

令和元年6月6日現在

機関番号：27102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11483

研究課題名(和文) 抗癌薬投与後の口内炎疼痛における分子基盤の解明

研究課題名(英文) Molecular-based mechanism underlying oral ulcerative mucositis following anti-cancer drugs

研究代表者

小野 堅太郎 (Ono, Kentaro)

九州歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：40316154

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：抗癌剤(5-フルオロウラシル)を投与した口内炎モデルラットにおいて、抗癌剤による免疫機能の低下により口内炎部位の細菌量が増大し、よりひどい症状を示していた。細菌からの毒素が痛みに関する神経を刺激し、侵害受容TRPチャネル分子を活性化させることで痛みを引き起こしていることが明らかとなった。傷害による口内炎や別の種類の抗癌剤(シスプラチン)投与後の口内炎では、異なるメカニズムにて疼痛が引き起こされていた。既に臨床で鎮痛効果が確認された漢方薬(半夏瀉心湯)に関して、成分レベルでの作用機序を明らかにし、ショウガオールなどの成分が鎮痛作用に関与することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌治療患者における激しい疼痛を伴う口内炎の発症は、臨床上大きな問題となっていたものの、その発症メカニズムは不明であった。本研究結果にて、抗癌剤による全身的な影響が口内炎の症状を増悪させ、特定の侵害受容TRPチャネルを介して痛みを生じていることが明らかとなった。口内炎の発症原因や抗癌剤の種類によって病態やTRPチャネルの種類が異なっていたため、患者によってより効果的な治療法を選択する必要があることが示唆される。また、臨床で使用される漢方薬の西洋科学的エビデンスを提供できたと考えている。

研究成果の概要(英文)：The anti-cancer drug 5-fluorouracil-received oral ulcerative mucositis model of rats showed severe mucositis due to massive bacterial infection in the ulcerative region following leucopenia. Bacterial toxins excited pain-related nerves via activation of nociceptive TRP channels. Other oral ulcerative mucositis models by mechanical injury or another anti-cancer drug cisplatin demonstrated different molecular mechanism underlying oral mucositis-induced pain. The Japanese herbal medicine, Hangeshashinto, has been reported to improve oral mucositis in cancer patients. In the 5-fluorouracil-received oral ulcerative mucositis model, the traditional drug elicited anti-nociceptive effect on pain by shogaols at ingredient level.

研究分野：口腔生理学

キーワード：口内炎 疼痛 抗癌薬 三叉神経節 プロスタグランジン TRPV1 TRPA1 TRPV4

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

1981年から日本の死因第1位は悪性新生物(癌)となった。口内炎は化学療法を受ける癌患者の60%程度に発症し、特に頭頸部癌患者での放射線化学療法では98%の患者で発生する(Sonis et al., *Cancer*, 2004)。健全な人でも口内炎ができてしまうと痛みの処置に苦慮するが、癌患者における口内炎は広範囲で深い潰瘍性口内炎を発症し、食事や会話ができないほどの強烈な痛みを生じる。結果的に、化学療法の開始の遅れ、減薬、中断を強いることになり、癌患者の生存率を著しく下げている。研究代表者は頭頸部癌自体の疼痛メカニズムについて多くの報告をしてきた(Ono et al., *Eur J Pain*, 2009; Harano et al., *J Dent Res*, 2010; Hidaka et al., *Neurosci*, 2011; Sago et al., *Brain Res*, 2012; Ye et al., *Acta Neuropathol Commun*, 2014; Viet et al., *Clin Cancer Res*, 2014)。しかしながら、口内炎疼痛については当時、基礎研究レベルでは全く研究されておらず、発生機序は不明であった。

抗癌薬投与は口内炎だけでなく、副作用として食欲不振、白血球減少症、嘔吐などを引き起こす。おそらく食事時の咬傷や嘔吐時の胃酸による粘膜損傷が引き金となり、抗癌薬による粘膜上皮の再生能の低下と相まって口腔潰瘍が形成されると考えられた。潰瘍形成は口腔粘膜バリアの破壊であるため、口腔内細菌の粘膜深部への感染を許してしまう。臨床にて口内炎は白血球減少と相関して発症すると報告されていることから(Lockhart & Sonis, *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 1979)、栄養不良状態と造血幹細胞への毒性による白血球減少(Schulz & Muller, *Nature*, 1962; Crawford et al., *Cancer*, 2004)は、口内炎の重篤化と治癒遅延、そして疼痛増悪を引き起こしていることが予想された。また、唾液は口腔粘膜保護機能に関わることから、唾液分泌能の低下も疑われた。

