

平成 27 年 5 月 1 日現在

機関番号：32703

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24593013

研究課題名(和文)ファイトケミカルを用いた癌化学療法に伴う口内炎の新規治療法の確立

研究課題名(英文) Establishment of a new treatment of oral stomatitis associated with cancer chemotherapy using a phytochemical

研究代表者

吉野 文彦 (YOSHINO, FUMIHKO)

神奈川県大学・歯学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：20308307

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：研究の目的は、口内炎における活性酸素の関わりとそれに伴うレドックスバランスの変化を *in vivo* 電子スピン共鳴(ESR)法を用いて証明することである。ハムスター cheek pouch に対し、5-FU+酢酸処置で口内炎を誘導し、生じた口内炎を摘出し脂質過酸化レベルの増加を見出した。さらに、ESR 測定の結果、口内炎の局所においてレドックスバランスが顕著に崩壊していた。また、これらの影響は グルコシルヘスペリジン投与で有意に抑制された。以上の結果より、口内炎初期ステージにおいて過剰に活性酸素種が産生され、それに伴い局所の抗酸化物質が多く消費されるが、ファイトケミカルの投与で予防できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was thus to demonstrate the involvement of reactive oxygen species (ROS) and the alteration of the redox state in oral mucositis using an electron spin resonance (ESR). An oral mucositis animal model induced by treatment of 5-fluorouracil with 10% acetic acid in hamster cheek pouch. Lipid peroxidation was measured and the rate constants of the signal decay of nitroxyl compounds using *in vivo* L-band ESR were calculated from the signal decay curves. We established the oral mucositis animal model induced in hamster cheek pouch. An increased level of lipid peroxidation was found by measuring malondialdehyde. The decay rate constants of carbamoyl-PROXYL were decreased. These disorders was inhibited by treatment of alpha-glucosyl-hesperidine. These results suggest that a redox imbalance might occur by excessive generation of ROS at an early stage of oral mucositis and the consumption of large quantities of antioxidants in the locality of oral mucositis.

研究分野：薬理学

キーワード：口内炎 ファイトケミカル 抗酸化作用 化学療法 脂質過酸化 酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

現在、癌化学療法に併発する口内炎に対しては、口腔ケアによる予防が重要であると考えられている。しかし、癌化学療法の副作用は口内炎だけではなく、嘔吐や全身倦怠感などがみられ、化学療法施行中は、患者自身が積極的に口腔ケアを行うことが困難となることが多い。その結果、口内炎の発症を口腔ケアだけで抑えることは容易ではないのが実情である。そのため、発症した口内炎に対しては氷片や線維素溶解酵素を用いたクライオセラピーや塩酸リドカイン外用液やステロイド軟膏を用いた疼痛緩和などの対症療法を中心に行われている。最近、癌化学療法により誘導される口内炎発症に活性酸素を含め様々な因子の存在が明らかにされ、既に活性酸素の1つであるスーパーオキシド合成系を阻害するアロプリノール含有含嗽剤が口内炎治療薬として期待されている。現在のところ、口内炎発症に関わる具体的な活性酸素種は十分に明らかにされておらず、口内炎治療における活性酸素の消去と治療効果の関係も不明である。そのため活性酸素を標的とした効果的な治療法開発には至っていない。

ファイトケミカルは主に果物や野菜に含まれ、栄養学の世界では第7の栄養素として脚光を浴びており、その強力な活性酸素消去(抗酸化)作用、癌細胞に対する抗プロモーター作用や免疫賦活化による抗癌作用または抗菌作用などの機能性に期待が寄せられている。これら作用に加え、副作用の少なさや高い汎用性また生体応用性をもつことで、抗癌剤投与による活性酸素の発生を阻害し、活性酸素によるDNA損傷を回避することで粘膜上皮細胞のアポトーシスの抑制効果を持つことが考えられる。したがって、この一連の反応を応用することで、癌化学療法により誘発される口内炎の発症は十分に抑制可能である。しかしながら、活性酸素の測定が非常に困難なため、その有効性の検討がほとんど行われていない。

