

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月7日現在

機関番号：34509

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21780136

研究課題名（和文） 共役 EPA と放射線の併用効果の検討

研究課題名（英文） Study on enhancement of human cancer cell radiosensitivity by conjugated eicosapentaenoic acid

研究代表者

米澤（熊本） 裕子（YONEZAWA (KUMAMOTO) YUKO)

神戸学院大学・栄養学部・研究員

研究者番号：80388777

研究成果の概要（和文）：魚油の主成分であるエイコサペンタエン酸（EPA）の二重結合を共役化した cEPA は、DNA 合成酵素の阻害活性に基づいた抗がん活性を示した。ヒト大腸がん細胞において、放射線照射後に cEPA を添加すると細胞増殖抑制やアポトーシスの相乗効果を示した。また、cEPA は既存の抗がん剤ゲムシタビンの細胞増殖抑制活性を向上させた。cEPA をはじめとする食品成分や栄養素は、がんの放射線療法と化学療法に対して併用効果をもたらす可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：We found that conjugated eicosapentaenoic acid (cEPA), which is a major fish oil, had anti-cancer activity based on DNA polymerase inhibition. In human colon cancer cells, the post-irradiation addition of cEPA significantly enhanced cancer cell radiosensitivity and apoptosis. cEPA also enhanced the suppression of human colon cancer cell growth by gemcitabine, which is a major clinical anti-cancer drug. cEPA could be a anti-cancer enhancer for radiotherapy and chemotherapy.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：食品機能

科研費の分科・細目：農学・食品科学

キーワード：共役エイコサペンタエン酸（cEPA）、放射線、がん治療、併用効果、DNA 合成酵素、酵素阻害剤、がん細胞

1. 研究開始当初の背景

近年の健康ブームにより、国民が食品に対し本来の栄養源（基本特性）や嗜好品（補完特性）としての価値だけでなく、医薬品に代わる『機能性食品』（Evidence Based Functional Foods）としての新たな可能性を求めている。食品成分や栄養素の健康機能性に新知見を見出すために、DNA を合成する酵

素である DNA ポリメラーゼ（pol）阻害活性を調査している。pol 活性を阻害する食品成分・栄養素には、『抗がん作用』が期待できる。そして、これまでに魚油に含まれる高度不飽和脂肪酸であるエイコサペンタエン酸（EPA）が pol を阻害して、ヒトがん細胞の増殖を抑制することを見出した。さらに、EPA をアルカリ異性化合成した共役 EPA（cEPA）

の方が EPA よりも強い活性を有することを見出した。また、cEPA はヌードマウスを用いた担がんヌードマウスにおける抗腫瘍活性を示し、ヒト由来の正常細胞の増殖には影響しなかったことから、副作用がない抗がん作用が期待される。

日本人の死因の第1位は「がん(癌)」であり、その中でも大腸がん患者は年々増加傾向にあり、2015年にはがん患者の中で1位になると予測されていて、その死亡率も高い。現在主流のがん治療は、外科療法、化学療法、放射線療法の3つであるが、大腸がんの治療には化学療法と放射線療法の併用が非常に有効であり、手術に匹敵する成績が得られるようになった。しかし放射線または化学療法単独よりも副作用が大きく、この治療法で再発した場合、手術で治療することはかなり困難となっている。

2. 研究の目的

食品成分である cEPA に注目して、ヒト由来大腸がん細胞株における放射線照射および既存の抗がん剤による増殖抑制活性に対する cEPA の影響を調査する。もしも併用効果が見られれば、その作用機序(メカニズム)の解明を目指す。cEPA の添加パターンや放射線照射のタイミングを変えることによって、投与量、照射量を減らすことが可能であるかを検討する。

将来的には、がんの放射線療法や化学療法へ cEPA のような抗がん機能性を有する食品成分・栄養素を併用することによって、がん患者の QOL 改善やストレス軽減を目指したい。

