

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23792496

研究課題名(和文) 口内炎モデルを用いた創傷治癒過程促進のメカニズムの解析

研究課題名(英文) Analysis study for wound healing process of oral mucositis

研究代表者

細川 亮一 (Hosokawa, Ryoichi)

東北大学・歯学研究科(研究院)・講師

研究者番号：40547254

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：がん治療の副作用の一つである口腔粘膜炎を軽減、または抑制する効果が期待出来る薬剤の効果とその作用機序に関する検索を行った。臨床的に口内炎に効果がある事がわかり、保健収載もされている半夏瀉心湯の効果について検討を行ったところ、投与群で有意に症状の軽減が認められた。また、細胞培養によるスクラッチテストでは、投与によって上皮細胞の細胞増殖能が亢進している事が認められた。一方でスクラッチテストによる細胞遊走能は、添加によって抑制されている事が示された。この事から、半夏瀉心湯は、口腔粘膜の強度を挙げ、潰瘍形成を抑制する働きを有しているが、創傷治癒そのものを亢進する可能性は低い事が考えられた。

研究成果の概要(英文)： We researched the effect of medication reducing or prohibiting oral mucositis, which is one of severe side effect of chemotherapy and radiotherapy for cancer. It was saying that Hangeshashintou, TJ14 has effect for oral mucositis clinically. Our research indicated this medication inhibited the exacerbation of oral mucositis during radiotherapy for head and neck cancer. We also investigated the pharmacological action of Hangeshashintou by TR146, oral epithelial cell line, culture system. Cell proliferation was increasing on dose-dependent manner. On the other hand, migration assay indicated that Hangeshashintou prohibited cell migration on dose-dependent manner.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会系歯学

キーワード：口内炎 創傷治癒 抗がん剤 分子生物学

## 1. 研究開始当初の背景

日本人の死亡原因で最も多いものの一つに悪性腫瘍がある。近年の医療技術ならびに治療薬の進歩に伴って、がん患者の社会復帰を目指した治療が行われている。また、抗癌剤の進歩は目覚ましく、外来通院においても治療が可能となっている。その一方で、その副作用も複雑になってきており、多職種によるがん支持療法の重要性が増してきている。化学療法や放射線療法中の重篤な副作用の一つに口腔粘膜炎が挙げられる。その発現頻度は、頭頸部がんへの照射では100%、がん化学療法で40~70%である。口腔粘膜炎が増悪した場合、経口摂食を行うことが出来ず胃瘻を行わなくてはならず、更には、下痢によって栄養補給が困難となり、体力低下による治療中断の場合もある。その為、口腔粘膜炎の予防と症状の軽減の為に取り組みが積極的になされている。その取り組みには、口腔ケアによって口腔を清潔に保つ事や術前の歯科治療等、歯科の関わりが重要である事が認識されている。また、口腔粘膜炎の予防と治療を目的とした投薬について研究が進められている。海外ではhuman recombinant KGF製剤であるpaliferminや食品であるハチミツが口腔粘膜炎の軽減に有効である報告がなされてきた。

## 2. 研究の目的

本研究では、今まで口内炎に効果があると言われている治療薬がどのように口内炎の治癒過程(創傷治癒過程)を促進するかそのメカニズムを解明することを目的としている。

- (1)放射線治療における半夏瀉心湯の効果について検討を行う。
- (2)ポラプレジンの効果と創傷治癒における薬理効果
- (3)半夏瀉心湯の創傷治癒における薬理効果  
これらの作用機序を明らかにする事で、薬の口腔粘膜炎への効果と安全性、医療経済学的な利益、つまり入院期間の短縮の可能性等が

明らかとなり、がん支持療法を歯科として支えていく基礎となるデータを採取する事を本研究の最終的な目的としている。

## 3. 研究の方法

(1)臨床において使用している半夏瀉心湯の効果について、非投与群8名、投与群8名後ろ向き追跡調査を行った。口腔粘膜炎の判定はNCI-CTCAE Version3.0による分類に基づいて行った。2群間に年齢、性別、疾患の偏りが無いように患者の抽出を行った。

