

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 3 月 31 日現在

機関番号：34419

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23650630

研究課題名（和文）

前立腺発癌モデルマウスを用いたセレンウムによる前立腺発癌予防効果の検討

研究課題名（英文）

Prevention of prostate cancer by selenium using a mouse model

研究代表者

野澤 昌弘 (NOZAWA MASAHIRO)

近畿大学・医学部・講師

研究者番号：00441080

研究成果の概要（和文）：

前立腺がん発癌モデル・マウスを用いて、セレンウム摂取による前立腺がん発癌の予防効果の有無を検討するために本研究を実施した。今回、対象とした前立腺がん発癌モデル・マウスにおいては、コントロール飼料群および低濃度および高濃度セレンウム含有飼料群の3群間で、前立腺癌の発癌様式に有意差を認めなかった。

研究成果の概要（英文）：

We conducted this study to research the effect of selenium intake on prevention of the prostate cancer using a mouse model. As a result, no significant difference was detected in the occurrence of prostate cancer among three groups of mice that had been fed with the control or low- or high-concentration selenium-containing feeds.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	1,800,000	540,000	2,340,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学、がん疫学・予防

キーワード：予防介入研究

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 今日の医療財政危機は早急に解決策を講じる必要のある問題である。前立腺がんは罹患率の増加が著しく、かつ、罹病期間が比較的長いという特徴を有することから、前立腺がんの発癌予防に関する研究はがん研究全体のなかでも最優先的に行われるべきものの一つと考える。

(2) 前立腺がん発症は患者個人に対して身体的、精神的および経済的に多大なる不利益をもたらすと同時に、医療財政的観点からも看過できない問題といえる。申請者らは、この問題に対する根源的な解答の一つは前立腺がんの発癌予防であると考えている。最近、前立腺がんの発癌に必須微量元素の一つ、セレン

ウムの摂取不足が関与している可能性が示唆された。

### 2. 研究の目的

日常の栄養摂取による前立腺がんの発癌予防を最終目標とし、そのなかでセレンウムの効果を明らかにすることを研究目的とする。そのために、以下の事項を明らかにする。

(1) 申請者らが樹立した前立腺がん発癌モデル・マウスを用いて、セレンウム摂取による前立腺がん発癌の予防効果の有無を検討する。

(2) 前立腺がん予防のための、セレンウムの至適摂取量を検討する。

- (3) セレンウムの摂取状況をモニターする方法を検討する。
- (4) セレンウム摂取群および非摂取群において、前立腺組織における前立腺がん関連分子およびアポトーシス関連分子等の発現の相違を検討する。
- (5) 発現タンパク・プロファイルからセレンウムによる前立腺がん発癌の予防機序を考察する。

### 3. 研究の方法

(1) 前立腺がん発癌モデル・マウスの準備  
申請者らは、PSA プロモーター結合 Cre 遺伝子を有するマウスと PTEN 遺伝子を loxP 配列にて挟んだトランスジェニック・マウスとの交配から最終的に前立腺上皮細胞において両方のアレルの PTEN を欠損するマウス

(PTEN<sup>flox/flox</sup>/PSA-Cre) および一方のアレルのみ PTEN を欠損するマウス

(PTEN<sup>flox/wt</sup>/PSA-Cre) を得た。前者は生後 2 ヶ月で全例に前立腺がんを生じた。一方、後者は生後 3~6 ヶ月で約 25% に前癌病変を発症し、ツーヒット・セオリーに基づいたヒト前立腺がん発癌のよいモデルと考えられた。本研究では、後者の、一方のアレルのみ PTEN を欠損するマウス

(PTEN<sup>flox/wt</sup>/PSA-Cre) を前立腺がん発癌モデルとして用いる。

(2) セレンウム調整飼料の準備

連携研究者は、カイワレを利用して植物性セレンウム化合物であるメチルセレノシステイン (MSC) を調製することに成功した。これを用いて低濃度または高濃度 MSC 含有飼料およびセレンウムを含まないコントロール飼料を作成する。コントロール飼料はカゼイン・ベースの超低セレンウム飼料とし、低濃度および高濃度 MSC 飼料はコントロール飼料にそれぞれ 0.2 μg/g および 2.0 μg/g のセレンウムを含有させた飼料とする。