3. 研究の方法

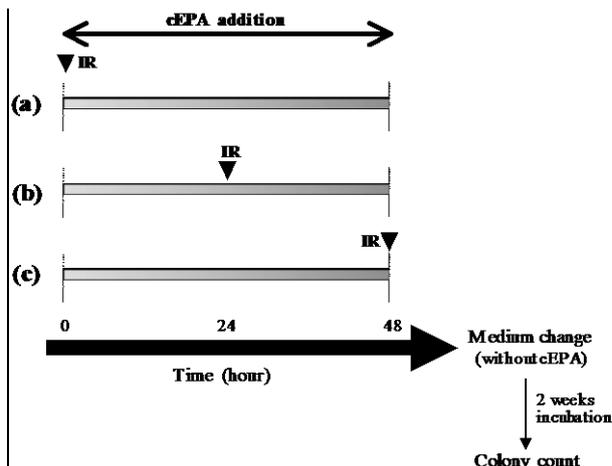
(1) cEPA の調整

cEPA は、EPA の試薬を購入してアルカリ異性化法により共役型を化学合成してから、シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製した。そして、500mg 以上の cEPA を準備できた。

(2) ヒト大腸がん細胞増殖における cEPA と放射線の影響調査

①コロニー形成試験(コロニーアッセイ)

ヒト由来の大腸がん細胞(HCT116 cells)を用いた cEPA と放射線照射(IR)の併用のタイミングについて、(a) cEPA 添加→IR、(b) cEPA 添加と IR を同時に施行、(c) IR→cEPA 添加、これら3つの条件で最も細胞増殖抑制を示すものをコロニーアッセイにより比較検討した【図1】。IRについては、神戸大学医学部放射線科で所有する放射線照射装置を使用した(神戸大院・医・佐々木良平准教授と共同研究を実施)。



【図1】コロニーアッセイにおける cEPA 添加と IR のタイミング

②アポトーシス誘導試験

図1に示した併用条件で培養した各細胞の Annexin V 染色性をフローサイトメーターで測定した。さらに、DNA ラダーの検出、カスパーゼ活性測定を実施することで、アポトーシス誘導性を比較した。

③DNA 損傷試験

コメットアッセイにより細胞単位の DNA 損傷度を検出することで、DNA 修復の初期障害、修復動態、残存障害について検討した。

④マイクロアレイ(遺伝子発現)解析

図1に示した併用条件で培養した細胞を回収して、常法により全 mRNA を抽出・精製してからマイクロアレイを行った。cEPA および IR の無処理細胞を対照として、3,000 種類以上の遺伝子発現レベルを網羅的に解析した。

(3) 抗がん活性における cEPA と抗がん剤ゲムシタピン(GEM)の影響調査

核酸(ヌクレオシド)類似体である GEM は、抗がん剤として臨床現場で使用されている。GEM のがん化学療法に対する cEPA の併用効果を検討するため、次の2つを実施した。具体的には、cEPA 単独、GEM 単独、cEPA と GEM の同時添加による活性の影響を調査した。

①哺乳類 pol 阻害活性

pol 活性測定は、鋳型 DNA として子牛胸腺 DNA を DNase I で部分消化した活性化 DNA (Activated DNA)、ヌクレオチドは ^3H -dTTP を含む dNTPs を基質として用いて、pol 反応によって鋳型 DNA に取り込まれたトリチウム(^3H)の放射活性を測定した。

