

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09911

研究課題名(和文) 抗酸化物質を用いた酸化ストレス制御による口腔粘膜炎の発症予防・進行抑制効果の解明

研究課題名(英文) Protective effects of antioxidants against chemotherapy induced oral mucositis

研究代表者

玉木 直文 (TAMAKI, Naofumi)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学域)・准教授

研究者番号：20335615

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：細胞モデルにおいて、レスベラトロールの抗酸化・抗炎症効果について検討した。口腔粘膜炎のin vitroモデルとして、培養ヒト表皮角化細胞株に、抗癌剤 5-fluorouracil (5-FU)を投与した。その結果、5-FU投与によって活性酸素種の過剰産生や炎症性サイトカインが増加したが、レスベラトロールによって抑制された。レスベラトロールは5-FUで誘導された口腔粘膜炎のin vitroモデルにおいて、抗酸化・抗炎症メカニズムを活性化することが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌の治療のために化学放射線療法を行うことが増えてきているが、その副作用として口内粘膜炎(口内炎)が発症し、患者が摂食困難などなることが問題となっている。近年、化学放射線療法時に発生する口腔粘膜炎に酸化ストレスが関与していることが分かってきた。そこで本研究において、抗酸化物質の摂取によって酸化ストレスを制御することで、口腔粘膜炎の発症予防や進行抑制を行うことが出来るかの基礎的な研究を様々な観点から評価した。

研究成果の概要(英文)：Oral mucositis is a common adverse event associated with chemotherapy against various cancers. Resveratrol is known to decrease oxidative damage and inflammation. In this study, we examined the protective effects of resveratrol on 5-fluorouracil (5-FU) induced oxidative stress and inflammatory responses in normal human keratinocytes as in vitro oral mucositis model. Resveratrol suppressed 5-FU-induced overproduction of reactive oxygen species by upregulating anti-oxidant defense genes. Concerning inflammatory responses, resveratrol suppressed the 5-FU-induced expression of pro-inflammatory cytokines. Resveratrol would be useful for preventing 5-FU-induced oral mucositis by activating anti-oxidant and anti-inflammatory responses.

研究分野：予防歯科

キーワード：酸化ストレス 抗酸化物質 炎症性サイトカイン 抗酸化力 口腔粘膜炎

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年、活性酸素種(Reactive Oxygen Species; ROS)が体内の酸化ストレスを増加させることで数十種類もの全身的な疾患の発症に関与することが分かっている。活性酸素種は、主に宿主の防御反応として細胞から産生される。しかし過剰に産生された場合は、宿主組織のタンパク質、DNA や脂質にもダメージを与えることが報告されている。健康な状態では、活性酸素種と抗酸化物質のバランスによって酸化ストレス状態が保たれている。しかし様々な要因により活性酸素種が増加し、抗酸化作用によって除去できる以上の活性酸素種が生体内で発生していた場合、核酸(DNA)、タンパク質や脂質などを攻撃し損傷を与える。これらは細胞を構成している分子であり、酸化変性されることによって細胞の機能が障害されることが分かっている。

これまで主に、歯周病の進行と活性酸素種の増加との関連や歯周病治療による酸化ストレスの減少について報告してきた。これらの研究の結果は、歯周病が活性酸素種の過度な産生を介して、全身の臓器や疾患に影響を及ぼす可能性を示唆している。さらに酸化ストレスの影響は、口腔癌の化学放射線療法時の副作用として発症する難治性口内炎や粘膜創傷にも及び、炎症性サイトカインや増殖因子と共に複雑かつ多様に関与し、重要な役割を果たしている。口腔癌における放射線療法や化学療法は、いわゆる活性酸素種を産生させることで癌細胞にアポトーシスを引き起こさせるが、同時に正常な口腔上皮細胞に口内粘膜炎を起こすことも分かっていた。口腔癌患者に化学放射線療法を行った場合、ほぼ 100%の確率で口内粘膜炎が発症するが、治療中に良化することはなく悪化の一途をたどる。発症後は摂食機能の低下を引き起こし、重症の場合は胃瘻になるなどQOLも急速に低下する。

