

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 10 日現在

機関番号：17301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659921

研究課題名（和文）頭頸部癌治療による障害を軽減した低侵襲治療体系構築への再生医学の応用

研究課題名（英文）Applying the regenerative medicine to cure the side-effects causing by the chemo/radiation therapy such as oral mucositis.

研究代表者

奥村 映仁（Okumura Teruhito）

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・客員研究員

研究者番号：50585396

研究成果の概要（和文）：

口腔癌治療の選択肢として、機能温存の可能な放射線化学療法が注目されているが、副作用としての口腔粘膜炎など障害は患者の QOL を著しく低下させている。一方、近年骨髓由来細胞（BMDC）による細胞治療の可能性が、虚血性心疾患や脳梗塞など様々な疾患において示唆されている。そこで細胞治療によって網羅的に放射線障害を軽減、もしくは予防する可能性を探るため、その第一歩として、BMDC 移植の口腔粘膜炎に対する効果を昨年度より検討している。実験は、口腔粘膜炎モデルとして、C3H マウスの舌に放射線照射（16Gy）を行ない、舌炎を惹起させた。BMDC はドナーマウス的大腿骨より採取し、 $5 \times 10^6$  個の細胞を照射直後のモデルマウス尾静脈に投与した。その後、照射 2, 5, 7, 9, 11, 14 日目に舌を採取し、組織学的・免疫組織化学的に解析を行なった。照射 2, 5 日目の粘膜上皮において、細胞投与群では非投与群と比較して、アポトーシスを示す細胞の減少を認めた。照射 7 日目では、組織採取の全期間を通して、非投与群で潰瘍形成が最大になるが、移植群では潰瘍形成の抑性が認められた。又、投与群では組織学的に基底層に PCNA 陽性細胞の増加、および基底層直下に vWF 陽性部位の亢進を認めた。さらに、照射 9, 11 日目では投与群の潰瘍消失や縮小の亢進が認められた。即ち、放射線性の舌炎障害の抑性あるいは治癒に BMDC 投与の効果を認めた。放射線性の萎縮唾液腺と同様に、口腔粘膜炎に対する骨髓由来細胞の細胞治療の可能性が示唆される。

研究成果の概要（英文）：

Oral mucositis is a serious and painful side effect for patients with head and neck cancer who received radiation- and/or chemo-therapy. It causes not only the limitation on the ability of patients to tolerate cancer therapies in some cases but also the harmful effects on the quality of life. However, current clinical strategies cannot efficiently prevent the occurrence of oral mucositis. Therefore, effective therapy should be developed urgently. BMDCs isolated from male C3H mice were transplanted to the female mice just after the irradiation through the tail vein. After 2, 5, 7 and 11 days of irradiation, the tongues were harvested, and the macroscopic, histological and immunological analyses were performed to clarify the effects of BMDC transplantation. After 2 days of irradiation, the tongues of non-treated mice (IR) showed significant apoptosis of the cells throughout the basal cell layer while few cells were observed in that of BMDCs-treated mice (BM). After 7 days of irradiation, while the ulcer area became

maximum in the tongues of IR, the area of ulcers formed in BM specimens was approximately 60% of IR and preserved the epithelial thickness. Consistent with this appearance, histological analysis shows that tongues of BM demonstrated an increased level of tissue regenerative activity such as blood vessel formation and cell proliferation. Finally, after 11 days of irradiation, the area of ulcers in BM decreased remarkably compared with that in IR. Our data suggests that cell therapy with BMDCs can prevent the maximum ulceration caused by head and neck irradiation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

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：唾液腺再生、神経堤細胞、相互作用

#### 1. 研究開始当初の背景

口腔癌治療では、現在、外科的切除が第一選択で、顎や舌等の切除により機能障害ばかりか人間の尊厳に関わる審美障害に陥ることが少なくない。しかし、近年、不破、藤内らの日本人によって開発された超選択的動注化学・放射線療法 (SSCR) は、浅側頭動脈と後頭動脈からのカテーテル長期留置を可能にし、連日の放射線療法と動注化学療法の同時併用を可能にした。この方法は、高い治療効果を持ち、原発組織の機能と形態の温存を図る低侵襲療法であることから、患者 QOL の維持を図る上で、頭頸部癌領域の新しい戦略として期待されている。

