

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 22 日現在

機関番号：11101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23792308

研究課題名（和文）化学療法誘発口腔粘膜炎の革新的治療法の開発に向けた RIG-I の機能解析

研究課題名（英文）The study on RIG-I function analysis for establishment of innovative therapy for mucositis induced by chemotherapy

研究代表者

久保田 耕世 (KUBOTA KOSEI)

弘前大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10529689

研究成果の概要（和文）：本研究では RIG-I を介した感染防御機構を応用し、化学療法誘発口腔粘膜炎の新規治療法に向けた基礎的研究を行うことを目的とし、研究を行った。歯肉線維芽細胞を培養後、ドセタキセルを添加後に LPS ならびに polyIC を添加し、RIG-I ならびに炎症性サイトカインの mRNA 発現を検討した。その結果を基に cDNA マイクロアレイにより自然免疫関連遺伝子の解析したところ、1 型インターフェロンの発現上昇が認められた。歯肉線維芽細胞において RIG-I を介した自然免疫応答能が化学療法誘発口腔粘膜炎の機序に一部役割を担っていることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to establish new therapy of oral mucositis induced by chemotherapy. Cultured human gingival fibroblasts were stimulated with docetaxel, LPS and polyIC, and examined the expression of RIG-I and inflammatory cytokines mRNA. The cDNA microarray indicated the expression of type I interferon. RIG-I may have some roles in pathogenesis of oral mucositis induced by chemotherapy in gingival fibroblasts.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：歯学・遺伝子・口腔粘膜炎

## 1. 研究開始当初の背景

近年口腔癌治療において化学療法や化学放射線療法が用いられ、治療効果が認められている。その一方、口腔癌に対する化学療法や化学放射線療法では口腔粘膜炎の出現は必

発であり、摂食障害や重篤化すると敗血症を引き起こし致死的状态となる。化学療法の直接作用による口腔粘膜炎の機序については、Sonis ら (Nat Rev Cancer 2004) が報告しており、潰瘍形成前のシグナル期に各種サイトカ

インの産生が行われ、潰瘍期に細菌・ウイルスが関与し、それに伴い粘膜炎が増悪し治癒が遅れると考えられている。しかしながら、その機序は十分に解明されていないのが現状である。研究者は、口腔粘膜の代表的な構成細胞である歯肉線維芽細胞の免疫応答能に関し研究を行ってきた。その中でも病原体認識レセプターの 1 つである Retinoic acid-inducible gene-I (RIG-I) に着目し、研究を行った。その結果、細菌感染やウイルス感染で RIG-I 遺伝子発現、タンパク産生が上昇すること、また、RIG-I は一部の炎症性サイトカインの発現にも関与し、感染防御における初期免疫応答で重要な役割を担っていることが明らかになった (Sakaki et al, Oral Microbiol Immunol 2005, Kubota et al. Oral Microbiol Immunol 2006. )。これまでの研究と臨床的にも線維芽細胞から構成される角化上皮が薄い可動粘膜が化学療法誘発口腔粘膜炎の必発部位であることから、歯肉線維芽細胞の役割、特に感染防御機構に関与する RIG-I が化学療法誘発口腔粘膜炎の過程で重要な役割を果たしていると推測された。そこで研究者は歯肉線維芽細胞の RIG-I が化学療法の直接作用による口腔粘膜炎に関連する事を解明し、それをもとに RIG-I を応用した画期的な新規化学療法誘発口腔粘膜炎の治療法開発への基礎研究に着目した。

## 2. 研究の目的

研究者はこれまで歯肉線維芽細胞における RIG-I の感染防御機構について研究を行っており、その研究結果をもとに以下の点を検討し、RIG-I の化学療法誘発口腔粘膜炎における役割とその機序を解明し、新規治療法へと展開できる基礎的研究を行うことを目的とする。

(1) 抗悪性腫瘍剤添加による歯肉線維芽細胞の RIG-I 遺伝子発現を検討する (口腔粘膜

炎のシグナル期を想定)。

(2) 抗悪性腫瘍剤添加後の細菌感染やウイルス感染による歯肉線維芽細胞の RIG-I 遺伝子発現について明らかにする (口腔粘膜炎の潰瘍期初期を想定)。

(3) 抗悪性腫瘍剤添加と細菌感染やウイルス感染による歯肉線維芽細胞の RIG-I を介したサイトカインの発現・産生について明らかにする (口腔粘膜炎の潰瘍期後期を想定)。

## 3. 研究の方法

(1) 抗悪性腫瘍剤の口腔癌細胞への効果について

口腔癌細胞を培養用ディッシュで培養した後、培養上清中に様々な濃度のドセタキセルを添加し、細胞増殖試験を行い、抗悪性腫瘍剤の最適添加濃度を決定した。

(2) 抗悪性腫瘍剤添加による歯肉線維芽細胞における RIG-I 発現について (口腔粘膜炎のシグナル期に相当)

(1) で決定した濃度の抗悪性腫瘍剤を培養歯肉線維芽細胞に添加し一定時間培養の後 Total RNA を回収し、一本鎖 cDNA を合成する。その後、RIG-I 並びに各種サイトカインの mRNA 発現・タンパク産生を検討し、歯肉線維芽細胞の応答する最適条件を検討した。