2. 研究の目的

ファイトケミカルは疾病治療や健康増進など、生体に有益な効果をもたらすことが報告されているにも関わらず、医療応用がほとんど行われていないのが現状である。したがって、ファイトケミカルの抗酸化作用を口内炎治療・予防に応用し、その発症原因分子に着目し治療薬を検索することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究は癌化学療法に併発する難治性口内炎に対するファイトケミカルの有用性の確立をゴールとしている。そのため、申請者らにより確立された *in vivo*, *in vitro* 電子スピン共鳴 (ESR) 法による活性酸素検出技術を実験基盤とし、以下の実験を遂行した。

- (1) 抗癌剤投与により生成される口内炎モデル動物における活性酸素種の解析: シリアンハムスターに対し抗癌剤として5-フルオロウラシル (5-FU) を 60 mg/kg を腹腔内に0日目、2日目に投与し、また2日目にハムスターチークポーチ内に10%酢酸溶液を注入し化学療法薬による口内炎モデルを作成した。なお、口内炎評価として経日的に口腔内をデジタルカメラにて撮影し、画像解析ソフト (Image J) により潰瘍面積の分析を行った。

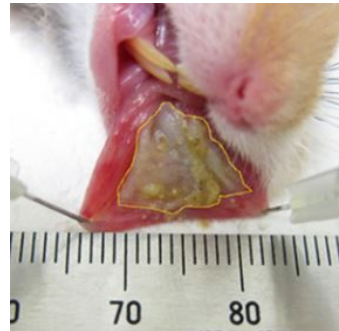


図1 口内炎面積の測定

- 活性酸素種の測定は、実感開始4日目に *in vivo* L-band ESR 法を用いて、RSR スピンプローブ剤である Carbamoyl-PROXYL (C-PROXYL) 代謝速度を測定することで行った。
- (2) 粘膜上皮組織を用いた酸化ストレスマーカーの解析: 上記にて作成したハムスターチークポーチを摘出し、酸化ストレスマーカーであるマロンジアルデヒド (MDA) 濃度を ELISA 法にて解析を行った。
- (3) ファイトケミカルの活性酸素種消去能の解析: 水溶性ファイトケミカルとして α グルコシルヘスペリジン α グルコシルルチン エピガロカテキンガレート クロロゲン酸を用い、*in vitro* X-band ESR 法を用いてスーパーオキシド、およびヒドロキシルラジカルに対する消去活性を測定した。
- (4) 口内炎モデル動物に対するファイトケミカル有効性評価: 上記3にて各種ファイトケミカルの IC₅₀ を算出し、この値をもとに、両活性酸素に対して消去能を示し、且つ安価なファイトケミカルを実験開始5日前より飲料水に添加し自由摂取させ、その後作成した口内炎に対する有用性を測定した。なお、実験動物に関わる全ての本研究は神奈川歯科大学実験動物倫理委員会の審査・承認を得て行った。

4. 研究成果

- (1) 抗癌剤投与により生成される口内炎モデル動物における活性酸素種の解析：5-FU+酢酸処置により口内炎を発症し、潰瘍部面積は処置開始 4 日で最大となった (図 2)。また、口内炎面積が最大となる計測日に in vivo ESR 測定を行った結果、5-FU+酢酸処置群で C-PROXYL 減衰速度の有意な低下を認めた (図 3) (Yoshino *et al.*, PLoS ONE, 2013)。

