

平成 22 年 4 月 12 日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19390161
 研究課題名（和文）
 発がんにおける肥満と食餌性因子の多段階がん機構への関与の解明とリスク評価
 研究課題名（英文）
 Roles of obesity and dietary factors on multistage carcinogenesis and risk assessment
 研究代表者
 村田 真理子 （MURATA MARIKO）
 三重大学・大学院医学系研究科・教授
 研究者番号：10171141

研究成果の概要（和文）：

全がんの 35% が食餌性因子および肥満によると推定されている。肥満とがんの関連性がコホート研究により報告されている。我々は多段階発がんにおける肥満と食餌性因子の役割の解明とリスク評価を目的として遺伝子損傷性および細胞増殖能について、クロロゲン酸、2-ニトロトルエン、フタル酸エステルおよび高血糖と酸化ストレス状態について検討した。その結果、これらの因子はある種の条件下で DNA 損傷性および遺伝子発現作用を有することが明らかになり、食餌性因子および肥満によるがんの予防には更なる研究が必要であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Estimates suggest that 35% of all human cancers have a linkage to dietary and obesity. Several reports showed the evidences of an association between obesity and cancer derives from cohort studies. To clarify the roles of obesity and dietary factors on multistage carcinogenesis and risk assessment, we examined DNA damage and ability for cell proliferation for chlorogenic acid, 2-nitrotoluene, phthalate and status of high glucose and oxidative stress. These factors could cause DNA damage and gene expression under several conditions, and therefore further studies are needed to prevent cancers due to dietary factors and obesity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	5,500,000	1,650,000	7,150,000
2008 年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
2009 年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
年度			
年度			
総計	14,800,000	4,440,000	19,240,000

研究分野：環境衛生学

科研費の分科・細目：社会医学・衛生学

キーワード：食餌性因子、肥満、発がん、DNA 損傷、細胞増殖作用、遺伝子発現

1. 研究開始当初の背景

「飽食の時代」と呼ばれるようになって久しく、24 時間いつでも飲食店がオープンしており冷蔵庫には食べ物が溢れている現状がある。また、肥満や過体重とがんのリスクの上昇に有意な関連性が認められている。がんの原因として、食餌性因子は約 35% を占めているといわれており、最も重要な因子である。主要栄養素についても炭水化物の過剰摂取、アミノ酸のインバランス、過酸化脂質など発がんに関与するという疫学調査が報告されている。また、食品添加物、残留農薬のみならず、食品には多くの化学物質が含まれ、また、微量元素による発がんへの影響も懸念されている。日本および世界の動向を鑑み、肥満による発がんの機構を解明することは、がん予防対策上、緊急課題である。

2. 研究の目的

食餌性因子と肥満関連生理活性物質がヒト遺伝子損傷と細胞増殖活性により相乗的に発がんリスクを高めることは容易に推測できる。がん予防の観点からこれらの因子についてヒト遺伝子損傷と細胞増殖活性のポテンシャルを解析し、総合的な発がんリスク評価を行うことが重要である。本研究は、肥満と食餌性因子による遺伝子損傷および細胞増殖活性を検討することにより、食餌性因子と肥満の発がん機構を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

細胞内 DNA 損傷性の解析

ヒト培養細胞を用い、処理細胞から DNA を抽出した後、酵素的にヌクレオシドに分解し、電気化学検出器付 HPLC (HPLC-ECD) で酸化的 DNA 損傷の指標である 8-オキシデオキシグアノシン (8-oxodG) を定量する。

遺伝子損傷解析と活性種の同定

ヒトがん関連遺伝子 (*c-Ha-ras*, *p53* および *p16*) の DNA 断片の 5' 末端を ^{32}P でラベルし、金属イオンや NADH など生体内物質存在下で食餌性因子と反応させ、多重連続塩基損傷について検討する。Maxam-Gilbert 法を応用して得られたオートラジオグラムをレーザーデンシトメーターにてホットスポット部位の DNA 損傷を解析する。

細胞増殖活性の検出

ヒト培養細胞に肥満関連生理活性物質あるいは食餌性因子を添加し、細胞増殖作用を細胞増殖定量システムにより測定する。

4. 研究成果

(1) クロロゲン酸

食餌性因子の 1 つであるクロロゲン酸はコーヒー、プルーン、サツマイモなどに含まれるポリフェノール化合物であり、抗酸化作用を有し健康増進作用に期待が持たれている。実際に高濃度のクロロゲン酸を含んだ健康飲料なども商品化されている。しかし、クロロゲン酸の代謝物であるカフェ酸は IARC で Group 2B (possibly carcinogenic) と評価されており、動物実験により発がん性の報告がある。本研究では、クロロゲン酸の安全性を評価するため、クロロゲン酸の DNA 損傷機構を検討した。 ^{32}P でラベルしたがん関連遺伝子を用いて DNA 損傷性を解析した。クロロゲン酸は Cu(II) の存在下で DNA を酸化的に損傷し、NADH の添加により損傷は著しくなり、Mn(II) を加えることにより、DNA 損傷はさらに増強した。また、クロロゲン酸による DNA 損傷はカタラーゼ、メチオナル、バソキュプロイン (Cu(I)キレート剤) によって抑制された。クロロゲン酸あるいはカフェ酸による DNA 損傷は同様の塩基特異性が認められ、