(3) セレンウム調整飼料によるモデル・マウスの飼育

モデル・マウスをコントロール飼料群および低濃度および高濃度 MSC 飼料群の 3 群に割り振り、生後から 6 ヶ月飼育した後、それらの前立腺組織を採集する。

(4) セレンウム調製飼料により飼育されたモデル・マウスの前立腺組織の病理組織学的検討

前立腺組織の病理組織学的検討によって、セレンウム含有飼料により前立腺がん発癌が

抑制されるかどうかを検討する。また、どういった組織学的相違があるかを検討する。もし、セレンウム含有飼料により前立腺がん発癌が抑制されなければ、上記②のステップに戻り、飼料中のセレンウム濃度を変更した飼料を作成し、飼育を再開する。すなわち、至適セレンウム濃度は非常に限定されたレンジで存在している可能性があるため、低濃度飼料中のセレンウム含有量をより多くし、反対に高濃度飼料中の含有量をより少なくする必要があります。

(5) 免疫組織学的手法による前立腺組織における前立腺がん関連分子およびアポトーシス関連分子等の発現の検討

前立腺組織の病理組織学的検討によって、セレンウム含有飼料により前立腺がん発癌が抑制される結果が得られた場合、前立腺上皮細胞における前立腺がん関連分子およびアポトーシス関連分子等の発現についてタンパク・レベルで評価するため免疫組織化学を施行する。

(6) 食餌中セレンウム濃度と前立腺がん発癌予防効果との相関関係の検討

セレンウム至適摂取量を考察するため、食餌中セレンウム濃度と前立腺がん発癌予防効果との相関関係を明らかにする。その目的で、最初の濃度設定と異なる濃度のセレンウム含有飼料を作成し、上記計画 (2) ~ (5) の実験を繰り返すことで、前立腺がん発癌予防効果の最も高い食餌中セレンウム濃度を導き出す。

(7) 食餌中セレンウム濃度と血中および爪中セレンウム濃度との相関関係の検討

本研究の最終的な目標は、ヒトへの応用であるので日常のセレンウム摂取量をモニターできるシステムを開発したい。その目的で、各濃度飼料で飼育されたマウスの血中および爪中セレンウム濃度を測定し、食餌中セレンウム濃度との相関関係を検討する。すなわち、血中濃度は短期間での摂取量を、また、爪中濃度は長期間における摂取量を反映するものと推測している。

(8) 発現タンパク・プロファイルからセレンウムによる前立腺がん発癌予防機序の考察

上記計画 (6) の実験から導き出された、至適セレンウム濃度飼料およびコントロール飼料にてモデル・マウスを飼育し、飼育から 1 ヶ月毎に前立腺を採集、病理組織学的変化を経時的に検討。同時に、各時期における前立腺がん関連分子およびアポトーシス関連分子等の発現に関してプロファイリングを行い、セレンウムによる前立腺がん発癌予防

機序の考察を行う。

#### 4. 研究成果

(1) 前立腺がん発癌モデル・マウスを準備した。まず、PSA プロモーター結合 Cre 遺伝子を有するマウスと PTEN 遺伝子を loxP 配列にて挟んだトランスジェニック・マウスとの交配から最終的に前立腺上皮細胞において両方のアレルの PTEN を欠損するマウス (PTENflox/flox/PSA-Cre) および一方のアレルのみ PTEN を欠損するマウス (PTENflox/wt/PSA-Cre) を準備した。

(2) セレニウム調整飼料を準備した。連携研究者により低濃度および高濃度セレニウム含有飼料およびセレニウムを含まないコントロール飼料が作成された。コントロール飼料はカゼイン・ベースの超低セレニウム飼料であり、低濃度および高濃度セレニウム含有飼料にはコントロール飼料にそれぞれ  $0.2 \mu\text{g/g}$  および  $2.0 \mu\text{g/g}$  のセレニウムを含有させた。

(3) セレニウム調整飼料によるモデル・マウスを飼育した。モデル・マウスをコントロール飼料群および低濃度および高濃度セレニウム含有飼料群の 3 群に割り付け、飼育を開始した。