②ヒト大腸がん細胞増殖抑制活性

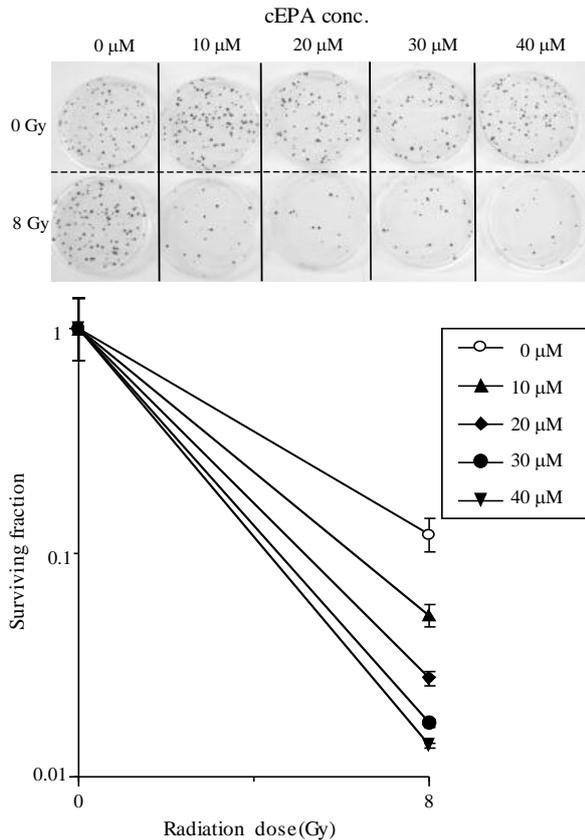
ヒト由来の大腸がん細胞(HCT116 cells)を用いて48時間培養後の生細胞の割合を MTT 法で測定した。

4. 研究成果

(1) ヒト大腸がん細胞増殖における cEPA と放射線の併用効果

①コロニー形成試験 (コロニーアッセイ)

ヒト大腸がん細胞 (HCT116 cells) を図 1 に示した (a)~(c) の実験群で $30\mu\text{M}$ の cEPA 添加と 8Gy の IR を 48 時間併用処理してから、平板培地にて 2 週間静置培養した後にコロニーアッセイを行った。その結果、(a) は EPA 単独、IR 単独よりも強いコロニー形成阻害を示し、それは相加効果ではなく相乗効果であった。この併用効果は添加する cEPA の濃度に依存していた【図 2】。一方、(b) と (c) は IR 単独処理と同程度の強さでコロニー形成を阻害したことから、cEPA 添加の効果が見られなかった。これらの結果から、(a) の併用条件、すなわち IR 処理後に cEPA 添加する順番が重要であることが示唆された。通常の放射線治療において抗がん剤を併用する時には、抗がん剤投与後に放射線照射をするのが一般的であるが、この常識を覆す結果となったことは非常に興味深い。

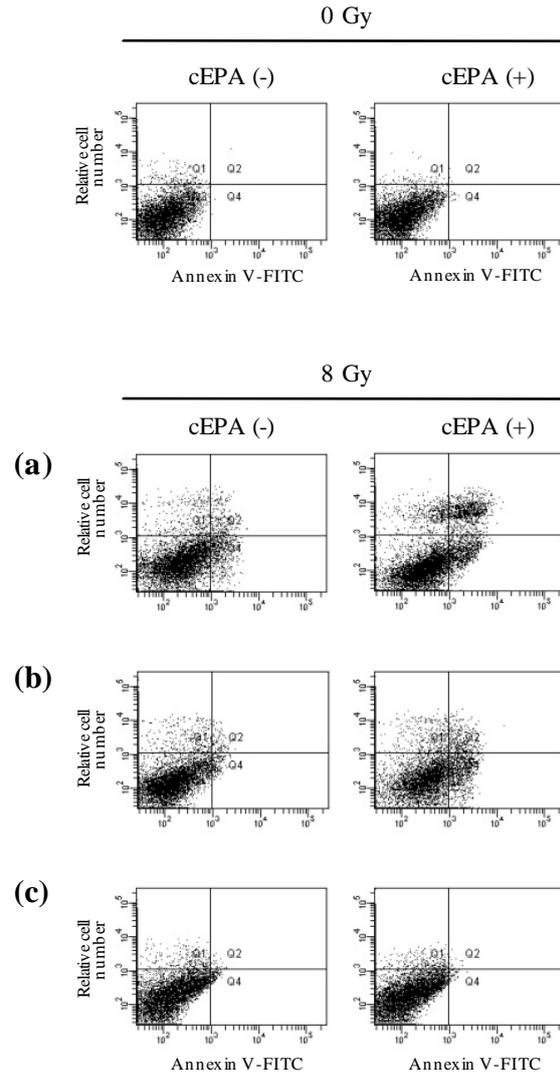


【図 2】cEPA 添加と放射線照射によるヒト大腸がん細胞増殖抑制活性の併用効果 (併用条件は図 1 の (a))

