

平成 30 年 5 月 15 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20441

研究課題名(和文) 口腔癌治療薬の口腔上皮系正常細胞に対する傷害性の克服に関する基礎研究

研究課題名(英文) Effects of polyphenols on doxorubicin-induced oral keratinocyte cytotoxicity and anticancer potency against oral cancer cells.

研究代表者

生 宏 (SHENG, HONG)

東北大学・歯学研究科・大学院非常勤講師

研究者番号：60771904

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：口腔扁平上皮癌の治療に使われているドキソルビシン(DOX)は、ヒト口腔由来正常ケラチノサイト(HOK)に対して口腔扁平上皮癌細胞(HSC-2)と同程度に傷害を与えることが報告されている。本研究は、DOX誘発性の口腔正常ケラチノサイト細胞傷害を軽減する方法を探索することを目的として上記の3種のポリフェノール添加により、ヒト口腔扁平上皮癌細胞に対する傷害性は促進されるが、正常ケラチノサイトに対する細胞傷害性の抑制、抗酸化作用及び細胞保護に関する可能性について検討を目的としている。

研究成果の概要(英文)：Normal human oral keratinocytes are highly sensitive to anticancer drugs including doxorubicin. Resveratrol, epigallocatechin gallate, and tannic acid are polyphenolic compounds that were reported to have cardioprotective effect when combined with doxorubicin. However, it is unknown whether these polyphenols could protect normal human oral keratinocytes against doxorubicin-induced cytotoxicity without weakening its cytotoxic potential against oral cancer cells. Here, we examined the effects of the 3 polyphenolic compounds on doxorubicin-induced cytotoxicity in normal human oral keratinocytes and also investigated their effects on doxorubicin potency in HSC-2 human oral squamous cell carcinoma cells.

This study for the first time reported the effects of resveratrol, epigallocatechin gallate, and tannic acid on doxorubicin-induced cytotoxicity in normal oral keratinocytes and oral cancer cells.

研究分野：歯科学

キーワード：ドキソルビシン ヒト口腔正常ケラチノサイト レスベラトロール 没食子酸エピガロカテキン タンニン酸 細胞傷害

1. 研究開始当初の背景

口腔扁平上皮癌罹患患者数は癌全体の 1~2% を占め、この 30 年間で約 3.8 倍増加している(厚生労働省「人口動態統計」)。治療法としては、外科療法、放射線療法、化学療法の 3 つが知られている。現時点で、口腔扁平上皮癌患者に対する化学療法に関する論文 4422 報のうち、ドキソルビシン (DOX) を使用した論文は、75 報(1.7%)であった。現在、DOX はセツキシマブとの併用で臨床使用されている。しかし、DOX の副作用として、吐き気・嘔吐・骨髄抑制・血管痛・静脈炎・心機能障害などが知られているが、分子標的抗体治療薬と併用すると心筋細胞死による左心室の機能不全が 27%まで増大することが報告されている (Nature Medicine 12 (8): 881-882, 2006)。癌患者に対する DOX の副作用に関する論文は、515 編報告されているが、口腔扁平上皮癌患者において検討されている論文は、1 編(癌と化学療法、10(12) 2538-2544)しか報告されていない。近年、ヒト口腔由来正常ケラチノサイト (NHOKs) に対して口腔扁平上皮癌細胞 (HSC-2) と同程度に傷害を与えることが報告された (Anticancer Res 35, 5341-5355, 2015)。NHOKs は口腔上皮の感染防御機構に重要な役割を担っている。抗癌剤治療に伴う口内炎発症率は 40% であり、このうち約 50% は症状が重度であり、抗癌剤の減量や、治療を中止せざるをえない状況も起こりうる。この場合、癌治療の目的を達成することが困難となり、患者の QOL は著しく低下することになる。抗癌剤誘発細胞傷害の発生防止または症状軽減は、QOL を改善し、治療費を減少させるために必要とされている。DOX の口腔正常上皮系細胞に対する副作用を減弱する方法を確立することが重要である。しかし、これまで DOX 誘発性の口腔上皮系正常細胞傷害の克服方法の検討はほとんど研究されていない。レスベラトロール (RSV)、没食子酸エピガロカテキン

(EGCG)、タンニン酸 (TA) の 3 種のポリフェノールは DOX による心筋傷害の抑制することが報告されている。しかし、この 3 種のポリフェノールは DOX 誘発性の口腔上皮系正常細胞傷害に対する抑制効果の検討は研究されていない。また、ポリフェノール類は一般的に、低濃度では抗酸化作用、高濃度では、酸化作用といった二面性を併せ持つことが報告されているが、この濃度に応じて逆の作用に変換する機構は不明である。もし、濃度の調整によって上記の 3 種のポリフェノールが DOX の抗癌細胞効果を損なわずに、抗酸化作用による細胞保護効果を賦与できれば、DOX 治療に伴う口腔上皮系正常細胞の傷害をより効果的に軽減できると考えていた。

