

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：14501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15738

研究課題名(和文) LED光を用いた頭頸部癌化学放射線療法に伴う口腔粘膜炎の新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of a novel treatment for oral mucositis associated with chemoradiotherapy for head and neck cancers using LED light

研究代表者

古森 孝英 (KOMORI, TAKAHIDE)

神戸大学・医学研究科・教授

研究者番号：50251294

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：国外では頭頸部の癌における抗がん剤や放射線の治療に伴う口腔粘膜炎の治療には、以前より「低反応レベルレーザー治療(LLLT)」と呼ばれるレーザー光を用いた治療が行われているが、我が国においては研究レベルではもちろん、臨床の場でもLLLTは全く用いられていないに等しい。近年、LEDなど他の光源も含めてLLLTを、「低反応レベル光治療」とするようになってきたが、本研究からLEDの有効性が見出せるならば、レーザーよりも安く、簡便なLED光を用いた口腔粘膜炎治療を実現できる可能性を秘めている。

研究成果の概要(英文)：Overseas, treatment of oral mucositis associated with anticancer drugs and radiation treatment in head and neck cancers has been undertaken using laser light called "Low reactive Level Laser Treatment (LLLT)". However, in our country, LLLT is not used at all in clinical practice as well as research. In recent years, LLLT including other light sources such as LEDs has come to be called "Low reactive Level Light Treatment". Therefore, our research has the possibility to realize treatment of oral mucositis using LED light which is cheaper and easier than laser if we can find the effectiveness of LED.

研究分野：口腔外科学

キーワード：LED LLLT 口腔粘膜炎

1. 研究開始当初の背景

頭頸部癌患者の化学放射線療法に伴う口腔粘膜炎の治療は、これまで機械的な口腔清掃や含嗽剤・薬物などの化学的方法が中心で、研究面でもそれらに関する内容が大半であったが、国外では以前より各種レーザー機器による低反応レベルレーザー治療 (Low reactive Level Laser Therapy: LLLT) が行われており、その有用性についても多くの報告がみられ、総説による文献でも検証がなされている (Migliorati C, et al. Systematic review of laser and other light therapy for the management of oral mucositis in cancer patients. Support Care Cancer. 21:333-41, 2013)。我が国では、本研究課題開始時には国内開発された適応となる LLLT レーザーが薬事承認を得ておらず、現在においても独自の臨床研究による報告は未だみられていない。

さる平成 24 年 4 月の診療報酬改定で、口腔機能管理料として周術期の口腔ケアが保険適応となり、またがん対策推進基本法の重点項目として医科歯科連携による口腔ケア推進が盛り込まれたが、口腔粘膜炎の対策に関しては、上記の国外での LLLT の現状がガイドラインで触れられているにすぎず、今後国内でも本領域の研究への積極的な取り組みが期待されている。そこで、当科においては従来より臨床の場で専門外来の一つとして「レーザー外来」と称した専門外来を設けるとともに、研究面でもレーザーや LED (light-emitting diode 発光ダイオード) の光源に関する臨床的、基礎的研究を併せて進めてきた経緯から、本研究課題の着想に至ったものである。

元来、低反応レベルレーザー治療 (LLLT) は、これまで国外ではレーザーを光源に利用する非侵襲的な治療法として、頭頸部癌の化学放射線療法に伴う口腔粘膜炎に対し用いられてきた。近年、レーザーだけでなく LED など様々な光源を含めて LLLT を捉え、Low reactive Level Light Therapy、即ち低反応レベル光治療という概念が提唱、認知されつつある。LLLT は元来、創傷治癒促進や除痛、生体刺激などを目的に使用されてきたが、レーザーによる LLLT 作用は同一の波長であれば LED 光でもレーザーと同様の作用を得ることが可能とされ、本研究の遂行により LED の口腔粘膜組織、またそこで生じる炎症への有効性を見出すことができれば学術的に意義深く、将来的にレーザーよりも低価格かつ操作のし易い新たな光治療機器が生まれる可能性を秘めている。

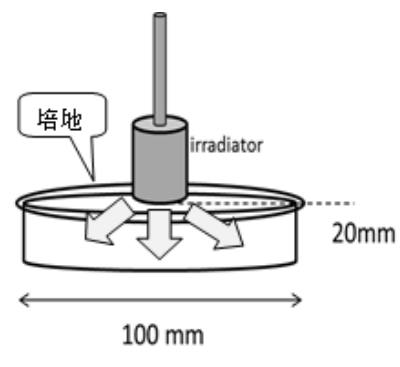
2. 研究の目的

LED はレーザーと比べると、操作が簡便かつ安全・安価であり、一般社会での実用化の現状として、産業界ではディスプレイ・信号機・イルミネーション等に使用されている。一方で医療分野においては、LED は創傷治癒

