



Amelioration of Radiation Enteropathy by Dietary Supplementation With Reduced Coenzyme Q10

Shimizu, Yasuyuki

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2019-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第7545号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1007545>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(課程博士関係)

学 位 論 文 の 内 容 要 旨

Amelioration of Radiation Enteropathy by Dietary Supplementation With Reduced Coenzyme Q10

還元型コエンザイム Q10 の経口投与による放射線腸炎の低減効果の検討

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻
内科系講座放射線腫瘍学分野
(指導教員：佐々木 良平教授)
清 水 康 之

背景

腹部、骨盤内の腫瘍への放射線治療において、放射線感受性が高い腸管の一部が高線量の放射線照射を受ける。その結果、一部の患者では放射線腸炎を生じるため、耐容線量の観点から腫瘍に根治線量を処方できないこともある。近年まで、腸管の放射線有害反応を低減するための効果的な方法は開発されていない。X 線照射では活性酸素種(ROS)を生成するが、ROS は腫瘍に対する腫瘍抑制効果と、正常組織の有害反応のいずれにも重要な因子であり、正常組織において ROS を効率よく除去できる抗酸化物質は放射線有害反応の低減が期待できる。機能性食品である還元型コエンザイム Q10(以下、CoQ10)は安全性が高く、抗酸化作用を有する事が報告されている。本研究の目的は、還元型 CoQ10 が放射線照射による腸管の放射線有害反応を改善する事が出来るか否かを検討することである。またその際に、放射線治療の目的である腫瘍に対する放射線照射の効果が還元型 CoQ10 によって低減しないかを確認する。

実験方法

1. 還元型 CoQ10 の投与方法

下記の 2 通りの方法にて投与した。

①コーン油に溶解した還元型 CoQ10(300 mg/kg)を測定または照射の 2 日前、1 日前、1 時間前にゾンデにより経口投与した群(3 回投与群)。

②還元型 CoQ10 が 1 %含有された餌を 9 日間継続投与し、さらに追加で測定または照射の 1 時間前にコーン油に溶解した還元型 CoQ10(300 mg/kg)をゾンデにより経口投与した群(継続投与群)。

2. 放射線照射

放射線照射は神戸大学医学部附属動物実験施設に設置されている放射線照射装置(MBR-1505R2)を用い、管電圧 150 kV、Al 1 mm フィルターを用いて 0.57 Gy/min で X 線を照射した。腸管防護の実験では、全身麻酔下で頭部から胸部と肛門から尾部までを、またヌードマウスを用いた腫瘍増殖抑制の実験では腫瘍部以外を鉛で遮蔽した。

3. 腸管内 CoQ10, CoQ9 の測定

8 週齢の C57BL/6J 雄マウスを用いて、還元型 CoQ10 非投与群、3 回投与群、継続投与群と比較検討した。測定はマウスの腸管を近位、中部、遠位の 3 つの部位に分けて測定を行い、CoQ10 及びコエンザイム Q9(CoQ9)の含有量を高速液体クロマトグラフィーを用いて測定した。

4. 還元型 CoQ10 による腸管の放射線有害反応の軽減の検討

8 週齢 C57BL/6J 雄マウスの腸管に対する放射線有害反応の軽減効果の確認はコントロール群、還元型 CoQ10 非投与の 13 Gy 照射のみの群、3 回投与の 13 Gy 照射群、継続投与の 13 Gy 照射群で比較検討を行った。組織学的解析は、ROS の検出のために照射 2 時間前にジヒドロエチジウムを腹腔内投与し、照射 4 時間後に腸管を採取し凍結切片を作成し観察した。アポトーシスの確

認は照射 8 時間後に腸管を摘出しホルマリン固定後 TUNEL Assay を行った。また照射 4 日後に腸管を摘出しホルマリン固定後 HE 染色による形態学的変化を評価した。なお、経過観察期間においては経時的にマウスの体重測定を行い、マウスの生存率を評価した。

5. 放射線照射に対する腫瘍増殖抑制試験

3 種類のヒト癌細胞株である MIA PaCa-2、HCT116、HeLa を用いて、還元型 CoQ10 が腫瘍増殖に対する放射線照射の腫瘍増殖抑制効果を阻害するか否かを *in vitro* で検討した。また、*in vivo* において 4 週齢 BALB /cAJcl-nu/nu 雄ヌードマウスを用いた腫瘍増殖抑制実験では MIA PaCa-2 を移植し還元型 CoQ10 が含有された餌を 9 日間継続投与した群と非投与群の腫瘍部位に対して 5 Gy を照射した。また、対照群として腫瘍移植のみで放射線を照射しないコントロール群を設定した。定期的にマウスの腫瘍サイズの測定を行い放射線照射の腫瘍増殖抑制を評価した。

