

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 29 日現在

機関番号：33904

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24501003

研究課題名(和文) エストロゲン代謝に着目した食品因子のホルモン依存性がん予防効果に関する基礎的研究

研究課題名(英文) A basic study on hormone-dependent cancer preventive effects of food factors focuses on estrogen metabolism

研究代表者

竹村 ひとみ (Takemura, Hitomi)

愛知学泉大学・家政学部・講師

研究者番号：60295558

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：内因性女性ホルモンのエストロゲンは、解毒代謝酵素シトクロムP450(CYP)により代謝活性化されカテコールエストロゲンおよびそのキノン体を生じる。これらがDNA付加体を形成し酸化的損傷をもたらすことから、乳がん発生の一因と考えられている。本研究では、ヒト乳がん細胞によるエストロゲンのDNA損傷性ならびにフラボノイド化合物によるDNA損傷抑制効果について検討した。エストロゲンによるDNA損傷に対し、メトキシフラボノイドを複合的に処理することにより、DNA損傷の程度が低下することを確認した。乳がん発生に対し、メトキシフラボノイドが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 principal factor of common to all endocrine-related risk factors is the prolonged exposure to estrogens. In particular, estrogens play a crucial role in the development and evolution of human breast cancer. In the metabolism of estrogens, hydroxylation is mediated by cytochrome P450, such as CYP1A1, 1A2 and 1B1. Quinone intermediates derived by oxidation of 4-hydroxy-estrogens have been reported to react with purine bases of DNA to form depurinating adducts that generate highly mutagenic apurinic sites. Furthermore, the metabolites of hydroxy-estrogens may also generate potentially mutagenic oxygen radicals.

A dietary methoxyflavonoid inhibited DNA damage induced by the carcinogenic endogenous estrogen metabolite, 4-hydroxy-estrogen. In this study, methoxyflavonoid showed inhibitory effects on DNA damage derived from estrogen metabolites. This indicates that such methoxyflavonoids may be a chemopreventive modulator involved in carcinogenesis such as in breast cancer.

研究分野：食品栄養科学

キーワード：ホルモン依存性がん エストロゲン代謝 がん化学予防 フラボノイド DNA損傷 カテコールエストロゲン

1. 研究開始当初の背景

乳がんは女性における罹患率が最も高いがんであり、世界保健機関の報告(2008年)によると、全世界中で女性のがん全体の16%を占め、年間でおよそ52万人が死亡している。日本人女性では、1998年に胃がんを抜き罹患率で第一位、2004年には5万人を超え、16人に一人が罹患するといわれ、年間約1万人が亡くなっている。年齢別罹患率では、30歳以降から急上昇し、45~49歳頃がピークとなっているが、近年は50歳代および60歳代の年齢層の増加傾向が顕著である。世界的には日本の乳がん罹患率・死亡率は低いとされるが、1980年から2000年までの20年間に2倍以上に上昇している(国立がんセンターがん対策情報センター)。

乳がんのリスク要因として、早期の初潮、閉経の遅延、高齢初産、未経産、高身長、肥満など、エストロゲンをはじめとするホルモンの体内レベルに影響を与える要因(エストロゲンへの長期曝露)が挙げられている。食生活では、カロリー過剰摂取やアルコールの摂取、またシフトワークなどの生活習慣によるメラトニン産生の低下が、エストロゲンレベルを上げることから、乳がんのリスクを高めるものと考えられている。女性ホルモン補充療法剤プレマリン(主成分: エキレニン)は、体内でエストロゲンとして働き、更年期症候群を軽減し、骨粗鬆症や心疾患の予防に効果が期待される一方で、乳がん・子宮がんのリスク因子であると考えられている。

エストロゲン(17 β -エストラジオール: E₂)は、シトクロム P450(CYP)により、主にカテコールエストロゲンの2-OHE₂および4-OHE₂に代謝される。乳腺、卵巣、子宮などのエストロゲン標的臓器ではCYP1B1の発現が高いため、主に4-OHE₂に代謝される。CYP1B1により生成した4-OHE₂はさらに酸化され、より反応性の高いエストロゲン-3,4-キノン(E2-3,4-Q)となり、その際生じる活性酸素種(ROS)により、DNAの一本鎖切断および酸化損傷である8-oxo-dGが生じる。また、このキノン体はDNAと付加体を形成するが、非常に不安定なため、直ちに脱プリン反応を起こす。その結果、DNA上に脱プリン部位(AP sites)が形成されるとともに、プリン塩基付加体である4-OHE₂-1-N3Adeと4-OHE₂-1-N7Guaが生じる。通常AP sitesは、塩基除去修復(BER)により修復されるが、エラーが生じやすく、E2-3,4-Qを処理したラット乳腺では、A.TからG.Cへの変異が誘発されることが報告されており、DNA損傷に基づく突然変異ががん発生に繋がる可能性が考えられている。ヒト乳がん組織中では正常乳腺組織に比べCYP1B1レベルが高く、4-OHE₂およびE2-キノン抱合体の含量が3倍程度高いこと、ヒト乳がん組織におけるN3Ade付加体含量は、正常乳腺組織の30倍にも及ぶことが報告されている。さらに近年、遺伝子多型解析から、エストロゲンの解毒代謝に重要な酵素

