

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11418

研究課題名(和文)酸化ストレス制御による口腔癌予防と化学放射線療法時の口内炎発症予防効果の解明

研究課題名(英文)Prevention of oral cancer and pathogenesis of stomatitis during chemo-radiotherapy via the control of oxidative stress

研究代表者

玉木 直文(TAMAKI, Naofumi)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学系)・准教授

研究者番号：20335615

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：抗酸化物質である水素水の摂取により、ラットの口蓋の創傷治癒が促進されることが示された。また、血清中の抗酸化力の増加による酸化ストレスの減少と、炎症性サイトカインの抑制が認められた。今回の創傷治癒の促進は、水素水の摂取によって抗酸化反応を主体とする生体防御反応が誘導され、炎症や酸化ストレスが抑制されたことと、細胞の増殖因子が増加したために生じたと考えられる。つまり、水素水摂取は口蓋粘膜の創傷治癒の促進において有用であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In the drinking hydrogen-rich water as an antioxidant, the palatal wound healing process was accelerated compared to that in the control group. As molecular hydrogen upregulated the Nrf2, systemic oxidative stresses were decreased by the activation of antioxidant activity. Furthermore, hydrogen-rich water intake reduced proinflammatory cytokine levels and promoted the expression of healing-associated factors. Oral administration of hydrogen-rich water would be beneficial during the wound healing process.

研究分野：予防歯科

キーワード：酸化ストレス 抗酸化力 抗酸化物質 炎症性サイトカイン 口内炎

1. 研究開始当初の背景

近年、活性酸素種 (Reactive Oxygen Species; ROS) が体内の酸化ストレスを増加させ、数多くの全身的な疾患の発症に関与することが明らかになってきた。活性酸素種は、主に宿主防御反応として炎症性細胞から産生されるが、過剰に産生された場合、宿主組織のタンパク質、DNA や脂質にもダメージを与えることが報告されている。また申請者は、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 (Tamaki N et al., *J Periodontol*: 2008; *J Periodontol*: 2009; *Clin Oral Invest*: 2011; *Oral Dis*: 2014)。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を介して、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。

健康状態では、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。しかし、ストレス、放射線や薬剤などの要因により活性酸素種が増加し、抗酸化能が除去できる以上の活性酸素種が生体内で発生していた場合、核酸 (DNA)、タンパク質や脂質などを攻撃し損傷を与える。これらの分子は細胞を構成しており、酸化変性されることによって細胞機能をも障害されることが分かっている。

さらに、酸化ストレスの影響は口腔癌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し、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、同時に正常な口腔上皮細胞に口内炎を起こすことが分かってきた。口腔癌患者に化学放射線療法を行った場合、ほぼ 100% の確率で口内炎が発症するが、治療中に良化することはなく悪化の一途をたどる。発症後は摂食機能低下を起こすが、重症の場合は胃瘻になるなど QOL も急速に低下する。発症メカニズムはまだ不明な点が多いが、1 次的に酸化ストレス、2 次的に細菌感染が関与すると考えられている。さらに、口内炎などの創傷治癒においては、細胞の再生と細胞外マトリクスの産生を介して組織が修復される過程であり、炎症性

サイトカイン、増殖因子や酸化ストレスなどが複雑かつ多様に関与している。

しかし現在の口内炎に対する治療法としては、物理的な病変部保護や疼痛緩和などの対症療法以外には有効な治療法は未確立である。

2. 研究の目的

近年、水素水に抗酸化や抗炎症作用があることが報告されてきており、創傷の治癒促進においても効果が期待される。そこで今回、創傷治癒の促進のための新たな手段として、抗酸化物質である水素水摂取の有効性を評価するため、ラット口蓋創傷モデルにおける水素水摂取の効果を検討した。さらに、全身的な酸化ストレス・抗酸化力や炎症性サイトカイン濃度を測定し、その作用機序についても検討した。