結果

1. 腸管内 CoQ10、CoQ9 の測定

CoQ10 は 3 回投与と継続投与の両方で腸管の近位、中部、遠位いずれの部位においても蓄積が確認されたが、CoQ9 の変動は見られなかった。

2. 還元型 CoQ10 の腸管の放射線有害反応の軽減

組織学的解析の結果、放射線照射は ROS を産生しアポトーシスを誘導することが確認された。その後、形態的にも絨毛に損傷を与えたことが確認された。一方で還元型 CoQ10 の投与は ROS の産生を抑制し、腸陰窩におけるアポトーシスを抑制し、照射後の絨毛構造の保存をもたらした。生存率の比較においては、還元型 CoQ10 を継続投与した群では照射単独群の 50%と比較して 92%と有意に上昇した。一方で 3 回投与群では 33%が死亡した。

体重の変化は非照射群といずれの照射群においても体重の減少を示したが、投与方法や投与の有無での差は見られなかった。

3. 放射線照射の腫瘍増殖抑制効果に対する還元型 CoQ10 の影響

In vitro における腫瘍増殖抑制試験では MIA PaCa-2、HCT116、HeLa の 3 種類いずれにおいても放射線照射に対して線量依存的に増殖抑制効果を示したが、還元型 CoQ10 の投与による変化は示さなかった。ヌードマウスを用いた *in vivo* における腫瘍増殖抑制試験では 5 Gy の放射線照射による腫瘍増殖抑制が認められたが、還元型 CoQ10 の投与による有意な変化は認められなかった。本検討において、還元型 CoQ10 は *in vitro*、*in vivo* いずれにおいても放射線照射の腫瘍増殖抑制効果を低減しなかった。

考察

本研究結果により、還元型 CoQ10 の投与は、放射線照射によって生じた腸管組織の ROS の除

去、アポトーシスの低減により組織の損傷が低減され、マウス個体の生存率が上昇した。特に継続的な投与により、有意に高い生存率が認められ、高い放射線有害反応の軽減効果を示した。また還元型 CoQ10 の投与は、腫瘍増殖抑制実験の *in vitro*、*in vivo* のいずれにおいても放射線照射による腫瘍抑制効果を低減しないことが示された。

放射線有害反応は ROS が大きな因子であると報告されていることから、抗酸化作用の高い還元型 CoQ10 は放射線有害反応の軽減効果を示すと考えられる。還元型 CoQ10 が投与された状態の腸管は、その抗酸化作用により ROS を媒介としたアポトーシスが阻害され、放射線照射の損傷が軽減されたと考えられ、その効果に伴いマウスの生存率が向上したと考えられる。さらに、Sikorska らは還元型 CoQ10 が正常組織である神経細胞を ROS の損傷から防護したことを報告しており、本研究結果においても放射線照射により生成された ROS から腸管を防護した可能性がある。また、継続投与により高い腸管保護効果を示した理由として CoQ10 の全身循環によってもたらされた可能性と、放射線照射後にミトコンドリアから生成される ROS が還元型 CoQ10 の継続投与によって照射中だけでなく照射後においても ROS の損傷から腸管を保護した可能性も示唆されるが、詳細なメカニズムは解明されていない。

一方で、臨床において放射線治療期間中における抗酸化物質の投与は、腫瘍増殖抑制の低減を示す可能性が否定できず、さらなる議論の余地がある。Lamson らは、外因性抗酸化剤の投与が癌治療中に化学療法または放射線照射の腫瘍抑制効果を低下させないことを報告した。これらの報告と一致して、本研究の *in vitro*、*in vivo* いずれの腫瘍増殖抑制実験においても、還元型 CoQ10 の投与は放射線照射の腫瘍抑制効果を阻害しなかった。これらの報告および本研究結果から、還元型 CoQ10 の投与は放射線照射の腫瘍抑制効果を低減させないことが示唆された。

本研究によって、放射線照射と還元型 CoQ10 の持続的な併用は、放射線の腫瘍増殖抑制効果を阻害せずに、腸管に対して放射線有害反応を効果的に改善することが確認された。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第2889号	氏 名	清水 康之
論文題目 Title of Dissertation	Amelioration of Radiation Enteropathy by Dietary Supplementation With Reduced Coenzyme Q10 還元型コエンザイムQ10の経口投与による放射線腸炎の低減効果の 検討		
審査委員 Examiner	主 査 鈴木 聡 Chief Examiner 副 査 橋本 香樹 Vice-examiner 副 査 見王 裕三 Vice-examiner		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

背景

腹部の腫瘍への放射線治療において、一部の患者では放射線腸炎などの有害反応を生じるが、有効な有害反応低減の方法は確立されていない。X線照射では活性酸素種(ROS)を生成するため、正常組織においてROSを効率よく除去できる抗酸化物質は放射線有害反応の低減が期待できる。還元型コエンザイムQ10(以下、CoQ10)は安全性が高く、抗酸化作用を有する事が報告されている機能性食品である。本研究の目的は、還元型CoQ10が放射線照射による腸管の放射線有害反応を改善する事が出来るか否かを検討することである。またその際に、放射線治療の目的である腫瘍に対する放射線照射の効果が還元型CoQ10によって低減しないかを確認する。

