

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K19207

研究課題名（和文）化学放射線療法による口腔粘膜炎に対する治療法の開発

研究課題名（英文）Development of treatments for chemoradiotherapy-induced oral mucositis

研究代表者

大橋 伸英（Ohashi, Nobuhide）

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：70783752

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：プロピルヒドロキシプロリン（Pro-Hyp）のヒト口腔線維芽細胞（HOrF）の細胞増殖は先行研究と同様に200nmol/mLの濃度で最も増殖能が高く、至適濃度と考えられた。また、高濃度のPro-HypはHOrFの増殖を抑制することが明らかになった。血清成分は細胞増殖能に大きな影響は与えないことが分かった。化学放射線療法により誘発された口腔粘膜炎発症マウスでは毒性が強く研究の継続が困難なため、放射線照射単独での検討となった。Pro-Hyp投与により体重減少が増悪し、口腔粘膜炎の増悪傾向があった。Pro-Hypの口腔粘膜炎発症時の投与は、口腔粘膜炎の重症化を助長する可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん化学放射線療法により誘発される口腔粘膜炎に対し、ジペプチドであるプロピルヒドロキシプロリンの効果を検討した。プロピルヒドロキシプロリンはヒト口腔線維芽細胞に対し、細胞増殖の増大効果を有していたが、マウスで口腔粘膜炎を発症させると増悪させる可能性があることがわかった。

研究成果の概要（英文）：Propylhydroxyproline (Pro-Hyp) increased cell proliferation in human oral fibroblasts (HOrF) at a concentration of 200 nmol/mL, which was considered the optimal concentration, as in previous studies. In addition, it was revealed that high-concentration Pro-Hyp inhibited the proliferation of HOrF. It was found that serum components do not significantly affect cell proliferation ability. Radiation alone was investigated because toxicity was high in mice with oral mucositis induced by chemoradiotherapy, making it difficult to continue the study. Administration of Pro-Hyp exacerbated weight loss and tended to exacerbate oral mucositis. Administration of Pro-Hyp at the onset of oral mucositis may promote aggravation of oral mucositis.

研究分野：口腔外科学

キーワード：口腔粘膜炎 プロピルヒドロキシプロリン 放射線性口腔粘膜炎 マウス

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

がん化学放射線治療では、治療を遅滞なく完遂することが重要であり、近年がん支持療法が注目されている。口腔領域のがん支持療法では、口腔粘膜炎の制御が要であり重症化を軽減させるための研究が行われている。一般的に化学療法では40%の患者に口腔粘膜炎が生じ、頭頸部癌の放射線療法では100%口腔粘膜炎が生じるとされている。いったん口腔粘膜炎が生じると、口腔粘膜の破綻と疼痛の増強により、経口摂取が困難となりやすく、口腔粘膜炎の重症化は敗血症や疼痛コントロールの制御を困難にし、治療中断の原因となる。治療中断は原疾患の治療成績に影響を与え、患者のQOLのみならず予後低下をもたらす。これまでに、皮膚の創傷治癒モデルである褥瘡においてアルギニン、グルタミンなどのアミノ酸やオリゴペプチドの摂取が創傷治癒を促進することが報告されている。小腸粘膜上皮にはタンパク質の代謝産物であるアミノ酸を吸収するアミノ酸トランスポーターだけでなく、オリゴペプチドの形で吸収することができるペプチドトランスポーターも存在することが明らかとなっている。ペプチドトランスポーターは構成アミノ酸による基質特異性が低く、他の栄養素にかかわるトランスポーターに比べて広範な基質認識性を有している。ペプチドトランスポーターは、コラーゲンペプチドの代謝過程で生じるプロリルヒドロキシプロリン (Pro-Hyp) も基質として認識し、創傷治癒促進効果を持つことがマウス皮膚片を用いた研究で報告されている。これは、培養皮膚片から線維芽細胞の増殖が誘導され、ヒアルロン酸合成酵素にかかわる2つの遺伝子発現とヒアルロン酸合成を促進し、創傷治癒にかかわるコラーゲンの生成することによると考えられている。アルギニンやグルタミンのようなアミノ酸を介する創傷治癒過程とは異なる経路でジペプチドである Pro-Hyp が創傷治癒を促進することが示されており、創傷治癒の相乗効果が期待されている。このことから、Pro-Hyp が化学放射線療法誘発性口腔粘膜炎の治癒に関わるのではないかと予想した。