2. 研究の目的

そこで本研究では、抗癌薬投与した後に酢酸処理により口内炎を発症させたモデルを用いて、全身的・局所的病態を明らかにすることを目的とした。抗癌薬としては、頭頸部癌の化学療法に主に用いられており、口内炎発症率の高い5-フルオロウラシル(5-FU)とシスプラチンを用いることとした。この抗癌薬投与口内炎モデルにおける白血球減少や口腔粘膜上皮再生能の低下が、どのように口内炎の重篤度や治癒遅延に関与するのかを検討し、炎症関連因子や細菌毒素による疼痛関連チャネル分子の活性化について明らかにする。さらに、明らかとなった病態や疼痛分子メカニズムに基づいて、癌患者における口内炎疼痛に対する有効な鎮痛法について検討することとした。

3. 研究の方法

実験にはWistar雄性ラットを使用した。頭頸部癌患者での5-FUとシスプラチンの総投与量はそれぞれ800と50 mg/m²であり(Winquist et al., *Cancer Treat Rev*, 2014)ヒトとの体表面積の違い(Reagan-Shaw et al., *FASEB J*, 2008)から換算されるラット推定投与量はそれぞれ128と8 mg/kgとなる。半減期の違いから、5-FUは40 mg/kgを2日毎に3回投与、シスプラチンは4 mg/kgを4日毎に2回投与した。コントロール投与として、生食を2日毎に3回投与した。口内炎作製にはペントバルビタール麻酔下にて50%酢酸の口腔粘膜30秒処理により作製した。これ以外にも、機械的傷害による口内炎モデルも新規に作製した。

ラット口腔内の疼痛評価のために、我々は新たに2つのラット覚醒下刺激法を確立した(Hitomi et al., *J Neurosci Method*, 2015)。口腔内滴下法ではラットを片手でハンドリングした状態で刺激溶液を口腔粘膜へ滴下し、顔面グルーミング時間を測定することで容易に粘膜での誘発痛を評価できた。安定開口法(Stable Intraoral opening method (SIO法))は下口唇部にピアスを装着し、一定の力で牽引して粘膜を露出するようにラットを2週間トレーニングする。これにより、安定してvon Frey毛を使った古典的機械疼痛評価法や局所麻酔薬処置が可能となった。さらに、この方法を用いることで、酢酸処理による口内炎モデルラットでの痛覚評価が可能となった。自発痛は口腔顔面領域の疼痛指標とされる両前肢で口元を舐める動作であるラッピングを10分間、自発的に行っている総時間から評価した。機械痛覚過敏は、SIO法を用いてvon Frey毛刺激による逃避閾値低下から評価した。抗菌薬や抗炎症薬に加えて、疼痛発症に関与する分子を同定するために、主にTRPチャネルの拮抗薬等を用いた。

行動解析の他、口腔粘膜、口内炎組織、三叉神経節をサンプルとした定量性RT-PCR法、ELISA法および免疫組織化学・蛍光染色法を行った。

4. 研究成果

5-FU投与口内炎モデルの病態ならびに関連疼痛分子の同定に成功した。5-FUは抗癌作用と同時に白血球減少を引き起こすため、口内炎部の細菌感染に対して無防備な状態となってしまう。そのため、過剰な口腔内細菌の感染により口内炎は増悪し、治癒の遅延がみられた。ゆえに抗菌薬の前投与は口内炎の症状、口内炎疼痛の緩和に有効であった。炎症部位でのプロスタグランジンE₂の産生はTRPV1チャネルを常に活性化させ自発痛の原因となっていた。一方、接触痛(物が触った時の痛み)はプロスタグランジンE₂の産生とは独立していた。当時のトピックスとして、炎症性疼痛はプロスタノイドや炎症性サイトカインにより引き起こされるといった従来の概念が大きく覆され、細菌毒素自体が1次求心性侵害受容神経に直接作用してTRPV1やTRPA1の活性化により引き起こされるという報告がなされた(Chiu et al., *Nature*,

2013; Meseguer et al., Nat Commun, 2014)。我々は早速、リポポリサッカライド (LPS) やホルミル化メチオニンペプチドをラット健常口腔粘膜に投与し、SIO法にて機械逃避閾値を測定したところ、両細菌毒素は機械痛覚過敏を引き起こし、その反応は TRP チャネル阻害薬であるルセニウムレッドや LPS 賦活薬ポリミキシン B もしくはホルミル化メチオニンペプチド受容体 FPR1 拮抗薬 Boc MLF によって抑制された。この結果を踏まえ、5-FU 投与口内炎モデルの接触痛について検討したところ、LPS による直接的もしくは FPR1 受容体を介した間接的作用による TRPA1 チャネルの機械感受性感作が原因となっていたことを見出した。

