

令和 6 年 5 月 30 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K10255

研究課題名（和文）化学放射線療法時の口腔粘膜炎発生に関する機序の解明と新たな予防及び治療戦略

研究課題名（英文）Clarification of the mechanism of chemotherapy induced oral mucositis

研究代表者

玉木 直文（Tamaki, Naofumi）

鹿児島大学・医歯学域歯学系・教授

研究者番号：20335615

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：細胞モデルを用いて、レスベラトロールの抗酸化・抗炎症効果について検討した。口腔粘膜炎のin vitroモデルとして、培養ヒト歯肉上皮細胞株に、抗癌剤Cisplatin (CDDP)を投与した。その結果、CDDP投与によって活性酸素種の産生や炎症性サイトカインの増加が統計学的有意に認められたが、レスベラトロール投与によってこれらが抑制された。レスベラトロールはCDDPで誘導された口腔粘膜炎のin vitroモデルにおいて、抗酸化・抗炎症メカニズムを活性化することが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔癌の治療のために化学放射線療法を行うことが増えてきているが、その副作用として口腔粘膜炎（口内炎）が発症し、患者が摂食困難などなることなどが問題となっている。近年、化学放射線療法時に発生する口腔粘膜炎に酸化ストレスや炎症が関与していることが分かってきた。そこで本研究において、抗酸化物質の摂取によって酸化ストレスを制御することで、口腔粘膜炎の発症予防や進行抑制を行うことが出来るかの基礎的な研究を様々な観点から評価した。

研究成果の概要（英文）：Oral mucositis is a common adverse event associated with radio-chemotherapy against various cancers. Resveratrol is known to decrease oxidative damage and inflammation. We examined the protective effects of resveratrol on Cisplatin (CDDP) induced oxidative stress and inflammatory responses in normal human gingival epithelial cells as in vitro oral mucositis model in this study. Resveratrol suppressed CDDP induced overproduction of reactive oxygen species by upregulating anti-oxidant defense genes. Concerning inflammatory responses, resveratrol suppressed the CDDP induced expression of pro-inflammatory cytokines. Resveratrol might be useful for preventing CDDP induced oral mucositis by activating anti-oxidant and anti-inflammatory responses.

研究分野：予防歯科

キーワード：口腔粘膜炎 抗酸化物質 酸化ストレス 炎症

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年、活性酸素種(Reactive Oxygen Species; ROS)が過剰に増加し、体内の酸化ストレス状態を悪化させることで数多くの全身的な疾患の発症に関与することが知られている。活性酸素種は、宿主の防御反応として主に細胞から産生される。しかし過剰に産生された場合は、宿主組織のタンパク質、脂質や核酸(DNA)にもダメージを与えることが報告されている。健康な状態では、活性酸素種と抗酸化物質のバランスによって酸化ストレス状態が保たれているとされている。しかし様々な要因によって活性酸素種が過剰に増加し、抗酸化作用によって消去される以上の活性酸素種が生体内で発生した場合はDNA、タンパク質や脂質などを攻撃し損傷を与えるとされている。これらは細胞を構成している分子であり、酸化変性されることによって細胞の機能が障害されることも分かっている。

これまで主に行ってきた研究として、歯周病の進行と活性酸素種の増加との関連や歯周病治療による酸化ストレスの減少について報告してきた。これらの研究の結果は、歯周病が活性酸素種の過度な産生に関与し、血流の滞ることによって全身の臓器や疾患に影響を及ぼす可能性を示唆している。さらに酸化ストレスの影響は、口腔癌などの化学放射線療法時の副作用として発症する難治性口内炎や粘膜創傷にも及び、炎症性サイトカインや増殖因子と共に複雑かつ多様に関与することで重要な役割を果たしている。口腔癌における放射線療法や化学療法は、いわゆる活性酸素種を産生させることで癌細胞にアポトーシスを引き起こさせるが、同時に正常な口腔上皮細胞にも悪影響を及ぼし、口内粘膜炎を起こすことも分かってきた。口腔癌患者に化学放射線療法を行った場合、ほぼ100%の確率で口腔粘膜炎が発症するが、治療中に良化することはなく悪化の一途をたどる。発症後は摂食機能の低下を引き起こし、重症の場合は胃瘻になるなど患者のQOLも急速に低下する。