CYP1B1、COMT、MnSODなどに乳がんが高リスクな遺伝子型が存在することが明らかとなってきた。

我々は、平成17-18年度科学研究費補助金による「新たな作用メカニズムに基づく食品成分中のホルモン依存性癌予防因子に関する研究」の中で、数種のメトキシフラボノイドにCYP1B1選択的な阻害活性を認めた。中でもルイボスティやエゴマの実に含有するクリソエリオールは、IC₅₀が19.7 nMと非常に高く、一方で4-OHE₂を解毒代謝(メチル化)するcatechol-O-methyl transferase (COMT)の阻害活性は認められなかった。さらに、50 nMクリソエリオールは、乳がん細胞中のCYP1B1を特異的に阻害し、4-OHE₂の生成を有意に抑えた(Takemura et al. 2010)。日本人成人女性のフラボノイドの一日摂取量は2~42 mgであり、そのうちケルセチンがおよそ56%を占めるとの報告がある。また玉葱(ケルセチン含量として68 mg)摂取後のヒトの血中ケルセチン濃度は、0.7時間後の224 ng/mLをピークとし、24時間後に30 ng/mL(およそ90 nM)程度血中に存在したのと報告から、in vitro試験および細胞試験で効果の得られた濃度は、ヒトの血中にも存在しうる濃度であり、日常的な(メトキシ)フラボノイドの摂取により、エストロゲンあるいはホルモン剤によるホルモン依存性がんのリスクを低減する可能性があるかと推測した。

従来日本では、乳がんなどのホルモン依存性がんが少ないとされ、欧米諸国と比較し大豆製品等に含有するイソフラボン類の摂取量が多いこととの関連性が指摘されてきた。ライフスタイル、食生活の変化、更年期症候群や閉経後骨粗鬆症におけるホルモン療法は、ホルモン依存性がんのリスクを上げる要因と考えられ、高齢社会において、その人口はさらに増加するものと予想される。

2. 研究の目的

本研究では、数種のメトキシフラボノイドのCYP1B1特異的阻害作用および既知のラジカル捕捉作用に基づき、ホルモン依存性の細胞における4-OHE₂由来のDNA損傷に対して、メトキシフラボノイドの抑制効果が期待されるのではないかとこの視点から、以下の項目について明らかにし、乳がん発生の抑制因子としての有効性について検証した。

ヒト乳がん細胞におけるE₂、4-OHE₂曝露による脱プリン部位(AP sites)の生成、単細胞ゲル電気泳動(Comet assay)を用いたDNA鎖切断により、ヒト乳がん細胞によるエストロゲンのDNA損傷性並びにメトキシフラボノイドの影響について検討した。

3. 研究の方法

(1) AP sites の検出

ヒト乳がん細胞 MCF-7 に 2-OHE₂ あるいは 4-OHE₂ を 30 μM 添加し、一定時間インキュベートした後、細胞を回収した。なお、1 時間前に Catechol-*O*-methyltransferase (COMT) 阻害剤 (Ro 41-0960) を 3 μM 前処理した。回収した細胞から DNA を抽出し、DNA 塩基損傷部位検出キット (Dojindo Mol. Tec. Inc.) を用いて脱プリン部位 (AP site) 生成量を測定した。

(2) Comet assay による DNA 損傷性

ヒト乳がん細胞 MCF-7 に E₂ を添加して一定時間インキュベートした後、細胞を回収した。一方、メトキシフラボノイドにて 15 分前処理を行った後、同様の処理を行い細胞を回収した。回収した細胞をスライドガラスの上でアガロースの薄層に封入し、溶解液に 60 分間、次いでアルカリ性溶液に 20 分間浸漬し DNA の一本鎖化処理を行った後、アルカリ性条件下 (pH > 13) で電気泳動 (25V, 300mA 30 分間) し、中和・脱水・染色を行った。蛍光顕微鏡にて細胞を観察し、画像解析ソフト (Comet Analyzer) により核外への DNA 断片の流出割合を指標に DNA 損傷の程度を評価した。

