

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K10088

研究課題名(和文) 口腔癌の化学療法誘発口腔粘膜炎に伴う顎骨露出メカニズムの解明

研究課題名(英文) Mechanisms of bone exposure of jaw associated with chemotherapy-induced oral mucositis in oral cancer

研究代表者

久保田 耕世 (Kubota, Kosei)

弘前大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：10529689

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：口腔粘膜炎での骨露出における歯肉線維芽細胞と腫瘍微小環境の癌関連線維芽細胞との相互作用の役割について検討した。TGF-betaシグナルは、線維芽細胞をがん関連線維芽細胞への誘導する上で重要な役割が示唆された。口腔粘膜炎モデルを作製し、歯肉線維芽細胞と比較したところ、COX-2、VEGFおよびMMP-1・9のmRNA発現が上昇した。この条件のcDNAマイクロアレイでは、3種のケモカインが発現上位10遺伝子に含まれていた。本研究により、重度の口腔粘膜炎や骨露出を引き起こすメカニズムに、口腔粘膜と腫瘍の微小環境における歯肉線維芽細胞が重要な役割を担っていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔粘膜炎での骨露出における歯肉線維芽細胞と腫瘍微小環境の癌関連線維芽細胞との相互作用の役割についての基礎的研究を行い、癌関連線維芽細胞誘導における癌微小環境のTGF-betaシグナルと、癌微小環境と正常歯肉線維芽細胞での炎症機序が口腔粘膜炎増悪に関与していることが示唆された。本研究で得られた結果を基にさらに腫瘍免疫学的研究を行い、口腔粘膜炎増悪と顎骨露出の制御に向けた研究を進めたいと考えている。

研究成果の概要(英文)：The role of interactions between gingival fibroblasts and cancer-associated fibroblasts in the tumor microenvironment in bone exposure in oral mucositis was investigated. TGF-beta signals were suggested to play an important role in inducing fibroblasts to become cancer-associated fibroblasts. In an oral mucositis model, expression of COX-2, VEGF, and MMP-1 and 9 mRNA were upregulated in gingival fibroblasts compared to gingival fibroblasts. The cDNA microarray of this condition showed that three chemokines were among the top 10 expressed genes. This study suggests that gingival fibroblasts in the oral mucosa and tumor microenvironment play an important role in the mechanism causing severe oral mucositis and bone exposure.

