

令和元年6月21日現在

機関番号：32710

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11708

研究課題名(和文)メラトニンの放射線防護効果と抗腫瘍効果を応用した新たな口腔癌治療法確立の可能性

研究課題名(英文) Possibility of establishing a new oral cancer treatment applying the radioprotective and antitumor effects of melatonin

研究代表者

藤永 桃歌 (Fujinaga, Momoka)

鶴見大学・歯学部・臨床助手

研究者番号：00772914

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)：メラトニンの各種癌細胞に対する増殖抑制効果が報告されているとともにわれわれは以前、放射線性口腔粘膜障害予防効果を示唆する研究結果を得ている。本研究では、メラトニンの口腔癌細胞に対する抗腫瘍および放射線性口腔粘膜障害の予防効果について明らかにすることを目的とした。口腔癌細胞株の細胞生物学的特性に対する影響についての検討においては、メラトニンの添加により増殖抑制傾向が認められたが、遊走、浸潤能に関しては有意な差は認められなかった。放射線照射による防護効果がある程度認められる傾向にあったが、明らかな有意差が認められず、今後はメラトニンの投与方法、投与量、投与時期等につき、さらなる検討が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

頭頸部領域の悪性腫瘍、とくに口腔癌の治療法は日々進歩を遂げている分野であるが、それらに伴う副作用や障害への対策については未だ十分であるとは言い難く、効果的な予防法や新たな補助療法の開発が望まれている。本検討によりメラトニンが照射による障害を軽減している可能性が示唆され、今後さらなる検討により腫瘍組織への放射線照射の効果に影響を及ぼさないこと、あるいはさらに直接的抗腫瘍効果を有することが明らかとなれば、今後増加、高齢化が予想されている口腔癌患者における抗癌治療完遂、抗癌治療効果の増強、そして治療後の患者のQOLの向上に大きく寄与することができるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：While the growth inhibitory effect of melatonin on various cancer cells has been reported, we have previously obtained research results suggesting a preventive effect on radiation-induced oral mucosal injury. In this study, we aimed to clarify the protective effect of melatonin on oral cancer cells and the preventive effect of radiation-induced oral mucosal injury. In the examination of the influence on the cell biological properties of the oral cancer cell line, the growth suppression tendency was observed in the addition of melatonin group, but no significant difference was found in the migration and invasion. Although the protective effect by radiation tended to be recognized, no significant difference was observed. It is necessary to further study the administration method, dose amount and period of melatonin.

研究分野：口腔外科学

キーワード：メラトニン 口腔癌 放射線防護

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

1. 研究開始当初の背景

(1) 超高齢社会を迎えたわが国では、癌患者の増加・高齢化がさらに進行すると予想される。口腔癌を含む悪性腫瘍に対する治療においては、今後より低侵襲な手術療法の適用に加えて、化学療法や放射線療法、免疫療法などの内科的治療が適応となる症例が増加するものと考えられている。

(2) 全身化学療法や頭頸部放射線療法に伴って発症する重篤な口腔粘膜障害は、患者の QOL を低下させるのみならず、治療の達成度をも左右する重要な因子となることから、口腔粘膜障害の発症予防、進行抑制、さらには効果的治療のための効果的手段を確立しておくことは重要な課題と言える。放射線治療に伴う口腔粘膜障害は、放射線照射により発生した活性酸素などのフリーラジカルが口腔粘膜細胞の DNA を損傷することにより惹起されると考えられていることから、放射線治療に伴う口腔粘膜障害の発症予防、進行抑制および治療には、フリーラジカルによる DNA 損傷を効果的に防止、抑制することが重要となる。われわれはこれまでに放射線性口腔粘膜障害の効果的な予防法、進行抑制法を模索してきた過程で、概日リズム調節ホルモンであるメラトニンが放射線性口腔粘膜障害をきわめて効果的に予防し得ることを強く示唆する研究結果を得た。主に夜間、松果体より分泌されるメラトニンは、現在までに体温調節作用、抗性腺作用、性周期調節作用、抗老化作用、免疫賦活作用、抗酸化作用などきわめて多彩な生理作用を有することが報告されている。また、興味深いことにメラトニンの生理作用の一つに抗腫瘍作用があげられる。これまでにメラトニンが、細胞の増殖、接着、遊走、浸潤、アポトーシスなどに関与することによりいくつかの腫瘍細胞に対して抑制的に作用するという報告が多数みられる。