口腔粘膜炎の発症メカニズムにおいてはまだ不明な点が多いが、病態として第1期：開始期、第2期：シグナル伝達期、第3期：シグナル増幅期、第4期：潰瘍期、第5期：回復期の5つのプロセスに分類されることが知られている。特に開始期である第1期において、活性酸素種が重要な役割を果たすことも分かってきている。口腔癌における放射線療法や抗癌剤は、いわゆる活性酸素種を産生させることで癌細胞にアポトーシスを引き起こさせるが、同時に図の様に正常な口腔上皮細胞に口内粘膜炎を起こすことが分かってきた。その原理として、放射線治療や抗癌剤を用いた化学療法を行うと細胞内に活性酸素種が過剰に発生することで細胞のDNAが損傷し、アポトーシスを引き起こすと考えられている。さらに第2・3期において、過剰に産生された活性酸素種によって血管内皮細胞、線維芽細胞、上皮細胞やマクロファージが活性化しNF- $\kappa$ Bを放出する。その結果、IL-1、IL-6やTNF- $\alpha$ などの炎症性サイトカインが大量に放出され、細胞のアポトーシスを引き起こす。この組織障害が、さらなる炎症性サイトカイン放出を誘導し、粘膜細胞の障害が増幅されることで、口腔粘膜炎がさらに増悪すると考えられている。以上のように、口腔粘膜炎の発症機序についてはだんだんと分かっているが、治療法としては物理的な病変部保護や疼痛緩和などの対症療法が行われているのが現状である。有効な治療法は未確立なため、新規の治療法の開発が期待されている。

### 2. 研究の目的

口腔粘膜炎の発症機序についてはこれまで数多く研究されてきているが、その詳細についてはまだまだ不明な点が多い。酸化ストレスや分子生物学的見地から検討した研究はまだまだ少なく、特に口腔粘膜炎において酸化ストレスとの関連性に着目した研究はほとんどみられない。口腔粘膜炎に酸化ストレスの上昇が関与していることが分っても、その対処方法がないことには発症予防は難しい。特に抗酸化物質の摂取によって酸化ストレスを制御し、口腔粘膜炎の発症抑制・進行抑制を評価することはほとんど研究されていない。よって本研究では、抗酸化物質の使用によって酸化ストレスを制御し、口腔粘膜炎の発症を予防・進行抑制することを主目的とする。特に、化学放射線療法時に発症する口腔粘膜炎を想定して、口腔上皮細胞を用いて研究を遂行する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 細胞培養

ヒト歯肉上皮細胞をKeratinocyte serum-free mediumを用いて5% CO<sub>2</sub>, 37℃で培養した。

#### (2) 細胞毒性試験

96ウェルプレートに播種後、各試薬添加24・48・72時間後に細胞毒性を評価した。WST-1を用

いた細胞毒性の測定は、標準プロトコル通り 450nm で吸光度を測定した。

### ( 3 ) 活性酸素種測定

活性酸素種の産生量は、CellROX Green 試薬を用いて標準プロトコル通り 15 分間反応させ、蛍光顕微鏡で観察するとともに、蛍光分光光度計を用いて励起波長 485nm / 発光波長 520nm で測定した。また核対比染色には Hoechst 33342 を用いた。

### ( 4 ) ELISA

細胞を各条件で反応させたのちに培養上清を採取し、遠心後に上清を回収した。各炎症性サイトカイン用の ELISA キットを用いて、標準プロトコル通りに測定を行った。各サイトカイン濃度は、スタンダード直線から計算した。

### ( 5 ) real-time PCR

Trizol 試薬を用いて標準プロトコル通りに細胞から RNA を抽出し、cDNA に逆転写した。SYBR グリーンを用いて real-time PCR 法によって遺伝子発現レベルを定量した。mRNA 発現レベルは GAPDH で標準化し、対照群を 1 として計算した。

### ( 6 ) 統計分析

各群の比較には、one-way analysis of variance (ANOVA) と Tukey ' s post hoc test を用いた。

## 4 . 研究成果

### ( 1 ) 細胞毒性試験

まずレスベラトロールのみ添加した場合の細胞毒性について検討した。1 ~ 100  $\mu$ M の間の様々な濃度のレスベラトロールを単独で投与したところ、10  $\mu$ M を超えた濃度では細胞毒性を示したため、今後の実験では 10  $\mu$ M 以下の濃度を用いて研究を遂行することとした。

次に、抗癌剤である Cisplatin (CDDP) の歯肉上皮細胞に対する細胞毒性実験を行った。0.5 ~ 10  $\mu$ g / ml の様々な濃度の CDDP を、96 ウェルプレートにまいた歯肉上皮細胞に投与し、24 時間・48 時間・72 時間後に、それぞれの細胞毒性の測定を行った。その結果、24 時間後における、CDDP 3  $\mu$ g / ml が今後の研究を進めていく上で最適な実験条件であることが分かった。

さらに CDDP 3  $\mu$ g / ml とレスベラトロールを同時に投与する実験を行ったところ、レスベラトロールの濃度が 5  $\mu$ M と 10  $\mu$ M において有効であることが認められた。