や殺菌、内視鏡の光源、新生児黄疸治療等に臨床使用され、LED 光を用いた基礎的研究としては、皮膚科・形成外科領域での瘢痕抑制、皮膚細胞の再生と活性化に関する研究などが進められている他、歯科・口腔外科領域では歯周病細菌の抑制に関する研究や口腔粘膜蛍光観察装置による癌・前癌病変の鑑別に関する研究なども進められ、一層の研究進捗が期待される。一方で、LLLT により癌が促進するとの報告もこれまでに複数報告がなされており、LED はもちろんのこと、レーザーの口腔外科領域での応用を考える際に議論されているところでもある。これより我々は、頭頸部癌患者の化学放射線療法に伴う口腔粘膜炎の治療に LED の応用を検討するにあたり、まずは LED の安全な照射条件の設定が重要であると考えた。すなわち、照射条件によっては、癌に促進的に作用する可能性が否定できないケースもあるものと考えられる。LED の癌細胞に対する影響についてこれまで細胞・分子レベルで検討した報告は、我々の渉猟し得る限りではみられていない。そこで、本研究は安全な臨床応用への足がかりを見出すため、口腔扁平上皮癌由来の培養細胞株 HSC-3 を用いた in vitro の実験を行い、HSC-3 に対して赤色波長領域の LED 光を照射し、その影響について知見を得ることを具体的な目的として検討を行った。

3. 研究の方法

赤色波長領域の LED 光 (630nm・3J) を用い、口腔扁平上皮癌由来の細胞株 HSC-3 細胞に対して下図のように LED 光照射を行い、細胞の増殖能および遊走能の観点から、下記の解析・検討を順次行った。



(1) 細胞増殖能および遊走能に関する解析

細胞増殖能検討のために WST-1 assay を適用し、遊走能については Wound healing assay および Transwell migration assay を行い、検討・評価した。

(2) 遊走能関連分子を用いた mRNA レベルおよび ELISA での発現解析

HSC-3 遊走の分子メカニズムを、過去に癌細胞の遊走に関与していると報告のある液性因子に絞り、Real time-PCR にて mRNA レベルで解析を行った他、細胞培地に含まれる血

清分泌タンパク IL-6 の量について、さらに ELISA を用いて測定した。

(3) 遊走能阻害抗体を用いての解析

遊走能阻害抗体、すなわち液性因子中和抗体を添加した細胞培地中で、再度 Wound healing assay および Transwell assay を行い、遊走能が抑制されるか否か検討を行った。

(4) 細胞の形態変化に関する解析

LED 照射後の細胞の形態的变化について、細胞骨格の観点から DAPI およびファロイジンによる蛍光免疫染色を行って、照射の有無による相違を観察、検討を加えた。

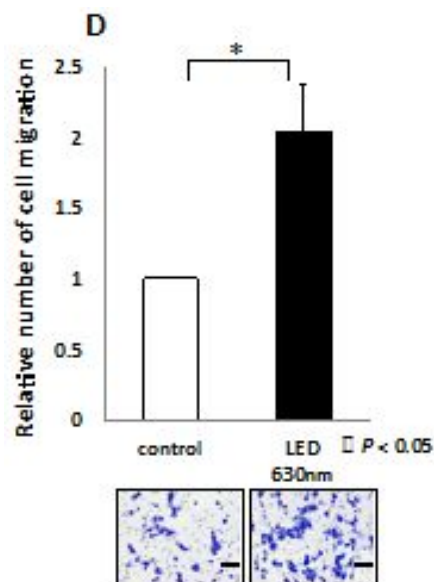
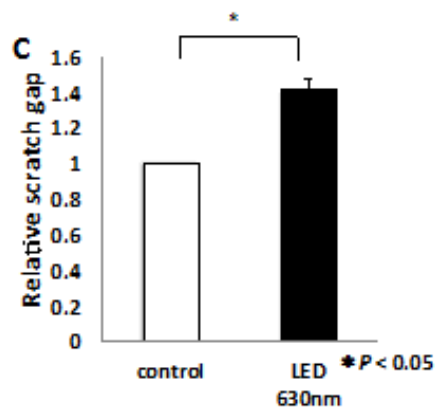
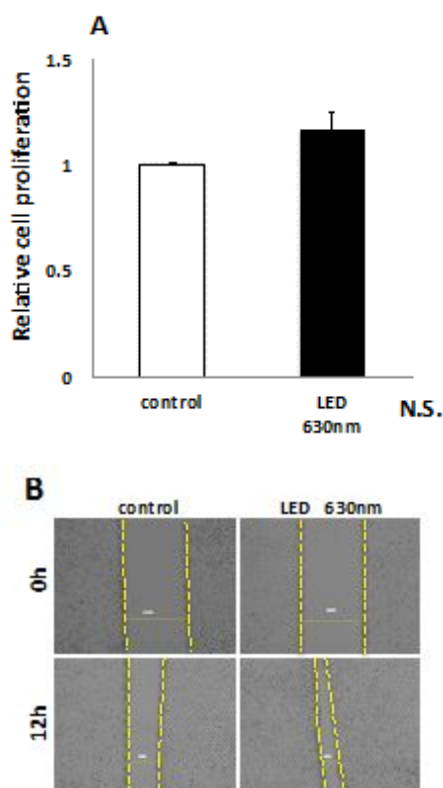
4. 研究成果