T の損傷が強く見られた。カフェ酸はクロロゲン酸に比べ DNA 損傷性が強かった。電気化学検出器付き HPLC で 8-oxodG の生成量を測定したところ、クロロゲン酸は HL-60 細胞において Mn(II) の添加により 8-oxodG 量を有意に増加させ、HP100 細胞では増加が認められなかったため、 H_2O_2 の関与が示唆された。クロロゲン酸は自動酸化の過程で H_2O_2 を生成し、Mn(II) 存在下で酸化が促進される。さらに NADH の存在下でレドックスサイクルが形成され、DNA 損傷が増強したと推定される。クロロゲン酸自体が DNA 損傷性を有し、代謝されてカフェ酸となることでさらに DNA 損傷性が増すと考えられ、発がん性を含めた安全性のさらなる検討が必要である。

(2) 2-Nitrotoluene (2-NO₂-T) は農薬、ゴム薬品および染料の合成に重要な商業用化学物質である。環境調査により河川および大気に 2-NO₂-T が存在することが示されている。National Toxicology Program により雌雄のラットにおいて 2-NO₂-T が明らかな発がん性を有することが示された。また雌雄のラットにおいて乳腺腺腫が認められている。発がん機構の解明のために 2-NO₂-T およびその代謝物 2-nitrosotoluene (2-NO-T) による遺伝子損傷性を細胞および単離 DNA を用いて検討した。P³² 標識単離 DNA 断片を用いた実験では、2-NO-T は Cu(II) および生体内還元物質 NADH 存在下で DNA を損傷したが、2-NO₂-T は損傷しなかった。2-NO-T による DNA 損傷はカタラーゼおよび Cu(I) キレート剤であるバソキュープロインにより抑制されたことから、過酸化水素と Cu(I) の関与が示唆された。ヒト培養細胞 HL-60 細胞を 2-NO-T で処理した結果、酸化的 DNA 損傷の指標である 8-oxodG の生成が有意に上昇した。リアルタイム RT-PCR を用いた解析により、2-NO-T 処理において

8-oxodG 修復酵素 OGG1 の遺伝子発現が 8-oxodG 生成と正相関することが確認された。エストロゲン感受性 MCF-7 乳癌細胞を用いた E-screen assay により、2-NO₂-T は細胞増殖作用を示し、2-NO-T は逆に増殖を抑制した。表面プラズモン共鳴法を用いたエストロゲン受容体 (ER) とエストロゲン反応領域 (ERE) との反応性の検討においても 2-NO₂-T はエストロゲン作用を、2-NO-T は抗エストロゲン作用を示した。2-NO-T による酸化的 DNA 損傷および 2-NO₂-T と 2-NO-T とによる内分泌攪乱作用が女性生殖器発がんに関与する可能性が示唆された。

(3) フタル酸類はポリ塩化ビニルプラスチック中の可塑剤として使用され、内分泌攪乱作用が懸念されている。di (2-ethylhexyl) フタル酸塩 (DEHP) は最も高い生産量があり、げっ歯類の発がん物質として知られる。我々はこの毒性のメカニズムを明確にするため、DEHP による DNA 損傷および遺伝子発現についてヒト培養細胞を用いて検討した。HPLC-ECD 分析では、HL-60 細胞を DEHP で 24 時間処理した結果 8-oxodG 生成が有意に上昇した。また、エストロゲン感受性 MCF-7 細胞を用いた E-screen assay により DEHP はエストロゲン活性を示した。定量的リアルタイム RT-PCR を用いた解析では、DEHP 24 時間処理において PPAR γ 発現の有意な上昇を示した。PPAR γ は脂肪蓄積作用を持ち、肥満を介して女性ホルモンに影響する可能性がある。したがって、DEHP による 8-oxodG 生成が発がんのイニシエーションおよび PPAR γ 発現増強とエストロゲン活性を介した肥満・女性ホルモン作用は発がんのプロモーションとして作用し、発がん、特に女性生殖器系がん、に寄与する可能性が示された。