(2)細胞は口腔粘膜上皮由来のTR146と腎上皮細胞由来のHEK293細胞による創傷治癒モデルにおける口腔粘膜炎改善の機序に関する研究

HEK293細胞培養におけるポラプレジンの薬理作用についてスクラッチテストにおける添加実験を行い、細胞動態を観察した。

[1] BrdUの取り込みによる細胞増殖能を観察

[2] 免疫染色によるアクチンフィラメントの発現様式の変化を観察

TR146細胞培養における上皮化の機序における半夏瀉心湯の薬理効果について、細胞遊走能を観察した。

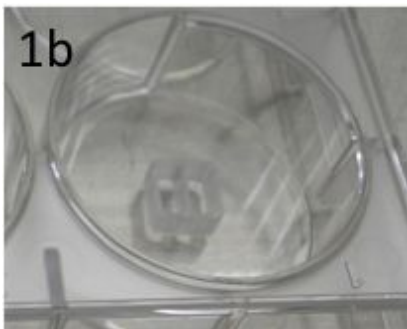
[1] 半夏瀉心湯添加による細胞増殖能をBrdUの取り込みにて観察

[2] スクラッチテストによる細胞遊走能試験

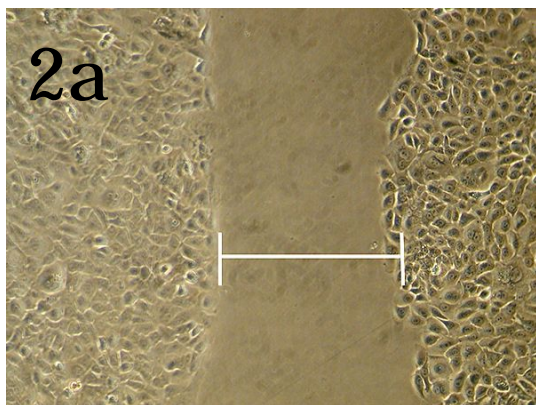
### スクラッチテストの概要

図1aと図1bに示すようにファルコン社製6穴の培養皿に日本ジェネティクス社製の創傷治癒モデル用カルチャーインサートを挿入し、 $4 \times 10^5$  cells / mlの細胞を含んだ培養液を左右のチャンバー(図1b)に70  $\mu$ lづつ加えて24時間培養を行い、インサートを除去した。図2のaに示すよ

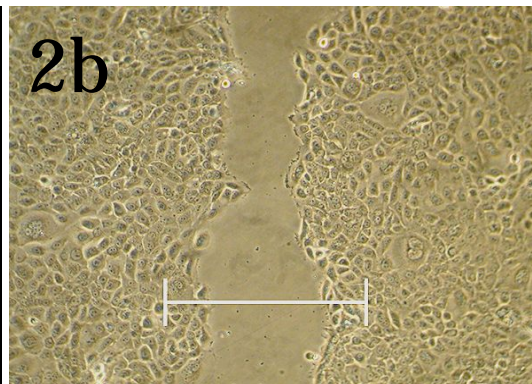
うに0時間においておよそ400umの幅の傷を再現性良く作成出来る。(このキットを使用する前は、スクラッチテストにおける再現性が最大の問題であった) その後、0 ug/ml、10 ug/ml、100 ug/ml、250 ug/mlの濃度の半夏瀉心湯を含んだ細胞培養液を加え、4時間後、12時間後、24時間後の傷の幅を測定した(図2b)



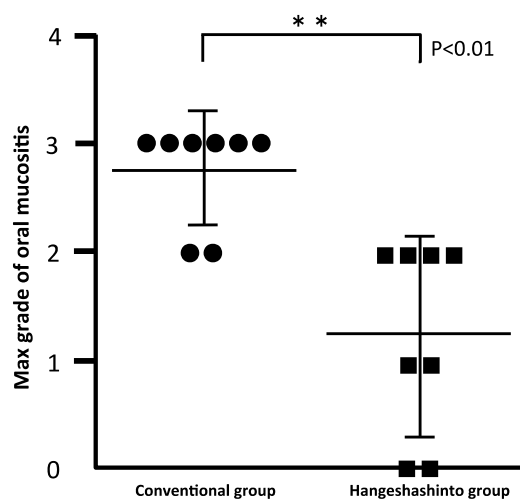
#### 4. 研究成果



(1) 臨床における後ろ向き調査では、最大の口内炎のグレードが、半夏瀉心湯投与群において有意に低下している事が示された(グラフ1)。この事は、頭頸部がんに対する放射線治療の副作用としての口腔粘膜を、半夏瀉心湯が抑制する事を示唆している(グラフ