一方で、SSCR の副作用として現れる広範な口内粘膜炎、唾液腺萎縮による重度口腔乾燥や、顎骨壊死とそれに伴う骨欠損の障害は、術後 QOL を著しく低下させる。特に唾液腺萎縮は、全ての受療患者が口腔乾燥による苦痛を訴える不可逆性の病変であるが、現在までに有効な治療法は確立されていない。又、晩期顎骨壊死に伴う広範な骨欠損も、結果的に患者の QOL を著しく低下させる。口腔癌に対する SSCR は、今後の適応拡大が期待さ

れる低侵襲療法であるが、それに伴う副作用の根治的治療をも含めた包括的な治療体系の確立が強く望まれる。

近年、成体の組織幹細胞を使用した再生医療に高い注目が寄せられている。なかでも、骨髄に由来する血管内皮前駆細胞 (EPC) が、末梢血中の単核球成分の一部として存在することが示されて以降 (Asahara T et al. 1997)、BMDC を用いた細胞治療の有効性が、血管、心筋、肝臓、骨組織等の再生や脳梗塞治療などで示唆されている。われわれは、BMDC の局所への遊走・生着能や分化能に注目し、唾液腺萎縮マウスの尾静脈へ BMDC を注入することで、萎縮腺組織の再生と機能回復について、その有効性を確認している (Sumita Y et al. 2011)。これらの知見は、BMDC による細胞治療が SSCR 後の障害を大きく軽減させ得ることを示唆しており、細胞の採取も容易なことから、早期の臨床応用モデルの確立が望まれる。

そこで、本研究では BMDC 移植の効果について、SSCR 後の障害の 1 つである口腔粘膜炎に対して、それを検討することで、萎縮唾液腺を含めて網羅的に放射線性障害を軽減、

もしくは予防する可能性を検討した。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、頭頸部癌に対する超選択的動注化学・放射線療法 (SSCR) の副作用として惹起される重度口内炎を、患者から採取した骨髄由来細胞 (BMDC) による細胞治療によって、軽減させる技術を開発することにある。頭頸部癌の低侵襲療法に伴う障害に対して、細胞治療による再生医療を展開することで組織の再生を図り、患者に対する障害の最小化を図る。

## 3. 研究の方法

本助成期間においては、唾液腺萎縮モデルの作出条件を指標にして口腔粘膜炎の発症条件の検討から実験を始め、両組織障害併発モデルマウスの作出を試みることから実験を開始した。そして、このモデルにおいて BMDC 投与の効果について評価を行なった。実際の実験方法は下記の通りである。

### 1) 両組織障害モデルの作出 ;

SSCR に併発する組織障害モデルの作出については、C3H マウスへの顎下腺や耳下腺領域まで含んだ頭頸部のみに放射線を与えることの出来る遮蔽器具を用いて、15-18Gy (x-ray) の線量を外照射することで、照射後 8 週で約 50%以下の唾液分泌量の低下を導く障害を唾液腺に与えることが出来る。本実験では、16Gy の外照射に併せて、頭頸部放射線化学療法による口内炎モデルを参考に抗癌剤の投与を行なった。抗癌剤 (シスプラチン 8mg/kg) の投与は、放射線照射の 4 時間前に腹腔内投与にて行なった。その後、照射後の各週にてマウスの体重計測を行なった上で、口腔粘膜炎の発症状態については照射後 2, 5, 7, 11, 14 日にて舌組織を採取し、肉眼的、

組織学的に評価を行なった。又、唾液腺萎縮について、照射後 8, 16 週にて唾液分泌量の計測 (Salivary Flow Rate) 行ない、併発モデルにおける効果発現の確認を行なった。

### 2) BMDC の単離と細胞投与 ;

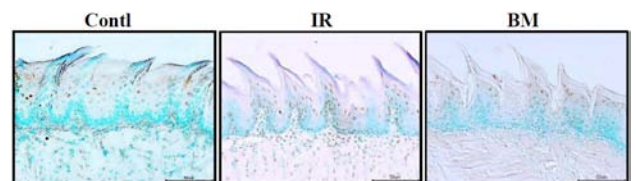
BMDC は雄 C3H マウス (8 週齢) より採取した骨髄から、DMEM 培地にてセルストレーナーを用いて単離した。尾静脈投与には、約  $1 \times 10^7$  個の細胞を 400 $\mu$ l の DMEM に濃縮し、1 匹のマウスへの 1 回投与に用いた。投与は、障害モデルの雌 C3H マウス (8 週齢) の尾静脈に行ない、投与を放射線照射直後に行なった。

