

令和元年6月24日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K11309

研究課題名(和文)mTOR阻害剤による口内炎の発症機序の解明

研究課題名(英文)Mechanism of mTOR inhibitor-associated stomatitis

研究代表者

北村 信隆 (Kitamura, Nobutaka)

新潟大学・医歯学総合病院・特任教授

研究者番号：90224972

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)：口内炎に関するin vitroでの基礎的実験として、口腔粘膜細胞を7継代から8継代まで細胞培養した。同培養細胞上にシロリムスを添加し、培養細胞の反応を観察した。その結果、細胞増殖のdoubling timeは0nMに比べ、10nMでは5倍に延長した。DNA合成能は20%程度低下した。形態は0nMでは紡錘形で大きい細胞が多く、1nM以上では小球形の細胞が増えた。核の面積はシロリムス0nMに比べ、10nMの方が有意に小さかった。細胞の面積はシロリムス0nMに比べ、0.1nM、1nMならびに10nMの方が有意に小さかった。さらにE-Cadherinの発現が抑制され、細胞間接着が脆弱になっていた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

申請者らは、リンパ脈管筋腫症に対するmTOR阻害剤の日米加共同MILES試験の日本側代表として試験の成功に貢献し、ついで安全性確立を目的とした医師主導治験を実施し、LAMに対する世界初の薬事承認に繋がった。その後、結節性硬化症の血管線維腫に対する外用が承認された。現在、難治性リンパ管疾患、限局性皮膚異形成II型のてんかん発作、進行性骨化性線維異形成症に対する医師主導治験が進行中であり、益々適応拡大が予想される。mTOR阻害剤により高頻度に発症する有害事象の一つに口内炎があり、患者のQOLを著しく低下させている。mTOR阻害剤による口内炎の発症機序の解明と治療・予防法の確立は喫緊の課題である。

研究成果の概要(英文)：As a basic experiment in vitro for sirolimus stomatitis, oral mucosal cells were cultured from 7 passages to 8 passages. Sirolimus was added onto the cultured cells, and the reaction of the cultured cells was observed. As a result, the doubling time of cell proliferation was prolonged by 5 times at 10 nM compared to 0 nM. The DNA synthesis ability decreased by about 20%. The morphology was spindle-shaped and many large cells at 0 nM, and small spherical cells increased at 1 nM or more. The area of the nuclei was significantly smaller at 10 nM compared to sirolimus 0 nM. The area of the cells was significantly smaller at 0.1 nM, 1 nM and 10 nM compared to sirolimus 0 nM. Furthermore, the expression of E-Cadherin was suppressed, and cell-cell adhesion was weakened.

研究分野：口腔外科学、生物統計学

キーワード：mTOR阻害剤 口内炎 口腔粘膜細胞培養 シロリムス 有害事象

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

申請者は、若年女性の希少難病であるリンパ脈管筋腫症に対する mTOR 阻害剤の日米加共同 MILES 試験の日本側代表として試験の成功に貢献し、ついで安全性確立を目的とした医師主導治験を実施し、LAM に対する世界初の薬事承認に繋がった。その後、結節性硬化症の血管線維腫に対する外用が承認された。現在、難治性リンパ管疾患、限局性皮質異形成 II 型のでんかん発作、進行性骨化性線維異形成症に対する医師主導治験が進行中であり、益々適応拡大が予想される。mTOR 阻害剤により高頻度に発症する有害事象の一つに口内炎があり、患者の QOL を著しく低下させている。しかし mTOR 阻害剤による口内炎の発症機序は不明であり、有効な予防法も確立されていない。mTOR 阻害剤による口内炎の発症機序の解明と治療・予防法の確立は喫緊の課題である。そこで、シロリムスによる口内炎発症の臨床的研究として、2012 年 6 月から 2014 年 7 月までの 2 年間にシロリムスが投与された 63 例を対象として、口内炎の発症状況ならびにそのリスクファクターに関する分析を行った。その結果、63 例中、56 例 (88.9%) に口内炎が発症した。口内炎に関するリスクファクター分析により、服薬時のヘモグロビン濃度が低い症例ほど、口内炎の累積発症率が高かった。さらに、シロリムスの投与後、貧血のタイプの指標である MCV (平均赤血球容積) と MCH (平均赤血球ヘモグロビン量) が経時的に急速に減少したが、その際、最初の 3 ヶ月での MCV ならびに MCH の減少量が大きい症例ほど、口内炎の累積発症率が高かった。

