

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 26 日現在

機関番号：23803

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25882027

研究課題名(和文)夜型生活に伴う乳がんリスク上昇を予防する食品因子に関する研究

研究課題名(英文)Studies on food factors inhibiting breast cancer induced by nocturnal light exposure

研究代表者

保田 倫子(Yasuda, Michiko)

静岡県立大学・食品栄養科学部・助教

研究者番号：00707036

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,900,000円

研究成果の概要(和文)：PAI-1は乳がんの成長や転移に促進的に作用することが明らかとなっており、夜間の光曝露はPAI-1遺伝子発現を増加させる(Aoshima et al., 2014)。これらに着目し、「夜型生活 時計遺伝子の調節変化 PAI-1量増加 乳がんリスクの上昇」という仮説を立て、これを食品の摂取により予防することを最終目的とした。本研究では、その第一歩として夜間の光曝露がPAI-1に及ぼす影響について検討した。マウスに暗期に光(250ルクス)を曝露させたところ、血中PAI-1量は、対照群に対して、光曝露2時間群で有意に上昇し、心臓および肝臓における時計遺伝子の発現についても変化がみられた。

研究成果の概要(英文)：Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1), a major component of the fibrinolytic system. Recently, Tang et al. reported that PAI-1 played roles on promoting breast cancer(Tang et al., 2013). Meanwhile, exposure to the nocturnal light disrupts many biological systems, and Aoshima et al. showed that the nocturnal light exposure (1 hour) induced PAI-1 gene expression in mice(Aoshima et al., 2014). Then, it is hypothesized that the nocturnal light exposure promotes breast cancer progression by induction of PAI-1, and that this system might be possibly prevented by administration of functional food factor. Thus, in this study, the effects of nocturnal light exposure on PAI-1 were examined. At the dark period, C3H/He mice were exposed to light (250 lux). In plasma of mice exposed to light, PAI-1 secretion was induced. And nocturnal light exposure altered hepatic expression of clock genes.

研究分野：食品機能

キーワード：夜型生活 光環境ストレス PAI-1 時計遺伝子 体内時計

1. 研究開始当初の背景

近年、ライフスタイルの変化により、女性が夜遅くに働くケースが増えている。たとえば、幼い子供の就寝後に仕事を行うケースや学生の生活の夜型化などであり、実際に、日本では NHK 国際生活時間調査(日本放送協会)によっても 1960 年代から睡眠開始時間の深夜化の推移が報告されている。また、看護師、介護士、工場勤務などのシフトワーカーについても挙げられる。一方、生活の夜型化、生活ストレス、時差ぼけなどにより体内時計の攪乱が起こり様々な悪影響を及ぼすことが明らかになりつつある。よって、上に述べたようなケースでは、生体への悪影響が危惧されており、実際にシフトワーカーの心筋梗塞や乳がんなどの疾病リスクが上昇する例が多数報告されている (Wu *et al.*, *Cancer Res.*, 2011, 71(7), 2622-31)。よって、これらのメカニズムの解明と予防・解決は、現代社会において解決すべき課題であると言える。

PAI-1 は、プラスミノーゲンアクチペターを抑制することで血栓形成を促すポリペプチドであり、血管系の疾患以外の関与の他にも、近年、乳がんの成長や転移に促進的に作用することが明らかとなっている (Tang *et al.*, *Biomed. Pharmacother.*, 2013)。一方、夜間の光照射による体内時計の攪乱により PAI-1 の遺伝子発現が増加する (Aoshima *et al.*, *Exp. Anim.* 2014, 63(3), 331-8)。よって、これらの知見に着目し、「夜型生活 時計遺伝子の調節変化 PAI-1 量増加 乳がんリスクの上昇」という仮説を立てるに至った。

2. 研究の目的

乳がんに対して抑制効果を示す食品因子は多数発見されているが、本研究で注目している経路をターゲットとしている食品因子の報告例はない。そこで、上記の乳がんリスクの上昇メカニズムを検討し、それを抑制する食品因子を探索することを最終目的とし、本研究ではまず、その第一歩として暗期に光曝露ストレスを与えることが PAI-1 産生に及ぼす影響について検討した(と)。

また、がんを含む様々な疾病に深く関与する炎症反応に注目し、炎症剤を投与した場合の PAI-1 産生への影響についても調べた。()

3. 研究の方法

まず、暗期の光曝露によりストレス応答が見られるかどうかを確認した。通常の飼育同様 12 h/12 h (明/暗) の光照射条件下で雌性マウスを馴化後、通常飼育条件下で飼育したマウスと、24 h/0 h (明/暗) 条件下で 2 日間、つまり、48 時間連続で光照射条件下で飼育したマウスとで、血中コルチコステロン量を比