### 3) 細胞投与後の組織回復評価 ;

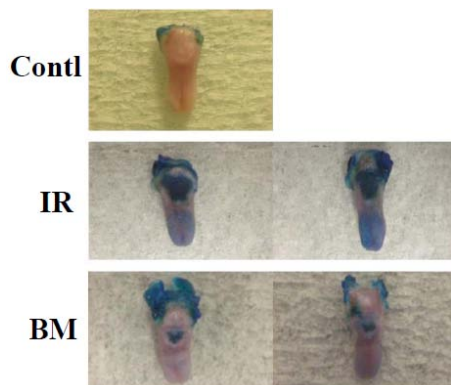
口腔粘膜に関しては、照射後 2, 5, 7, 11, 14 日で舌を採取し、上皮組織の破壊や壊死など障害の程度を観察した。採取した舌組織には、まずトルイジンブルー染色を施し、肉眼的に口内炎部位の大きさを確認した。その後、組織標本を作製し、組織学的・免疫組織学的に障害の程度を観察した。唾液腺については、照射後 8, 16 週にて唾液の分泌量の変化を解析した後、顎下腺を摘出し、組織学的・免疫組織学的に観察を行なった。

## 4. 研究成果

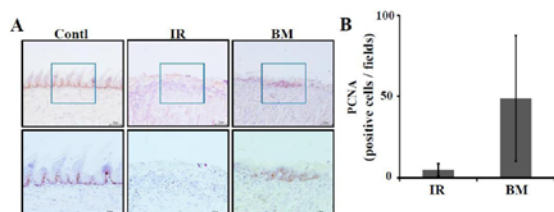
照射 2, 5 日目の上皮組織において、細胞投与群では非投与群と比較して、アポトーシスを示す細胞の減少を認めた。非投与群では、基底層を含む全層にわたり陽性細胞を認めたが、投与群ではコントロール群と同様に基底層には陽性細胞を認めなかった (下図)。



照射7日目では、組織採取の全期間を通して、非投与群で潰瘍形成が最大になるが、移植群では潰瘍形成の抑性が認められた（下図）。



又、投与群では組織学的に基底層に PCNA 陽性細胞の増加（下図）、および基底層直下に vWF 陽性部位の亢進を認めた。



さらに、照射9、11日目では投与群の潰瘍消失や縮小の亢進が認められた。即ち、放射線性の舌炎障害の抑性あるいは治癒に BMDC 投与の効果を認めた。又、照射後8、16週で唾液分泌量を計測したところ、投与群で非投与群と比較して唾液分泌量の回復を認めた。

これまでの結果より、放射線性の萎縮唾液腺と同様に、口腔粘膜炎に対しても骨髄由来細胞を使用した細胞治療の可能性が示唆され、さらに両組織障害を網羅的に軽減できる可能性も示された。今後は、投与した BMDC の障害組織での挙動解析を詳細に調査することで、さらに効果的な細胞の投与条件を明らかにしていく予定である。

## 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8件）

- 1) Zhong W, Sumita Y, Ohba S, Kawasaki T, Nagai K, Ma G, Asahina I. In vivo comparison of the bone regeneration capability of human bone marrow concentrates vs. platelet-rich plasma. Plos One., vol. 7(7):e40833, 2012.
- 2) Ohba S, Yamashita H, Takashi I, Asahina I. Marginal mandibulectomy for lower gingival carcinoma with a cheek-splitting transbuccal approach and reconstruction by buccal fat pad flap: a case report. J Oral Maxillofac Surg., vol. 71(2):e143-6, 2013.
- 3) Uehara H, Ikeda H, Nonaka M, Sumita Y, Nanashima A, Nonaka T, Asahina I. Predictive factor for photodynamic therapy effects on oral squamous cell carcinoma and oral epithelial dysplasia. Arch Oral Biol, vol. 56(11):1366-72, 2011.

（他5件）

〔学会発表〕（計1件）

- 1) 井隆司、住田吉慶、大場誠悟、南里篤太郎、朝比奈泉。「放射線性の口腔内障害に対する骨髄由来幹細胞治療応用の検討」第57回日本口腔外科学会総会・学術大会 平成24年10月21日（横浜）（口演）

〔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  
該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

奥村 映仁 (OKUMURA TERUHITO)  
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・  
客員研究員  
研究者番号：50585396

(2) 研究分担者

大場 誠悟 (OHBA SEIGO)  
長崎大学・大学病院・講師  
研究者番号：80363456

池田 久住 (IKEDA HISAZUMI)  
長崎大学・大学病院・講師  
研究者番号：00244088

(3) 連携研究者

該当なし