

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20212

研究課題名(和文)放射線性唾液腺障害に対する新規治療法の開発

研究課題名(英文)Development of novel treatment to radiological salivary gland dysfunction

研究代表者

古後 龍之介(Kogo, Ryunosuke)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：90529885

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：頭頸部癌治療において有用な治療法である放射線治療は臓器を温存できるという利点の反面、治療後の半永続的な唾液分泌の低下といった有害事象をきたす。rapamycinは細胞内活性酸素を除去することにより、放射線による組織障害を予防できる可能性がある。本研究ではrapamycinが正常唾液腺細胞の活性酸素産生を抑制することを示した。これによりrapamycinが放射線照射に伴う活性酸素産生を抑制する可能性があり、放射線性唾液腺障害を予防できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Radiation therapy is effective for head and neck squamous cell carcinoma and useful for organ preservation, however radiation induces permanent xerostomia due to salivary gland damage. It is reported that rapamycin, mTOR inhibitor, removes intracellular reactive oxygen species(ROS) in human oral keratinocytes and prevents senescence. This study shows rapamycin inhibits intracellular ROS production in normal salivary gland cell. This result indicates rapamycin inhibits ROS in irradiated salivary gland cells, too. Moreover, rapamycin might protect radiation induced salivary gland disorder.

研究分野：耳鼻咽喉・頭頸部外科

キーワード：放射線性唾液腺障害 rapamycin

1. 研究開始当初の背景

頭頸部癌は全癌の約 5%を占める悪性腫瘍であり、呼吸、発声、摂食、嚥下機能や整容面に関わる部位に発生する。また、扁平上皮癌が多くを占め、比較的放射線感受性が高い腫瘍であることから、外科的切除に放射線療法、化学療法を加えた集学的治療が行われることが多い。化学放射線療法の発達により、臓器温存率や生存率は上昇してきているが、放射線性唾液腺障害や粘膜障害に伴う口腔乾燥症や粘膜炎は頭頸部癌患者の著しい QOL (Quality of life) の低下をきたし、依然頭頸部癌治療における重要課題である。特に、放射線性唾液腺障害に伴う口腔乾燥症は照射終了後も永続的に持続することが多い。現在までに放射線性唾液腺障害（口腔乾燥症）に対する予防法は確立されておらず、基礎研究における新規の予防法の開発が望まれる。

2. 研究の目的

頭頸部癌における放射線治療は根治治療と臓器温存の面で重要な役割を果たす。しかしながら、放射線治療後の唾液腺障害は口腔乾燥、味覚・嚥下機能の低下など永続的な QOL の低下をきたす。現在までに放射線性唾液腺障害の予防法は確立されておらず、基礎研究による予防法の開発が重要である。mTOR inhibitor (rapamycin)は免疫抑制作用や抗癌作用を有する薬剤として注目されているが、近年放射線照射による上皮細胞内の活性酸素を減少させることで、放射線性粘膜障害を抑制することが報告されている。本研究では放射線性唾液腺障害治療に対する rapamycin の応用に加えて頭頸部癌細胞に対する rapamycin の効果を *in vitro model* を用いて検討する。

3. 研究の方法

1) 頭頸部癌細胞株に対する rapamycin の効果の検討

1. rapamycin の細胞生物学的効果の検討

複数の頭頸部癌細胞株 (SCC9, FaDu) を

用いて、rapamycin による細胞増殖抑制効果を MTS assay、Clonogenic assay を用いて測定する。

2. rapamycin 投与量の至適化

1 と同時に、それぞれの細胞株に対する rapamycin の至適投与量を IC₅₀ の測定で決定する。

3. mTOR pathway 活性化の程度の測定

それぞれの細胞株における rapamycin の至適投与量に影響すると思われる PI3K-Akt-mTOR pathway の活性化を下流のリン酸化 S6 タンパク量 (WB 法) を測定、定量する。

4. 放射線照射との併用の検討

1 と同様に、放射線照射 2-6Gy と rapamycin を併用し、rapamycin の相乗的もしくは相加的な細胞増殖抑制効果を検証する (MTS assay、Clonogenic assay)。

2) 正常唾液腺細胞株 (HSG、Hs917.T) に対する rapamycin の効果の検討

1. rapamycin 投与量、放射線照射量の至適化
唾液腺細胞株 HSG、Hs917.T に対する rapamycin 投与量と放射線照射量の至適化を IC₅₀、Survival fraction (Clonogenic assay)を測定することで決定する。

2. 放射線照射によって誘導される DNA 障害、細胞老化、アポトーシスに対する rapamycin の影響の検討

放射線性 DNA 障害は γ H2AX、放射線性細胞老化は p16 の発現を免疫細胞染色、WB 法で検出する。また、細胞老化については SA- β -galactosidase 染色で同様に検討する。アポトーシスについては Annexin/PI 染色後、フローサイトメトリーで検出する。