②アポトーシス誘導試験

ヒト大腸がん細胞 (HCT116 cells) を図 1 の (a)~(c) で示した併用条件 (cEPA は $30\mu\text{M}$ 、IR は 8Gy) で 48 時間培養した後、各実験群

の細胞を回収して Annexin V で染色させてからフローサイトメーター解析を行った【図 3】。その結果、(a) の条件では cEPA の添加により右上のアポトーシス領域の細胞が見られたが、(b) と (c) の条件下では cEPA の添加によってアポトーシス細胞は生じなかった。さらに、(a) ではアポトーシス形成の条件である DNA ラダーの検出、細胞核の断片化、カスパーゼ活性の上昇が見られたが、(b) と (c) の条件では見られなかった (データ示さず)。以上の結果は、図 2 のコロニー形成阻害の結果を反映していると言える。

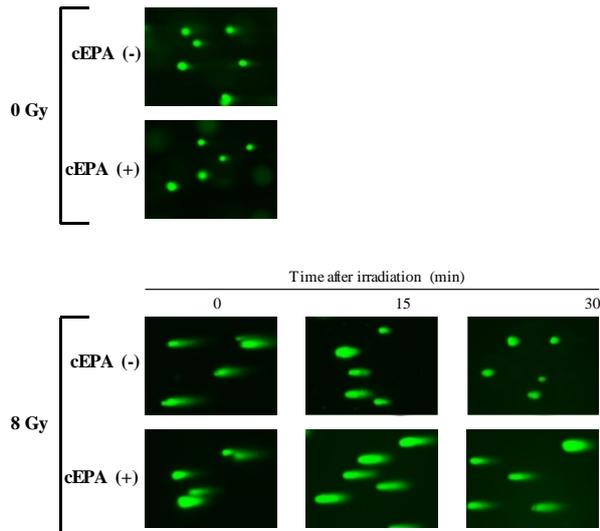


【図 3】cEPA 添加と放射線照射によるヒト大腸がん細胞のアポトーシス誘導 (併用条件は図 1 を参照)

③DNA 損傷試験

ヒト大腸がん細胞 (HCT116 cells) へ $30\mu\text{M}$ の cEPA を添加してから IR 処理後の細胞を回収して、コメットアッセイを行った【図 4】。IR 無処理においては、cEPA 添加の有無に関わらず細胞核のテール (尾) が見られなかったことから、cEPA は DNA 損傷に影響せず、

DNAには結合しないことが示唆された。一方、8GyのIRによって細胞核のテーリングが見られたことからDNA損傷が起こること、さらに30分後にはテーリングが無くなったことから、細胞内でDNA修復が速やかに行われていることが分かった。しかし、cEPAが存在するとIR処理30分後においてもテーリングが存在していたことから、DNA修復能が阻害されることが示唆された。cEPAはDNA修復型pol分子種の活性を阻害するためDNA損傷に対する修復能を失ったと考えられる。このことががん細胞増殖におけるcEPAと放射線の併用効果に繋がると予想される。



【図4】cEPA添加と放射線照射によるヒト大腸がん細胞のDNA損傷と修復能

④マクロアレイ（遺伝子発現）解析

<A>cEPA添加のみ、IRのみ、および<C>図1(a)に示した併用条件で48時間培養したヒト大腸がん細胞（HCT116 cells）を回収してからマイクロアレイを実施した。cEPAおよびIRの無処理細胞を対照として解析した結果、<A>はpolなど一部のDNA代謝系酵素（pol α 、pol δ 、pol ϵ など）や炎症メディエーター（IL系、INF- α 、 β 、 γ 、NFG系、TNF- α など）、コレステロール代謝系酵素の遺伝子発現量が増大、はアポトーシス誘導因子などの遺伝子発現量が増大、<C>は<A>との遺伝子発現量がともに増大していることが分かった。特に、<C>においては、<A>、の単独での遺伝子発現量よりも顕著に増大したことから、<A>との併用は相加効果ではなく相乗効果を発揮することが示唆された。