以上のことは、メラトニンが放射線障害から正常細胞を防護しつつ、腫瘍細胞に対しては抑制的に作用し得ることを示すものであり、新規治療(補助)薬としてのメラトニンの可能性を強く示唆するものと考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、メラトニンが種々の口腔癌細胞に対しても抗腫瘍作用を有するか否か検討するとともに、これまでにわれわれが見出してきたメラトニンの口腔粘膜保護作用と抗腫瘍作用との関連をさらに具体的かつ詳細に検討することにより、in vivo において放射線性口腔粘膜障害の予防効果を発揮するか否かについて明らかにすることを目的に、口腔癌患者の放射線治療に際して、メラトニンが抗腫瘍作用および放射線防護作用を同時に発揮し得る新たな治療(補助)薬となる可能性について検討を行った。

3. 研究の方法

(1) 各種口腔癌細胞の細胞生物学的特性に対するメラトニンの影響について検討するため、in vitro における各種口腔癌細胞の増殖、遊走、接着、浸潤およびアポトーシスに及ぼすメラトニンの影響について検討する。対象とする口腔癌細胞株としては、口腔底扁平上皮癌由来の Ho-1-u-1 細胞、歯肉癌由来の Ca9-22 細胞、舌癌由来の HSC-4 細胞、SAS 細胞および HSC-3 細胞の 5 細胞株とし、RIKEN の細胞バンクより入手する。これらの細胞を通常に従って培養し、以下の検討に用いる。a. 各癌細胞の増殖に対するメラトニンの影響、b. 各癌細胞の遊走に対するメラトニンの影響、c. 各癌細胞の浸潤能に対するメラトニンの影響: CytoSelect (Cell Biolabs, inc) などの細胞浸潤アッセイを用いて、各細胞をプレートインサートの上段に播種し、メラトニンを培養中に添加することでインサート下段への細胞浸潤が阻害されるか否かについて検討する。d. 各癌細胞におけるアポトーシス誘導に対するメラトニンの影響: 各細胞を培養しコンフルエントに達した後、メラトニンを各種濃度で添加し、経時的に細胞を固定し、TUNEL 染色あるいは活性化カスパーゼを対象とした免疫細胞化学的手法により、アポトーシスを起こしている細胞数を確認することで、メラトニンが癌細胞のアポトーシスの頻度に及ぼす影響について検討する。

(2) (1)の結果を前提に、同様の検討を放射線照射した各種癌細胞株を用いて行う。放射線照射後の各種癌細胞株を通常に従って培養し、a. 各癌細胞の増殖に対するメラトニンの影響、b. 各癌細胞の遊走に対するメラトニンの影響、c. 各癌細胞の浸潤能に対するメラトニンの影響、d. 各癌細胞におけるアポトーシス誘導に対するメラトニンの影響について検討する。

(3) 口腔癌に対するメラトニンの抗腫瘍効果を in vivo において確認することを目的に、まず各口腔癌細胞株を用いて担癌モデルマウスを作製する。6 週齢、雄性の SCID マウスを用い、各種口腔癌細胞株を通常に従って培養後、PBS100 μ l およびマトリゲル 100 μ l と混和し、これをマウス背部皮膚に 1 か所ずつ注入し、注入後 2 日に一回、計 1 か月間にわたり腫瘍径を計測し、安定して腫瘍が形成される細胞濃度および移植法を決定し、各細胞を用いた担癌モデルマウスを確立する。

