

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：22791984

研究課題名(和文) 難治性口内炎に対するメラトニンを用いた戦略的治療法の開発

研究課題名(英文) Establishment of effective cure of melatonin for severe stomatitis

研究代表者

工藤 景子 (KUDOH, Keiko)

徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部・助教

研究者番号：70380029

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、口腔がんの化学療法ならびに放射線療法に伴って生じる難治性口内炎に対するメラトニンの有効性を検討することを目的とした。in vitroおよびin vivoにおいて、メラトニンの口内炎に対する予防薬、進行抑制薬または治療薬としての作用を検討した。結果より、メラトニンが口腔がん治療時の副作用軽減の一助となる可能性を示唆できた。

研究成果の概要(英文)：In this study, it was intended that I examined the effectiveness of melatonin for severe stomatitis to occur with chemotherapy of oral cancer and radiotherapy. I examined the action as a prevention for stomatitis of melatonin, a progress suppressant or the therapeutic drug. I was able to suggest the possibility that melatonin helped the side effect reduction in the oral cancer treatment by these findings.

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：メラトニン

1. 研究開始当初の背景

メラトニンは、主に松果体より分泌されるホルモンであり、1958年にLernerらによってウシ松果体より分離・精製された。メラトニンは夜間に多く分泌されるが、日中はほとんど分泌されない。また、若年者ほど分泌は多く、年齢とともに分泌量は低下することが知られている。

現在までに報告されているメラトニンの主な生理作用としては、概日リズムの調整、性周期の調整、免疫賦活作用、および抗腫瘍作用など多岐に及ぶ。

研究代表者は、口腔外科医として従事する日々の臨床現場において、化学療法に伴う口内炎はもとより、局所療法として用いる放射線治療による口内炎に苦しむ患者を数多くみてきた。症状の程度には個人差があるものの、口内炎が重症化した場合、患者の摂食・飲水時の口腔内疼痛に伴うQOLの低下にとどまらず、障害が強い場合には治療の休止や中止が必要となり、元祖の物の治療が停滞してしまう。そのような中、固形がん（非小細胞肺癌、乳がんなど）の化学療法にメラトニンを併用したところ、副作用として生じる口内炎の発症が減少したという報告（1999年；Lossoniら）に着目した。研究代表者は、予備実験において、メラトニンがヒトの口腔粘膜上皮細胞や線維芽細胞の増殖を促進するという結果を得ており、メラトニンの局所での応用は実現性があると考えている。また、これまでに、メラトニンがヒト骨芽細胞に作用し、その増殖を促進するとともに分化を濃度依存的に促進すること、さらには薬理的濃度のメラトニンが増す酢の骨格成長を促進させることを明らかにしてきた(J. Pineal Res. 42:231-239,2007)。以上のような予備実験データや骨格成長におけるメラトニンの作用に関する研究から得られた知見を生かし、口内炎の予防、進行抑制および治療に対するメラトニンの有効性を解明したいと考えている。

また、当科ではFGF-2(Fibroblast Growth Factor-2)とメラトニンの相互作用

によりインプラント周囲の治癒促進効果があったという報告(2008年；Takechiら)もしており、メラトニンとFGFとの関連性も注目すべきだと考えた。研究代表者は、口腔内へ局所投与したメラトニンがFGFなどの増殖因子に作用して口内炎を治癒するのではないかと仮定した。本研究は、メラトニンを抗癌治療誘発性の口内炎に対する新規薬剤として確立することを目指した。

2. 研究の目的

本研究では、口腔がんの化学療法ならびに放射線療法に伴って生じる難治性口内炎に対するメラトニンの有効性を検討することを目的とする。すなわち、メラトニンの口内炎に対する予防薬、進行抑制薬または治療薬としての可能性を解明し、戦略的治療法を開発する。

3. 研究の方法

(1) 口腔粘膜上皮細胞、線維芽細胞の初代培養

ゴールデンシリアンハムスター（6週齢；雄性）より麻醉下に頬粘膜を採取した。粘膜上皮細胞細胞については、酵素処理（ディスパーゼ）を行った後に、播種して培養を行った。本研究は、継代数3～6代にて施行した。

(2) 正常細胞に対する抗がん剤の影響の検討

抗がん剤としては、現在口腔がんで使用され、口内炎の副作用がありことが知られている5-Fluorouracil（以下5-FUと略）を用いた。

前項（1）で初代培養した口腔粘膜上皮細胞および線維芽細胞を24wellプレートに200個/wellずつ継代播種。24時間後に細胞接着していることを確認後、各種濃度（0、100、1000、10000 μ M）の5-FUを添加した培地（DMEM；10%血清添加）に交換して、24時間培養。その時点の増殖抑制作用をMTTアッセイにて評価した。

