

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：12301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2014

課題番号：24890034

研究課題名(和文)微量元素セレンの放射線照射に対する二重効果：正常細胞保護作用と放射線治療補助効果

研究課題名(英文) Dual effect of selenium against x-ray irradiation: protective effects on normal cells and adjuvant effects on cancer cells.

研究代表者

山崎 千穂 (YAMAZAKI, CHIHO)

群馬大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：20506422

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：微量元素セレンは抗酸化作用だけでなく抗腫瘍作用も認められている。本研究では、正常細胞およびがん細胞に放射線照射を行い、セレン補充がそれぞれの細胞種に異なる効果を示すかを検討した。ヒト食道細胞では、50nM亜セレン酸ナトリウム添加により、X線2Gy照射72時間後における正常細胞の保護作用、およびがん細胞の細胞死誘導が観察された。また、マウスへの経口投与実験ではセレンの化学形により代謝や毒性が異なることが示された。これらのことは、セレン補充は放射線治療において補助的に利用できる可能性があるが、それぞれのセレン化学形の効果と安全性を検討する必要があることを示唆するものである。

研究成果の概要(英文)：Selenium has been reported its anti-oxidative effects as well as anticancer effects. We investigated the effects of selenium supplementation on x-ray irradiated carcinogenic and non-carcinogenic cells. Sodium selenite (50 nM) supplementation protected non-carcinogenic human esophageal cells against 2Gy X-ray irradiation, while induced cell death to carcinogenic cells. Oral administration of different chemical forms of selenium to mice for 8 weeks showed metabolism and toxicity differ between selenium compounds. These suggest that selenium supplementation may be useful as adjuvant to enhance efficacy of radiation therapy, but effects and safety of each selenium compound must be evaluated first.

研究分野：微量元素

キーワード：セレン 放射線治療

1. 研究開始当初の背景

わが国の平成 22 年の死亡者数は約 120 万人であるが、その死因の第 1 位ががんである。年次移行をみてもがんによる死亡率は一貫して上昇を続け、昭和 56 年以降死因順位の第 1 位となっている。現在がん治療では手術、抗がん剤治療、放射線治療が三大治療として確立されているが、中でも放射線治療は臓器や組織が温存でき、身体への負担が少ない、抗がん剤のように全身に毒性が及ばない、治療機器と照射技術の向上により限られた範囲の照射ができる、などメリットが多く、患者の QOL を下げない治療法として期待されるようになってきている。しかし、放射線宿酔(悪心、嘔吐、食欲不振、全身倦怠、頭痛、寒気など)、皮膚炎、造血機能の低下、味覚異常、急性胃炎、下痢などの副作用が大きな問題となっている。こうした副作用の原因となるのが活性酸素種である。活性酸素はがん細胞だけでなく、正常細胞の DNA にも損傷を与え、また炎症性サイトカインを誘導して局所的な炎症反応を惹起する。

放射線治療では副作用を軽減することが大きな課題となっている。毒性が低く、効果的な放射線保護剤の開発が求められており、これまでにチオール化合物、ニトロキシド、superoxide dismutase (SOD)、ビタミン、免疫修飾作用物質について検討されてきたが、現在においても効果的な放射線保護剤の報告はない。

セレンは抗酸化作用を有する必須微量元素である。セレンは有機物 (eg. セレノシステイン、セレノメチオニン) および無機物 (eg. 亜セレン酸、セレン酸) の形で存在するが、生体内では主にセレノシステイン(21 番目のアミノ酸)としてタンパク質に取り込まれ、グルタチオンペルオキシダーゼ(GPx)やチオレドキシシン還元酵素(TrxR)といった生体防御に深く関与する酵素の活性中心を担っている。身体が酸化ストレスに侵されたとき、例えば外科的手術後に GPx が誘導合成され活性値が上昇することが示されている¹⁾。

また、セレンには抗酸化作用だけでなく、抗腫瘍作用も認められている。我々はセレンの抗がん作用はカスパーゼカスケードの活性化(アポトーシス誘導)および Atk/mTOR 経路のダウンレギュレーション(細胞生存抑制)によるものであることを報告している²⁾。

以上のことを考え併せ、放射線治療前にセレン補充をしておくことで 2 重効果が期待できるのではないかと考えるに至った。つまり、正常細胞はセレンの抗酸化作用により保護される。一方、がん細胞では放射線照射による細胞死とセレンによるアポトーシス誘導の相乗効果により高い治療効果が期待できると考えた。

1) IR Defi, C Yamazaki et al. Biol Trace Elem Res 144(1-3):388-395, 2011

2) R. Abdulah et al. BMC Cancer 9:414, 2009.