1)。

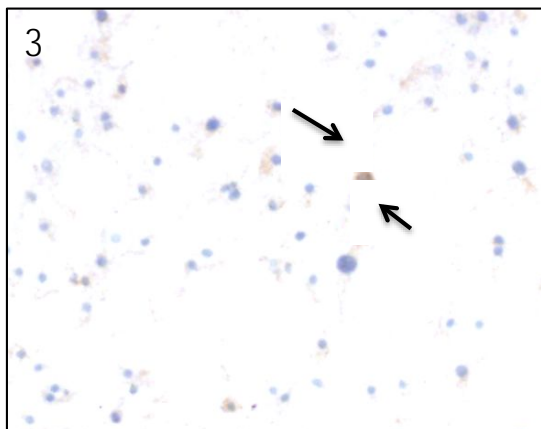


グラフ1

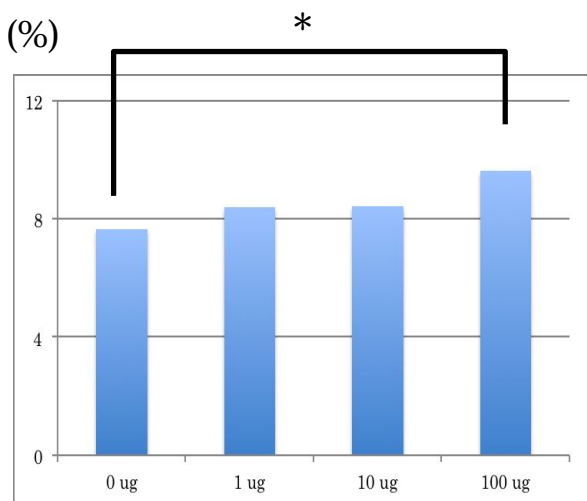
(2) HEK293 に対するポラプレジンクの添加による細胞増殖能は、添加群においてスクラッチ周辺の細胞の密集度が増加し、スクラッチ部がコントロール群と比べると早く細胞で満たされた。この、細胞密度が上がる機序として細胞増殖能を BrdU の免疫染色で確認したところ、添加群において細胞増殖が盛んになっている事が示された。また、アクチンフィラメントの免疫染色において添加群とコントロール群を比較すると、細胞膜周囲の発現が、コントロール群では鮮明であるのに対して、添加群では不鮮明となっており、発現様式の変化が認められた。このアクチンフィラメントの発現様式の変化は、二重染色で BrdU の取り込み一部一致しており、細胞分裂に伴う変化であると考えられた。このように、ポラプレジンクが、局所において、上皮細胞の増殖を促し創傷治癒を促進する事が示さ

れた。

(3) TR146 細胞における BrdU の取り込みについて BrdU の取り込みを 12 時間行い、その後、抗 BrdU 抗体で免疫染色を行い、その染色細胞数を全体の細胞数（ヘマトキシレンによる核染色）で割った陽性細胞率で比較したところ（図 3）、10 ug/ml、100 ug/ml とグラフに示す通り濃度依存的に上昇する事が示され、100 ug/ml 群では有意に増加している事が示された（グラフ 2）。一方、マイグレーションアッセイでは、グラフ 3 で示すよう

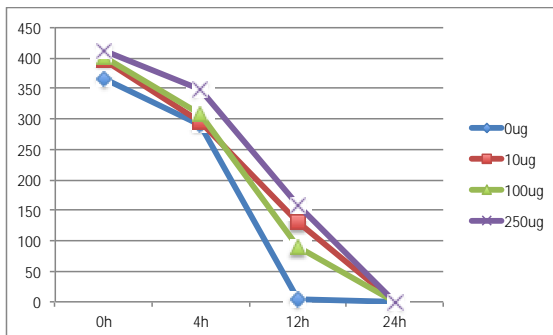


に濃度依存的に細胞遊走能が抑制されていた。4 時間までは大きな差を認めないが、12 時間後では、有意に傷の幅に差がある事が示されている。



グラフ 2

\* < 0.05



グラフ 3

## 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）

〔学会発表〕（計 7 件）

- (1) Hosokawa R, Tamahara T, Ito E, Tanda N, Iijima W, Dodo M, Kato K, Koseki K. HANGESHASHINTO, a Kampo medication, inhibit the development of radiotherapy induced oral mucositis head and neck cancer patients. Multinational Association of Supportive care in Cancer (MASCC) 2014 年 6 月 26 日～6 月 28 日 マイアミ アメリカ合衆国
- (2) 細川 亮一 ミニシンポジウム 「予防歯科医学における周術期の口腔機能管理の展開」 第 63 回 日本口腔衛生学会・総会 2014 年 5 月 29 日～5 月 31 日 熊本
- (3) 加藤 翼、細川 亮一、玉原 亨、吉田 英子、丹田 奈緒子、菅崎 将樹、末永 華子、百々 美奈、伊藤 恵美、小関 健由 東北大学病院におけるがん支持療法としての口腔機能管理の取り組み 第 63 回 日本口腔衛生学会・総会 2014 年 5 月 29 日～5 月 31 日 熊本
- (4) 山崎 佐千子、伊藤 恵美、細川 亮一 周術期等の高度医療を支える歯科医療を具体的に考えるシンポジウム、2014 年 1 月 26 日、岡山大学
- (5) Tamahara T, Hosokawa R, Yoshida E, Tanda N, Ito E, Koseki K. The situation of oral care in Tohoku University hospital after national health insurance coverage to oral management. Multinational Association of Supportive care in Cancer (MASCC) 2013 年 6 月 23 日～6 月 29 日 ベルリン ドイツ連邦共和国
- (6) Hosokawa R, Tamahara T, Ito E, Tanda N, Yoshida, E, Kojima, K, Koseki, T. Oral care support team in Tohoku University. International Association for Disability & Oral Health (iADH)

2012年10月28日～10月31日  
メルボルン オーストラリア連邦  
(7) 玉原 亨、細川 亮一、伊藤 恵  
美、吉田 英子、丹田 奈緒子、小関  
健由 東北大学病院における病棟患  
者における口腔ケアの臨床的検討  
第61回 日本口腔衛生学会・総会  
2012年5月25日～5月27日 横須  
賀

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

細川 亮一 (Hosokawa, Ryoichi)  
東北大学・大学院歯学研究科・講師  
研究者番号：4047254