5-FU 投与口内炎モデルとは対照的に、通常口内炎モデルでは、自発痛は TRPA1 の感作が関与し、接触痛には TRPV1, TRPA1, TRPV4 すべてが関与していた。また、ワイヤーによる機械傷害性口内炎モデルでは細菌浸潤の影響は少なく、白血球由来エラストラーゼによる TRPV4 チャネルの機械感受性感作は接触痛の原因となっていた。これらのことより口内炎部位の白血球浸潤の程度により疼痛発症のメカニズムが異なることが明らかとなった。

5-FU もしくはシスプラチン投与後に、唾液腺の重量を測定したところ、萎縮が起きていた。唾液腺の萎縮は唾液分泌量を低下させる。そこで唾液腺摘出ラットにおいて口内炎を発症させたところ、通常ラットよりも重篤な症状を示した。これらの結果は、抗癌剤による唾液分泌障害が、癌患者の口内炎増悪に関与していることを示している。

シスプラチンと口腔内疼痛の関係についてしらべたところ、5-FU 投与口内炎モデルとは大きく異なる予想外の結果が得られた。シスプラチン投与により引き起こされる白血球減少は非常に短期間で回復し、好中球の食作用を亢進させるため、口内炎重篤度に大きな変化が見られていない。また、口内炎が無くとも、シスプラチン投与のみで口腔粘膜に接触痛が発症するため、解析に難航した。現在はようやくシスプラチンによる活性酸素産生による TRPA1 の機械感作であることを突き止め、論文投稿予定である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計6件)

- 1: Hitomi S, Ujihara I, Sago-Ito M, Nodai T, Shikayama T, Inenaga K, Ono K. Hyposalivation due to chemotherapy exacerbates oral ulcerative mucositis and delays its healing. Arch Oral Biol. in press.
- 2: Nodai T, Hitomi S, Ono K, Masaki C, Harano N, Morii A, Sago-Ito M, Ujihara I, Hibino T, Terawaki K, Omiya Y, Hosokawa R, Inenaga K. Endothelin-1 Elicits TRP-Mediated Pain in an Acid-Induced Oral Ulcer Model. J Dent Res. 2018 Jul;97(8):901-908. doi: 10.1177/0022034518762381.
- 3: Ito M, Ono K, Hitomi S, Nodai T, Sago T, Yamaguchi K, Harano N, Gunnjigake K, Hosokawa R, Kawamoto T, Inenaga K. Prostanoid-dependent spontaneous pain and PAR₂-dependent mechanical allodynia following oral mucosal trauma: involvement of TRPV1, TRPA1 and TRPV4. Mol Pain. 2017 Jan;13:1744806917704138. doi: 10.1177/1744806917704138.
- 4: Hitomi S, Ono K, Terawaki K, Matsumoto C, Mizuno K, Yamaguchi K, Imai R, Omiya Y, Hattori T, Kase Y, Inenaga K. [6]-gingerol and [6]-shogaol, active ingredients of the traditional Japanese medicine hangeshashinto, relief oral ulcerative mucositis-induced pain via action on Na⁺ channels. Pharmacol Res. 2017 Mar;117:288-302. doi: 10.1016/j.phrs.2016.12.026.
- 5: Hitomi S, Ono K, Yamaguchi K, Terawaki K, Imai R, Kubota K, Omiya Y, Hattori T, Kase Y, Inenaga K. The traditional Japanese medicine hangeshashinto alleviates oral ulcer-induced pain in a rat model. Arch Oral Biol. 2016 Jun;66:30-7. doi: 10.1016/j.archoralbio.2016.02.002.
- 6: Yamaguchi K, Ono K, Hitomi S, Ito M, Nodai T, Goto T, Harano N, Watanabe S, Inoue H, Miyano K, Uezono Y, Matoba M, Inenaga K. Distinct TRPV1- and TRPA1-based mechanisms underlying enhancement of oral ulcerative mucositis-induced pain by 5-fluorouracil. Pain. 2016 May;157(5):1004-20. doi: 10.1097/j.pain.0000000000000498.

