk of breast cancer in postmenopausal Japanese woman. A case-control study., 第 69 回日本癌学会, 2010 年 9 月 22 日 大阪国際会議場 (大阪)
- ⑥ 八住香代子, 女子大学生の学年進行に伴う食事摂取状況の変動, 第 57 回日本栄養改善学会学術総会, 2010 年 9 月 11 日,

- 女子栄養大学（東京）
- ⑦ 中園栄里，女子大学生の身体および生活状況の年次変化に関する追跡調査，第 57 回日本栄養改善学会学術総会，2010 年 9 月 11 日，女子栄養大学（東京）
 - ⑧ 小野美咲，女子大学生における精神的健康状態が栄養摂取に及ぼす影響，第 56 回栄養改善学会学術総会，2009 年 9 月 4 日，札幌コンベンションセンター（札幌）
 - ⑨ 小野美咲，Does visceral adiposity hasten the onset of the breast cancer?，第 67 回日本癌学会，2008 年 10 月 29 日，名古屋国際会議場

〔図書〕（計 6 件）

- ① 小野美咲，メディカルレビュー社，NST ガイドブック 2011 改訂第 3 版，がん患者の栄養管理，2011，200-206
- ② 小野美咲，メディカルレビュー社，NST ガイドブック 2011 改訂第 3 版，悪心・嘔吐，2011，211-216
- ③ 小野美咲，メディカルレビュー社，NST ガイドブック 2011 改訂第 3 版，食欲不振，2011，216-221
- ④ 小野美咲，メディカルレビュー社，The Clinical Guide to Oncology Nutrition, Second Edition, 2011, 94-99
- ⑤ 馬場英司、草場仁志、中野修治 文光堂 老年腫瘍学 高齢者の消化器癌 薬物療法（消化器系の化学療法を中心に）2008 pp229-235
- ⑥ 中野修治 医学書院 今日の治療指針 2008 消化管癌の化学療法 2008 pp336-338

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中野 修治 (NAKANO SHUJI)
中村学園大学・栄養科学部・教授
研究者番号：4 0 1 6 4 2 4 8

(2) 研究分担者

宮崎 瞳 (MIYAZAKI HITOMI)
中村学園大学・栄養科学部・助教
研究者番号：6 0 4 1 2 5 5 8
小野 美咲 (ONO MISAKI) (H21-22)
中村学園大学・栄養科学部・助手
研究者番号：1 0 4 4 1 7 2 6

(3) 連携研究者

なし