### ( 2 ) 活性酸素種

CellROX green を用いた蛍光発色による活性酸素種の発生量は、CDDP 投与によって対照群よりも有意に増加した。しかし抗酸化物質であるレスベラトロール(5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M)の添加によって、有意に活性酸素種の発生量が減少した。また、蛍光顕微鏡での写真を下に示す。

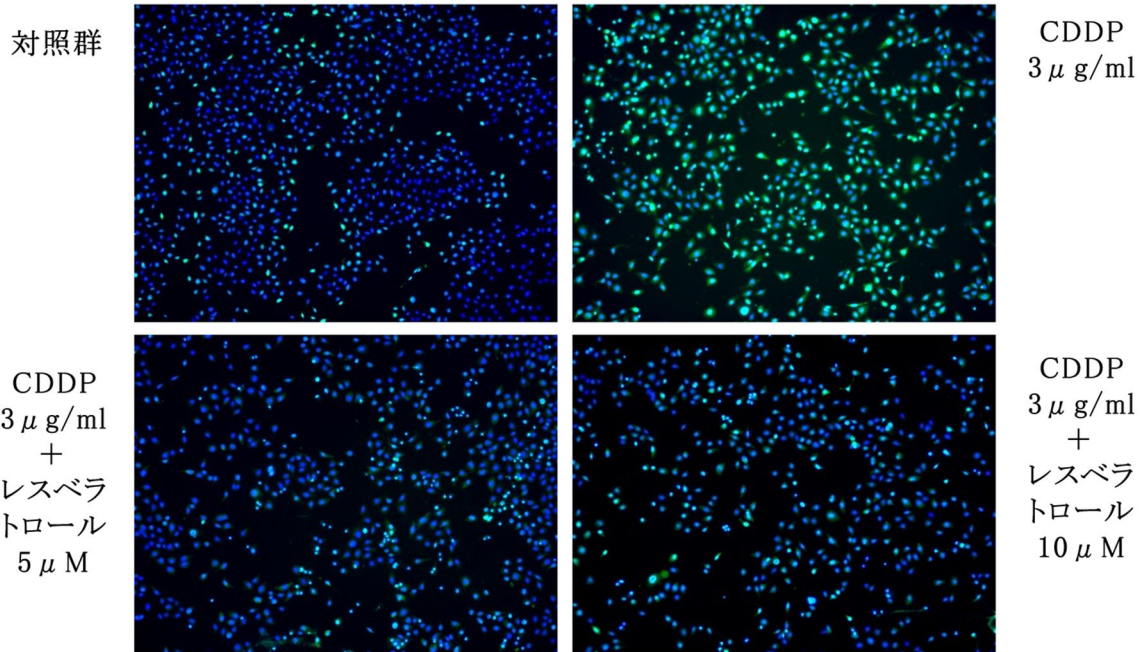


図 1. 活性酸素種の蛍光染色像

#### (5) 炎症性サイトカイン

炎症性サイトカインである interleukin (IL)-1 と IL-6 の遺伝子発現レベルを mRNA レベルで、タンパク質レベルでは ELISA を用いて測定した。

CDDP 投与によって mRNA レベルでの IL-1 と IL-6 のいずれも統計学的有意に増加していた。しかしレスベラトロールを添加したところ、これらの炎症性サイトカインの遺伝子発現レベルは、濃度依存的に抑制されていた。

また ELISA を用いたタンパク質レベルでは、CDDP 投与によって IL-1 と IL-6 のいずれも統計学的有意に増加していた。しかしレスベラトロールを同時に添加したところ、これらの炎症性サイトカインのタンパク質レベルでの産生量は、統計学的有意に減少していた。またその減少量は、濃度依存的に抑制されていた。

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 Shu Chen, Naofumi Tamaki, Yasusei Kudo, Takaaki Tsunematsu, Kaname Miki, Naozumi Ishimaru and Hiro-O Ito	4. 巻 69
2. 論文標題 Protective effects of resveratrol against 5-fluorouracil-induced oxidative stress and inflammatory responses in human keratinocytes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition	6. 最初と最後の頁 238-246
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3164/jcbn.21-23	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 玉木直文, 三木かなめ, 伊藤博夫
2. 発表標題 ヒト歯肉上皮細胞における抗癌剤による有害事象へのレスベラトロールの効果
3. 学会等名 第71回 日本口腔衛生学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 玉木直文, 陳 舒, 三木かなめ, 伊藤博夫
2. 発表標題 口腔粘膜炎のin vitroモデルにおけるレスベラトロールの抗酸化・抗炎症効果
3. 学会等名 第70回 日本口腔衛生学会総会
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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------