(1) 細胞増殖能および遊走能に関する解析

HSC-3 細胞の増殖能に関して WST-1 assay より、赤色 LED 照射群はコントロール群と比較し、1.1 倍増殖活性が増加していたものの有意差は認めず、増殖能には影響を及ぼさなかった (Fig 1-A)。

続いて遊走能を Wound healing assay で観察した。LED 照射 12 時間後の写真を示す (Fig 1-B)。照射群はコントロール群に比べスクラッチ幅の減少が大きかった。また、スクラッチ幅の減少率を定量すると、コントロール群の減少率 ($53.9 \pm 4.3\%$) であるのに対し、照射群は ($74.2 \pm 4.3\%$) と、統計学的有意差を認めた ($*P < 0.05$, Fig 1-C)。さらに、遊走能を Transwell assay により観察したが、照射群ではコントロール群と比較し、HSC-3 の遊走は約 2 倍亢進していた ($*P < 0.05$, Fig 1-D)。

Fig 1

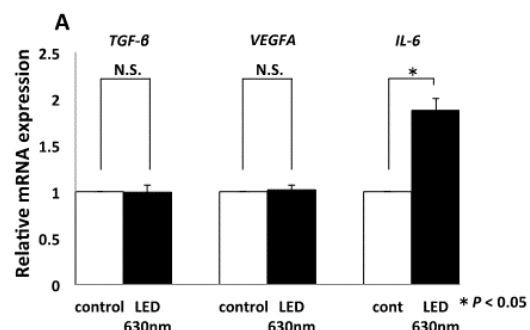


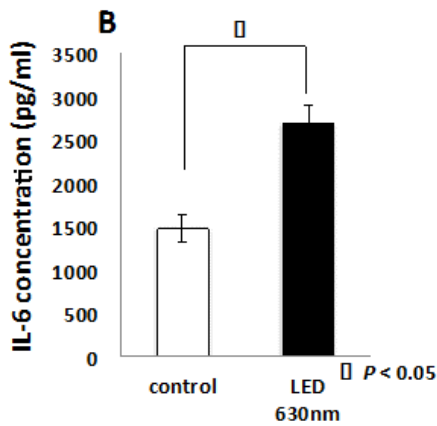
(2) 遊走能関連分子を用いた mRNA レベルおよび ELISA での発現解析

TGF- β 、VEGF、IL-6 の発現検討の結果、それぞれコントロール群と比較して 0.99 倍、1.01 倍、1.87 倍となり、IL-6 のみ統計学的に有意な発現量増加が誘導された ($*P < 0.05$, Fig 2-A)。

mRNA レベルで発現量に有意差を認めた IL-6 の ELISA でのタンパク発現量は、コントロール群では 1476.3 pg/ml であったのに対し、照射群においては 2697.5 pg/ml と増加していた ($*P < 0.05$, Fig 2-B)。

