

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 19 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24792199

研究課題名(和文) 骨髄幹細胞由来培養上清を用いた放射線口内炎治療法の開発

研究課題名(英文) Evaluation mesenchymal stem cell conditioned medium for prevention of oral mucositis

研究代表者

古江 浩樹 (FURUE, HIROKI)

名古屋大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40567012

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：口腔癌に対する放射線治療に伴う口内炎は、疼痛、経口摂取困難、治療中断等を引き起こし治療効果の低下につながる重篤な合併症である。しかし現在のところ有効な治療法は存在しない。そこで新たな治療法の開発のため、以前の研究にて有効性が示された幹細胞由来培養上清による口内炎予防効果について検討した。まずラットに放射線を照射し口内炎を作成後、培養上清を投与しその治療効果を検討した。その結果、明らかな粘膜炎治療効果を認めることができなかった。次に他の炎症性疾患を有する動物モデルによる炎症性サイトカインの発現を検討した結果抑制効果を認めた。今後さらに培養上清による口内炎治療効果について検討が必要と考える。

研究成果の概要(英文)：Oral mucositis is the major side effect by radiation therapy for oral cancer. Today there is no efficient and safe therapeutic solution for oral mucositis. Our earlier studies showed that mesenchymal stem cell-conditioned medium(CM) contains many growth factors derived from stem cells, and accelerate skin wound healing. Therefore we investigated the treatment effect of CM on oral mucositis. First, rats were used for pathological assessment. Rats were treated with mouth radiation alone or in combination with CM. 5 weeks after radiation, tongue specimens were collected. There is no significant difference between radiation alone and CM. Next, for investigating the anti-inflammatory effect of the CM, some inflammatory cytokines were assayed by q-PCR or ELISA by using other animal model of inflammatory disorder. In the result, expression level of some cytokines were reduced by CM. Further studies on the mechanism of CM to protect oral mucositis by radiation therapy are needed.

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：放射線口内炎 口腔癌 放射線治療

1. 研究開始当初の背景

癌治療における粘膜障害は、化学療法、放射線治療を行う際に問題となる副作用の一つである。粘膜炎は、摂食障害、味覚障害、構音障害、嚥下障害、疼痛等を引き起こし、患者の QOL に多大な影響を与える。さらに治療中断、治療効果の低下、さらに死亡率さえも増加させる。口内炎発症予防において最も重要な要因は口腔ケアによる口腔管理である。しかし現在のところ、患者が自律的に行う対処療法以外に治療法はなく、有効であるとは言い難い。

これまで申請者らの研究室では、ティッシュエンジニアリング的手法を用いて皮膚、骨、歯根膜、口腔粘膜など様々な組織再生を試み臨床的有効性を報告してきたが、採取する患者の負担が大きいこと、幹細胞の分化、増殖能が分裂回数を重ねることで減弱すること、移植した細胞の腫瘍化などの問題点があった。最近、骨髄幹細胞由来培養細胞上清 (CM) を用いた再生医療の研究を行っている。CM は多くの組織修復に関与する成長因子を含有すること、細胞移植と比較し費用、時間、安全性から患者負担が軽減されるという利点がある。皮膚の創傷治癒に関する研究にて、間葉系幹細胞と同様、その培養上清は多くの成長因子を有し、皮膚の創傷治癒に有効に作用することを明らかにした。

2. 研究の目的

本研究は、再生医療技術を土台として、放射線治療による口内炎を骨髄幹細胞由来細胞培養上清 (CM) を用いて、予防また治療法を開発することを目的とする。本研究によって口内炎予防の理解が進めば、口腔癌のみでなく、より口内炎が頻発する造血器腫瘍の化学療法を受ける患者をはじめ多くの患者の口内炎を予防することが可能となり、癌治療とその支持療法、再生医療、歯科医学の発展に貢献することが期待される。