(3) 抗悪性腫瘍剤並びに細菌・ウイルス感染による RIG-I 発現について (口腔粘膜炎の潰瘍期に相当)

(1) と (2) の結果を基に、抗悪性腫瘍剤添加後の歯肉線維芽細胞に LPS (細菌感染を想定)、polyIC (ウイルス感染を想定) を添加する。一定時間培養の後、一本鎖 cDNA を合成し RIG-I 並びに各種サイトカインの mRNA 発現・タンパク産生を検討した。

(4) cDNA マイクロアレイによる化学療法誘発口腔粘膜炎での歯肉線維芽細胞の役割を検討

(3) の結果を基に最適条件により歯肉線維芽細胞の cDNA マイクロアレイを施行し、自然免疫応答に関与する遺伝子を中心に網羅的に解析した。

#### 4. 研究成果

1) 歯肉線維芽細胞におけるドセタキセルならびにシスプラチン刺激による RIG-I 発現について

ドセタキセルならびにシスプラチンを歯肉線維芽細胞に添加し、RIG-I mRNA 発現を検討したところ、軽度発現上昇が認められた。両群で比較したところ、ドセタキセル添加群での発現が優位であった。また、炎症性サイトカインの発現についても検討したところ、ドセタキセル添加群が優位に発現していた。以降の本研究はドセタキセルを用いて行うこととした。

(2) ドセタキセルならびに LPS または polyIC 添加による RIG-I ならびに各種サイトカインの mRNA 発現について

(1) の結果を基に歯肉線維芽細胞にドセタキセル添加後に LPS または polyIC を添加し、検討したところ、RIG-I の mRNA 発現は、ドセタキセル単独では発現傾向ではないが、LPS や polyIC 刺激ではドセタキセル非添加群と比し、発現傾向にあった (図 1)。また、ドセタキセル添加群では炎症性サイトカインの mRNA 発現が上昇した。

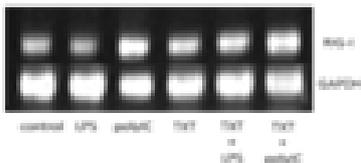


図 1

(3) cDNA マイクロアレイによるドセタキセルならびに LPS または polyIC 添加による自然免疫関連遺伝子の解析。



表 1

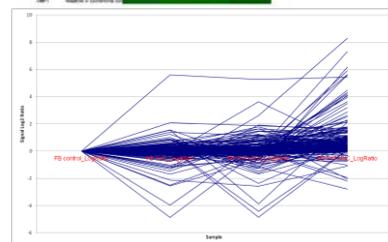


図 2

その結果、自然免疫に関与する 1 型インターフェロンを中心とした遺伝子の mRNA 発現上昇が認められた (表 1, 図 2)。これまでの研究で施行した歯肉線維芽細胞に RIG-I 遺伝子導入した cDNA マイクロアレイを再検討したところ、同様の傾向があり、タキソテール添加後の LPS または polyIC 添加刺激による 1 型インターフェロンの mRNA 発現に RIG-I の関与が示唆された。

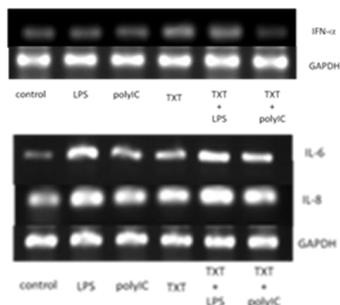


図 3

また、一部の炎症性サイトカインも同様に発現上昇していることから (図 3)、歯肉線維芽細胞において RIG-I を介した自然免疫応答能が化学療法誘発口腔粘膜炎の機序に一部役割を担っていることが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

① 小林 恒・佐藤 寿・榊 宏剛・中川 祥・久保田 耕世・成田憲司・今 敬生・成田 紀彦・鄭 明源・木村 博人  
 口腔癌頸部リンパ節転移に対するドセタキセルとネダプラチンによる超選択的動注を用いた化学放射線療法の有効性  
 日本口腔科学会雑誌 61 巻 1 号、2012、8-15

[学会発表] (計 3 件)

① 久保田 耕世 他  
 Weekly Docetaxel 静注併用放射線療法を施行した高齢者頭頸部癌 5 症例の検討  
 第 56 回日本口腔外科学会総会・学術大会  
 2011 年 10 月 21 日 (大阪)

② 榊 宏剛・松宮 朋穂・久保田 耕世・中川 祥・小林 恒・木村 博人  
 RIG-I は口腔癌由来細胞株において細胞周期の制御に関与する  
 第 56 回日本口腔外科学会総会・学術大会  
 2011 年 10 月 21 日 (大阪)

③ 小林 恒・佐藤 寿・榊 宏剛・久保田 耕世・今 敬生・中川 祥・成田 紀彦・木村 博人・鄭 明源  
 進行口腔癌に対する動注化学放射線療法後の放射線性顎骨壊死に関する臨床的検討

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

久保田 耕世 (KUBOTA KOSEI)

弘前大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10529689