(4) 糖尿病と発癌との関連を背景として、グルコースと過酸化水素の酸化ストレス関連の遺伝子発現への影響について検討した。ヒト前骨髄球性白血病由来 HL-60 細胞およびその過酸化水素耐性株を用いてグルコースおよび過酸化水素を反応させ、DNA 損傷および遺伝子発現を解析した。その結果、過酸化水素を介した酸化的 DNA 損傷と CYP1A1 の発現上昇が認められた。糖尿病の病態である高血糖は活性酸素の生成や酸化ストレスに関与して、さまざまな経路で DNA damage を引き起す。また CYP1A1 などの代謝酵素は、種々の発がん物質を代謝活性化し、DNA 損傷、ひいては発がんのリスクを高める可能性が示された。

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 30 件)

1. Watanabe C., Egami T., Midorikawa K., Hiraku Y., Oikawa S., Kawanishi S., Murata M., DNA damage and estrogenic activity induced by the environmental pollutant 2-nitrotoluene and its metabolite. *Environ. Health Prev. Med.* (in press)(2010) 査読有
2. Huang Y-J., Zhang B-B., Ma N., Murata M., Tang A-Z., Huang G-W., Nitrate and oxidative DNA damage as potential survival biomarkers for nasopharyngeal carcinoma. *Med Oncol.* (in press) (2010) 査読有
3. Hiraku Y., Kawanishi S., Ichinose, T., Murata M., The role of iNOS-mediated DNA damage in infection- and asbestos-induced carcinogenesis, *Ann. NY Acad. Sci.* (in press) (2010) 査読有
4. Minata M, Harada KH, Kärrman A, Hitomi T, Hirosawa M, Murata M., Gonzalez FJ, Koizumi A. Role of Peroxisome Proliferator-activated Receptor-alpha in Hepatobiliary Injury Induced by Ammonium Perfluorooctanoate in Mouse Liver. *Ind Health.* 48(1):96-107. (2010) 査読有
5. Oikawa S., Yamada T, Minohata T, Kobayashi H, Furukawa A, Tada-Oikawa S, Hiraku Y., Murata M., Kikuchi M, Yamashima T. Proteomic identification of carbonylated proteins in the monkey hippocampus after ischemia-reperfusion. *Free Radic Biol Med.*46:1472-1477. (2009) 査読有
6. Kobayashi H, Fukuhara K, Tada-Oikawa S, Yada Y, Hiraku Y., Murata M., Oikawa S. The mechanisms of oxidative DNA damage and apoptosis induced by norsalsolinol, an endogenous tetrahydroisoquinoline derivative associated with Parkinson's disease. *J Neurochem.* 108(2):397-407. (2009) 査読有
7. Ma N, Kawanishi M, Hiraku Y., Murata M., Huang GW, Huang Y, Luo DZ, Mo WG, Fukui Y, Kawanishi S. Reactive nitrogen species-dependent DNA damage in EBV-associated nasopharyngeal carcinoma: the relation to STAT3 activation and EGFR expression. *Int J Cancer.* 122(11):2517-25. (2008) 査読有
8. Thanan R., Murata M., Pinlaor S, Sithithaworn P, Khuntikeo N, Tangkanakul W, Hiraku Y., Oikawa S., Yongvanit P, Kawanishi S. Urinary 8-oxo-7, 8-dihydro-2'-deoxyguanosine in patients with parasite infection and the effect of anti-parasitic drug in relation to cholangiocarcinogenesis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*

- 17(3):518-24. (2008) 査読有
9. Tada-Oikawa S, Kato T, Kuribayashi K, Nishino K, Murata M, Kawanishi S. Critical role of hydrogen peroxide in the differential susceptibility of Th1 and Th2 cells to tributyltin-induced apoptosis. *Biochem Pharmacol.* 75(2):552-61. (2008) 査読有
 10. Hoki Y, Murata M, Hiraku Y, Ma N, Matsumine A, Uchida A, Kawanishi S. 8-Nitroguanine as a potential biomarker for progression of malignant fibrous histiocytoma, a model of inflammation-related cancer. *Oncol Rep.* 8(5):1165-9. (2007) 査読有
 11. Hiraku Y, Tabata T, Ma N, Murata M, Ding X, Kawanishi S. Nitrate and oxidative DNA damage in cervical intraepithelial neoplasia associated with human papilloma virus infection. *Cancer Sci.* 98(7):964-72. (2007) 査読有

[学会発表] (計 69 件)

1. 平工雄介、松永雄太、堀部善照、馬寧、村田真理子、Cellular nitrate DNA damage induced by carbon black (カーボンブラックによる細胞内ニトロ化 DNA 損傷), 日本環境変異原学会第 38 回大会、静岡市、2009 年 11 月 26~27 日
2. 渡邊千草、糸魚川英之、翠川薫、平工雄介、及川伸二、村田真理子、可塑剤フタル酸エステル DEHP による DNA 損傷および遺伝子発現, 日本環境変異原学会第 38 回大会、静岡市、2009 年 11 月 26~27 日
3. Yusuke Hiraku, Shosuke Kawanishi, Takamichi Ichinose, Mariko Murata, The role of iNOS-mediated DNA damage in inflammation-related carcinogenesis, 4th