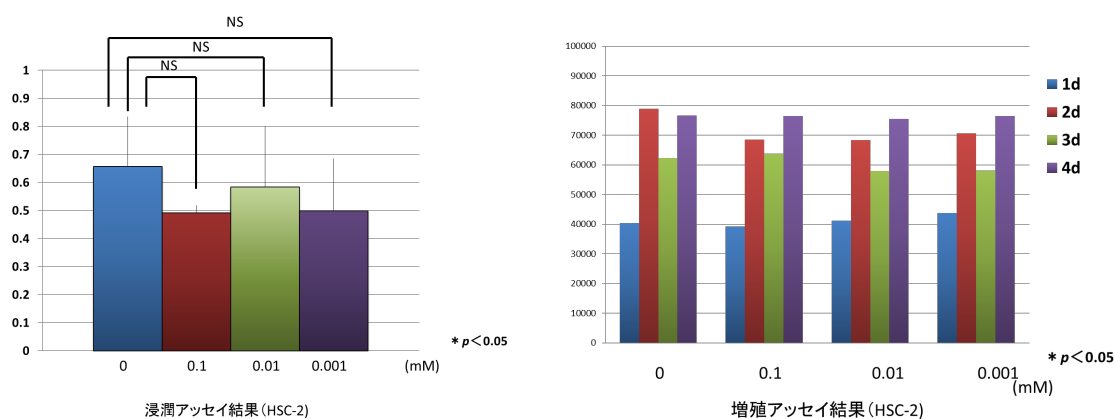
(4) さらに、担癌モデルマウスにおけるメラトニンの抗腫瘍効果と正常組織障害予防効果についての検討のため、得られた各担癌モデルマウスをメラトニン投与群と非投与群とに分け、それぞれの群の腫瘍部に放射線照射を行う。経時的に腫瘍の大きさを確認し、メラトニン非投与群における腫瘍に対する放射線照射の効果と、メラトニン投与群での放射線照射による効果に差があるか否か、すなわちメラトニン投与による抗腫瘍効果の増強あるいは減弱があるか否かについて検討する。その際腫瘍を周囲組織とともに回収し、詳細に検討する。またメラトニン投与群と非投与群で照射部周囲の正常皮膚における放射線障害の有無および程度について組織学的および免

疫組織化学的に検討し、メラトニンによる放射線障害予防効果が抗腫瘍効果とともに発揮されるか否かについて検討する。

4. 研究成果

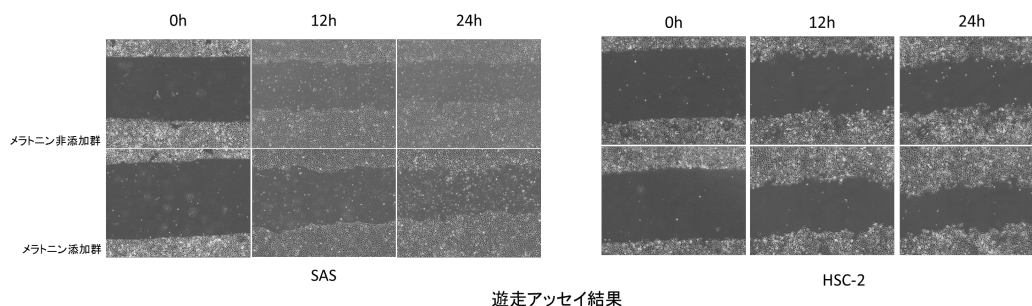
(1) 口腔癌細胞株の細胞生物学的特性に対するメラトニンの影響

各種細胞株について各種メラトニン濃度にて検討を行った。対象とする口腔癌細胞株を通常法に従って培養し、以下の検討に用いた。a. 各細胞の培養過程で各種濃度(0.1、0.01、0.001、0 : コントロール)のメラトニンを添加し、細胞増殖能の変化を細胞増殖試験により検討した。 b. スクラッチ後、種々の濃度のメラトニンを添加し、経時的に細胞が遊走してきた面積を計測、遊走に対するメラトニンの影響を検討した。 c. 各細胞をプレートインサートの上段に播種し、メラトニンを培養中に添加することでインサート下段への細胞浸潤が阻害されるか否かについて検討した。 d. TUNEL 染色および活性カスパーゼを対象とした免疫細胞化学的手法により、メラトニンが癌細胞のアポトーシス頻度に及ぼす影響について検討した。細胞増殖においてはメラトニンの添加により一部検討条件において増殖抑制傾向が認められたが、遊走、浸潤能に関しては有意な差は認められなかった。