(4) 飼育されたモデル・マウスの前立腺組織を採取し、その病理組織学的検討を行った。モデル・マウスにおける前立腺組織を経時的に解析した結果、PTENflox/wt/PSA-Cre マウスでは、前立腺がん発癌の様式に個体によるばらつきが大きいことが明らかとなった。したがって、PTENflox/flox/PSA-Cre マウスを対象に解析を進めることにした。

(5) コントロール飼料群および低濃度および高濃度セレニウム含有飼料群の 3 群に割り付けて飼育された PTENflox/flox/PSA-Cre マウスから採取された前立腺組織を病理組織学的に検討した。8 週齢の時点で摘出された前立腺組織において 3 群とも 10-20% に発癌を認め、3 群間に差を認めなかった。10 週齢、12 週齢、15 週齢、および 20 週齢の時点で、それぞれ前立腺を摘出し、病理組織学的検討を行った結果、各時点で 3 群間に発癌に差を認めなかった。

(6) (5) において摘出した前立腺組織を用いて Ki-67 発現に関する免疫組織化学染色を施行した。

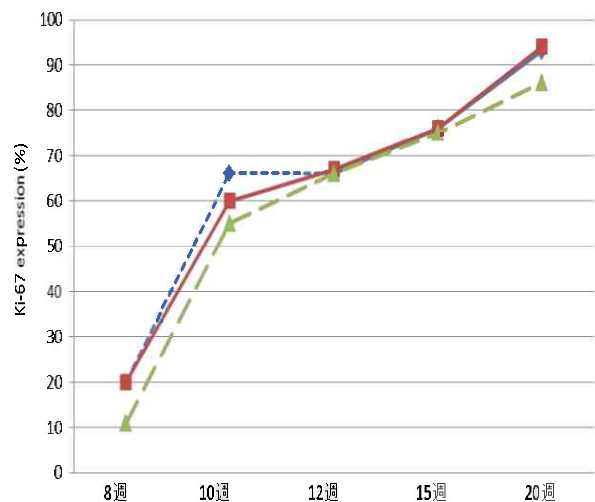
① Ki-67 陽性細胞数比率は、8 週齢でコントロール飼料群が 20% ( $\pm 3.5$ )、低濃度セレニウム含有飼料群が 20% ( $\pm 7.9$ )、高濃度セレニウム含有飼料群が 11% ( $\pm 6.5$ ) であった。

② 10 週齢ではコントロール飼料群が 66% ( $\pm 6.5$ )、低濃度セレニウム含有飼料群が 60% ( $\pm 3.5$ )、高濃度セレニウム含有飼料群が 55% ( $\pm 3.5$ ) であった。

③ 12 週齢ではコントロール飼料群が 66% ( $\pm 4.1$ )、低濃度セレニウム含有飼料群が 67% ( $\pm 4.5$ )、高濃度セレニウム含有飼料群が 66% ( $\pm 4.2$ ) であった。

④ 15 週齢ではコントロール飼料群が 76% ( $\pm 4.2$ )、低濃度セレニウム含有飼料群が 76% ( $\pm 4.2$ )、高濃度セレニウム含有飼料群が 75% ( $\pm 3.5$ ) であった。

⑤ 20 週齢ではコントロール飼料群が 93% ( $\pm 2.7$ )、低濃度セレニウム含有飼料群が 94% ( $\pm 2.2$ )、高濃度セレニウム含有飼料群が 86% ( $\pm 4.2$ ) であった。



(7) (5) において摘出した前立腺組織を用いて Caspase 3 発現に関する免疫組織化学染色を施行した。

8 週齢、10 週齢、12 週齢、15 週齢、および 20 週齢の各時点において、コントロール飼料群および低濃度および高濃度セレニウム含有飼料群の 3 群のいずれの前立腺組織においても、Caspase 3 発現は認められなかった。

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)

特になし。

6. 研究組織

(1)研究代表者

野沢昌弘 (NOZAWA MASAHIRO)

近畿大学・医学部・講師

研究者番号：00441080

(3)連携研究者

吉田 宗弘 (YOSHIDA MUNEHIRO)

関西大学・化学生命工学部・教授

研究者番号：30158472

デベラスコ マルコ (DeVelasco Marco)

近畿大学・医学部・助教

研究者番号：20449838