### 2. 研究の目的

これまでに、化学放射線療法誘発性口腔粘膜炎に対する原因療法は確立していない。本研究では、化学放射線療法誘発性口腔粘膜炎に対し、

①Pro-Hyp がヒト口腔線維芽細胞の増殖能評価

②マウスの化学放射線療法誘発性口腔粘膜炎に対する Pro-Hyp の至適濃度と安全性の評価を目的に探索した。

### 3. 研究の方法

#### (1) Pro-Hyp 投与によるヒト口腔線維芽細胞の増殖能評価

ヒト口腔線維芽細胞 (H0rF) を DMEM 培地で細胞培養した。H0rF に血清成分が必要かを検討するため、ウシ胎児血清 (FBS) の添加なし (FBS 濃度 0%) とあり (FBS 濃度 10%) の条件下で培養した。H0rF の増殖能に Pro-Hyp が関与するかどうかを検討するために、培地にマウス培養皮膚片における研究 (Shigemura et al. 2009) で至適濃度とされる 200 nmol/mL の Pro-Hyp を基準に 0, 100, 200, 300, 400, 1000 nmol/mL の濃度の条件下で 24 時間, 48 時間, 72 時間培養し、それぞれにおける吸光度を計測し、増殖能を評価した。

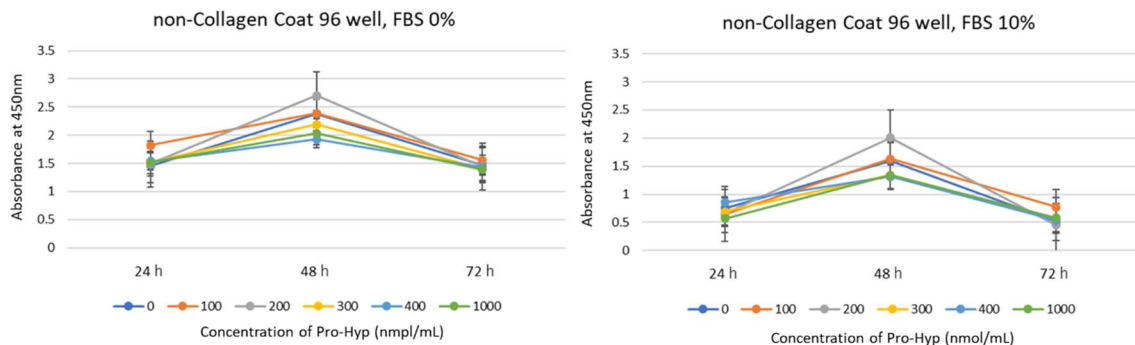
#### (2) マウスの化学放射線療法誘発性口腔粘膜炎に対する Pro-Hyp の至適濃度, 安全性の検討

殺細胞性抗腫瘍薬のシスプラチン (11mg / kg) を雄の BALB / c マウスに腹腔内注射し、マウスの頭頸部に X 線を 17Gy 単回照射し化学放射線療法誘発性口腔粘膜炎マウスモデルを作成した (S.-H. RYU et al. 2010)。口腔粘膜炎発症なしのマウスと化学放射線療法誘発性口腔粘膜炎発症マウスを用意し、それぞれに対し、化学放射線療法後から口腔粘膜炎が消失する前日まで Pro-Hyp を 1 日 2 回腹腔内注射 (生食投与 (control), 80, 400, 2000µg/body/回) した。肉眼的評価により口腔粘膜炎が生じた日数, 体重減少, 生存率を計測し治癒効果と安全性の比較検討を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) Pro-Hyp 投与によるヒト口腔線維芽細胞の増殖能評価 (図1)

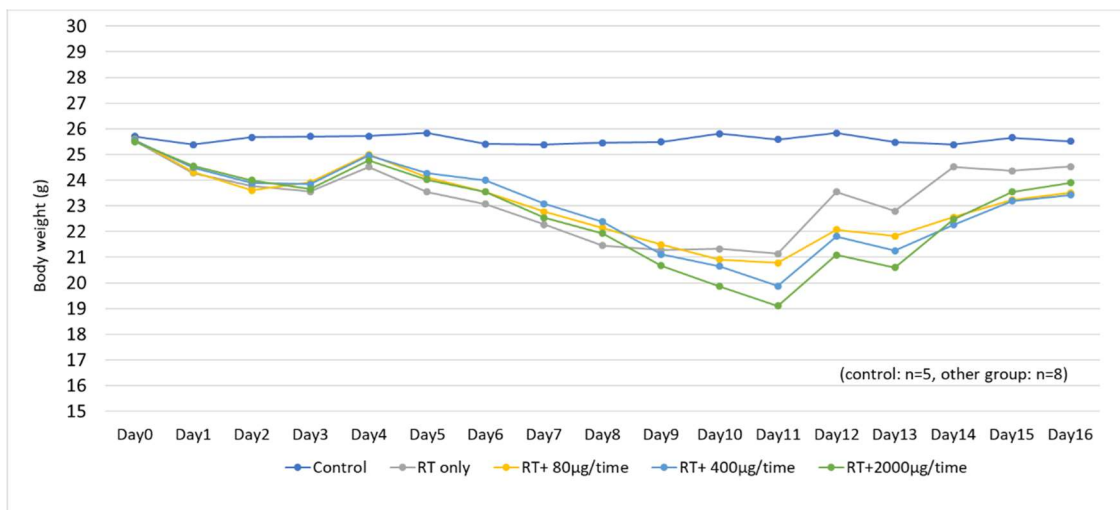
H0rF の細胞増殖に関して、培養開始 48 時間後に最大の増殖傾向を示していた。Pro-Hyp 投与は Shigemura らのマウス培養皮膚片における研究と同様に、200nmol/mL の濃度が最も増殖能が高く、200nmol/mL が至適濃度と考えられた。また、高濃度の Pro-Hyp は H0rF の増殖を抑制することが明らかとなった。血清成分の影響に関しては、FBS の存在が細胞増殖能に大きな影響を与える可能性はないことが明らかとなった。FBS 存在下でも Pro-Hyp は 200nmol/mL が至適濃度と考えられ、高濃度の Pro-Hyp は増殖抑制にはたらく可能性が示唆された。