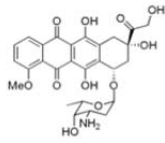
2. 研究の目的

本研究は、DOX 誘発性の口腔正常ケラチノサイト細胞傷害を軽減する方法を探索することを目的として上記の 3 種の各濃度のポリフェノール添加により、ヒト口腔扁平上皮癌細胞に対する傷害性は促進される一方、正常ケラチノサイトに対する細胞傷害性の抑制、細胞保護に関する可能性について検討を目的としている。

3. 研究の方法

各種濃度の DOX と 3 種のポリフェノール (Figure 1) を単独あるいは併用で、細胞増殖および細胞死の誘導をそれぞれ解析した。ポリフェノールの酸化を介した細胞内活性酸素の変化により、DOX の細胞内への取込阻害に関する可能性を検討した。





Doxorubicin (DOX)
 $(C_{27}H_{29}NO_{11})$
 Log P: 2.82
 MW: 543.52 g mol⁻¹

Figure 1: Chemical structure of polyphenols and doxorubicin.

4. 研究成果

既報の通り、NHOKs の生存率は、DOX 濃度依存的に減少した。供試した3種のポリフェノールのうち、RSV と DOX の併用で NHOKs と HSC-2 細胞に対して、両方とも細胞毒性は RSV 濃度依存的に増強されたことを見出した (Figure 2)。この結果は正常口腔ケラチノサイトに対する細胞傷害性の抑制・細胞保護に関する可能性の検討という研究目的と合致しなかった。しかし、EGCG と TA の併用では NHOKs と HSC-2 細胞に対する DOX の細胞毒性の影響が違うことが明らかにした。興味深い結果として、高濃度 DOX の場合は、EGCG と TA により DOX の抗癌細胞効果を損なわずに NHOKs に対する DOX の細胞毒性を一定程度軽減するという挙動を発見した (Figure 3 and 4)。しかし、EGCG と TA の NHOKs 細胞毒性を一定程度軽減の挙動パターンが異なる。EGCG の併用では、低濃度 DOX の場合は、細胞毒性は EGCG 濃度依存的に増強されたが、高濃度 DOX の場合は、EGCG により細胞毒性は軽減される (Figure 3)。一方で、TA の併用では、HSC-2 細胞に対して、TA 濃度依存的に傷害性は促進されたが、NHOKs に対して、DOX 濃度に関わらず、ほぼ一定の細胞生存率を示し、かつ TA 濃度依存的に細胞生存率は高かったことを見出した (Figure 4)。メカニズムの解明に関して、NHOKs 細胞死の解析では、EGCG および TA の併用は、ネクローシスを減少させるとともにアポトーシスを増加させるという結果が得られた (Figure 5)。早期の細胞内活性酸素の解析による、EGCG や TA での NHOKs の細胞障害軽減と HSC-2 の細胞障害増強には細胞内 ROS の関与は示されなかった。NHOKs と

HSC-2 細胞に細胞周期制御作用および細胞膜の影響が違うことにより、DOX の細胞内への取込阻害の効果が違うか引き続き検討が必要である。

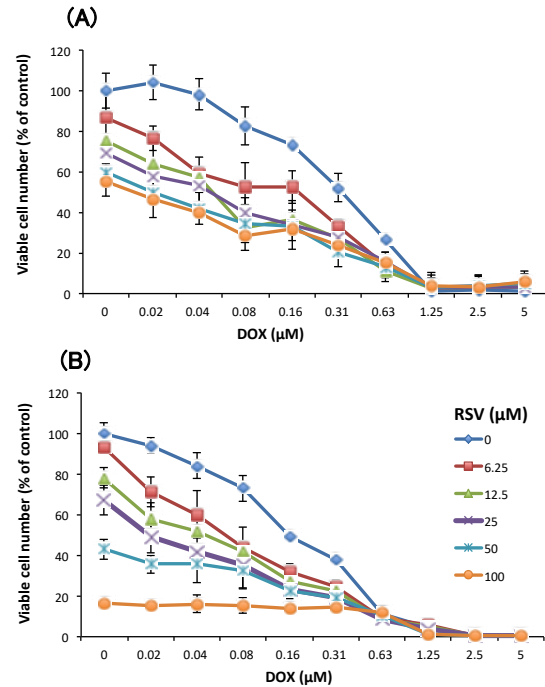


Figure 2. Effect of combination of RSV and DOX on the cell viability in NHOKs (A) and HSC-2 (B).

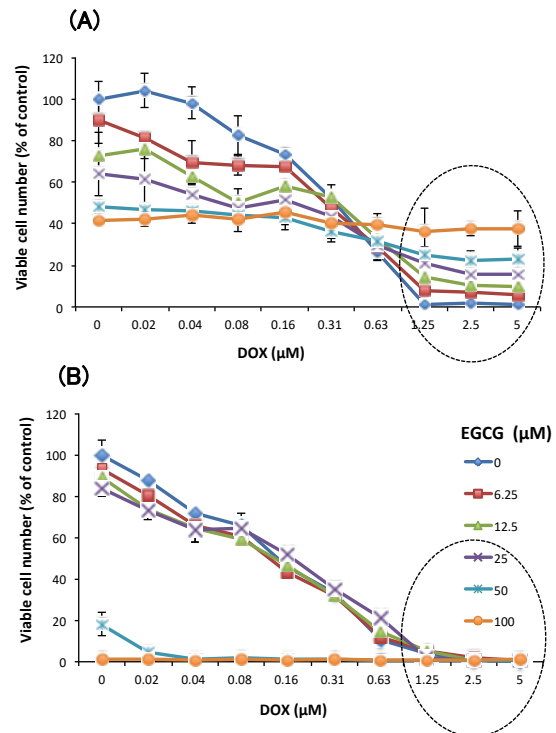


Figure 3. Effect of combination of EGCG and DOX on the cell viability in NHOKs (A) and HSC-2 (B).