(2)抗がん活性におけるcEPAと抗がん剤ゲムシタピン（GEM）の影響調査

抗がん剤であるGEMを購入して、GEMの一リン酸化体（GEM-MP）、二リン酸化体（GEM-DP）、三リン酸化体（GEM-TP）を順次化学合成に成

功した。

①哺乳類 pol 阻害活性

GEMとそのリン酸化体3物質の哺乳類 pol分子種に対する阻害活性を調査した結果、10 μ MのGEMはpolを阻害しなかったが、リン酸化体は阻害を示した。特にGEM-TPが最も強くpolを阻害し、GEM-TP>GEM-DP>GEM-MP>GEMの順番であった。

GEM-TPは、哺乳類 polを阻害することが分かったので、cEPAとのpol阻害活性の併用効果を調べた。[1] 酵素(pol)とGEM-TP/cEPAを混合 → 基質を添加、および[2] 基質とGEM-TP/cEPAを混合 → 酵素(pol)を添加、と添加する順番を比較した結果、[2]の方が[1]よりも強いpol阻害活性を示した。さらに、[2]の条件下において、GEM-TP単独、cEPA単独よりも両者を混合するとpol阻害活性の併用効果が見られ、それは相加効果ではなく相乗効果を示した。

polの基質は、鋳型DNAとヌクレオチドの2種類を必要とする。鋳型DNAとして活性化DNA（DNase IでDNAを消化させることでギャップを形成させたDNA）とヌクレオチドとしてdNTPsを使用して、Lineweaver-Burkの両逆数プロットから阻害様式を解析した。その結果、GEM-TPの子牛pol α 阻害様式は、鋳型DNAに対して「拮抗阻害」、ヌクレオチドに対して「拮抗阻害」であった。また、cEPAの子牛pol α 阻害様式は、鋳型DNAに対して「非拮抗阻害」、ヌクレオチドに対して「非拮抗阻害」であった。これら2物質は、鋳型DNAに対する阻害様式が異なっていることから、作用機序が違うことが示唆され、それによってpol阻害の相乗効果が発揮されると考えられる。

②ヒト大腸がん細胞増殖抑制活性

cEPAとGEMは、ヒト大腸がん細胞（HCT116 cells）の増殖を抑制し、その50%阻害濃度（LD₅₀値）は、それぞれ30 μ M、80nMであった。

cEPAとGEMを併用することによる増殖抑制の相乗効果の有無を検討した。GEMはLD₅₀値の1/2の濃度（40nM）で試験した。その結果、cEPAとGEMの同時添加とGEM→cEPA添加の場合は併用効果が見られず、cEPA単独と同じ強さの細胞増殖抑制であった。一方、cEPA→GEM添加の場合は、cEPA単独およびGEM単独を添加して得られた細胞増殖抑制活性値を足した数値よりも強い活性があったことから、相乗効果を示したと言える。

cEPA単独、GEM単独、cEPA→GEM添加のいずれにおいても増殖抑制された細胞は、アポトーシスを起こした。アポトーシス頻度は、cEPA単独、GEM単独よりもcEPA→GEM添加の方が高かったことから、アポトーシス誘導においても相乗効果が見られた。

(3)まとめ

食品成分である cEPA は、pol 阻害活性に基づいた抗がん作用があり、放射線療法に対して併用効果（相乗効果）があることを見出した。そして、そのメカニズムについてマクロアレイなど基礎研究レベルで解明できた。