3. 研究の方法

(1) 口蓋粘膜への創傷付与

8 週齢の Wistar 系雄性ラットの上顎口蓋から直径 3.5mm の円形に組織を剥離し、粘膜下固有層を露出させた。ラットはランダムに蒸留水摂取の対照群と水素水群の 2 群に分け、自由摂取させた。

創傷付与の直後、1 日、3 日と 7 日目に体重を測定し、写真を撮影した。写真から創傷の面積を、ImageJ を用いて計測し、創傷治癒の割合を比較した。

(2) 血液サンプル測定

また、3 日目と 7 日目にラットをと殺し、血液を採取した。血清中の酸化ストレス度 (reactive oxygen metabolites; ROM) と抗酸化力 (OXY-adsorbent test) および炎症性サイトカイン (Interleukin-1, Interleukin-6 および Tumor necrosis factor-) の濃度を測定した。

(3) 口蓋粘膜における遺伝子発現量の定量的比較

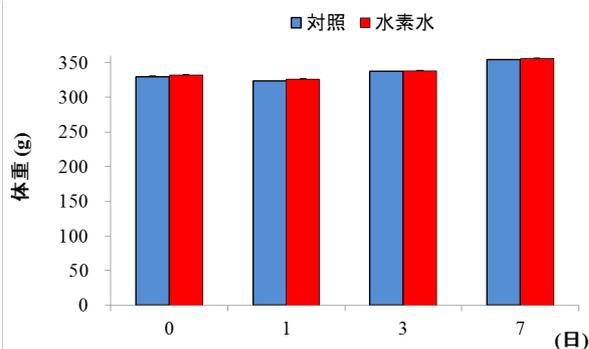
創傷部位の組織を採取し、TRIzol を用いて、総 RNA を抽出した。抽出した mRNA を cDNA に変換後、real-time PCR を用いて、創傷治癒関連物質の遺伝子発現の定量解析を行った。

二群間の統計分析は、Mann-Whitney の U 検定を用いて行った。また、 $p < 0.05$ の場合を、統計学的に有意な差があるとみなした。

4. 研究成果

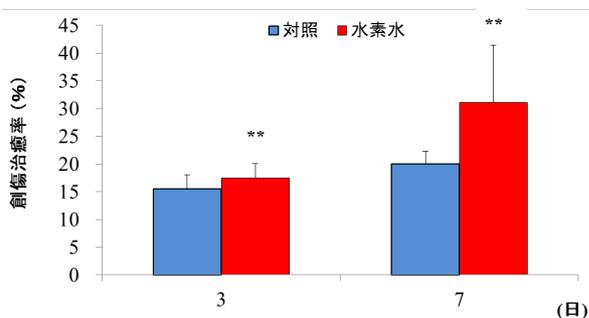
(1) 体重変化

創傷付与の直後、1日、3日と7日目の体重変化を図に示す。1日目に両群とも体重が減少した。対照群と水素水群において、いずれの日においても、体重変化に統計学的に有意な差は認められなかった。



(2) 創傷閉鎖の割合

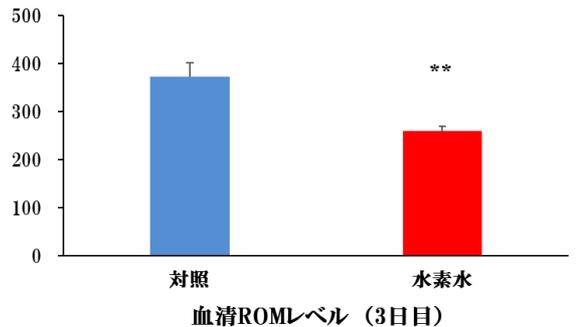
創傷付与の3日目と7日目の創傷部位の閉鎖の割合を図に示す。3日目と7日目において、水素水を摂取した群の方が、蒸留水を摂取させた対照群に比べて創傷閉鎖の割合が統計学的有意に高かった ($p < 0.01$)。つまり、水素水によって創傷の治癒が促進されていたことが観察された。