(3) 抗がん剤により影響を受けた正

常細胞に対するメラトニンの影響の検討

前項(2)により障害を受けた細胞に各種濃度のメラトニン(0、1、10、100 μ M)を作用させ、メラトニン添加 24、48、および 72 時間後、7、10 日および 14 日目における増殖能を評価した。

(4) 正常細胞に対する放射線の影響についての検討

エックス線照射装置にて前項(1)にて初代培養下各種細胞に放射線照射(15Gy)を行った。エックス線出力条件は 150kVp、5mA とし、厚さ 1mm のアルミニウム板を濾過して行った。24well プレートにてセミコンフルエントに達した細胞に放射線照射を行い、その後 0、6、12、24、48 時間後に細胞増殖に対する影響を評価した。

(5) 放射線照射により影響を受けた正常細胞に対するメラトニンの影響の検討

前項(4)により障害を受けた細胞に各種濃度のメラトニン(0、1、10、100 μ M)を作用させ、メラトニン添加 24、48、および 72 時間後、7、10 日および 14 日目における増殖能を評価した。

(6) ハムスターを用いた口内炎病態モデルの作製

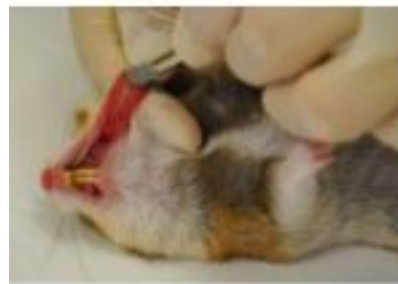
ハムスターは、ゴールデンシリアンハムスター(6週齢、雄性)を用いた。

<薬剤性口内炎モデル>

0日目、2日目に 5-FU(60 mg/kg)を腹腔内投与した。また、1日目、2日目にミニワイヤーブラシにて左側頬粘膜に機械的刺激(H. Mitsuhashi et.al, European Journal of Pharmacology, 551, 152-155, 2006)を加えた。3日目には、口内炎が出現したため、この時点で口内炎の測定(サイズ測定、肉眼所見によるスコアリング(紅斑、充血、出血、上皮の潰瘍、膿瘍などの程度に基づいて行う)、MPO 活性測定(S. Watanabe et al., European Journal of Pharmacology, 6161, 281-286, 2009)を行った。

<放射線性口内炎モデル>

エックス線照射装置にて行った(エックス線出力条件は前項(4)と同様)。0日目に、麻酔下に左側頬粘膜に 40Gy の単回照射を行った(E Alvarez et. Al., Clinical Cancer Research, 9, 3454-3461, 2003)。2日目に、上述のように口内炎の評価を行った。さらに、3日以降自然治癒するまでの期間(毎日)の口内炎のサイズ測定および肉眼所見スコアリングを継続した。



【写真1】ミニワイヤーブラシにてハムスターの左側頬粘膜に機械的刺激を加えた。

(7) 口内炎ハムスターに対するメラトニンの影響の検討(治療薬としてのメラトニンの役割を検討)

局所投与

口内炎ハムスターに対して、各種重量(0、0.1、1、10 μ g)のメラトニンを混入したワセリンを塗布した(3日目以降治癒するまで毎日)。口内炎の治癒状況については上述口内炎の評価()と同様に評価した。

全身投与

口内炎ハムスターに対して、メラトニン(生理食塩液に希釈して全量 0.2ml にする)を腹腔内投与((0、0.1、1、10mg/kg)した(3日目以降治癒するまで毎日)。口内炎の状況は上述口内炎の評価()と同様に評価した。

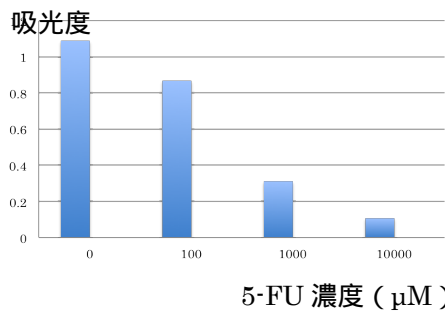
(8) 口内炎ハムスターに対するメラトニンの影響の検討(予防薬としてのメラトニンの役割を検討)