較した。(明期の光条件: 250 ルクス)

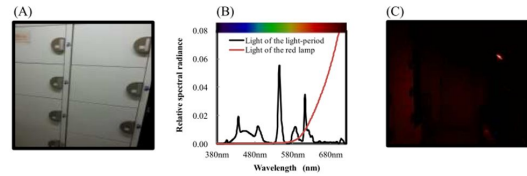


図 1 : 本研究の光環境条件
(A) Individual animal breeding system; (B) Spectral radiance distribution of the light source, a cold cathode fluorescent lamp in individual animal breeding system and red lamp. Black line and red line represent light of the light-period and light of the red lamp, respectively. Their intensity were set at 250 lux during the light-period and set at 2 lux when mice were given feeds and changed breedings.; (C) in the dark-period when red lamp was used at 2 lux. Mice can't recognize its wavelength.

12 時間ごとの明暗サイクル (ZT0-12: 明期、ZT12-24: 暗期、ZT は光などの環境因子で規定された日内リズムでの時刻を指し本研究では照明が点灯する時刻を ZT0 としている) で雄性 C3H/He マウス 4 週齢を 4 週間馴化後、ZT14 に光 (250 ルクス) を曝露させ 2 時間後に再び暗期に戻した。

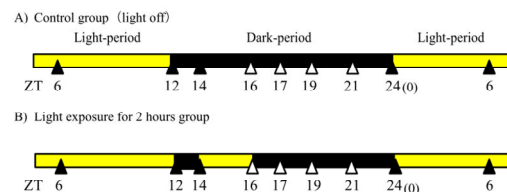


図 2 : の実験スケジュール
After 4 weeks of acclimatization, one group (A) was not exposed to light and another group (B) was exposed to 250 lux of light for 2 hours from ZT14 to 16. Blood and livers, heart samples were collected at ZT16 (just after the light exposure), 17, 19, 21, respectively. Δ; dissection time

乳がんをはじめとして様々ながんに対してがんに関与する炎症反応について注目し、炎症剤であるリポ多糖 LPS による PAI-1 の産生応答に対して光照射が与える影響について検討した。12 h/12 h (明/暗) の光照射条件下で馴化後、group A: 通常飼育条件、group B: 馴化後に 24 h/0 h (明/暗) の光照射条件下で 1 日間(24 時間連続光照射)、group C: 馴化後に 24 h/0 h (明/暗) の光照射条件下で 2 日間(48 時間連続光照射)飼育したマウスとで、LPS を腹腔内に投与した 3 時間後の血中 PAI-1 量を比較した。

4. 研究成果

48 時間光照射条件下で飼育したマウスについては、通常の飼育条件下で飼育したマウスに比べてコルチコステロン量が有意に低下することが示された。一般に、環境ストレスをマウスに供すると血中コルチコステロン量は増加する。よって、今回の結果では、予想に反して 48 時間光照射条件でコルチコステロン量は低下したが、ストレスホルモンの量を攪乱させるような刺激として 48 時間光少照射が作用している、ということは考えられる。

血中 PAI-1 量は、ZT21 での対照群に対して、ZT21 での光曝露 2 時間群で有意に上昇した。血中コルチコステロン量は、光曝露による有意な変化が見られなかった。肝臓において *Pai-1* 遺伝子は、ZT16 と ZT17 での対照群の発現に対して、ZT16 と ZT17 での光曝露 2 時間群の発現が高発現となった。心臓においては、*Pai-1* 遺伝子は、ZT16 と ZT21 での対照群の発現に対して、ZT16 と ZT21 での光曝露 2 時間群の発現が上昇した。*tPA* は、ZT16 での対照群の発現に対して、ZT16 での光曝露 2 時間群の発現で 0.62 倍有意な減少が確認された。肝臓における時計遺伝子の発現についても検討し、*Bmal1*、*Clock*、*Per2*、*Cry2* について変化がみられた。

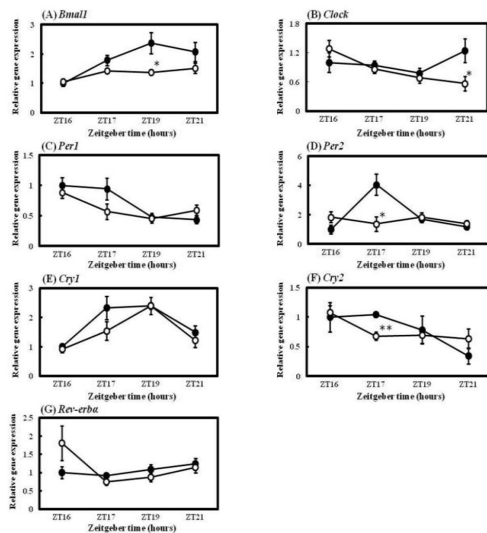


図 3 : マウス肝臓における時計遺伝子の発現変化

Normal type light (250 lux) was exposed to mice for 2 hours from ZT14 to 16. Gene expression levels were analyzed at ZT16, 17, 19, 21. Following genes were investigated, *Bmal1*(A), *Clock*(B), *Per1*(C), *Per2*(D), *Cry1*(E), *Cry2*(F), *Rev-erba*(G). Values were normalized using β -actin mRNA levels and represented mean \pm S.E.M (n= 4-6). Control gene expression levels in the