Fig 2



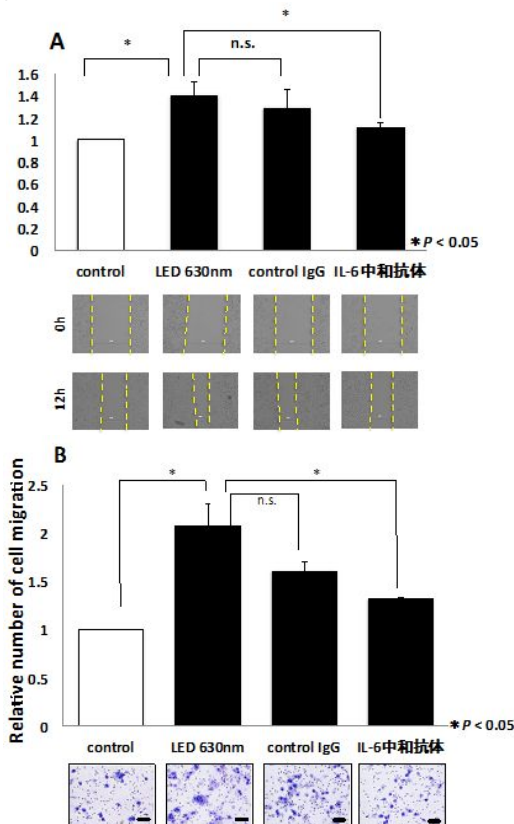


(3) 遊走能阻害抗体を用いての解析

Wound healing assay (Scratch assay)でのスクラッチ幅の減少率は、コントロール群(抗体を含まず、LED照射なし)との比較において、抗体を添加しない培地で培養した細胞への赤色LED照射群では1.39倍、コントロールIgG抗体添加培地細胞への照射群では1.28倍、IL-6中和抗体添加培地細胞への照射群では1.1倍であった(* $P < 0.05$, Fig 3-A)。

さらに、Transwell assayではコントロール群と比べ、抗体を添加しないLED照射群では2.07倍、コントロールIgG抗体添加培地へのLED照射群では1.06倍、IL-6中和抗体添加培地へのLED照射群は1.32倍となった(* $P < 0.05$, Fig 3-B)。これより、赤色LED光の照射を行っているにも関わらず、細胞の遊走能は抑制されることがわかった。

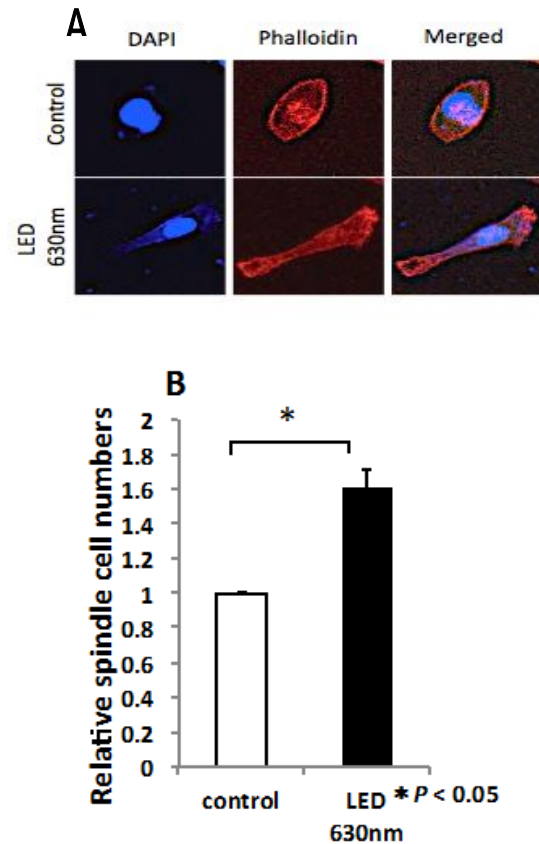
Fig 3



(4) 細胞の形態変化に関する解析

遊走能の上昇に働いた赤色LED光照射群においては、細胞の紡錘形への形態変化が確認された(Fig 4-A)。また、細胞形態の相対的变化率を定量したところ、コントロール群と比較して、1.6倍細胞形態変化を生じており、有意差が認められた(* $P < 0.05$, Fig 4-B)。

Fig 4



以上、これらの結果より、赤色LED光の照射はIL-6の発現誘導を介し、口腔扁平上皮癌細胞の遊走能を促進する可能性が示唆された。

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 7 件)

Kishimoto M, Akashi M, Tsuji K, Kusumoto J, Furudo S, Shibuya Y, Inui Y, Yakushijin K, Kawamoto S, Okamura A, Matsuoka H, Komori T: Intensity and duration of neutropenia relates to the development of oral mucositis but not odontogenic infection during chemotherapy for hematological malignancy. PLoS One. 査読有, 2017, 12, 7: e0182021.

Kimoto A, Suzuki H, Yamashita J, Takeuchi J, Matsumoto K, Enomoto Y, Komori T. A retrospective evaluation of

partial glossectomy for early tongue cancer using a carbon dioxide laser. Photomed Laser Surg. 査読有, 2017, 35, 9:479-483.