口内炎作製0日目よりハムスターに対して、メラトニン(生理食塩液に希釈して全量 0.2ml にする)を腹腔内投与((0、

0.1、1、10mg/kg) 開始した。3 日目に出現している口内炎について上述口内炎の評価 () と同様に評価した。尚、上述の本研究の動物実験の実施にあたっては、徳島大学動物実験委員会の許可を受け、徳島大学動物実験指針に基づいて行った。また、動物の手術、屠殺を行う際にはペントバルビタールによる麻酔を行い、無痛的に施行した。

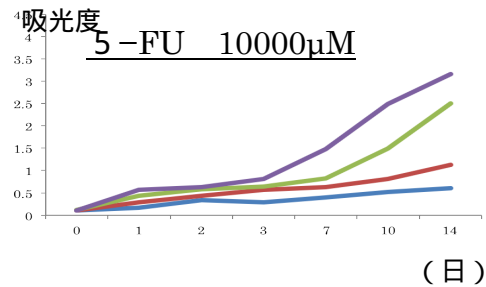
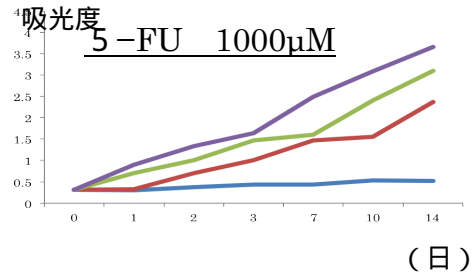
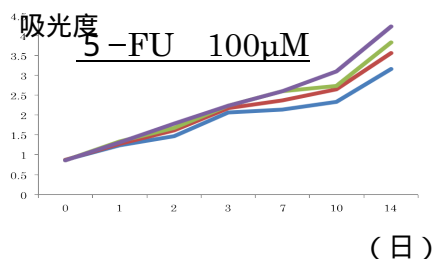
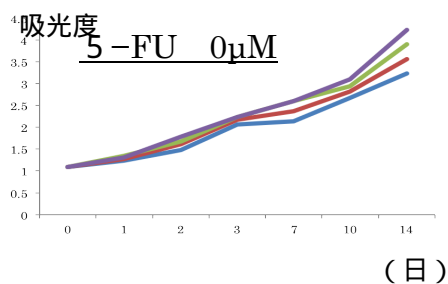
4. 研究成果

(1) 正常細胞に対する抗がん剤の影響の検討



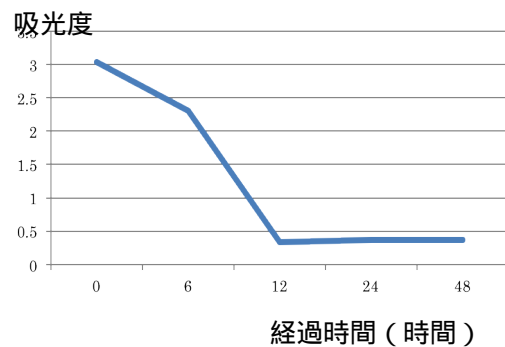
【図1】ハムスター線維芽細胞に対する 5-FU の影響。1000 μM および 10000 μM 添加群は非添加群と比較して有意に細胞増殖抑制を認めた。

(2) 抗がん剤により影響を受けた正常細胞に対するメラトニンの影響の検討



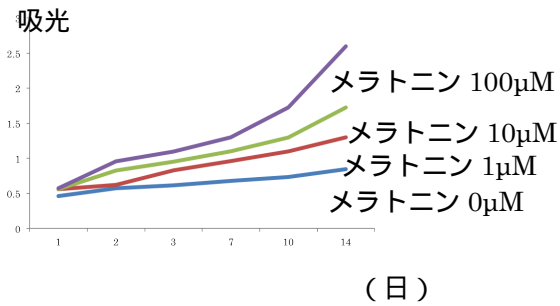
【図2】各種濃度 (0、100、1000、10000 μM) の 5-FU により細胞増殖抑制を受けたハムスター線維芽細胞に対して、各種濃度 (100 μM、10 μM、1 μM、0 μM) のメラトニンを添付した培養液で培養したところ、濃度依存的に回復傾向が認められた。しかし、有意差は認められなかった。

(3) メラトニン正常細胞に対する放射線の影響についての検討



【図3】ハムスター線維芽細胞に対する放射線照射の影響。セミコンフルエントに達していた細胞は、放射線照射により障害を受け、照射 12 時間後には細胞数は低値となり、その後回復は認められなかった。