(2) 放射線照射後口腔癌細胞株の細胞生物学的特性に対するメラトニンの影響

口腔癌細胞株の細胞生物学的特性に対するメラトニンの影響についての検討と概ね同様に細胞増殖においてはメラトニンの添加により若干の増殖抑制傾向が認められたが、遊走、浸潤能に関しては有意な差は認められなかった。



(3) 担癌モデルマウスにおけるメラトニンの抗腫瘍効果と正常組織障害予防効果についての検討

非照射群と照射群におけるメラトニン非添加と添加群で比較したところ、照射群でのメラトニン非添加群と比較して、メラトニン添加群では添加条件により照射による照射部周囲の正常粘膜における放射線障害が認められる傾向が低くなる群が認められた。これらのことからメラトニンが照射による障害を軽減している可能性が示唆された。一方、放射線照射による防護効果がある程度認められる傾向にあったが、明らかな有意差が認められなかったことから、今後はさらに口腔癌細胞への直接投与、また、放射線照射による口腔癌細胞への直接的な増殖抑制効果の評価方法の変更によるメラトニンの効果との鑑別、これらを踏まえたより効果的なメラトニンの投与方法、投与量、投与時期等につき、さらなる検討が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計6件)

戸田(徳山)麗子、井出信次、田所 晋、梅木泰親、竹部祐生亮、瀧居博史、寺田知加、館原誠晃、堤 千明、里村一人、口腔癌に対する新規温熱療法開発の可能性、第73回NPO法人日本口腔科学会学術集会、2019年5月19-21日、ウエスタ川越(埼玉県川越市)

戸田(徳山)麗子、大久保充、梅木泰親、田所 晋、井出信次、寺田知加、下間雅史、館原誠晃、里村一人、放射線性口腔粘膜障害に対するメラトニンの予防効果、第16回日本抗加齢医学会総会、2016年06月10-12日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

戸田(徳山)麗子、大久保充、梅木泰親、田所 晋、井出信次、寺田知加、下間雅史、館原誠晃、里村一人、放射線口腔粘膜障害に対するメラトニンの予防効果とそのメカニズムの検討、第26回日本口腔内科学会・第29回日本口腔診断学会合同学術大会、2016年09月23・24日、さん太ホール(岡山県岡山市)

福島龍洋、館原誠晃、竹部祐生亮、井出信次、戸田(徳山)麗子、里村一人、ヒト歯髄幹細胞シートの骨再生療法への応用の可能性、第16回日本再生医療学会総会、2017年3月7日、仙台国際センター(宮城県仙台市)

福島龍洋、館原誠晃、竹部祐生亮、井出信次、戸田(徳山)麗子、里村一人、骨再生におけるヒト歯髄幹細胞を用いた3次元細胞培養体の作成、第71回NPO法人日本口腔科学会学術集会、2017年4月26-28日(愛媛県)

井出信次、戸田(徳山)麗子、梅木泰親、田所 晋、館原誠晃、竹部祐生亮、寺田知加、福島龍洋、瀧居博史、里村一人、ウマプラセンタによる創傷治癒促進効果とその新規薬剤としての可能性、第71回NPO法人日本口腔科学会学術集会、2017年4月26-28日(愛媛県)

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：里村 一人

ローマ字氏名：(SATOMURA,kazuhito)

所属研究機関名：鶴見大学

部局名：歯学部

職名：教授

研究者番号(8桁)：80243715

研究分担者氏名：徳山 麗子

ローマ字氏名：(TOKUYAMA, reiko)

所属研究機関名：鶴見大学

部局名：歯学部

職名：学内講師

研究者番号(8桁)：20380090

研究分担者氏名：館原 誠晃

ローマ字氏名：(TATEHARA, seiko)

所属研究機関名：鶴見大学

部局名：歯学部

職名：講師

研究者番号（8桁）：90380089

研究分担者氏名：井出 信次

ローマ字氏名：(IDE, shinji)

所属研究機関名：鶴見大学

部局名：歯学部

職名：助教

研究者番号（8桁）：00611998

(2)研究協力者

なし

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。