3. 研究の方法

(1) 放射線口内炎マウスの作成と培養上清投与による放射線粘膜炎の治癒効果判定

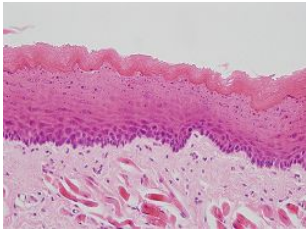
実験開始当初は、マウスを用い放射線粘膜炎の作成を行ったが、口腔への局所的に放射線照射が困難であったこと、照射後の栄養管理が困難であったことなどから、粘膜炎の評価が可能なモデル作成が困難であった。そこで研究対象の動物をラットに変更し放射線粘膜炎を作成し実験を行った。ラットの頭部を除く体全体を鉛板にて被覆し放射線防護を行った上で、頭部に 30Gy 照射し粘膜炎を作成した。照射と同時に培養上清を頸動脈より投与し 5 週後に、舌粘膜を採取し標本を作成し、粘膜炎の治癒効果を評価した。

(2) 扁平上皮癌細胞株の放射線感受性評価
臨床応用を開始する際は、培養上清投与による癌細胞に対する細胞増殖効果の評価が必要となる。そのため、今回は前段階の実験として確立された扁平上皮癌細胞株 (KYSE1.0) に放射線照射を行い、その感受性を評価した。

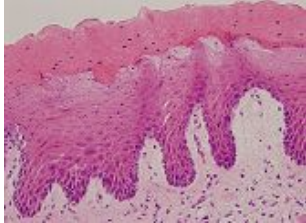
(3) 培養上清による抗炎症作用の評価
研究期間中に安定した口内炎動物モデルの作成が困難であったため、抗炎症効果については、他の炎症性疾患モデルによって評価した。ブレオマイシン投与による肺炎モデルを作成後、培養上清投与群とコントロール群における組織内の抗炎症作用について、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 から代表的炎症性サイトカインの発現量をリアルタイム PCR を用いて評価した。その他、マウスによる心筋虚血再灌流モデルにおいて培養上清を投与し、24 時間後の血漿中の炎症性サイトカイン IL-6 を ELISA 法で定量した。

4. 研究成果

(1) 放射線口内炎マウスの作成と培養上清放射線照射を行ったラットに培養上清投与したものと、投与を行わなかったものとの組織像を図 1 に示す。



培養上清投与



コントロール

図1 培養上清投与後の口腔粘膜

両者において肉眼レベルにおいては、明らかな差を認めることはできなかった。組織像においては、いずれも基底層は保たれているが、培養上清を投与した粘膜と比較し投与しなかった粘膜は、基底層が鋸歯状に乱れ細胞分裂像も多く認める。また有棘細胞層は培養上清を投与しなかった群において、肥厚している。評価時点である5週間目においてコントロールにおいては未だ治癒経過中であることが示唆される。上皮層の剥離や、厚さに明らかな差を認めない。血管新生については、培養上清を投与したもののの方が形成されていることが観察される。

今回の研究では、粘膜炎モデル動物の作成が困難であったため、両者を統計学的に評価するには至らなかった。しかし、評価が可能であった動物においては図1に示したように培養上清の投与による治癒促進効果を示唆する結果を得ることが出来たため、今後は放射線照射量の調整や、栄養投与方法の改善等の実験方法を改善する必要がある。さらに、放射線照射による組織損傷のメカニズムの見地からの評価が必要であると考え。放射線による殺細胞効果はDNA二重らせん構造の破壊により引き起こされ、培養上清には急性の損傷や急性炎症において組織修復能を有するが、放射線による損傷のようにDNA修復を必要とするような粘膜の治癒経過においては異なる治療促進効果を有する可能

性がある。今後はモデル動物の作成をはじめ、放射線照射による治癒のメカニズムにおいて培養上清がどのように影響を与えるか、評価方法を検討する必要があると考える。

(2) 扁平上皮癌細胞株の放射線感受性の評価(図2)

扁平上皮癌細胞株による放射線感受性試験を行い、細胞の生存率曲線を作成した。本実験は、癌細胞に対する培養上清の影響を評価するために行ったものである。研究期間内に培養上清投与による影響の評価を行う事が出来なかったが、今後培養上清を投与した群と、投与しなかった群との間で生存率に差が生じるか、また差が生じたとした場合は臨床応用上での安全性等、どのような問題点があるかを検討する必要がある。

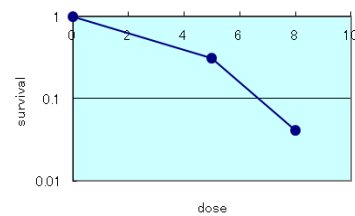


図2 細胞株の放射線照射に伴う生存曲線

(3) 培養上清による抗炎症作用の評価

ラットによる放射線粘膜炎症モデル作成が困難であったため今回の研究において使用することが困難であった。そのため、他のモデル動物を用いて培養上清による抗炎症効果について検討を行った。まず、肺炎モデルにおける実験においては、肺炎組織における炎症性サイトカインの評価をリアルタイムPCRにおいて行ったところ、図3に示すように組織内において発現の抑制効果を認め、抗炎症効果を有することが示唆された。