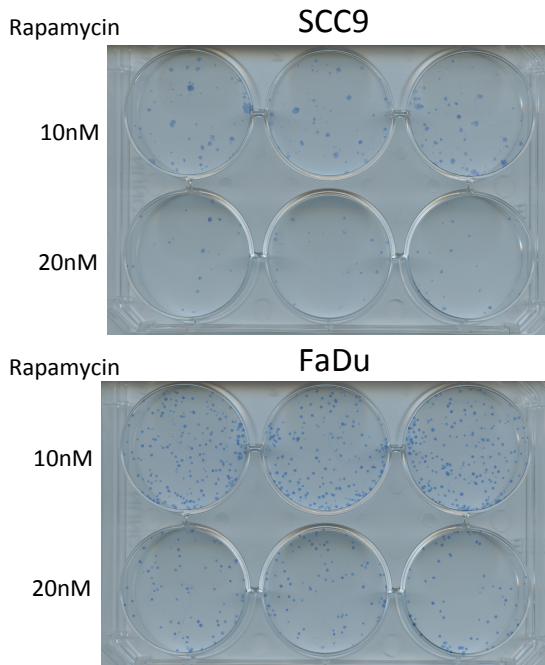
3. 放射線照射によって誘導される細胞内

ROS (活性酸素) に対する rapamycin の影響の検討

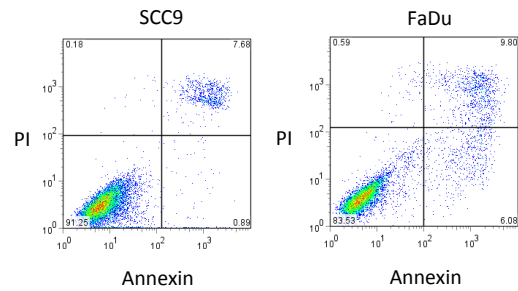
細胞内 ROS 量は DCF-DA 蛍光プローブを用いてフローサイトメトリーで定量する。

4. 研究成果

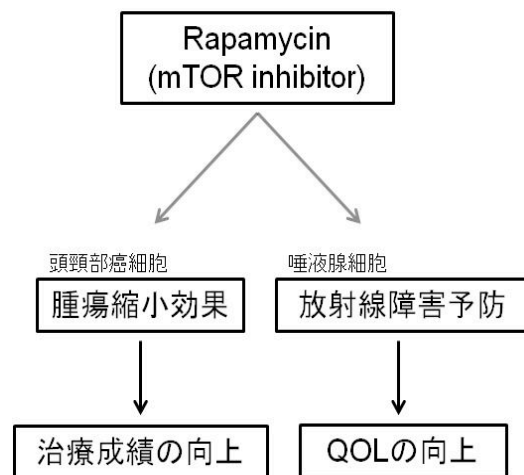
(1)頭頸部癌細胞株 (SCC9、FaDu) に rapamycin を投与し、clonogenic assay、MTS assay とともに rapamycin の濃度依存的な増殖抑制効果を示した。



(2)頭頸部癌細胞株 (SCC9、FaDu) に比し、正常唾液腺細胞株 (HSG、Hs917.T) は clonogenic assay、MTS assay とともに rapamycin による増殖抑制効果が低かった。また、この原因としてそれぞれの細胞株で Annexin-PI assay を行い、正常唾液腺細胞株が頭頸部癌細胞株に比べて有意にアポトーシスが抑制されていることがわかった。アポトーシス抑制の原因の 1 つとして DCF-DA assay で rapamycin 投与時の正常唾液腺細胞株の細胞内活性酸素量 (ROS) が頭頸部癌細胞株よりも低いことを確認した。このことは正常唾液腺細胞株の細胞内活性酸素除去能が高いことを示している。



以上より、rapamycin は頭頸部癌細胞株に対して、より殺細胞性に働き、正常唾液腺細胞株の活性酸素産生を減少させる可能性が示



唆された。この働きは化学療法や放射線療法による活性酸素の産生を抑制する可能性も示唆している。本研究では頭頸部癌細胞株、正常唾液腺細胞株に対するX線照射や抗癌剤投与による酸化ストレスを加えた実験が時間的に未実施である。しかしながら、rapamycin は他の癌腫と同様に頭頸部癌細胞に対しても治療薬となりうると考えられ、正常唾液腺細胞のアポトーシスを抑制する可能性がある。さらなる研究で rapamycin が放射線照射から正常唾液腺への障害を予防する可能性も今後明らかになると思われる。これまで不可能であった放射線治療中の唾液腺の保護が可能になる可能性も秘めている。

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 0 件)

〔学会発表〕（計 1 件）

頭頸部化学放射線療法に対する栄養管理と
治療完遂率に関する検討
古後龍之介 安松隆治 内龍太郎 中野貴
文 橋本和樹 若崎高裕 中川尚志
第 41 回日本頭頸部癌学会 2017.6.8-6.9

〔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
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古後 龍之介 (KOGO, Ryunosuke)
九州大学病院 耳鼻咽喉・頭頸部外科 助
教
研究者番号：90529885

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()