

令和 2 年 5 月 30 日現在

機関番号：27102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11648

研究課題名(和文) 潰瘍性口内炎の抑制を目的とした上皮細胞へのシゾンAPX遺伝子導入の有効性

研究課題名(英文) Antioxidative effect of ascorbate peroxidase derived from Cyanidioschyzon merolae in mammalian cells

研究代表者

人見 涼露 (Hitomi, Suzuro)

九州歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：70548924

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：病気やストレス等で増加する酸化ストレスに対して、我々は様々な抗酸化機構で対処している。しかし、過剰な酸化ストレスや抗酸化機構の破綻により、身体に傷害が生じてしまう。原始紅藻シゾンは高温強酸環境下に生息しており強い抗酸化能を持っている。本研究では、動物細胞の抗酸化能を増強することを目的として、シゾン由来のアスコルビン酸ペルオキシダーゼ(cAPX)を動物細胞に導入しその有効性を検討した。活性酸素種を産生する各種刺激後の細胞生存率は、コントロールに比べてcAPX発現マウス線維芽細胞で増加した。よって、植物由来の抗酸化酵素は動物細胞においても機能し、抗酸化能を相加的に増強させることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果は、動物細胞におけるAPXの機能解明に役立つだけでなく、がん治療を原因として局所に産生される過剰な活性酸素種(ROS)の除去に応用できる可能性がある。がんの放射線治療や化学療法では、がん細胞に対するROSの傷害作用を抑制することなく、がん細胞以外の“局所”でROSを調節することが望ましい。今後、cAPX発現細胞を用いた細胞シートなどによる粘膜保護が可能になれば、粘膜細胞が酸化ストレスに強い抵抗性を獲得し、酸化ストレスを原因とした粘膜潰瘍や疼痛の抑制に役立つ可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Ascorbate peroxidase (APX) derived from Cyanidioschyzon merolae, which is a primitive red alga living in high-temperature and acidic environment, has been reported greater anti-oxidative capacity than those in other plants. In the present study, we examined a possibility to increase anti-oxidative capacity in mammalian cells by the expression of Cyanidioschyzon merolae-driven APX (cAPX). cAPX gene was introduced into the mice fibroblast-like cell line C3H10T1/2. Production of reactive oxygen species (ROS) and/or cell viability after heat, H₂O₂ and acid stimulations were assessed. Heat and H₂O₂ stimulations caused ROS production. cAPX-expressed cells were more tolerant to oxidative stress induced by heat, H₂O₂ and acid stimulations than control cells. From these results, introduction of cAPX increases antioxidative capacity in mammalian cells.

研究分野：口腔生理学

キーワード：ascorbate peroxidase Cyanidioschyzon merolae oxidative stress reactive oxygen species

1. 研究開始当初の背景

がん治療により発症する潰瘍性口内炎は激痛を伴うため食事や会話が困難になり QOL が大きく低下する。このような潰瘍性口内炎の発症は、放射線照射や抗がん薬によるがん抑制作用の影響が正常な口腔粘膜にも及んでしまうことで引き起こされる (Volpato et al. 2007)。放射線による染色体破壊および抗がん薬による転写阻害は活性酸素種 (reactive oxygen species; ROS) を生成し、DNA 傷害や細胞死を連鎖的に引き起こす (Park et al. 2005; Yamamori et al. 2012; Bhattacharyya et al., 2014)。これはがん細胞の成長抑制に有効であるが、ROS は正常口腔粘膜細胞に対しても細胞傷害作用を發揮し口腔粘膜潰瘍を引き起こす。潰瘍形成は他にも食事の軽い咬傷、酸刺激、熱刺激などによっても誘引され、これらの刺激も同様に ROS を発生させ、口腔粘膜バリアの連鎖的破壊に關与する。

さらに、ROS は疼痛発生にも關与する。以前、頭頸部がん化学療法で多用される抗がん薬の一つシスプラチンをラットに投与した際の口腔粘膜および口内炎部における接触痛は、抗酸化作用を持つ リポ酸 (-LA) の局所塗布により抑制された (論文作成中)。同様の効果が、もう一つの代表的抗がん薬 5-フルオロウラシルの投与による増悪口内炎モデルでも得られている (未発表)。つまり、がん治療に伴う ROS 発生は口内炎の発症に加え、口内炎に伴う疼痛発症にも關連する。

そこで、我々は粘膜細胞が酸化ストレスに強い抵抗性を獲得することが粘膜潰瘍や疼痛の抑制に役立つのではないかと考え、高温強酸性環境に生息する原始紅藻 *Cyanidioschyzon merolae* (*C. merolae*, シゾン) の高い抗酸化能を持つシゾンのアスコルビン酸ペルオキシターゼ (cAPX) に着目した (Hirooka et al. 2009)。

2. 研究の目的

cAPX を導入した動物細胞が高い抗酸化能を獲得するかどうかを検討することで、cAPX の有用性を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) cAPX 発現細胞の作製

cAPX 発現用ベクターは、*C. merolae* の genome DNA から得た cAPX 遺伝子を、真核細胞用ベクター (pcDNA3.1 D/V5-His-TOPO) に挿入することにより作製した。マウス線維芽細胞 C3H10T1/2 細胞 (ATCC, Manassas, VA, USA) は、10% fetal bovine serum (FBS)、100 U/ml ペニシリン (WAKO)、100µg/ml ストレプトマイシン (WAKO) 含有 Dulbecco's modified Eagle's medium (D-MEM) で培養した。C3H10T1/2 細胞に pcDNA3.1 empty vector または pcDNA3.1 cAPX vector を Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA) を用いて遺伝子導入した。遺伝子導入後、G418 硫酸塩 (WAKO) で処理し、ペニシリンカップを用いてシングルクローンを採取した。

(2) 熱刺激による ROS 産生の解析

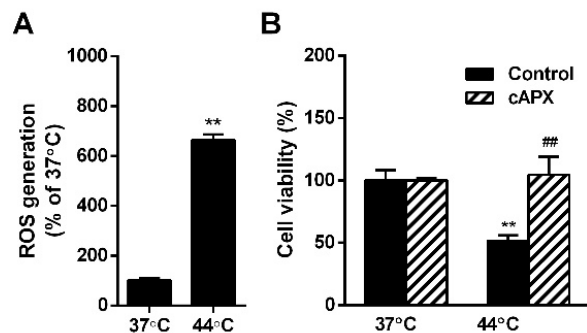
96 ウェルプレートに 10000 個の正常 C3H10T1/2 細胞を播種し、1 日後に 37°C または 44°C に設定したインキュベーターに 2 時間留置した。その後、ROS detection Cell-Based Assay kit (Cayman Chemical) を用いてウェル内の蛍光強度を測定することで ROS の産生程度を評価した。

(3) 細胞生存率の測定

cAPX 導入 C3H10T1/2 細胞とコントロール細胞を 96 ウェルプレートに各 10000 個播種し、一晚培養した。その後、それぞれ (2) と同様の手順で熱刺激を加えた後、Cell counting kit-8 (同仁堂) を用いて細胞生存率を測定した。

4. 研究成果

正常 C3H10T1/2 細胞に 44°C の熱刺激を加えると、37°C の刺激と比べて有意に ROS 産生が増加した (図 A)。次に、C3H10T1/2 細胞に cAPX ベクターを導入したところ、シゾン由来の cAPX 遺伝子は細胞形態を変化させることなく発現した。そこで、cAPX 導入 C3H10T1/2 細胞とコントロール細胞に対して、37°C および 44°C の刺激を加えたところ、37°C の刺激では、両細胞の細胞生存率に変化は認められなかったが、44°C 刺激に対しては、コントロール細胞では有意に細胞生存率が低下したものの、cAPX 発現細胞では細胞生存率の低下は認められなかった (図 B)。



以上の結果より、シゾン APX を動物細胞に発現させることで、相加的に抗酸化能を向上させることが明らかになった。将来、口腔粘膜細胞にこの cAPX を発現させることができれば、その高い抗酸化能によりがん治療による組織傷害を予防できるかもしれない。

< 引用文献 >

- Bhattacharyya, A., R. Chattopadhyay, S. Mitra and S. E. Crowe (2014). Oxidative stress: an essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases. *Physiological reviews* **94**(2): 329-354.
- Hirooka, S., O. Misumi, M. Yoshida, T. Mori, K. Nishida, F. Yagisawa, Y. Yoshida, T. Fujiwara, H. Kuroiwa and T. Kuroiwa (2009). Expression of the Cyanidioschyzon merolae stromal ascorbate peroxidase in *Arabidopsis thaliana* enhances thermotolerance. *Plant cell reports* **28**(12): 1881-1893.
- Park, M. T., M. J. Kim, Y. H. Kang, S. Y. Choi, J. H. Lee, J. A. Choi, C. M. Kang, C. K. Cho, S. Kang, S. Bae, Y. S. Lee, H. Y. Chung and S. J. Lee (2005). Phytosphingosine in combination with ionizing radiation enhances apoptotic cell death in radiation-resistant cancer cells through ROS-dependent and -independent AIF release. *Blood* **105**(4): 1724-1733.
- Volpato, L. E., T. C. Silva, T. M. Oliveira, V. T. Sakai and M. A. Machado (2007). Radiation therapy and chemotherapy-induced oral mucositis. *Braz J Otorhinolaryngol* **73**(4): 562-568.
- Yamamori, T., H. Yasui, M. Yamazumi, Y. Wada, Y. Nakamura, H. Nakamura and O. Inanami (2012). Ionizing radiation induces mitochondrial reactive oxygen species production accompanied by upregulation of mitochondrial electron transport chain function and mitochondrial content under control of the cell cycle checkpoint. *Free radical biology & medicine* **53**(2): 260-270.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Morii A, Miyamura Y, I Sago M, Mizuhara M, Shikayama T, Naniwa M, Hitomi S, Ujihara I, N Kuroishi K, K Gunjigake K, Shiga M, Morimoto Y, Kawamoto T, Ono K.	4. 巻 147
2. 論文標題 Orthodontic Force-Induced Oxidative Stress in the Periodontal Tissue and Dental Pulp Elicits Nociception via Activation/Sensitization of TRPA1 on Nociceptive Fibers.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Free Radical Biology & Medicine	6. 最初と最後の頁 175-186
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.freeradbiomed.2019.12.016	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hitomi S, Ujihara I, Sago-Ito M, Nodai T, Shikayama T, Inenaga K, Ono K.	4. 巻 105
2. 論文標題 Hyposalivation due to chemotherapy exacerbates oral ulcerative mucositis and delays its healing.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Archives of Oral Biology	6. 最初と最後の頁 20-26
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.archoralbio.2019.06.003.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nodai T., Hitomi S., Ono K., Masaki C., Harano N., Morii A., Sago-Ito M., Ujihara I., Hibino T., Terawaki K., Omiya Y., Hosokawa R., Inenaga K.	4. 巻 97
2. 論文標題 Endothelin-1 Elicits TRP-Mediated Pain in an Acid-Induced Oral Ulcer Model	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Dental Research	6. 最初と最後の頁 901-908
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/0022034518762381	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Hitomi S, Kokabu S, Matsumoto K, Ujihara I, Ono K
2. 発表標題 Functional expression of ascorbate peroxidase derived from Cyanidioschyzon merolae in mammalian cells
3. 学会等名 第97回日本生理学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 人見涼露, 氏原 泉, 小野堅太郎
2. 発表標題 抗がん薬シスプラチンによる口腔内疼痛発症メカニズムの解明
3. 学会等名 第13回三叉神経領域の感覚-運動統合機構研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hitomi, S., Yamaguchi, K., Seta, Y., Ujihara, I., Ono, K.
2. 発表標題 Cisplatin-induced intraoral neuropathy due to TRPA1 sensitization in rats.
3. 学会等名 9th FAOPS Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 人見涼露, 氏原泉, 左合一伊藤美紗, 鹿山武海, 小野堅太郎
2. 発表標題 抗がん薬による唾液分泌機能低下は口内炎治癒を妨げる
3. 学会等名 第95回日本生理学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hitomi, S., Ono, K., Ujihara, I., Terawaki, K., Matsumoto, C., Omiya, Y., Inenaga, K
2. 発表標題 Gingerol and shogaol, the herbal contents, relief oral ulcerative mucositis-induced pain through sodium channel blockage.
3. 学会等名 The 3rd Oral neuroscience (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Nodai, T., Hitomi, S., Masaki, C., Ito, M., Hosokawa, R., Ono, K. and Inenaga, K
2. 発表標題 Oral ulcerative mucositis induces pain via endothelin receptors.
3. 学会等名 The 5th Asia-Pacific Conference (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	小野 堅太郎 (Ono Kentaro) (40316154)	九州歯科大学・歯学部・教授 (27102)	
研究分担者	古株 彰一郎 (Kokabu Shoichiro) (30448899)	九州歯科大学・歯学部・教授 (27102)	
研究分担者	松本 謙一郎 (Matsumoto Ken-ichiro) (10297046)	国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・放射線医学総合研究所 放射線障害治療研究部・グループリーダー(定常) (82502)	