研究分野：口腔外科学

キーワード：口腔癌 口腔粘膜炎 癌微小環境 遺伝子発現

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

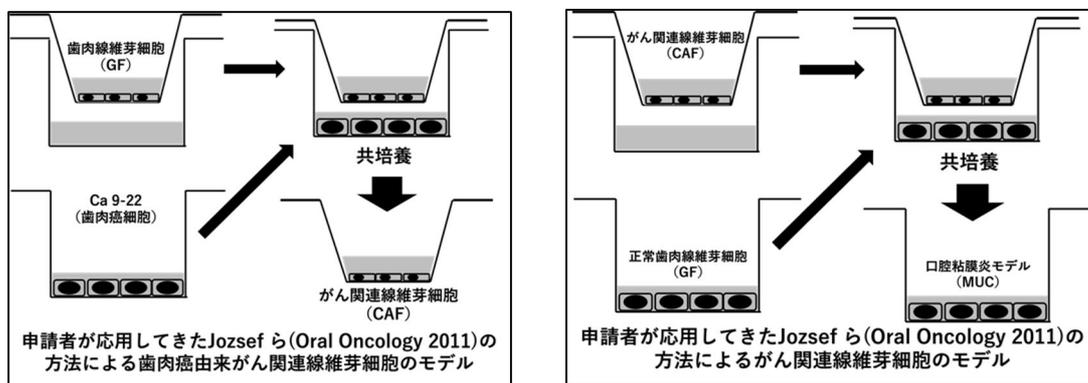
1. 研究開始当初の背景

近年口腔癌治療で化学療法や化学放射線療法の治療技術・成績は向上しているが、重篤な口腔粘膜炎の出現は必発である。歯肉・歯槽粘膜下には顎骨があり、口腔粘膜炎で顎骨の露出を伴うことがある。顎骨の露出は激しい疼痛を伴い、患者のQOLを著しく低下し、大量のオピオイドを用いた疼痛管理を必要とし、対応に苦慮することが多い。しかしながら、口腔粘膜炎の機序と顎骨露出のメカニズムについては依然として解明されていない。申請者はこれまで歯肉線維芽細胞やがん関連線維芽細胞の初期免疫応答能におけるRIG-Iの役割について研究を行っており、学術的独自性を有している。また、化学療法誘発口腔粘膜炎機序においてがん関連線維芽細胞のRIG-I発現や初期免疫応答能と正常歯肉線維芽細胞との相互作用を免疫学的に解析する本研究は独創的な研究であるといえる。申請者のこれまでの研究により、がん関連線維芽細胞は細菌・ウイルスの非感染依存的にサイトカインを産生し、正常歯肉線維芽細胞との相互作用により口腔粘膜炎が遅延し、骨露出を惹起することが予想される。本研究により口腔癌化学療法の重篤な副作用である口腔粘膜炎と顎骨露出の予防・治療法の開発に貢献することが期待され、本研究を行うに至った。

2. 研究の目的

顎骨露出を伴う口腔粘膜炎を制御するため、その発症機序におけるがん関連線維芽細胞と正常線維芽細胞の役割を免疫学的側面から解明することが目的である。

3. 研究の方法

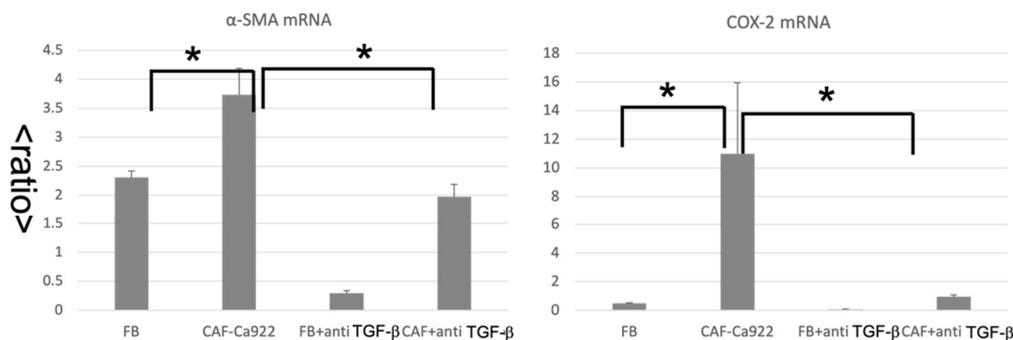


口腔癌細胞株としてCa9-22(歯肉癌)を使用した。

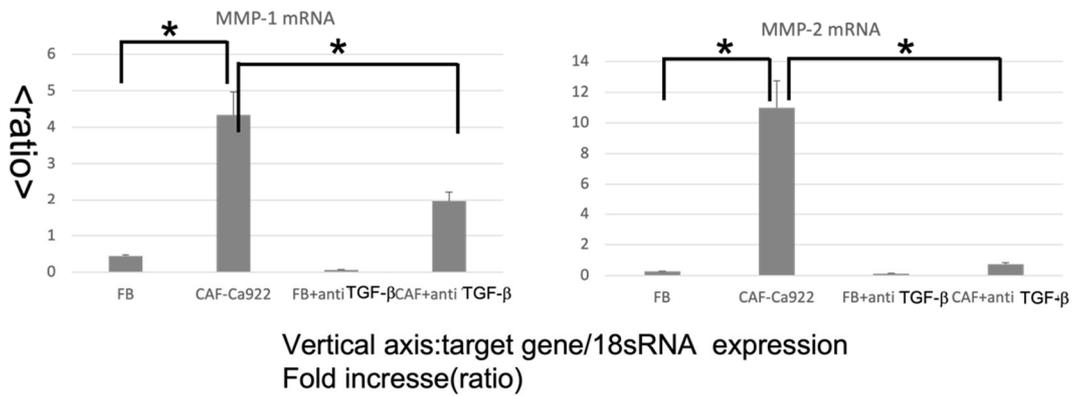
口腔癌細胞と正常歯肉線維芽細胞(GF)を培養用ディッシュで培養した後、Jozsefら(Oral Oncology 2011)の方法に従い、共培養ディッシュで1週間共培養を行い、がん関連線維芽細胞モデル(CAF)を作製する。CAFとGFを共培養してがん関連線維芽細胞と近接する線維芽細胞の口腔粘膜炎モデル(MUC)を作成した。その後、CAFとMUCでのがん免疫関連遺伝子のmRNAの発現を定量PCRで解析した。