[学会発表](計32件)

- 1: Hitomi S, Yamaguchi K, Seta Y, Ujihara I, Ono K. Cisplatin-induced intraoral neuropathy due to TRPA1 sensitization in rats. 9th FAOPS Congress, Kobe (March), 2019
- 2: Naniwa M, Hitomi S, Ujihara I, Matsuda K, Yoshino K, Nakamichi A, Ono K. Therapeutic effects of highly-residual ointments on oral ulcerative mucositis. 9th FAOPS Congress, Kobe (March), 2019
- 3: Miyamura Y, Hitomi S, Ujihara I, Terawaki K, Omiya Y, Morimoto Y, Ono K. Analgesic effect of isoliquiritigenin on oral ulcer-induced pain by blocking of Nav channels. 9th FAOPS Congress, Kobe (March), 2019
- 4: Miyamura Y, Hitomi S, Ujihara I, Terawaki K, Omiya Y, Morimoto Y, and Ono K. The Glycyrrhiza ingredient isoliquiritigenin alleviates acute pain by ion channel

- inhibition. 第6回アジア太平洋国際カンファレンス, Fukuoka (May), 2018.
- 5: 小野堅太郎: これまでとこれから～体液調節・唾液・口腔顔面感覚の研究～ 第12回三叉神経領域の感覚-運動統合機構研究会特別講演, 千葉(12月), 2018
 - 6: 宮村侑一, 人見涼露, 氏原泉, 寺脇潔, 大宮雄司, 森本泰宏, 小野堅太郎: 甘草由来成分イソリクイリチゲニンはNavチャンネル抑制により口内炎疼痛を緩和する 第12回三叉神経領域の感覚-運動統合機構研究会, 千葉(12月), 2018
 - 7: 浪花真子, 人見涼露, 氏原泉, 松田一成, 小野堅太郎: ステロイドおよび抗菌薬を含む高残留性軟膏の口内炎への治癒効果 第12回三叉神経領域の感覚-運動統合機構研究会, 千葉(12月), 2018
 - 8: 宮村侑一, 人見涼露, 氏原泉, 寺脇潔, 大宮雄司, 森本泰宏, 小野堅太郎: 甘草成分イソリクイリチゲニンはNavチャンネル阻害により口内炎疼痛を抑制する 第69回西日本生理学会, 北九州(10月), 2018
 - 9: 宮村侑一, 人見涼露, 氏原泉, 小野堅太郎: 半夏瀉心湯含有成分イソリクイリチゲニンは電位依存性イオンチャンネルを阻害することで口内炎性疼痛を抑制する 第60回歯科基礎医学会学術大会, 福岡(9月), 2018
 - 10: 小野堅太郎: 口内炎における疼痛発症メカニズム: 食に関わる痛覚の生理学的重要性(メインシンポジウム2) 第60回歯科基礎医学会学術大会, 福岡(9月), 2018
 - 11: 人見涼露, 小野堅太郎: 抗癌剤による口腔感覚過敏の発症メカニズム Mechanism of oral hypersensitivity induced by anticancer drug, 第23回日本口腔顔面痛学会, 北九州(7月), 2018
 - 12: 宮村侑一, 人見涼露, 小野堅太郎: 漢方薬半夏瀉心湯の成分イソリクイリチゲニンは口内炎性疼痛を緩和する 第23回日本口腔顔面痛学会, 北九州(7月), 2018
 - 13: Hitomi, S., Ono, K., Ujihara, I., Terawaki, K., Matsumoto, C., Omiya, Y., Inenaga, K.: Gingerol and shogaol, the herbal contents, relief oral ulcerative mucositis-induced pain through sodium channel blockage. 第3回 Oral neuroscience, Osaka (August), 2017.
 - 14: Nodai, T., Hitomi, S., Masaki, C., Ito, M., Hosokawa, R., Ono, K. and Inenaga, K.: Oral ulcerative mucositis induces pain via endothelin receptors. 第5回アジア太平洋国際カンファレンス, Fukuoka (May), 2017.
 - 15: Nodai, T., Hitomi, S., Ono, K., Masaki, C. and Hosokawa, R.: Oral ulcerative mucositis induces pain via endothelin receptor. IADR, 2017年3月22-25日 San Francisco, U. S. A.
 - 16: 人見涼露, 氏原泉, 左合一伊藤美紗, 鹿山武海, 小野堅太郎: 抗癌薬による唾液分泌機能低下は口内炎治癒を妨げる 第95回日本生理学会大会(徳島), 3月, 2018
 - 17: 宮村侑一, 人見涼露, 氏原泉, 寺脇潔, 大宮雄司, 小野堅太郎: イソリクイリチゲニンは特定の侵害性末梢神経を阻害して口内炎性疼痛に鎮痛効果を示す 第95回日本生理学会大会(徳島), 3月, 2018
 - 18: 人見涼露, 氏原泉, 鹿山武海, 左合一伊藤美紗, 小野堅太郎: 抗癌薬投与後の唾液腺萎縮は口内炎治癒を遅延させる 第11回三叉神経領域の感覚-運動統合機能研究会(大阪), 12月, 2017
 - 19: 人見涼露, 伊藤美紗, 野代知孝, 氏原泉, 小野堅太郎: 口内炎疼痛に対する半夏瀉心湯の鎮痛メカニズムの解明 アップデートシンポジウム 第59回歯科基礎医学会(松本), 9月, 2017
 - 20: 野代知孝, 人見涼露, 伊藤美紗, 氏原泉, 正木, 細川隆司, 小野堅太郎: エンドセリン-1シグナルを介した口内炎疼痛メカニズム 第59回歯科基礎医学会(松本), 9月, 2017
 - 21: 野代知孝, 人見涼露, 伊藤美紗, 正木千尋, 細川隆司, 小野堅太郎, 稲永清敏: 口内炎疼痛発症にエンドセリン-1が関与する. 第77回九州歯科学会総会, 北九州(5月), 2017.
 - 22: 人見涼露, 小野堅太郎, 山口喜一郎, 寺脇潔, 松本千波, 大宮雄司, 稲永清敏: ラット口内炎疼痛に対する半夏瀉心湯の鎮痛メカニズム. 第77回九州歯科学会総会, 北九州(5月), 2017.
 - 23: Ito M, Ono K, Hitomi S, Kawamoto T. TRPV1- and TRPA1-mediated spontaneous pain and TRPV4-mediated mechanical pain in orthodontic wire-induced oral mucositis. The 29th TAO Annual Meeting. Taiwan Marriot Hotel. 2016/12/2-12/4
 - 24: M. Ito, K. Ono, S. Hitomi, K. Yamaguchi, T. Nodai, K. Gunjigake, K. Kuroishi, T. Kawamoto, K. Inenaga. A new preclinical pain model of oral ulcer by orthodontic wire appliance. The 16th International Association for the Study of Pain 2016/9/23-30 Yokohama
 - 25: T. Nodai, K. Ono, S. Hitomi, M. Ito, R. Hosokawa, K. Inenaga Pain-associated mediators and genes in acetic acid-induced oral ulcerative mucositis. 16th International Association for the Study of Pain 2016/9/23-30 Yokohama
 - 26: Ito M, Ono Kentaro, Hitomi S, Yamaguchi K, Nodai T, Gunjigake K, Kuroishi K, Kawamoto T, Inenaga K. A new preclinical pain model of orthodontic wire appliance-induced oral ulcer. Asia-Pacific Conference (第4回アジア太平洋国際カンファレンス 2016 May 11;