2. 研究の目的

mTOR 阻害剤(分子標的薬)のシロリムスは、若年女性の希少難病であるリンパ脈管筋腫症(略称 LAM)の治療薬(分担者ら、New Engl.J.Med. 2011)として、申請者らを中心に医師主導治験が行われ、2014 年 7 月、世界で初めて薬事承認された。高頻度に発症する有害事象の一つに口内炎がある。それによりしばしば摂食・嚥下や会話等の機能が低下することがあり、投薬の減量や中止を余儀なくされることもある。しかし mTOR 阻害剤による口内炎の発症機序は不明であり、有効な予防法も確立されていない。そこで本研究では、mTOR 阻害剤による口内炎の予防法を確立すべく、ヒト口腔粘膜上皮細胞の手法を応用して、mTOR 阻害剤による口内炎発症機序の解明を目指したい。

3. 研究の方法

mTOR 阻害剤による口内炎の臨床所見 (= アフタ性口内炎) は、従来の殺細胞性抗がん剤による口内炎 (= 潰瘍性口内炎) と異なるため、両者の発症機序も異なると考えられる。そこで本研究では、以下の如くヒト口腔粘膜上皮細胞培養の技術を用いて、口腔上皮細胞ならびに粘膜にシロリムスを作用させ、*in vitro* でヒト口腔粘膜上皮細胞の増殖能、分化能、細胞活性ならびに粘膜の再上皮化に対する影響等を調べることににより、粘膜上皮細胞ならびに口腔粘膜における反応を調べる。

1) ヒト口腔粘膜上皮細胞の培養：新潟大学歯学部倫理委員会の承認のもと、同意の得られた患者より口腔粘膜を採取し、無血清培地 (EpiLife®) の存在下で口腔粘膜上皮細胞を培養した。

2) シロリムス添加培地による口腔粘膜上皮細胞の培養

3) 細胞増殖能分析：リンパ脈管筋腫症におけるシロリムス有効トラフ血中濃度は、5-15ng/ml とされているが、これは、5-15 nM にあたる。ほとんどは、赤血球中に分布しているので、実際に患者の血漿中のシロリムス濃度は、数 10pM とされる。

4) 形態的検索：培養した口腔粘膜上皮細胞の形態については位相差顕微鏡下ならびに光学顕微鏡下で観察、画像化した。

5) 表面抗原検索：シロリムス非存在下および存在下で培養した口腔粘膜上皮細胞の Annexin や E-Cadherin の発現を調べる。

4. 研究成果

口内炎に関する *in vitro* での基礎的実験として、口腔粘膜細胞を 7 継代から 8 継代まで細胞培養した。同培養細胞上にシロリムスを添加し、培養細胞の反応を観察した。

口腔粘膜細胞 (8 から 9 継代したもの) を無血清培地中で培養し、そこにシロリムスを添加して、4 日目に生残率を MTT アッセイで調べたところ、IC50 はおよそ 0.2 pM であった。

口腔粘膜細胞は、楕円形から紡錘形の付着細胞であるが、シロリムス存在下では小型紡錘形細胞の割合が増加した。

細胞増殖の doubling time は 0nM に比べ、10nM では 5 倍に延長した。DNA 合成能は 20% 程度低下した。形態は 0nM では紡錘形で大きい細胞が多く、1nM 以上では小球形の細胞が増えた。

核の面積はシロリムス 0nM に比べ、10nM の方が有意に小さかった。細胞の面積はシロリムス 0nM に比べ、0.1nM、1nM ならびに 10nM の方が有意に小さかった。