4. 研究成果

(1) AP sites の検出

E₂ 処理、2-OHE₂ 処理では COMT 阻害剤添加の有無にかかわらず AP sites の生成は見られなかった。一方、4-OHE₂ 処理では COMT 阻害剤存在下、非存在下共に AP sites の生成が見られた。阻害剤存在下では 1 時間後、非存在下では 4 時間後に AP sites 生成量は有意に増加し、その後経時的に減少した。エストロゲン代謝物のうち 4-OHE₂ は、解毒代謝に重要な COMT の阻害により、DNA 付加体形成に伴う DNA 損傷をより高めることが示唆された。

(2) Comet assay による DNA 損傷

E₂ 単独処理および 4-OHE₂ 単独処理では、無処理と比較し DNA 損傷 (Tail Distance, Tail Moment) の増加を認めた。一方、メトキシフラボノイドのクリソエリオール単独処理では、DNA 損傷の増加は認められなかったが、クリソエリオールおよび E₂ の複合処理により、DNA 損傷の減少が認められた。エストロゲンによる DNA 損傷に対し、クリソエリオールが抑制効果を有することが示唆された。

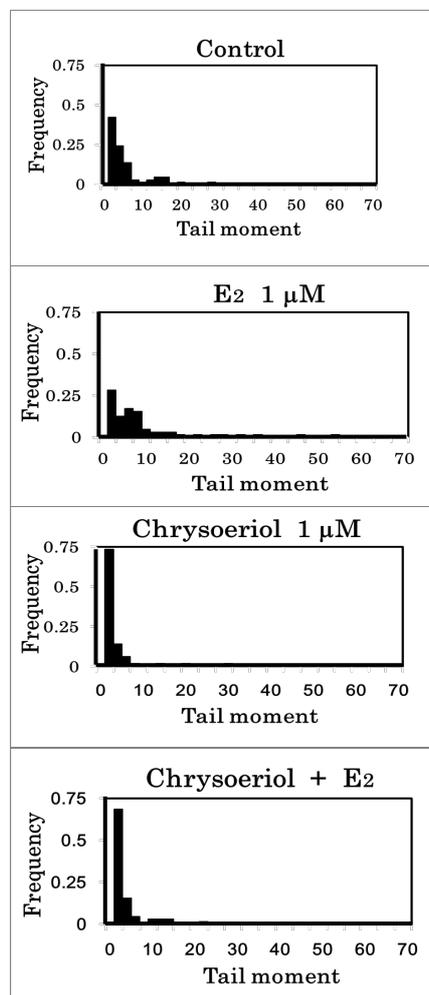


図 1. E₂ による DNA 損傷とクリソエリオールによる抑制効果

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 3 件)

Yamazaki S, Sakakibara H, Takemura H, Shimoi K. 4-Hydroxyestradiol induces γ -H2AX in the presence of an inhibitor of catechol-*O*-methyltransferase in human breast cancer MCF-7 cells. *Genes and Environment*. 34, 129-135 (2012) 査読有
DOI:10.3123/jemsge.34.129
Takemura H, Sakakibara H, Yamazaki S, Shimoi K. Breast cancer and flavonoids—a role in prevention. *Current Pharmaceutical Design*. 19, 6125-6132 (2013) 査読有
ODI:10.2174/1381612811319340006
Yamazaki S, Sakakibara H, Takemura H, Yasuda M, Shimoi K.

Quercetin-3-O-glucuronide inhibits noradrenaline binding to α 2-adrenergic receptor, thus suppressing DNA damage induced by treatment with 4-hydroxyestradiol and noradrenaline in MCF-10A cells. J Steroid Biochem Mol Biol. 143, 122-129 (2014)
DOI: 10.1016/j.jsbmb.2014.02.014.

〔学会発表〕(計 3 件)

山崎隼輔、榊原啓之、竹村ひとみ、下位香代子. 正常乳腺細胞 MCF-10A においてノルアドレナリンは受容体を介して DNA 損傷を増加させる. 日本環境変異原学会第 41 回大会(静岡)2012 年 11 月 29 日~30 日

Shimoi K, Takemura H, Yamazaki S, Sakakibara H, Yasuda M.

Chemopreventive effects of flavonoids on the breast cancer development.

Antioxidants and Redox Process in Health. (招待講演) São Paulo, Brazil.

2013 年 10 月 21 日~22 日

下位香代子、竹村ひとみ、山崎隼輔、保田倫子. フラボノイド類の乳がん予防における役割. 第 8 回日本ポリフェノール学会学術大会(東京)2014 年 8 月 8 日

〔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)

愛知学泉大学・家政学部・講師

研究者番号: 60295558

(2)研究分担者

下位 香代子 (SHIMOI, Kayoko)

静岡県立大学・大学院生活健康科学研究科・教授

研究者番号: 10162728

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし