

令和 2 年 5 月 13 日現在

機関番号：34533

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15532

研究課題名(和文)3次元培養細胞を用いた抗がん剤・放射線誘発口腔粘膜炎モデルの構築

研究課題名(英文)Development of a model of anticancer drug and radiation-induced oral mucositis using 3D cultured cells

研究代表者

村上 雅裕 (Murakami, Masahiro)

兵庫医療大学・薬学部・助教

研究者番号：40744420

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：3次元培養した再生ヒト口腔粘膜上皮モデル(HOE)を用いて、過酸化水素(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)および炎症性サイトカイン(IL-1、TNF- $\alpha$ )添加による口腔粘膜炎モデルの作製を検討した結果、TNF- $\alpha$ の添加によりPGE<sub>2</sub>産生量およびiNOSタンパク発現量の増加が認められた。しかし、総NO産生量やCOX-2タンパク発現量の増加は認められなかった。一方、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>およびIL-1の添加では、これらの増加は認められなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生理的環境に近い条件下において、抗がん剤・放射線誘発口腔粘膜炎の細胞モデルを構築することは、臨床での効果が期待できる発症メカニズムに基づいた新規治療薬の開発につながると考えられる。本研究では、細胞モデルを確立する段階までには至らなかったが、その可能性の一部を示すことができたと考えている。

研究成果の概要(英文)：A reconstructed human oral mucosal epithelium model (HOE) cultured in 3D was used to investigate the creation of a model of oral mucositis by the addition of hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and inflammatory cytokines (IL-1 and TNF- $\alpha$ ). The results showed that the addition of TNF- $\alpha$  increased PGE<sub>2</sub> production and iNOS protein expression. However, no increase in total NO production or COX-2 protein expression was observed. In contrast, the addition of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and IL-1 did not result in these increases.

研究分野：医療薬学

キーワード：口腔粘膜炎 三次元培養 抗がん剤

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

がん治療では、抗がん剤の投与や放射線の照射により、副作用として口腔粘膜炎が生じる。その発症頻度は、抗がん剤単独では 30～40%と言われており、抗がん剤と放射線を併用する頭頸部がんに対する化学放射線療法では、ほぼ 100%の高頻度で発症する。口腔粘膜炎による強い痛みは、水分や食物の摂取を困難にすることから、患者の生活の質(QOL)を著しく低下させる。しかしながら、現時点で口腔粘膜炎に対する有効な治療薬は開発されていない。

口腔粘膜炎の発症には、抗がん剤の投与や放射線の照射により発生する活性酸素が関与しているとの報告がある(Sonis ST. Oral Dis 2010.)。活性酸素は、口腔粘膜の上皮基底細胞や粘膜下細胞に作用し、遺伝子の発現を調節する転写因子 nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B) という細胞内のタンパク質を活性化する。これにより、炎症の発現に関与するインターロイキン-1 (IL-1) や腫瘍壊死因子アルファ(TNF- $\alpha$ )などの炎症性サイトカインが誘導される。また、これらの炎症性サイトカインは、シクロオキシゲナーゼ-2 (COX-2) や誘導性一酸化窒素合成酵素(iNOS)の発現量を増加させ、プロスタグランジン E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) や一酸化窒素(NO)を産生することで組織障害を引き起こす。さらに、サイトカインのポジティブフィードバックにより組織障害はさらに増悪する。また、細胞の機能発現において重要な働きをしている分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ(mitogen-activated protein kinase: MAPK)の活性化を介する経路も炎症の発現に関連していると考えられている。

現在、抗がん剤・放射線誘発口腔粘膜炎の研究には、主にハムスターやラットを用いた動物モデルや単層培養による細胞モデルが使用されている。しかし、動物モデルでは物理的に炎症を誘発することから、発症メカニズムに基づくモデルとは言い難い。また、単層培養による細胞モデルでは、生理的環境に近い状態を再現することは難しい。本研究により、生理的環境に近い状態で培養可能な 3 次元培養再生ヒト口腔粘膜上皮モデルを用いた、口腔粘膜炎の発症メカニズムに基づく細胞モデルの構築が可能となれば、臨床応用に直結した新規治療薬の開発につながるかと期待される。

### 2. 研究の目的

抗がん剤投与や放射線照射の副作用である口腔粘膜炎の治療は、がん治療における重要な課題であり、治療効果を左右する要因にもなっている。近年、3次元培養された再生ヒト口腔粘膜上皮モデルが、オーラルケア用品の安全性や有効性の評価に使用されている。そこで、本研究では、頬粘膜の扁平上皮細胞癌由来 TR 146 細胞株を 3 次元培養した再生ヒト口腔粘膜上皮モデル(HOE, SkinEthic)を用い、抗がん剤・放射線誘発口腔粘膜炎の発症メカニズムに基づいた細胞モデルの作製を行い、口腔粘膜炎の評価系として有用であるかどうかを明らかにすることを目的とした。これにより、臨床での効果が期待できる発症メカニズムに基づいた新規治療薬の開発につながると考えられる。

### 3. 研究の方法

(1) 過酸化水素(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)および炎症性サイトカイン(IL-1、TNF- $\alpha$ )の添加による細胞モデルの作製

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.01%)、IL-1 (10ng/mL) および TNF- $\alpha$  (10ng/mL) をそれぞれ HOE に添加し、6 時間培養後、培養上清中の PGE<sub>2</sub> および NO の含量を ELISA kit を用いて測定した。

(2) ウエスタンブロット法による COX-2 および iNOS 発現量の測定

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.01%)、IL-1 (10ng/mL) および TNF- $\alpha$  (10ng/mL) をそれぞれ HOE に添加し、6 時間培養後、細胞を回収し、COX-2 および iNOS の発現量をウエスタンブロット法により測定した。

### 4. 研究成果

(1) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、IL-1 および TNF- $\alpha$  添加後の培養上清中における PGE<sub>2</sub> および総 NO 含量の検討

TNF- $\alpha$  添加群では、control 群と比較して PGE<sub>2</sub> 産生量は増加していたが、有意な差は認められなかった。一方、IL-1 添加群では、control 群と比較して PGE<sub>2</sub> 産生量はほぼ同等であった。また、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 添加群では、control 群と比較して PGE<sub>2</sub> 産生量は減少していた。総 NO 産生量は、すべての添加群において、control 群と比較してほぼ同等であった(図 1)。

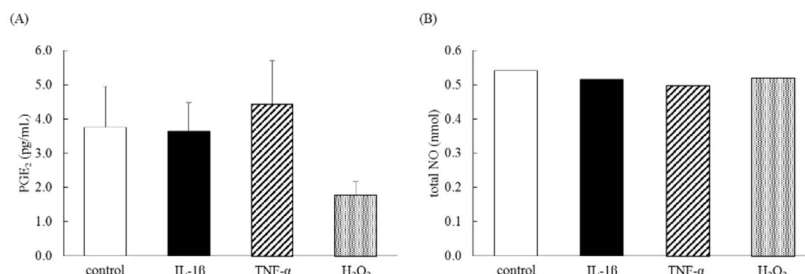


図 1 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、IL-1 および TNF- $\alpha$  添加 6 時間後の培養上清中の PGE<sub>2</sub> および総 NO 含量

(2) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、IL-1 および TNF- $\alpha$  添加後の HOE 内における COX-2 および iNOS タンパク発現量の検討

COX-2 タンパク発現量は、すべての添加群において、control 群と比較して減少していた。iNOS

タンパク発現量は、TNF- $\alpha$  添加群において、control 群と比較して増加していたが、有意な差は認められなかった。一方、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 添加群および IL-1 $\beta$  添加群では、control 群と比較して iNOS タンパク発現量は減少していた (図 2)。

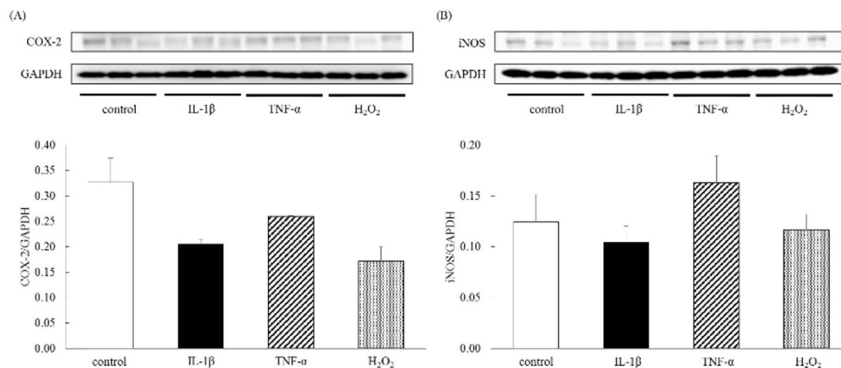


図 2 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、IL-1 および TNF- $\alpha$  添加 6 時間後の H9c2 内の COX-2 および iNOS タンパク発現量

以上の結果より、TNF- $\alpha$  添加群では PGE<sub>2</sub> 産生量および iNOS タンパク発現量の増加が認められたことから、TNF- $\alpha$  を添加することによる抗がん剤・放射線誘発口腔粘膜炎の細胞モデル作製の可能性が示唆されたが、総 NO 産生量や COX-2 タンパク発現量の増加は認められなかったことから、細胞モデルを確立する段階までには至らなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----