Fukuoka.

- 27: Nodai T, Ono K, Hitomi S, Ito M, Masaki C, Hosokawa R, Inenaga K. The change of pain-associated mediators and genes in acetic acid-induced oral ulcerative mucositis model. Asia-Pacific Conference (第4回アジア太平洋国際カンファレンス 2016 May 11; Fukuoka.
- 28: 伊藤美紗、小野堅太郎、人見涼露、野代知孝、川元龍夫、稲永清敏 機械的外傷後の口腔粘膜疼痛メカニズム 第10回三叉神経領域の感覚－運動統合機能研究会、長野県佐久市、2016年11月26日
- 29: 野代知孝、人見涼露、小野堅太郎、伊藤美紗、正木千尋、細川隆司、稲永清敏 酢酸誘発口内炎モデルラットの疼痛発症メカニズムに対するエンドセリン1の関与 第10回三叉神経領域の感覚－運動統合機能研究会、長野県佐久市、2016年11月26日
- 30: 人見涼露、小野堅太郎、野代知孝、伊藤美紗、正木千尋、細川隆司、稲永清敏 酢酸誘発口内炎モデルラットにおける疼痛関連因子の変化 第58回歯科基礎医学会 (北海道), 8月, 2016
- 31: 野代知孝、人見涼露、小野堅太郎、伊藤美紗、正木千尋、細川隆司、稲永清敏 酢酸誘発口内炎モデルラットに発症する口腔内疼痛に対するエンドセリン1の関与 第58回歯科基礎医学会 (北海道), 8月, 2016
- 32: 野代知孝、小野堅太郎、人見涼露、伊藤美紗、正木千尋、細川隆司、稲永清敏 酢酸誘発口内炎モデルラットにおける病態と遺伝子変化 第76回九州歯科学会総会 5月28-29日、2016

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等: なし

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 人見涼露

ローマ字氏名: Hitomi, Suzuro

所属研究機関名: 九州歯科大学

部局名: 生理学分野

職名: 講師

研究者番号(8桁): 70548924

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。