(4) 放射線照射により影響を受けた正常細胞に対するメラトニンの影響の検討

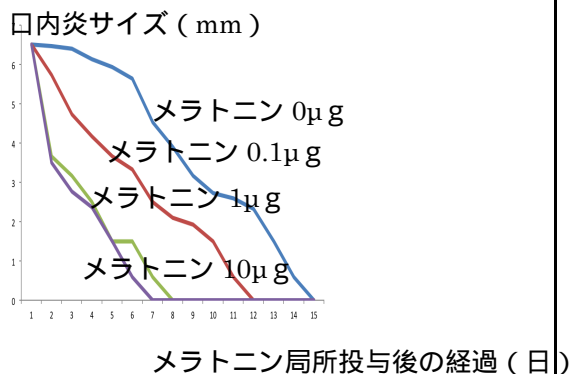


【図 4】放射線により障害を受けたハムスター線維芽細胞に各種濃度のメラトニンを添付した培養液で培養したところ、濃度依存的に回復傾向が認められた。しかし、有意差は認められなかった。

(5) 口内炎ハムスターに対するメラトニンの影響の検討

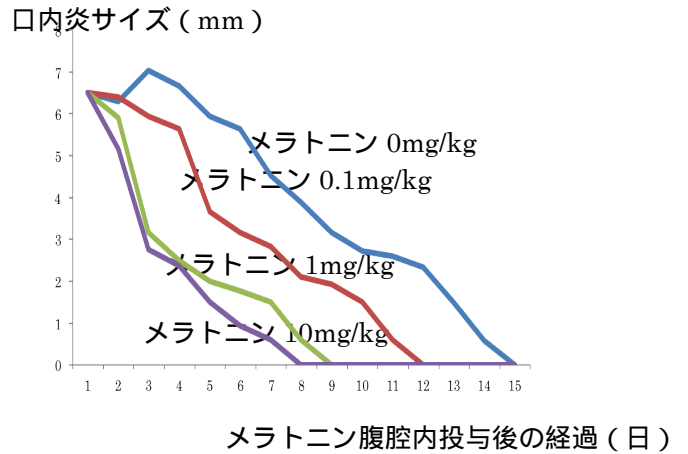


【写真 2】抗癌剤(5-FU)投与および左側頬粘膜の機械的刺激により生じた口内炎。

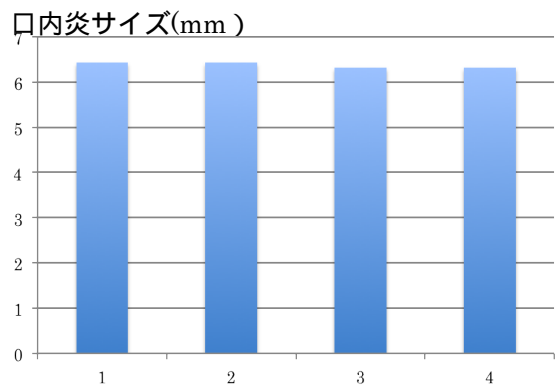


【図 5】口内炎作成後より、メラトニンをワセリンに混合し、局所投与した際の口内炎サイズの経時的変化。メラトニンの投与濃度依存的に口内炎サイズ縮小促進傾向が認められた。非投与群では完全消失まで 15 日要し

たが、メラトニン投与 1 μg および 10 μg の群においては、約 7~8 日で治癒した。(非投与群および 1 μg または 10 μg 群においては有意差あり $p < 0.05$)



【図 6】口内炎作成後より、メラトニンを腹腔内投与した際の口内炎サイズの経時的変化。メラトニンの投与濃度依存的に口内炎サイズ縮小促進傾向が認められた。非投与群では完全消失まで 15 日要したが、メラトニン投与 1mg/kg および 10mg/kg の群においては、約 8~9 日で治癒した。(非投与群および 1mg/kg または 10mg/kg 群においては有意差あり $p < 0.05$)



【図 7】メラトニンを予防投与した際の口内炎サイズ(横軸 1:メラトニン非投与、横軸 2:メラトニン 0.1mg/kg 投与、横軸 3:メラトニン 1mg/kg 投与、横軸 4:メラトニン 10mg/kg 投与)。メラトニン投与の有無に関わらず、口内炎は形成され、明らかな予防効果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0件)

[学会発表](計0件)

[図書](計0件)

[産業財産権]
出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

工藤 景子 (KUDOH, Keiko)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教
研究者番号：70380029

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：