(3) 血清 ROM 値

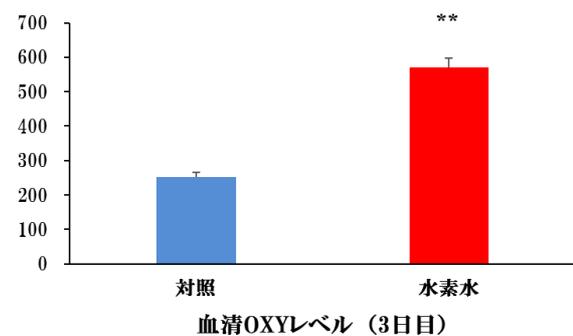
創傷付与の3日目の血清 ROM 値を図に示す。酸化ストレス度である ROM 値は、3日目において対照群よりも水素水摂取群の方が統計学的に有意に低かった ($p < 0.01$)。また7日目

においても、対照群よりも水素水摂取群の方が、統計学的に有意に低かった ($p < 0.05$)。これらのことから、水素水の摂取によって、全身的な酸化ストレス度が減少していたことが示された。



(4) 血清抗酸化力

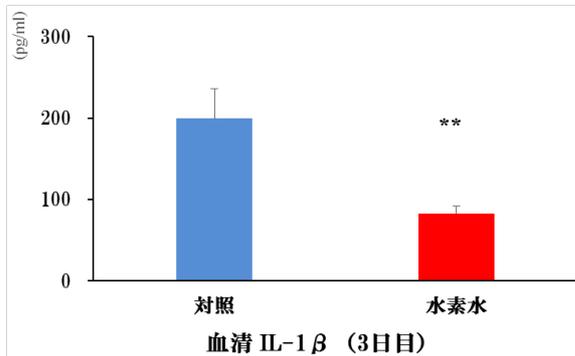
創傷付与の3日目の血清抗酸化力を図に示す。抗酸化力である OXY 値は、3日目において対照群よりも水素水摂取群の方が統計学的に有意に高かった ($p < 0.01$)。また7日目においても、対照群よりも水素水摂取群の方が、統計学的に有意に高かった ($p < 0.05$)。これらのことから、水素水の摂取によって、全身的な抗酸化力が上昇していたことが示された。



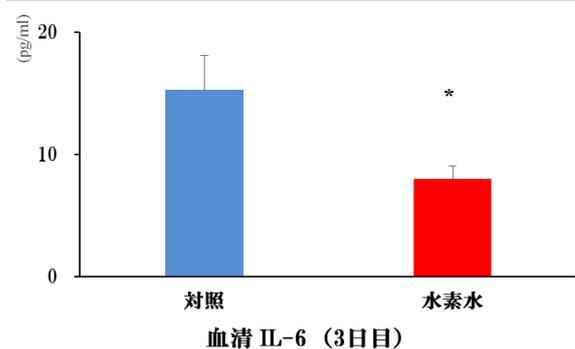
(5) 血清中の炎症性サイトカイン

創傷付与の3日目の血清中の炎症性サイトカイン (IL-1, IL-6, TNF-) の結果を図に示す。

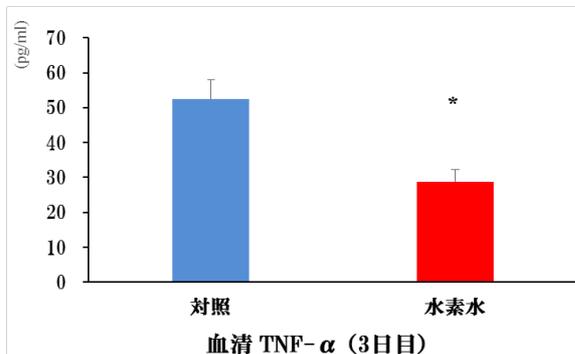
血清中の IL-1 濃度は、3日目において対照群よりも水素水摂取群の方が統計学的に有意に低かった ($p < 0.01$)。しかし、7日目においては両群間で有意な差は認められなかった。



血清中の IL-6 濃度は、3 日目において対照群よりも水素水摂取群の方が統計学的に有意に低かった($p < 0.05$)。しかし、7 日目においては両群間で有意な差は認められなかった。



