

令和 4 年 5 月 18 日現在

機関番号：17102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K23087

研究課題名（和文）器官培養法を用いた抗がん剤副作用回避モデルの構築

研究課題名（英文）Construction of anti-cancer drug side effect avoidance model using organ culture method

研究代表者

鮎田 亜実（Funada, Ami）

九州大学・歯学研究院・特別研究員

研究者番号：10888077

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：がん治療における化学療法は、上皮-間葉相互作用により形成される歯、唾液腺および味蕾などの様々な器官に副作用として甚大な影響を与える。Cyclophosphamide（CPA）はアルキル化剤として小児白血病の治療に用いられる。本研究では、器官培養システムを用いて、抗がん剤副作用が器官形成に与える影響を直接的に評価した。CPA添加により、正常な器官発生は阻害され、細胞死が引き起こされ、細胞増殖や分化が抑制された。そこで、本培養システムを用いて副作用の回避法を検討したところ、CPA添加による形成阻害は低温培養により回避できることを発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、抗がん剤による副作用は、低温により回避できる可能性が示された。近年、がん治療は飛躍的進歩を遂げており、がんサバイバーと呼ばれる人々が増えてきている一方で、彼らはがん治療による副作用との戦いを余儀なくされている。本研究成果は、がん治療後のQOLの回復の一助となるものであり、低温による副作用の回避が、抗がん剤による歯胚形成阻害や脱毛の予防に役立つ可能性が考えられる。

研究成果の概要（英文）：Chemotherapy has a large effect on organ formation, and causes serious side effects on organs formed by epithelial-mesenchymal interactions such as teeth, hair, salivary glands, and taste buds. Cyclophosphamide (CPA) is an alkylating agent commonly used in the treatment of childhood leukemia and induces cell death of cancer cells. In this study, we performed analysis using an organ culture system to directly observe the molecular mechanism of side effects on organs. Treatment of CPA inhibited the normal growth of tooth germs in the morphogenesis stage by inducing apoptosis and inhibiting the ability of proliferation and differentiation. Furthermore, we found that affected organs could be rescued in a low temperature stimulated environment during CPA treatment, avoiding the inhibition of organ morphogenesis and differentiation by CPA.

研究分野：口腔外科学

キーワード：器官培養 スクリーニングモデル 抗がん剤

## 1. 研究開始当初の背景

近年のがん研究の進歩により、様々ながんの生存率は飛躍的に向上してきた。生涯に、二人は一人は何かのがんにかかる時代において、手術、化学療法および放射線治療などを組み合わせることで、より高い生存率を獲得できるようになってきており、特に、胃がん、大腸がん、肺がんなどの比較的罹患率の高いがんは、多くの患者が生存可能になってきた。一方で、これまで治療が困難であったがんを克服し、生存もしくは延命可能な、がんサバイバーが増えてきており、がん患者は「がん」との戦いだけでなく、がん治療による「副作用」との戦いも余儀なくされている。治療中、治療後の副作用の克服、それに伴う QOL の獲得は、がん患者だけでなく医療者の負担軽減の意味においても、重要な課題であると考えられる。

## 2. 研究の目的

歯の形成不全が生じる抗がん剤として、小児白血病の治療に使われるシクロフォスファミド (CPA) がよく知られている。これまでの抗がん剤を用いた副作用の研究は実験動物を用いてその影響を確認する方法が用いられてきた。しかしながら、発生期における影響を見るためには、母体を通して胎仔に抗がん剤を作用させる必要があり、器官発生における直接的な影響をリアルタイムに解析することが困難であった。そこで本研究では、歯を培養皿上で生育させることのできる器官培養法を応用することで、抗がん剤の器官に与える直接的な影響を解析できる副作用検出モデルを構築し、その回避法を模索することを目的として研究を開始した。

## 3. 研究の方法

マウス胎仔歯胚を用いて、器官培養法を行い、CPA による歯胚形成阻害について検討を行った。さらに、培養温度を変化させることで、低温刺激における歯胚形成能の評価を行った。歯胚形成能の評価は、顕微鏡下での形態評価、免疫染色法、RT-qPCR 法および western blotting 法を用いて行った。

## 4. 研究成果

### 歯胚器官培養法による抗がん剤副作用モデルの構築

歯胚器官培養法を用いて、抗がん剤による歯胚形成阻害能の検討を行った。歯胚発生初期である胎生 14 日齢 (E14) マウス歯胚を摘出し、器官培養法にて培養したところ、7 日間で正常な歯胚形成が認められた。そこで、小児白血病の治療に使用される CPA を添加し、歯胚形成能を評価したところ、CPA 濃度依存的に歯胚形成が阻害された。次に、細胞分化期である E18 の歯胚を用いて、検討したところ、CPA による形態形成阻害は認められなかった。以上の結果から、CPA による歯胚形成阻害は、歯胚形成の時期に応じて引き起こされる可能性が示唆された。

### CPA による歯胚形成阻害

CPA による歯胚形成阻害の評価を行った。E14 歯胚を 3 日間培養し、形成された歯胚の大きさを評価したところ、CPA 添加群において、歯胚の幅、高さおよび厚さが有意に減少していた。さらに、CPA 添加群において、細胞増殖マーカーである Ki67 陽性細胞数が、上皮細胞および間葉細胞の両方において、減少していた。さらに、アポトーシスを示す TUNEL 陽性細胞が、CPA 添加群の上皮細胞および間葉細胞において増加していた。また、CPA 添加群において、細胞増殖抑制マーカーである p21 の発現の上昇を認めた。