Yonezawa N, Minamikawa T, Kitajima K, Takahashi Y, Sasaki R, Nibu K, Komori T. The maximum standardized uptake value increment calculated by dual-time-point F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography predicts survival in patients with oral tongue squamous cell carcinoma. NAGOYA JOURNAL OF MEDICAL SCIENCE, 査読有, 2017, 79, 2:189-198.

Hasegawa T, Yanamoto S, Otsuru M, Yamada SI, Minamikawa T, Shigeta T, Naruse T, Suzuki T, Sasaki M, Ota Y, Umeda M, Komori T. Retrospective study of treatment outcomes after postoperative chemoradiotherapy in Japanese oral squamous cell carcinoma patients with risk factors of recurrence. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol. 査読有, 2017, 127, 524-530.

Soutome S, Yanamoto S, Funahara M, Hasegawa T, Komori T, Yamada S, Kurita H, Yamauchi C, Shibuya Y, Kojima Y, Nakahara H, Oho T, Umeda M. Effect of perioperative oral care on prevention of postoperative pneumonia associated with esophageal cancer surgery. Medicine, 査読有, 2017, 96, 33:1-5.

岸本恵美, 古土井春吾, 岩田英治, 藤林淳子, 楠元順哉, 明石昌也, 古森孝英. 頭頸部癌患者における化学放射線療法による口腔粘膜炎の重症度を予測する因子. 日本口腔感染症学会雑誌, 査読有, 2017, 24, 1:9-13.

古森孝英, 榎本由依, 北山美登里, 小守紗也華, 松本耕祐, 木本明, 竹内純一郎, 鈴木泰明. 【最近の歯科におけるレーザーの応用】口腔外科領域におけるレーザーの応用. 日本レーザー医学会誌, 査読有, 2016, 37, 52-57.

〔学会発表〕(計 4 件)

松尾健司, 鈴木泰明, 榎本由依, 松本耕祐, 北山美登里, 重岡学, 古森孝英. 口腔扁平上皮癌細胞に及ぼす LED 照射の影響 - 安全な臨床応用を目指して -. 第 62 回(公社)日本口腔外科学会総会・学術大会, 2017 年 10 月 20 - 22 日, 京都国際会議場(京都府).

松尾健司, 鈴木泰明, 八谷奈苗, 山下淳也, 榎本由依, 筧康正, 松本耕祐, 北山美登里, 重岡学, 古森孝英. 口腔扁平上皮癌細胞に与える LED 光照射の影響. 第 29 回日本レーザー歯学会, 2017 年 9 月 23-24 日, 日本歯科大学新潟生命歯学部(新潟県).

松尾健司, 鈴木泰明, 八谷奈苗, 山下淳也, 榎本由依, 松本耕祐, 北山美登里, 重岡学, 古森孝英. 赤色 LED 光による口腔扁平上皮

癌細胞株の遊走能促進には IL-8 が関与する. 第 30 回レーザー医学会 関西地方会, 2017 年 7 月 29 日, 神戸大学医学部(兵庫県).

Suzuki H, Asai T, Enomoto Y, Kitayama M, Matsumoto K, Kimoto A, Shigeoka M, Chikazu D, Komori T. EFFECTS OF RED LIGHT-EMITTING DIODE IRRADIATION ON THE PROLIFERATION AND DIFFERENTIATION OF PREOSTEOBLASTIC MC3T3-E1 CELLS. 22nd International Conference on Oral and Maxillofacial Surgery, 2015.10.27-30, Melbourne(Australia).

〔図書〕(計 3 件)

古森孝英, 永末書店, 「改訂版 口腔ケア基礎知識」. 日本口腔ケア学会, 編. 糖尿病患者の口腔ケア. 2017, 201-202 頁.

古森孝英, 永末書店, 「改訂版 口腔ケア基礎知識」. 日本口腔ケア学会, 編. 心疾患患者の口腔ケア. 2017, 203-204 頁.

古森孝英, 口腔保健協会, 「地域包括ケアと口腔ケア」. 2-3-1 心疾患について 2) 服用薬剤が原因となる口腔症状. 2017. 49-51 頁.

〔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

古森 孝英 (Komori, Takahide)
神戸大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号: 50251294

(2) 研究分担者

鈴木 泰明 (Suzuki, Hiroaki)
神戸大学・医学部附属病院・講師
研究者番号: 10397812

(2)研究分担者

南川 勉 (Minamikawa, Tsutomu)
神戸大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：10397804

(2)研究分担者

木本 明 (Kimoto, Akira)
神戸大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：30397167