- International Conference on Oxidative/Nitrosative Stress and Disease, New York, USA, 2009 年 10 月 28~30 日
4. Mizutani H, Hiraku Y, Tada-Oikawa S, Oikawa S, Ikemura K, Murata M, Kawanishi S, Mechanism of Oxidative DNA Damage and Apoptosis Induced by Doxorubicin through Generation of Reactive Oxygen Species., EHRlich II, 2nd World Conference on Magic Bullets, Oct 3-5, 2008, Nurnberg, Germany
 5. Mariko Murata, Yusuke Hiraku, Shinji Oikawa, Ning Ma and Shosuke Kawanishi, Nitrate and oxidative DNA damage via chronic inflammation by liver fluke infection; in relation to cholangiocarcinoma development. Fifth International Conference Biology, The 5th International Conference on the Biology, Chemistry and Therapeutic Applications of Nitric Oxide, Bregenz, Austria, August 24-28, 2008
 6. Yusuke Hiraku, Mariko Murata, Ning Ma, Shosuke Kawanishi, Formation of 8-nitroguanine, a nitrate DNA lesion, in patients infected with oncogenic viruses, HPV and EBV, The 5th International Conference on the Biology, Chemistry and Therapeutic Applications of Nitric Oxide, Bregenz, Austria, August 24-28, 2008
 7. 渡邊千草、江上剛史、翠川薫、平工雄介、及川伸二、川西正祐、村田真理子、2-nitrotoluene と代謝物による遺伝子損傷性とエストロゲン活性の検討、第 79 回日本衛生学会総会、2009 年 3 月 29 日-4 月 1 日、東京
 8. 及川(多田)佐枝子、加藤琢磨、栗林景容、村田真理子、川西正祐、トリブチル

- スズの Th2 優位性誘導を介したアレルギー性疾患増悪作用,第 79 回日本衛生学会総会、2009 年 3 月 29 日-4 月 1 日、東京
9. 平工雄介、後藤啓元、幸野真樹、村田真理子、川西正祐, Metal-mediated DNA damage induced by methylene blue in relation to the carcinogenicity (メチレンブルーによる金属依存性 DNA 損傷: 発がん性との関連), 日本環境変異原学会第 37 回大会、宜野湾市、2008 年 12 月 4-6 日
 10. 渡邊千草、江上剛史、翠川薫、平工雄介、及川伸二、川西正祐、村田真理子、環境汚染物質 2-nitrotoluene による発がん機構の検討、第 37 回日本環境変異原学会、2008 年 12 月 4-6 日、沖縄
 11. 小端久美、及川伸二、小林果、古川絢子、及川(多田)佐枝子、吉原新一、村田真理子、平工雄介、川西正祐, ビスフェノール A による発がん機構の解明、第 37 回日本環境変異原学会、2008 年 12 月 4-6 日、沖縄
 12. Mariko Murata, Yusuke Hiraku, Shinji Oikawa, Kiyoshi Fukuhara, and Shosuke Kawanishi, Oxidative DNA damage induced by a metabolite of tamoxifen, an anti-breast cancer drug; in relation to carcinogenicity. 第 67 回日本癌学会総会、2008 年 10 月 28-30 日、名古屋。
 13. 翠川薫、村田真理子、翠川裕、中村哲、Bouavanh Southivong, 東南アジアにおける生活習慣病の現状について、第 78 回日本衛生学会総会、2008 年 3 月 28-31 日、熊本市
 14. Kimiko Ito , Mariko Murata, Dietary supplementation with coenzyme Q 10 decreases urinary level of

8-hydroxydeoxyguanosine in healthy subjects, Asian Conference on Environmental Mutagens & 36th Annual Meeting of The Japanese Environmental Mutagen Society, 2007 年 11 月 29-30 日、北九州市

15. Mariko Murata, Yusuke Hiraku, Shinji Oikawa and Shosuke Kawanishi, Manganese enhances oxidative damage to cellular and isolated DNA induced by a coffee polyphenol, chlorogenic acid, European Meeting 2007 of the Society for Free Radical Research, 2007 年 10 月 10-13 日, Portugal.

[図書] (計 2 件)

1. 村田哲也、村田真理子、第 1 章 がんの生物学、腫瘍薬学 (川西正祐、他 編)、南山堂、1-14 (2010)
2. 谷口アキ、村田真理子、第 5 章 子どもの病気とその予防、子どもの保健-理論と実践-、日本小児医事出版社、第 6 版、139-208 (2010)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村田真理子 (MURATA MARIKO)
三重大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 10171141

(2) 研究分担者

及川伸二 (OIKAWA SHINJI)
三重大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号: 10277006

平工雄介 (HIRAKU YUSUKE)
三重大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号: 30324510