2. 研究の目的

本研究では、正常細胞およびがん細胞に放射線照射を行い、セレン補充の効果を検討する。また、生体レベルでも酸化ストレスがセレン補充により、どの程度軽減されるのかを検討する。

3. 研究の方法

(1) 培養細胞における放射線照射に対するセレン補充の効果の検討

培養細胞をセレン添加/無添加下で培養し、放射線照射を行い、細胞生存率、細胞周期などの解析を行った。細胞は、放射線治療で影響を受けやすい食道細胞と、セレンによる抗腫瘍作用が報告されている前立腺細胞について検討した。

(2) in vivo におけるセレン投与による抗酸化力への効果および効果的なセレン化学形の検討

マウス(BALB/c)にセレン溶液(1 μ g/g body weight)もしくは蒸留水(コントロール)を 8 週間、毎日経口投与した。体重、血清および肝臓セレン濃度、血清 GPx 活性、dROM テストと BAP テストによる総合的な血中酸化ストレス度と抗酸化力を経時的に測定した。セレンは化学形によって作用や毒性が異なる。本研究では、セレンサプリメントとして用いられている亜セレン酸ナトリウム(SS)およびマウスにおいて抗腫瘍作用が報告されているセレノメチルセレノシステイン(MSeC)について検討した。

(3) in vivo イメージングシステムによる酸化ストレスの測定

酸化ストレス可視化マウス(OKD-Luc)に放射線照射し、in vivo イメージングシステムを用いて経時的に酸化ストレスシグナルを測定した。

4. 研究成果

(1) 培養細胞における放射線照射に対するセレン補充の効果の検討

ヒト正常食道細胞(CHEK-1)を SS 添加下で培養したところ、濃度依存的な GPx 活性の増加が見られ、50nM で飽和した。そこで、50nM SS 添加下培養後に 2Gy の放射線照射を行ったところ、照射 72 時間後でコントロール群(0nM)に比べ細胞生存率が高く、FACS による解析では、アポトーシスの減少が見られた。一方、ヒト食道がん細胞(TE-1)では、50nM SS 添加群は 2Gy 照射 72 時間後において、コントロール群に比べ、細胞生存率が低かった。これは、50nM SS 添加は、2Gy の照射に対して正常細胞を保護し、がん細胞の細胞死を誘導することを示唆する。それぞれの細胞種において照射により誘導される pathway の検討は今後の課題である。

前立腺がん細胞(DU-145)に対して、SS、

セレノメチオニン(SeMet)、メチルセレニク酸(MSeA)の3種類のセレンの IC50(50% 阻害濃度)を MTT アッセイにより解析したところ、MSeA が最も低く(3 μ M)、次に SS(4 μ M)で、SeMet は最も高かった(58 μ M)。MSeA は毒性が強いことに加え、治療濃度域がとても狭く、治療の利用には不適當であると思われる。

実験に用いる線量を検討するため、X 線 0-12Gy を単回照射し、コロニー法によって細胞生存率を算出した。細胞の生存が 10%となる線量(D10)を求めたところ、7Gy であった。次に SS 添加下(0, 0.5, 1, 2.5 μ M)で 72 時間培養したのち、再播種し、6-8 時間後に 6Gy を照射し、コロニーアッセイによって生存率を算出した。SS 前処理により放射線に対する感受性が増加することを期待したが、0.5, 1 μ M では効果は見られなかった。また、2.5 μ M では非照射群でも細胞生存率は 3%ほどで、これは 2.5 μ M SS 添加下での細胞生存率(播種 6-8h 後に SS 添加し、コロニーアッセイ)の 80%と比較して極端に低い。一連の操作により生存率が減少している可能性が高く、現在検証中である。