次に、歯胚形成における分化マーカーについて、評価を行った。Amelogenin, Ameloblastin, AmeloD および Nkx2-3 について RT-qPCR 法を用いて遺伝子発現を確認したところ、CPA 添加群において、遺伝子発現の著しい減少を認めた。歯原性上皮細胞株 M3H1 を用いた実験においても、同様の結果を得られた。以上の結果から、CPA による歯胚形成阻害は、細胞増殖および分化を抑制し、アポトーシスが誘導されていることが判明した。

### 低温培養による CPA 歯胚形成阻害の回避

CPA による歯胚形成阻害を回避する方法を模索するため、歯の発生に重要とされる様々な増殖因子を添加してみたところ、歯胚形成阻害の回避は認められなかった。そこで、培養温度を調節することで、CPA による副作用の回避を試みた。25°C の低温条件で、器官培養を行ったところ、CPA 添加による歯胚形成阻害が回避され、正常な歯胚形成が認められた。

そこで、低温培養条件下におけるアポトーシス誘導および DNA damage の評価を行った。37°C 培養条件下において、CPA による TUNEL 陽性細胞および  $\gamma$ -H2AX 陽性細胞の増加を認めたが、25°C 培養条件下においては、認められなかった。以上の結果から、CPA による歯胚形成阻害は低温刺激によって回避できる可能性が示唆された。

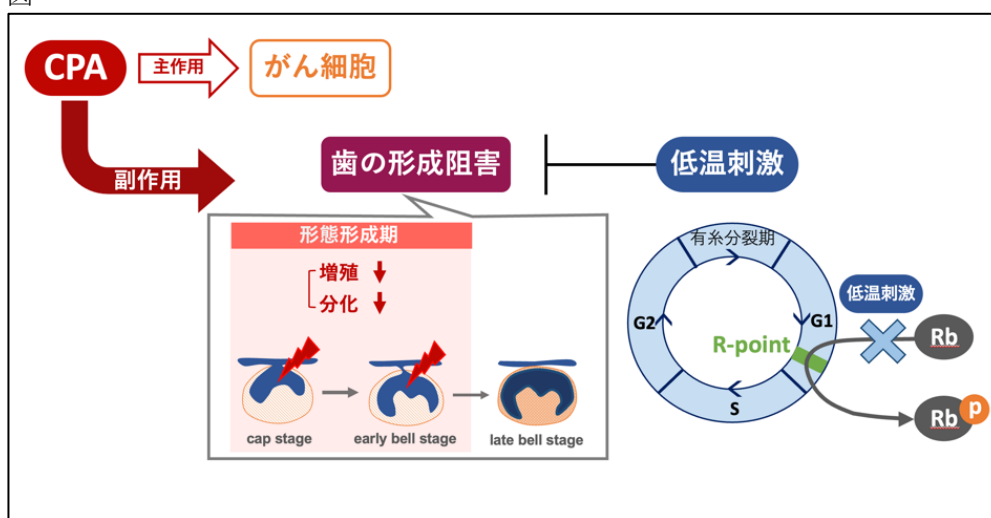
### 低温器官培養における細胞周期制御

低温により、CPA による歯胚形成阻害が回避できるメカニズムを解明するため、網羅的遺伝

子発現解析を行った。Gene ontology 解析の結果、低温刺激による歯胚形成阻害の回避には、アポトーシス、DNA damage および細胞周期 G1/S チェックポイント関連遺伝子の関連が認められた。そこで、G1/S 期チェックポイントに重要である Rb のリン酸化についてウェスタンブロッティング法にて解析を行った。37°C培養群において、6-12 時間後に Rb のリン酸化が認められるのに対し、25°C培養群においては、RB のリン酸化が認められなかった。この現象は、CPA 添加群においても同様であった。以上の結果から、低温刺激によって、細胞周期におけるチェックポイントを乗り越えられずに細胞周期が停止することで、CPA による DNA damage を回避できている可能性が示唆された。

本研究により、歯の形態形成期における抗がん剤の副作用は、低温刺激により回避できる可能性が示唆された。抗がん剤は、主作用としてがん細胞を死滅させる必要がある反面、副作用として細胞増殖が旺盛な器官に重要な副作用をもたらす(下図)。本研究成果は、25°Cという比較的臨床上応用可能な温度による副作用の回避の可能性を示し、今後の抗癌剤治療後の副作用回避による QOL 獲得に新たな可能性を示すものである。

図



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 Tian Tian, Miyazaki Kanako, Chiba Yuta, Funada Keita, Yuta Tomomi, Mizuta Kanji, Fu Yao, Kawahara Jumpei, Han Xue, Ando Yuna, Funada Ami, Yamada Aya, Iwamoto Tsutomu, Nakamura Seiji, Takahashi Ichiro, Fukumoto Satoshi, Yoshizaki Keigo	4. 巻 12
2. 論文標題 An ex vivo organ culture screening model revealed that low temperature conditions prevent side effects of anticancer drugs	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 3093
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-06945-7	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0件

〔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
研究協力者	吉崎 恵悟  (Yoshizaki Keigo)  (10507982)	九州大学・歯学研究院・助教   (17102)	

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