口腔粘膜炎の発症メカニズムはまだ不明な点が多いが、病態として第1期：開始期、第2・3期：シグナル伝達・増幅期、第4期：潰瘍期、第5期：回復期の5つのプロセスに分類される。特に開始期である第1期において、活性酸素種が重要な役割を果たすことが分かっている。口腔癌における放射線療法や抗癌剤は、いわゆる活性酸素種を産生させることで癌細胞にアポトーシスを引き起こさせるが、同時に図の様に正常な口腔上皮細胞に口内粘膜炎を起こすことが分かっていた。その原理として、放射線治療や抗癌剤を用いた化学療法を行うと細胞内に活性酸素種が過剰に発生することで細胞のDNAが損傷し、細胞死を引き起こすと考えられている。さらに第2・3期において、過剰に産生された活性酸素種によって血管内皮細胞、線維芽細胞、上皮細胞やマクロファージが活性化する。その結果、IL-1、IL-6やTNF-などの炎症性サイトカインが大量に放出され、細胞のアポトーシスを引き起こす。この組織障害がさらなる炎症性サイトカイン放出を誘導し、粘膜細胞の障害が増幅されることで、口腔粘膜炎がさらに増悪すると考えられている。以上のように、口腔粘膜炎の発症機序については少しずつ分かっているが、治療法としては物理的な病変部保護や疼痛緩和などの対症療法が行われているのが現状である。有効な治療法は未確立なため、新規の治療法の開発が期待されている。

### 2. 研究の目的

粘膜炎の発症機序については数多く研究されてきたが、その詳細についてはまだまだ不明な点が多い。酸化ストレスや分子生物学的見地から検討した研究は少なく、特に口腔粘膜炎において酸化ストレスとの関連性に着目した研究はほとんどない。口腔粘膜炎に酸化ストレスの上昇が関与していることが分っても、その対処方法がないことには発症予防は難しい。抗酸化物質の摂取によって酸化ストレスを制御し、口腔粘膜炎の発症抑制・進行抑制を評価することはほとんど研究されていない。よって本研究では、抗酸化物質の使用によって酸化ストレスを制御し、口腔粘膜炎の発症を予防・進行抑制することを主目的とする。特に、化学放射線療法時に発症する口腔粘膜炎を想定して、研究を遂行する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 細胞培養

ヒト皮膚角化(HaCaT)細胞を10% fetal bovine serumを添加したDulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)を用いて5% CO<sub>2</sub>, 37℃で培養した。

#### (2) 細胞毒性試験

96ウェルプレートに播種後、各試薬添加24時間後に細胞毒性を評価した。WST-1を用いた測定は標準プロトコル通り450nmで吸光度を測定した。

### ( 3 ) 活性酸素種測定

活性酸素種の産生量は、CellROX Green 試薬を用いて標準プロトコル通りに反応させ、蛍光分光吸光度計を用いて励起波長 485nm / 発光波長 520nm で測定した。

### ( 4 ) Western blotting

細胞を各条件で反応させたのちに全タンパクはRIPAバッファー、核タンパクはNE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Kit を用いて抽出した。SDS-PAGE で分離後、polyvinylidene difluoride メンブレンに転写し、ブロッキングの後、標準プロトコル通りに一次抗体・二次抗体と反応させて化学発光法で各バンドを検出した。

### ( 5 ) real-time PCR

Trizol 試薬を用いて標準プロトコル通りに細胞から RNA を抽出し、cDNA に逆転写した。SYBR グリーンを用いて real-time PCR 法によって定量した。mRNA 発現レベルは GAPDH で標準化し、対照群を 1 として計算した。

### ( 6 ) 統計分析

各群の比較には、one-way analysis of variance (ANOVA) と Tukey ' s post hoc test を用いた。

## 4 . 研究成果

### ( 1 ) 細胞毒性試験

まずレスベラトロールのみ添加した場合の細胞毒性について検討したところ、低濃度(0.1-100  $\mu$ M)において対照群と変わらなかったが、高濃度(150-1,000  $\mu$ M)においては減少した。次に、5-FU (5  $\mu$ g/ml)と各濃度のレスベラトロールを同時に添加した時の細胞毒性を検討した。その結果、5-FU 投与によって有意に細胞活性は減少したが、低濃度のレスベラトロール群ではやや上昇する傾向が認められた。特に 10  $\mu$ M と 100  $\mu$ M の濃度において、細胞活性は有意に上昇していた。