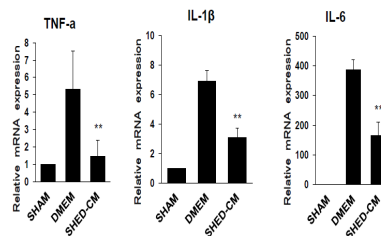


図3 リアルタイムPCRによる評価

つづいて、心筋虚血再灌流モデルにおける抗炎症効果について、血漿中の炎症性サイトカイン IL-6 を ELIZA にて評価したところ、図 4 に示すよう培養上清投与群において発現の抑制を認めた。

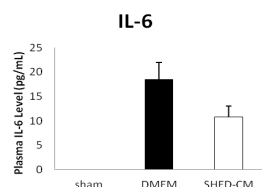


図 4 ELIZA による評価

以上の結果から、炎症性疾患においては、炎症性サイトカインの発現を抑えることで治癒促進効果を有することが示唆された。

(4) まとめ

研究期間内の研究においては、培養上清に投与による放射線粘膜炎の統計学的に評価可能である明らかな治癒促進効果は認めなかった。しかし培養上清には抗炎症効果を有することが示唆されたため、今後は放射線粘膜炎の治癒のメカニズムをさらに検討し評価が必要と考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

S.Hagiwara, N Yamamoto, H Furue, H Sakakura, T Shigetomi, Y Murakumo, H Hibi, M Takahashi, M Ueda. Pathological analysis of Ki-67 and CD109 expression in tongue squamous carcinoma Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine and Pathology 査読有、25(3)、2013、276-281

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ajoms.2012.10.002>

〔学会発表〕(計 6 件)

西川雅也、山本憲幸、古江浩樹、萩原純孝、山口聡、石川純、若山博隆、日比英晴、上田実 口腔扁平上皮癌患者に対する上部消化管内視鏡検査の有用性について 第 32 回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会 2014 年 1 月 23 日～2014 年 1 月 24 日 札幌市 札幌

コンベンションセンター

八木俊路朗、鳥山和宏、高成啓介、澤村尚、神戸未来、山本憲幸、古江浩樹、重富俊雄、亀井譲 関節頭付き再建プレートと遊離腓骨皮弁を用いた下顎再建 第 37 回日本頭頸部癌学会 2013 年 6 月 13 日～2013 年 6 月 14 日 東京都新宿区 京王プラザホテル

坂倉寛紀、萩原純孝、山本憲幸、古江浩樹、長嶺健二郎、西川雅也、日比英晴、高橋雅英、上田実 Exosome 構成タンパクとしての CD109 第 58 回日本口腔外科学会・学術大会 2013 年 10 月 11 日～2013 年 10 月 3 日 福岡市 福岡国際会議場

山口聡、山本憲幸、西川雅也、古江浩樹、萩原純孝、長嶺健二郎、玉利正之、石川純、日比英晴、上田実 副甲状腺機能亢進症に関連した下顎骨に生じた骨形成繊維腫の一例 第 58 回日本口腔外科学会・学術大会 2013 年 10 月 11 日～2013 年 10 月 3 日 福岡市 福岡国際会議場

古江浩樹、西川雅也、澤村昌嗣、市村典久、阿部厚、吉岡文、長縄弥生、高松磨由子、山本憲幸、栗田賢一、上田実、長谷川泰久 愛知県がんセンターの取り組み 第 30 回東海頭頸部腫瘍研究会 2013 年 2 月 2 日 名古屋市 ウィンク愛知

古江浩樹、山本憲幸、西川雅也、萩原純孝、玉利正之、日比英晴、上田実 舌に生じた巨大血管腫の一例 第 31 回日本口腔腫瘍学会 2013 年 1 月 23 日～2013 年 1 月 24 日 東京都 秋葉原コンベンションセンター

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古江 浩樹 (Furue, Hiroki)
名古屋大学・医学部附属病院・病院助教
研究者番号：24792199