4. 研究成果

1)FB(正常歯肉線維芽細胞)とCAF-Ca9-22(歯肉癌由来がん関連線維芽細胞)におけるTGF-βの役割について

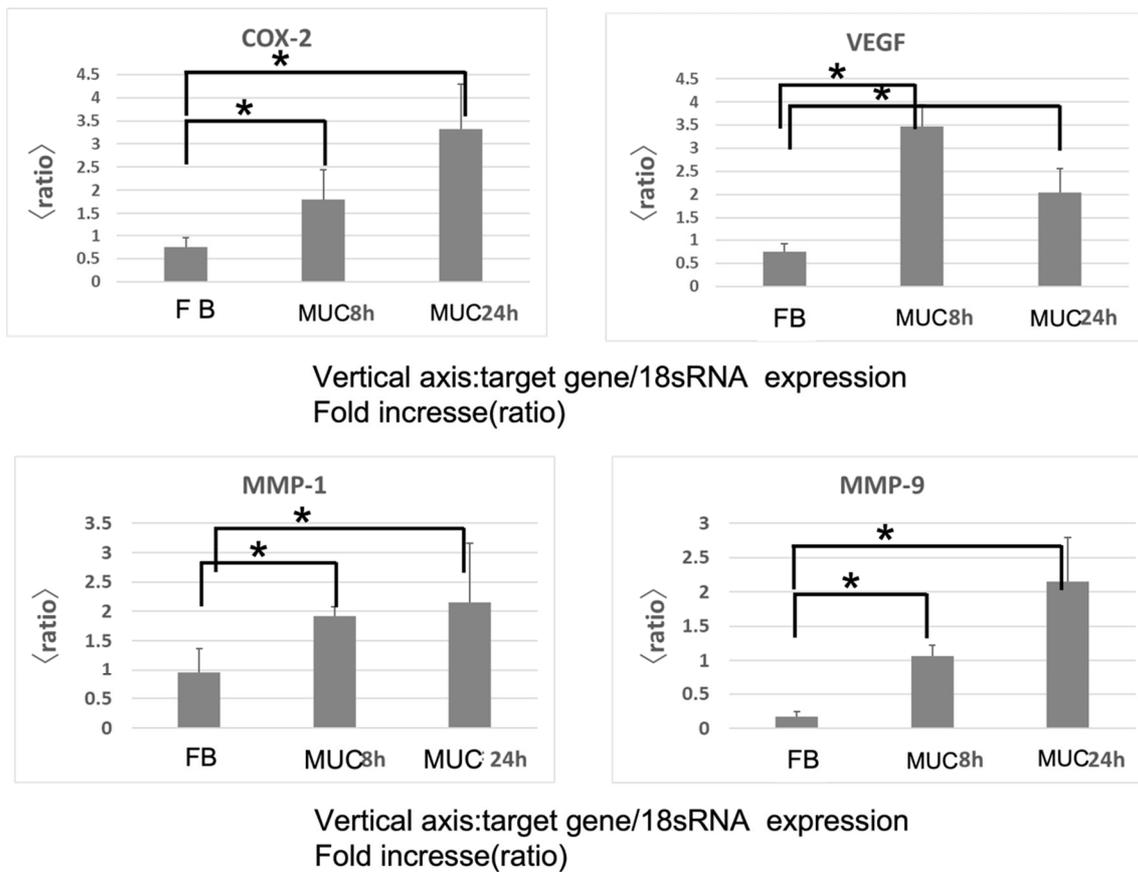


Vertical axis:target gene/18sRNA expression
Fold increase(ratio)