(2) in vivo におけるセレン投与による抗酸化力への効果および効果的なセレン化学形の検討

血清セレン濃度および血清 GPx 活性は、SS 群、MSeC 群ともにコントロール群と比較し有意に増加したが、d-ROM テストと BAP テストでは有意な差は見られなかった。体重増加は投与開始後 5 週目頃から SS 群で有意な抑制が認められた。これはセレンの毒性影響による食欲不振によるものではないかと考えられる。また、MSeC 群では他群に比べ肝臓セレン濃度が高かったが、血清 GPx 活性は SS 群の方が高値で MSeC 群はコントロール群と変わらなかったことから、SS の方が GPx など他のセレンタンパク質に代謝されやすく、MSeC は肝臓に蓄積しやすいことが示された。日常的なサプリメントの摂取も含め、生体におけるセレンの効果を検討する際には、濃度だけでなく、どのセレン化学形を用いるか、安全性の検討が必要である。

(3) in vivo イメージングシステムによる酸化ストレスの測定

OKD-Luc マウスに対し、8Gy の全身照射を行い、6、24、72 時間後に in vivo イメージングシステム(IVIS)により酸化ストレスの検出を試みた。雄ではどの時点でもほとんどシグナルは検出できなかった。一方、雌では、経時的な酸化ストレスシグナルの増加が見られ、リアルタイム PCR によるストレスマーカー(HO-1)の発現と一致していた。しかし、全体的にシグナル強度が弱く、解析に用いるのは難しいと思われた。OKD-Luc は黒毛であるため、シグナルが吸収されてしまうことが原因だと考えられる。当初、同一マウスで経時的に(日オーダーで)酸化ストレスを測定

することを考えていたが、何度も剃毛をするのは現実的ではなく、この方法を用いての解析には、OKD-Luc マウスをバッククロスさせて白毛にするなど、さらなる工夫・検討が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1. IM Puspitasari, R Abdulah, C Yamazaki, S Kameo, T Nakano, H Koyama. Updates on clinical studies of selenium supplementation in radiotherapy. *Radiat Oncol.* 9:125. (2014) 査読有

〔学会発表〕(計 6 件)

1. 山崎千穂、イルマ・メルヤニ・プスピタサリ、小山洋. 異なるセレン化合物補充による抗酸化力と安全性の検討. 第15回日本抗加齢医学会総会. 2015.5.29-31. 福岡国際会議場
2. Puspitasari Irma M., Yamazaki Chiho, Abdulah Rizky, Putri Mirasari, Kameo Satomi, Nakano Takashi, Koyama Hiroshi. Protection of Sodium Selenite Supplementation on Normal Human Esophageal Cells (CHEK-1) in Radiotherapy. 第61回北関東医学会総会. 2014.9.25-26. 群馬大学医学部刀城会館
3. Irma M. Puspitasari, Chiho Yamazaki, Mirasari Putri, Rizky Abdulah, Satomi Kameo, Hiroshi Koyama. The protective effect of sodium selenite supplementation on normal human esophageal cells during radiation treatment. 第25回日本微量元素学会学術集会. 2014.7.3-4. 岡山大学津島キャンパス創立五十周年記念館
4. Irma M. Puspitasari, Rizky Abdulah, Chiho Yamazaki, Satomi Kameo, Takashi Nakano, Hiroshi Koyama. The effects of low dose sodium selenite supplementation to normal human esophageal cell line (CHEK-1 cells) against radiation treatment. The 10th International Society for Trace Element Research in Humans (ISTERH). 2013.11.18-22. Tokyo.
5. Irma M. Puspitasari, Rizky Abdulah, Chiho Yamazaki, Satomi Kameo, Takashi Nakano, Hiroshi Koyama. Selenium supplementation protects normal human esophageal cells against X-ray irradiation. The 10th International Symposium on Selenium in Biology and Medicine 2013. 2013.9.14-18. Berlin.
6. Irma M. Puspitasari, Chiho Yamazaki, Satomi Kameo, Hiroshi Koyama. Selenium Supplementation in Patients Undergoing Radiotherapy: A Review. 第59回北関東医学会総会. 2012.9.27-28. 群馬大学医学部刀城会館

6 . 研究組織

(1)研究代表者

山崎 千穂 (YAMAZAKI, Chiho)
群馬大学・医学系研究科・助教
研究者番号：20506422