実験方法

1. 還元型CoQ10の投与方法

下記の2通りの方法にて投与した。

①コーン油に溶解した還元型CoQ10(300 mg/kg)を測定または照射の2日前、1日前、1時間前にゾンデにより経口投与した群(3回投与群)。

②還元型CoQ10が1%含有された餌を9日間継続投与し、さらに追加で測定または照射の1時間前にコーン油に溶解した還元型CoQ10(300 mg/kg)をゾンデにより経口投与した群(継続投与群)。

2. 放射線照射

放射線照射は神戸大学医学部附属動物実験施設に設置されている放射線照射装置(MBR-1505R2)を用いた。還元型CoQ10による腸管の放射線有害反応の軽減の検討では腹部のみに13 Gy、放射線照射に対する腫瘍増殖抑制試験の検討では腫瘍のみに5Gy照射した。

3. 腸管内CoQ10, CoQ9の測定

8週齢のC57BL/6J雄マウスを用いて、還元型CoQ10非投与群、3回投与群、継続投与群で比較検討した。測定はマウスの腸管を近位、中部、遠位の3つの部位に分けて測定を行い、CoQ10及びコエンザイムQ9(CoQ9)の含有量を高速液体クロマトグラフィーを用いて測定した。

4. 還元型CoQ10による腸管の放射線有害反応の軽減の検討

8週齢C57BL/6J雄マウスの腸管に対する放射線有害反応の軽減効果の確認はコントロール群、13 Gy照射単独群、還元型CoQ10の3回投与13 Gy群、継続投与13 Gy群で比較検討を行った。組織学的解析はROSの検出のためのジヒドロエチジウム染色、アポトーシスの確認のためのTUNEL Assay、形態学的変化の評価のためのHE染色を行った。なお、経過観察期間においては経時的にマウスの体重測定を行い、マウスの生存率を評価した。

5. 放射線照射に対する腫瘍増殖抑制試験

3種類のヒト癌細胞株であるMIA PaCa-2、HCT116、HeLaを用いて、還元型CoQ10が腫瘍増殖に

対する放射線照射の腫瘍増殖抑制効果を阻害するか否かを *in vitro* で検討した。また、*in vivo* において 4 週齢 BALB /cAJcl-nu/nu 雄ヌードマウスを用いた腫瘍増殖抑制実験では MIA PaCa-2 を移植し照射を行わない非処置群および、還元型 CoQ10 の継続投与群と非投与群の腫瘍部位に対して 5 Gy を照射して比較を行い腫瘍サイズの測定を行った。

結果

1. 腸管内 CoQ10, CoQ9 の測定

CoQ10 は 3 回投与と継続投与の両方で腸管の近位、中部、遠位いずれの部位においても蓄積が確認されたが、CoQ9 の変動は見られなかった。

2. 還元型 CoQ10 の腸管の放射線有害反応の軽減

組織学的解析の結果、放射線照射は ROS を産生しアポトーシスを誘導することが確認された。その後、形態的にも絨毛に損傷を与えたことが確認された。一方で還元型 CoQ10 の投与は ROS の産生を抑制し、腸陰窩におけるアポトーシスを抑制し、照射後の絨毛構造の保存をもたらした。

生存率の比較においては、還元型 CoQ10 を継続投与した群では照射単独群の 50%と比較して 92%と有意に上昇した。一方で 3 回投与群では 33%が死亡した。

体重の変化は非照射群といずれの照射群においても体重の減少を示したが、投与方法や投与の有無での差は見られなかった。

3. 放射線照射の腫瘍増殖抑制効果に対する還元型 CoQ10 の影響

In vitro における腫瘍増殖抑制試験ではいずれの細胞においても放射線照射の腫瘍増殖抑制効果は還元型 CoQ10 の投与による変化は示さなかった。ヌードマウスを用いた *in vivo* における腫瘍増殖抑制試験では 5 Gy の放射線照射による腫瘍増殖抑制が認められたが、還元型 CoQ10 の投与による有意な変化は認められなかった。

結論

本研究結果により、還元型 CoQ10 の投与は、放射線照射によって生じた腸管組織の ROS の除去、アポトーシスの低減により組織の損傷が低減され、マウス個体の生存率が上昇した。特に継続的な投与により、有意に高い生存率が認められ、高い放射線有害反応の軽減効果を示した。また還元型 CoQ10 の投与は、腫瘍増殖抑制実験の *in vitro*、*in vivo* のいずれにおいても放射線照射による腫瘍抑制効果を低減しないことが示された。

本研究は、還元型 CoQ10 の経口での持続的な投与は、放射線治療時に腫瘍増殖抑制効果を阻害せずに、腸管に対して放射線有害反応を効果的に改善することが確認された価値ある研究である。

よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。