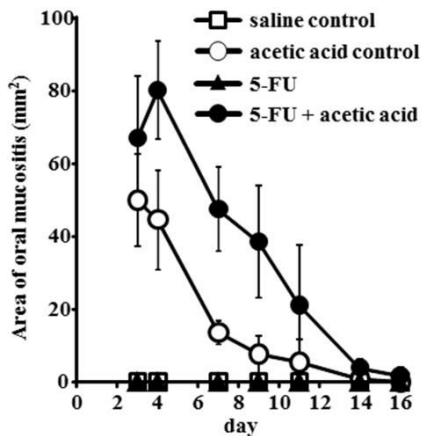


図 2 口内炎面積

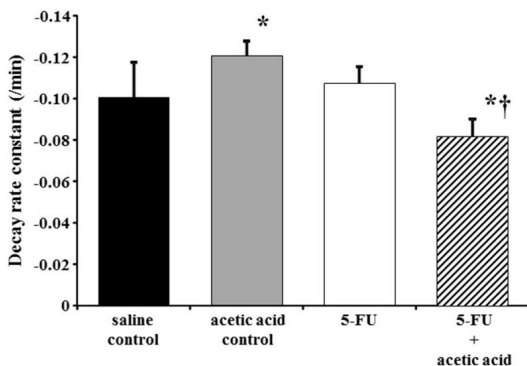


図 3 口内炎部活性酸素

- (2) 粘膜上皮組織を用いた酸化ストレスマーカーの分析：口内炎を発症したハムスター cheek pouch を摘出し MDA 濃度を測定した結果、口内炎発症群で有意な MDA 濃度の増加を認めた (図 4)。

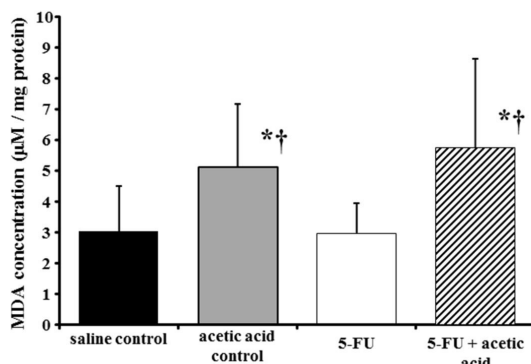


図 4 口内炎部の MDA 濃度

- (3) ファイトケミカルの活性酸素種消去能の解析：実験に用いたすべてのファイトケミカルはスーパーオキシド、ヒドロキシルラジカルに対して消去活性を示した (図 5)。加えて、 α グルコシルヘスペリジンを口内炎発症前より投与した所非投与群と比較し、有意な口内炎面積の低下、および回復の促進が認められた。

IC50 (mg/ml)	vs. スーパーオキシド	vs. ヒドロキシルラジカル
α グルコシルヘスペリジン	0.258	0.285
α グルコシルルチン	0.195	0.077
エピガロカテキンガレート	0.190	0.170
クロロゲン酸	0.004	0.282

図 5 ファイトケミカルの抗酸化活性

これら以上の結果より、口内炎の初期ステージにおいて過剰に活性酸素種が産生され、それに伴い局所でのグルタチオンを含む抗酸化物質が多く消費され、レドックスバランスが破綻した可能性が示唆された。加えて、水溶性ファイトケミカルである α グルコシルヘスペリジン投与は化学療法にて誘発される口内炎の増悪を抑制したことから、これらの知見は口内炎の病因に関わる活性酸素の存在を裏付けるものであり、今後の新規口内炎治療薬の開発に役立つかもしれない。

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) Yoshino F, Yoshida A, Nakajima A, Wada-Takahashi S, Takahashi S-S, Lee M-C: Alteration of the redox state with reactive oxygen species for 5-fluorouracil-induced oral mucositis in hamsters. PLoS ONE, 査読有, 8(12): e82834, 2013, doi:10.1371/journal.pone.0082834

〔学会発表〕(計 2 件)

- (1) 吉野文彦, 吉田彩佳, 高橋俊介, 高橋聡子, 前畑洋次郎, 宮本千央, 李 昌一: ハムスターを用いた癌化学療法に併発する口内炎における活性酸素評価. 第 14 回 日本抗加齢医学会総会, 2014 年 6 月 6 日 ~ 8 日 (大阪府・吹田市)
- (2) 吉野文彦, 吉田彩佳, 高橋俊介, 高橋聡子, 前畑洋次郎, 宮本千央, 李 昌一: 化学療法において併発する口内炎における活性酸素評価. 神奈川歯科大学学会 第 48 回総会, 2013 年 11 月 30 日 (神奈川県・横須賀市)

〔その他〕

ホームページ等

- (1) 神奈川歯科大学大学院歯学研究科口腔科学講座光歯科学分野

<http://www.labs.kdu.ac.jp/pmd/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

吉野 文彦 (FUMIHIKO YOSHINO)

神奈川歯科大学大学院歯学研究科口腔科学

講座光歯科医学分野・准教授

研究者番号：20308307