### ( 2 ) 活性酸素種

CellROX green を用いた蛍光発色による活性酸素種の発生量は、5-FU 投与によって対照群よりも有意に増加した。しかし抗酸化剤であるレスベラトロール (10  $\mu$ M, 100  $\mu$ M) 添加によって、対照群とほとんど同じ程度にまで活性酸素種の発生量が減少した。

### ( 3 ) 抗酸化経路

レスベラトロールと 5-FU の同時添加によって、Nrf2 の核内移行が増強され( 図 1 ), Sirtuine-1 の発現量がタンパク質レベルで増加した。またその結果、抗酸化酵素である HO-1 の発現量も増加していた( 図 2 )。レスベラトロール添加によって Nrf2/抗酸化経路が活性化され、活性酸素種が抑制されたと考えられる。

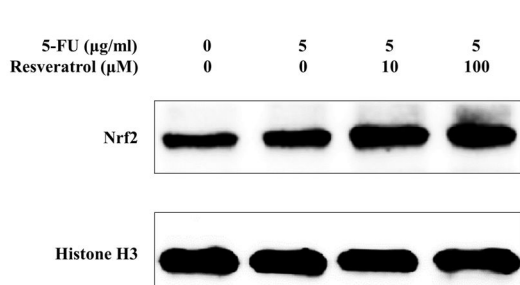


図 1. Nrf2

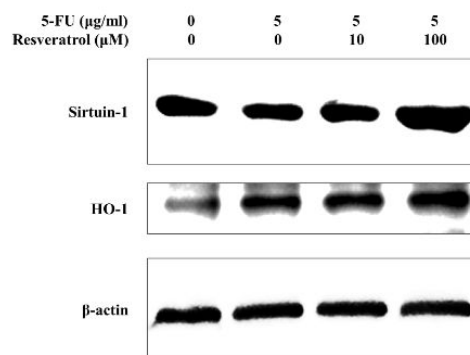


図 2. Sirtuine-1 と HO-1

( 4 ) NF- B p65

5-FU 投与によって NF- B p65 の核内移行が亢進されたが , レスベラトロールによって抑制された ( 図 3 )

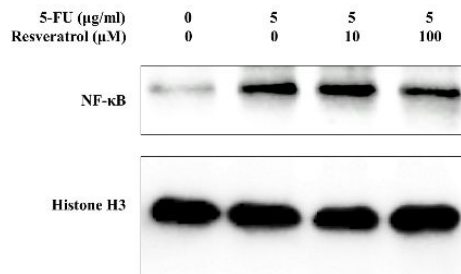


図 3. NF- B

( 5 ) 炎症性サイトカイン

炎症性サイトカインである interleukin (IL)-1 , IL-6 と tumor necrosis factor (TNF)- の発現レベルを mRNA レベルで測定したところ , 5-FU 投与によっていずれも有意に増加していた。しかしレスベラトロールを添加したところ , 炎症性サイトカインの発現は抑制された。レスベラトロール添加によって NF- B 経路が抑制されたことによって , 炎症性サイトカインも抑制されたと思われる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>玉木直文, 陳 舒, 工藤保誠, 三木かなめ, 石丸直澄, 伊藤博夫 |
| 2. 発表標題<br>実験的口腔粘膜炎モデルにおけるレスベラトロールの抗酸化・抗炎症効果  |
| 3. 学会等名<br>第38回分子病理研究会 淡路島シンポジウム              |
| 4. 発表年<br>2019年                               |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>玉木直文, 陳 舒, 工藤保誠, 三木かなめ, 石丸直澄, 伊藤博夫 |
| 2. 発表標題<br>レスベラトロール投与による実験的口腔粘膜炎への効果          |
| 3. 学会等名<br>徳島県歯科医学会大会                         |
| 4. 発表年<br>2020年                               |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

|  |
|--|
| 徳島大学大学院予防歯学分野ホームページ<br><a href="http://preventdent-tokushima-u.jp/index.html">http://preventdent-tokushima-u.jp/index.html</a> |
|--|

6. 研究組織

| 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|