liver at ZT16 were defined as 1. Closed circles and opened circles represent control groups without light exposure and exposed group, respectively. *P<0.05, **<0.01 vs Control (Welch's t-test).

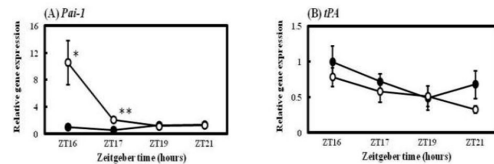


図 4 : マウス肝臓における *Pai-1* および *tPA* 遺伝子の発現変化

Normal type light (250 lux) was exposed to mice for 2 hours from ZT14 to 16. Gene expression levels were analyzed at ZT16, 17, 19, 21. Following genes were investigated, *Pai-1*(A), *tPA*(B). Values were normalized using β -actin mRNA levels and represented mean \pm S.E.M (n= 5-6). Control gene expression levels in the liver at ZT16 were defined as 1. Closed circles and opened circles represent control groups without light exposure and exposed group, respectively. *P<0.05, **<0.01 vs Control (Welch's t-test).

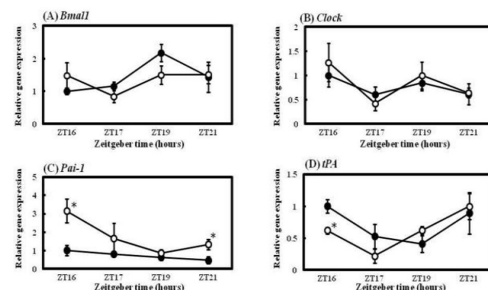


図 5 : マウス心臓における時計遺伝子および *Pai-1* および *tPA* 遺伝子の発現変化

Normal type light (250 lux) was exposed to mice for 2 hours from ZT14 to 16. Gene expression levels were analyzed at ZT16, 17, 19, 21. Following genes were investigated, *Bmal1*(A), *Clock*(B), *Pai-1*(C), *tPA*(D). Values were normalized using β -actin mRNA levels and represented mean \pm S.E.M (n= 5-6). Control gene expression levels in the liver at ZT16 were defined as 1. Closed circles and opened circles represent control groups without light exposure and exposed group, respectively. *P<0.05, **<0.01 vs Control (Welch's t-test).

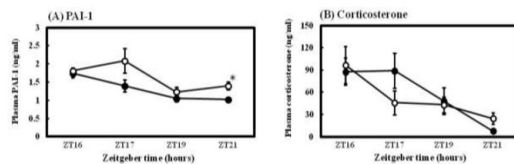


図6：マウス血中の PAI-1 およびコルチコステロン量

Normal type light (250 lux) was exposed to mice from ZT14 to ZT16. Plasma PAI-1 (A) and corticosterone (B) levels were analyzed at ZT16, 17, 19, 21. Values represented mean±S.E.M (n= 5-6). Closed circles and opened circles represent control groups without light exposure and exposed group, respectively. *P<0.05 vs Control (Welch's t-test).

いずれの飼育条件においても LPS 投与により、顕著に血中 PAI-1 量は増加したが、LPS 投与群間で、PAI-1 量の差は見られなかった。一方、LPS 非投与群間では group A に比べて group B および group C において PAI-1 量が増加する傾向がみられたが、有意な差は見られなかった。

よって、暗期の一時的な光曝露により、PAI-1 分泌量および時計遺伝子の発現変化がみられ、これにより、体内リズムの攪乱により PAI-1 の産生量が増加する可能性が示唆された。さらに光曝露が体内時計と PAI-1 におよぼす効果を調べ、夜間の光曝露の乳がんリスクに対する影響の有無について検討していく予定である。

5．主な発表論文等

〔その他〕

渡辺悠人、保田倫子、下位香代子：暗期における光曝露の時間的变化が生体に与える影響、富士山麓アカデミック&サイエンスフェア 2014 (富士)、C-06、2014 年 11 月 28 日

6．研究組織

(1)研究代表者

保田 倫子 (YASUDA MICHIKO)
 静岡県立大学・食品栄養科学部・助教
 研究者番号：00707036