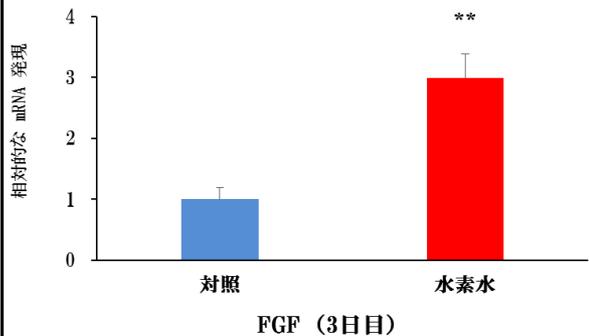
血清中の TNF- α 濃度は、3 日目において対照群よりも水素水摂取群の方が統計学的に有意に低かった($p < 0.05$)。しかし、7 日目においては両群間で有意な差は認められなかった。



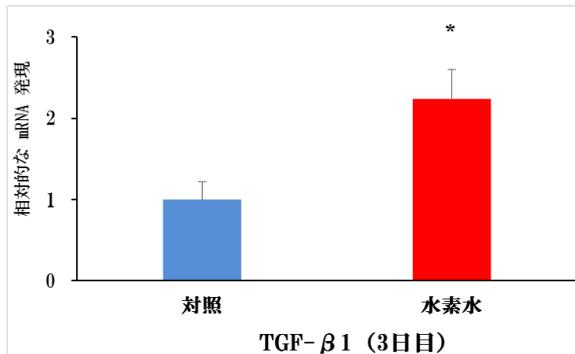
(6) 増殖関連遺伝子の発現量

創傷付与部位の口蓋粘膜組織から抽出した mRNA における増殖関連因子の遺伝子発現量の比較を図に示す。

創傷付与の3日目において、ケラチノサイト増殖因子である fibroblast growth factor 7 (FGF7) の発現量は、対照群よりも水素水摂取群の方が統計学的に有意に高かった($p < 0.01$)。また7日目においても、対照群よりも水素水摂取群の方が、統計学的に有意に高かった($p < 0.05$)。



また、創傷治癒にも密接に関わると考えられている transforming growth factor beta 1 (TGF- β 1) は、創傷付与の3日目における発現量が、対照群よりも水素水摂取群の方が統計学的に有意に高かった($p < 0.05$)。しかし、7日目においては両群間で有意な差は認められなかった。



さらに他にも、増殖因子である vascular endothelial growth factor (VEGF)と治癒関連遺伝子である alpha smooth muscle actin (α -SMA)において、創傷付与の3日目における発現量が、対照群よりも水素水摂取群の方が統計学的に有意に高かった($p < 0.05$)。しかし、7日目においては両群間で有意な差は認められなかった。また、type I コラーゲンの発現量は、水素水摂取群の方が増加する傾向にあったが、3日目と7日目の両方において、両群間に統計学的に有意な差は認められなかった。

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)

Tamaki N, Orihuela R, Fukui M, Ito H-O, Hydrogen-rich water intake accelerates oral palatal wound healing via activation of the Nrf2/antioxidant defense pathways in a rat model, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 査読有, 2016, 5679040, pp. 2016
DOI: 10.1155/2016/5679040

〔学会発表〕(計3件)

玉木 直文 (5人中1番目), 実験的口腔粘膜炎モデルにおけるレスベラトロールの効果の検討, 第66回日本口腔衛生学会総会, 2017年

玉木 直文, 地域住民における歯周病と酸化ストレスの関連性の検討, 第65回日本口腔衛生学会総会, 2016年

玉木 直文 (5人中1番目), 水素水の抗酸化・抗炎症作用の検討, 第64回日本口腔衛生学会総会, 2015年

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://preventdent-tokushima-u.jp/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

玉木 直文 (TAMAKI, Naofumi)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・准教授
研究者番号: 20335615

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし

(4)研究協力者
なし