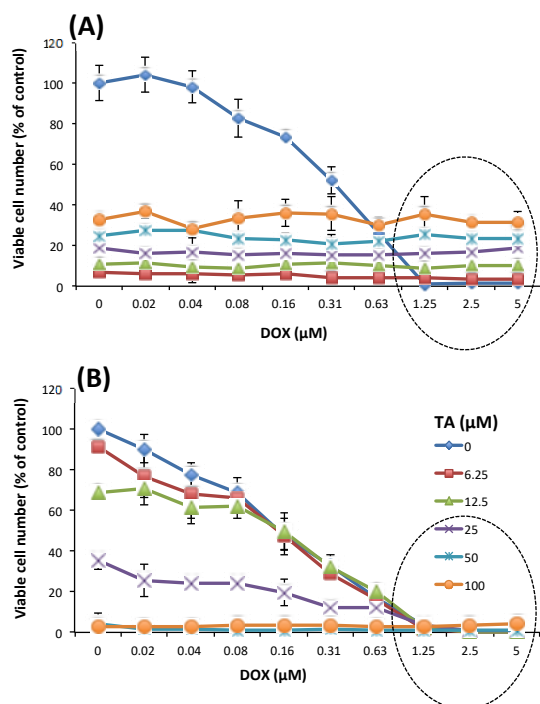


Figure 4. Effect of combination of TA and DOX on the cell viability in (A) and HSC-2 (B).

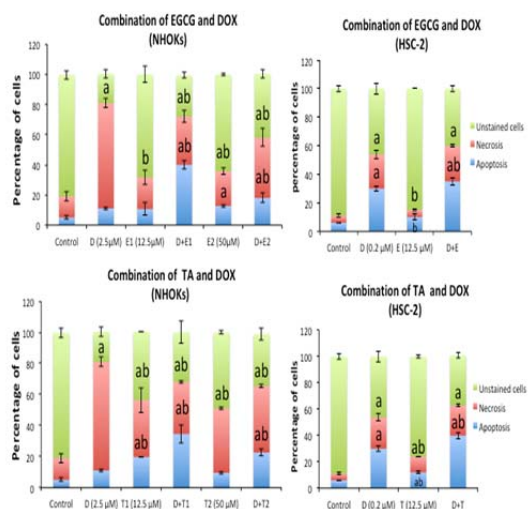


Figure 5. Cells apoptosis and necrosis induced by EGCG and TA in combination with DOX. Turkey's HSD. (^avs control; ^bvs DOX), * (P < 0.05). (D: DOX, E: EGCG, T: TA).

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 2 件)

- ① Sheng H, Ogawa T, Niwano Y, Sasaki K, Tachibana K. Effects of polyphenols on doxorubicin-induced oral

keratinocyte cytotoxicity and anti cancer potency against oral cancer cells. J Oral Pathol Med. 2018 Apr;47 (4):368-374. doi: 10.1111/jop.12685. (査読有)

- ② Narihira K, Watanabe A, Sheng H, et al. Enhanced cell killing and apoptosis of oral squamous cell carcinoma cells with ultrasound in combination with cetuximab coated albumin microbubbles Journal of drug targeting. J Drug Target. 2018 Mar ;26(3):278-288. doi: 10.1080/1061186X.2017.1367005. (査読有)

[学会発表] (計 3 件)

- ① Sheng H, Ogawa T, Niwano Y, Sasaki K, Tachibana K. Effects of polyphenols on doxorubicin-induced oral keratinocyte cytotoxicity and anticancer potency against oral cancer cells.

14th meeting of the international society for maxillofacial rehabilitation-64th annual meeting of the american academy of maxillofacial prosthetics. San Francisco, California USA, 2017.

- ② Sheng H, Ogawa T, Niwano Y, Sasaki K, Tachibana K. Effects of polyphenols on doxorubicin-induced cytotoxicity in normal human oral keratinocytes. 第 59 回歯科基礎医学会学術大会, 2017.

- ③ 生宏、渡邊晶子、成平恭一、立花克郎. 超音波照射によるドキソルビシンおよびナノバブルを併用した抗癌効果. 日本超音波医学会第 90 回学術集会, 2017.

[図書] (計 1 件)

- ① Sakagami H, Sheng H, Yasui T, Fukuchi K, et al. Therapeutic potential of solubilized nanolignin against oral diseases. Chapter 18, 545~576, Elsevier. (査読有)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

生 宏 (SHENG, Hong)

東北大学・大学院歯学研究科・大学院非常
勤講師

研究者番号：60771904