がんの放射線治療は、有効な治療法の一つであるが、単独治療では十分な治療成績が得られておらず、臨床の現場では新たな併用療法が模索されている。また、がんの化学療法に関しては、有効な抗がん剤の開発が待たれている。特に、進行期の膵臓がんに対しては GEM が抗がん剤として導入されているが、治療率の向上には至っていない。その為、がんの放射線治療へ cEPA をはじめとする抗がん機能性を有する食品成分や栄養素を活用することにより、①放射線増感による治療率の向上（放射線療法との併用）、②既存の抗がん剤の使用低減（化学療法との併用）、が期待できる。将来的には、cEPA をがん治療のための健康補助食品（サプリメントなど）としての用途開発を目指したい。

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 6 件）

- ① Y. Kumamoto-Yonezawa, R. Sasaki, Y. Suzuki, Y. Matsui, T. Hada, K. Uryu, K. Sugimura, H. Yoshida, Y. Mizushina 「Enhancement of human cancer cell radiosensitivity by conjugated eicosapentaenoic acid - a mammalian DNA polymerase inhibitor」 *Int. J. Oncol.* vol. 36, no. 3, p. 577-584, 2010.
DOI:10.3892/ijo_00000532
- ② Y. Kumamoto-Yonezawa, R. Sasaki, Y. Ota, Y. Suzuki, S. Fukushima, T. Hada, K. Uryu, K. Sugimura, H. Yoshida, Y. Mizushina 「Cell cycle arrest triggered by conjugated eicosapentaenoic acid occurs through several mechanisms including G1 checkpoint activation by induced RPA and ATR expression」 *Biochim. Biophys. Acta* vol. 1790, no. 5, p. 339-346, 2009.
DOI:10.1016/j.bbagen.2009.02.004

〔学会発表〕（計 4 件）

- ① 米澤（熊本）裕子、佐々木良平、鈴木陽子、松井由樹、瓜生圭介、羽田尚彦、杉村和郎、水品善之、吉田弘美「cEPA の細胞増殖抑制活性の放射線併用による効果」第 32 回日本分子生物学会年会（横浜）2009 年 12 月 9 日～12 日

- ② 松井由樹、佐々木良平、鈴木陽子、米澤（熊本）裕子、羽田圭一郎、前田尚輝、水品善之、吉田弘美「ホウレンソウ由来糖脂質 MGDG（mono-galactosyl diacyl-glycerol）と放射線照射の併用による大腸癌細胞に対する増殖抑制活性」日本農芸化学会 西日本・中四国・関西支部合同大会（第 461 回講演会）2009 年 10 月 30 日～31 日
- ③ 松井由樹、佐々木良平、鈴木陽子、米澤（熊本）裕子、羽田圭一郎、前田尚輝、水品善之、吉田弘美「ホウレンソウ糖脂質成分の癌細胞増殖抑制活性における放射線照射による併用効果の検討」第 63 回日本栄養・食糧学会大会（長崎）2009 年 5 月 20 日～22 日

〔図書〕（計 3 件）

- ① Y. Mizushina, Y. Kumamoto-Yonezawa, H. Yoshida 「Enhancement of human cancer cell radiosensitivity by conjugated eicosapentaenoic acid, an inhibitor of DNA polymerase and topoisomerase」 Nova Science Publishers, pp1-54, 2011. ISBN: 978-1-61942-089-2
https://www.novapublishers.com/catalog/product_info.php?products_id=31185

〔産業財産権〕

- 出願状況（計 0 件）
- 取得状況（計 0 件）

〔その他〕

なし

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
米澤（熊本）裕子 (YONEZAWA (KUMAMOTO) YUKO)
神戸学院大学・栄養学部・研究員
研究者番号：80388777
- (2) 研究分担者
なし
- (3) 連携研究者
なし
- (4) 研究協力者
水品 善之 (MIZUSHINA YOSHIYUKI)
神戸学院大学・栄養学部・准教授
研究者番号：20307705
佐々木 良平 (SASAKI RYOHEI)
神戸大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：30346267