(図1) Pro-Hyp の濃度と増殖能の関係

(2) マウスの化学放射線療法誘発性口腔粘膜炎に対する Pro-Hyp の至適濃度、安全性の検討  
 シスプラチンと放射線単回照射 (17Gy) による化学放射線療法誘発性口腔粘膜炎発症させたマウスでは、化学放射線療法による著しい毒性である体重減を認め、安楽死または死亡となった個体が 86.3% (19/22 個体) であった。そのため、有害事象を軽減させるため放射線療法 (放射線単回照射 (17Gy)) のみで口腔粘膜炎を発症させる方法を Pro-Hyp の有用性と安全性の評価を行った。

体重減少は、放射線照射単独の体重減少が最も小さく、Pro-Hyp 投与量に依存的に体重減少が進行した。Pro-Hyp 投与群では、放射線照射後 11 日目が体重の最低値を示した。12 日目以降は体重増加に転じ、Pro-Hyp の投与量依存的に体重増加が急速に進むことが確認された (図 2)。口腔粘膜炎は Pro-Hyp の投与の有無にかかわらず、放射線照射後 9 日目に生じはじめ、11 日目に全例口腔粘膜炎が確認された口腔粘膜炎の増悪傾向が続いた (図 3)。



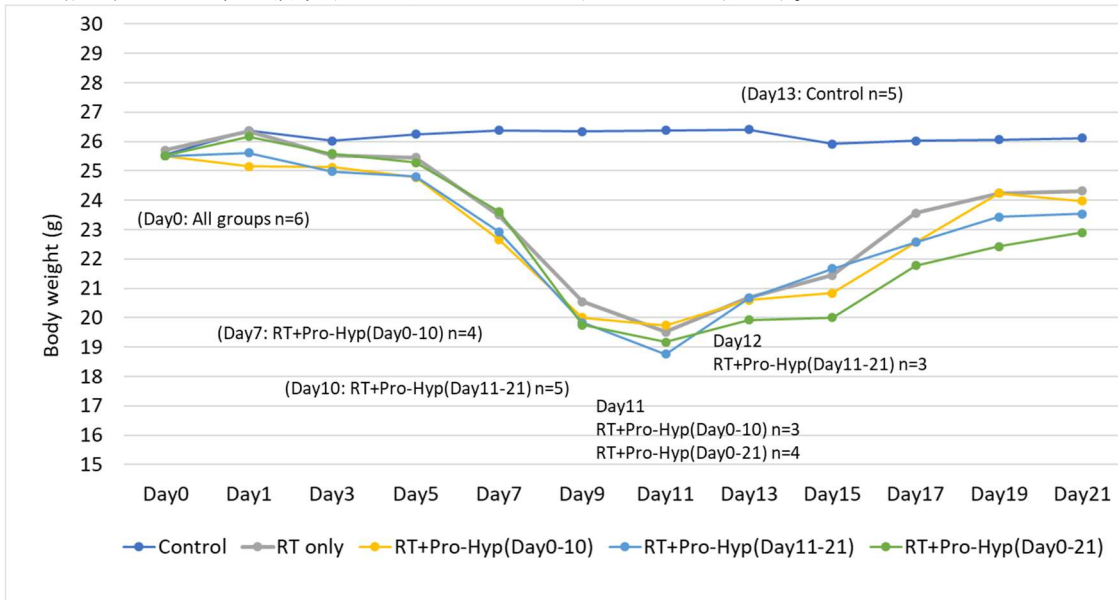
(図2) Pro-Hyp の投与量によるマウスの体重変化



(図3) 放射線照射後 14 日目の口腔粘膜炎と放射線性口唇炎

Pro-Hyp は放射線照射後口腔粘膜炎が発症し増悪する 11 日目を境目とし、11 日以前までと 11 日以降に Pro-Hyp の投与がマウス口腔粘膜炎に与える影響を検討した。Pro-Hyp を放射線照射日から照射後 10 日目まで投与した場合、生存率は 58.3% (n = 7/12) であったのに対し、投与されていない場合、生存率は 100% (n = 6/6) であった。Pro-Hyp の粘膜炎増悪時に投与することは、

口腔粘膜炎の重症化を誘引する可能性があると考えられた (図4)。



(図4) Pro-Hypの時期によるマウスの体重変化と生存個体数

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 7件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (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
---------	---------