共培養によりFBと比較しCAFではCAFのマーカである α -SMA、炎症に関与するCOX-2、MMP-1、また癌の浸潤転移の際に基底膜を破壊するMMP-2が上昇した。その一方、抗TGF- β 抗体を添加したところ、 α -SMA、COX-2、MMP-1・2の低下が認められた。

2) 口腔粘膜炎症モデル(MUC)におけるCOX-2, VEGF, MMPの発現について



CAFとGFを共培養してMUCモデルを作成した。共培養を8時間施行したところ、COX-2, VEGF, MMP-1, MMP-9の発現上昇を認めた。また、24時間共培養したところ、VEGFは低下傾向にあったが、それ以外は発現が上昇していた。

3) MUCモデルのcDNA microarrayについて

2)の結果を基に共培養を24時間施行したMUCモデルとFBを用いてcDNA microarrayを施行し、と比較した。その結果、MUCモデルではFBと比較して以下の遺伝子発現に変化がみられた。35680遺伝子中、発現上昇上位10遺伝子としてCXCL8、LILRB1、MIR1302-6、MIR562、MIR4433A、LINC01284、CXCL3、CXCL5、LCE1A、MIR548Tが認められた。また、発現低下上位10遺伝子として、MIR548E、IGHD、MIR892A、MIR548C、OMD、MIR4797、CTSLP8、CTSLP8、LOC100505841、MAPK8IP1、APELAが認められた。

4) 考察

癌関連線維芽細胞モデルを作成し、共培養の際に抗 TGF- β 抗体を添加したところ、CAF のマーカーである α -SMA や CAF で発現が上昇していた COX-2、MMP-2 の低下が認められた。このことから癌微小環境において癌細胞と線維芽細胞が相互作用し癌関連線維芽細胞へと変化する際に TGF- β シグナルが重要な役割を担っていることが示唆された。

また、口腔粘膜炎モデルを作成のため、癌関連線維芽細胞と正常歯肉線維芽細胞の共培養を行った。その結果、炎症に關与する COX-2 や VEGF、MMP1・9 の mRNA 発現上昇が認められた。

また、口腔粘膜炎モデルの cDNA microarray を行い、ケモカインである CXCL8, CXCL3, CXCL5 が発現上昇上位 10 遺伝子に認められた。

以上のことから、癌細胞と歯肉線維芽細胞の TGF- β シグナルが癌微小環境において重要であり、また、歯肉癌の癌微小環境を構成するがん関連線維芽細胞に近接する正常歯肉線維芽細胞は COX-2、VEGF、ケモカインの発現誘導が促されることが示唆された。本研究を通して得た結果から、口腔癌の顎骨へ浸潤機序において癌微小環境と歯肉線維芽細胞をはじめとした歯周組織との相互作用が重要であると考えられた。本機序をさらに解明し、化学療法誘発口腔粘膜炎の顎骨露出機序を解明したいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kubota Kosei, Ito Ryohei, Narita Norihiko, Tanaka Yusuke, Furudate Ken, Akiyama Natsumi, Chih Chuang Hao, Komatsu Shotaro, Kobayashi Wataru	4. 巻 22
2. 論文標題 Utility of prognostic nutritional index and systemic immune-inflammation index in oral cancer treatment	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BMC Cancer	6. 最初と最後の頁 368
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12885-022-09439-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 久保田耕世、伊藤良平、成田紀彦、古舘健、福田はるか、秋山なつみ、小林恒
2. 発表標題 口腔癌動注化学放射線療法による好中球減少予防に対するベグフィルグラスチムの使用経験について
3. 学会等名 第40回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会について
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 久保田 耕世、伊藤 良平、田中 祐介、福田はるか、中川 祥、小林 恒
2. 発表標題 歯肉癌由来がん関連線維芽細胞の免疫学的応答能について
3. 学会等名 日本口腔科学会学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	松宮 朋穂 (Matsumiya Tomoh) (30344592)	弘前大学・医学研究科・助教 (11101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------