シロリムスの濃度が高くなるにつれ、Annexin の発現が上昇した。すなわち、シロリムス濃度の増加により、細胞死の割合が高くなっていった。さらに E-Cadherin の発現が抑制され、細胞間接着が脆弱になっていた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

- 1) Risk factors for stomatitis in patients with lymphangiomyomatosis during treatment with sirolimus: A multicenter investigator-initiated prospective study. Kitamura N, Seyama K, Inoue Y, Nagai K, Suzuki M, Moriyama H, Takada T, Tazawa R, Hirai T, Mishima M, Hayashida M, Hirose M, Arai T, Sugimoto C, Hattori N, Watanabe K, Tamada T, Akazawa K, Tanaka T, Nakata K. Pharmacoeconomics and drug safety 26(10) 1182-1189 2017年10月
- 2) Efficacy and Safety of Long-term Sirolimus Therapy for Asian Patients with Lymphangiomyomatosis. Takada T, Mikami A, Kitamura N, Seyama K, Inoue Y, Nagai K, Suzuki M, Moriyama H, Akasaka K, Tazawa R, Hirai T, Mishima M, Hayashida M, Hirose M, Sugimoto C, Arai T, Hattori N, Watanabe K, Tamada T, Yoshizawa H, Akazawa K, Tanaka T, Yagi K, Young LR, McCormack FX, Nakata K. Ann Am Thorac Soc. 13(11) 1912-1922 2016年11月

〔学会発表〕(計4件)

- 1) 伊藤祐子、武井延之、北村信隆、中田光：口腔粘膜細胞に及ぼすシロリムスの影響。第18回日本再生医療学会総会，2019
- 2) 山本陽香、伊藤祐子、北村信隆、中田光：シロリムスが口腔粘膜細胞の増殖と分化に与える影響に関する研究。第18回日本再生医療学会総会，2019
- 3) 中田光、山本陽香、伊藤祐子、北村信隆、武井延之：シロリムス口内炎の発症機序に関する研究。第3回LAM研究会，2018
- 4) Nakata K, Seyama K, Inoue Y, Takada T, Suzuki M, Tamada T, Arai T, Hirai T, Sugimoto C, Kitamura N, Tazawa R. Risk Factors for Stomatitis in Patients with Lymphangiomyomatosis During Treatment with Sirolimus: A Multicenter Investigator-Initiated Prospective Study. ATS 2017, A43.NON-IPF ILD: Clinical studies.

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

- 1) リンパ脈管筋腫症患者に対するシロリムス投与による口内炎発症のリスクファクター
<http://www.bmrctr.jp/lam/data/research02.html>
- 2) シロリムス口内炎の予防
<http://www.bmrctr.jp/lam/>
- 3) アジア人リンパ脈管筋腫症患者に対するシロリムス長期投与の効果と安全性
<http://www.bmrctr.jp/lam/data/research01.html>

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：中田 光
ローマ字氏名：NAKATA Koh
所属研究機関名：新潟大学
部局名：医歯学総合病院
職名：教授
研究者番号（8桁）：80207802

研究分担者氏名：芳澤 享子
ローマ字氏名：YOSHIZAWA Michiko
所属研究機関名：松本歯科大学
部局名：歯学部
職名：教授
研究者番号（8桁）：60303137

研究分担者氏名：武井 延之
ローマ字氏名：TAKEI Nobuyuki
所属研究機関名：新潟大学
部局名：脳研究所
職名：准教授
研究者番号（8桁）：70221372

(2)研究協力者

研究協力者氏名：泉 健次
ローマ字氏名：IZUMI Kenzi

研究協力者氏名：伊藤 祐子
ローマ字氏名：ITO Yuko

研究協力者氏名：山本 陽香
ローマ字氏名：YAMAMOTO Youka

研究協力者氏名：大橋 瑠子
ローマ字氏名：OHASHI Riuko

研究協力者氏名：藤本 陽子
ローマ字氏名：HUJIMOTO Yoko

研究協力者氏名：渡辺 真理
ローマ字氏名：WATANABE Mari

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。