

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：42723

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K10196

研究課題名(和文) 抗腫瘍薬誘発粘膜障害に対するPARP阻害剤併用効果の基礎的研究

研究課題名(英文) Basic research of PARP inhibitor effects for chemotherapy induced mucositis

研究代表者

藤原 久子 (Fujihara, Hisako)

鶴見大学短期大学部・歯科衛生科・教授

研究者番号：80396746

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)：本研究では、CDDPとPARP阻害剤のマウスへの投与が腸管粘膜と腸内細菌叢に及ぼす影響を検証した。C57BL/6メスを4群(CDDP群、PARP阻害剤群、併用群、コントロール群)に分け、腹腔内注射を行い、1・3・6か月目に解析を行った。体重は1ヶ月目にCDDP群と併用群で減少したが、3・6か月目には回復した。生存率はCDDP群で40日目までに減少し、200日後に併用群で低下した。消化管粘膜では、CDDP群では絨毛が有意に短縮、併用群ではコントロール群との有意差も認められなかった。以上の結果より、PARP阻害剤がシスプラチンによる消化管ダメージを軽減する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において、PARP阻害剤を併用することによって、以前から報告されているCDDPの抗腫瘍効果の増強効果だけでなく、CDDPによる副作用軽減の両方を期待できることが示唆される結果が得られた。従って、さらに分子生物学的なメカニズム解明のための研究意義が生じるだけでなく、消化管症状を誘発させる他の抗腫瘍薬においても同様の検証を行う学術的意義が発生する。それにより抗腫瘍薬誘発消化管粘膜障害ならびに粘膜免疫応答の破綻によって発症する疾患のメカニズム解明につながる可能性が期待でき、当該疾患発症の予防法や治療法の新たな展開につながる社会的意義がある。

研究成果の概要(英文)：In this study, the systemic effects of the anti-tumour drug CDDP and the molecularly targeted drug PARP inhibitor on mice were examined. Mice were randomly divided into four groups: CDDP, PARP inhibitor, combination, and control group. Cisplatin and the PARP inhibitor were administered by intraperitoneal injection. At 1 month, weight significantly decreased in the CDDP and combination groups but recovered by months 3 and 6. Survival analysis indicated a significant decrease in the CDDP group by day 40. Regarding the gastrointestinal mucosa, no significant differences were observed between the control and PARP inhibitor groups. The CDDP group showed significant shortening of villi compared to the control and PARP inhibitor groups. The combination group did not exhibit significant villi shortening compared to the CDDP group and showed no significant difference from the control group. These findings suggest that the PARP inhibitor may mitigate the intestinal damage caused by cisplatin.

研究分野：口腔外科学

キーワード：PARP阻害剤 CDDP 抗腫瘍薬誘発障害 菌叢解析

1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍の治療には、主に1) 外科的療法、2) 化学療法、3) 放射線療法の三者併用療法が行われている。初発時の進行度や全身状態にもよるが、手術技能の改良、抗腫瘍薬や分子標的薬の開発、放射線照射機器の開発や改良に伴い、生命予後を含めた悪性腫瘍の治療成績は向上している。ただ、化学療法の薬剤による副作用には、骨髄機能低下による白血球数減少や免疫応答システムの減弱、貧血、腎機能肝機能低下、口内炎や胃腸炎、嘔吐・下痢・便秘など様々あり、特に口内炎や腸炎による消化管症状は、自覚症状があるため治療中のQOLに強く影響する。この抗腫瘍薬誘発性口内炎や腸管粘膜障害の発症のメカニズムについては不明な点が多く、対症療法に終始せざるを得ず、症状改善が捗々しいとは言い難いのが実情である。さらに副作用のグレードによっては化学療法を中止せざるを得ず、生命予後への影響が問題となっている。

一方、我々は以前より生体内におけるポリADP-リボース合成酵素(PARP)の役割について研究を行ってきた。PARPは細胞内NAD⁺を消費してADP-リボースのポリマーを生成し、ゲノムの安定性やapoptosis、転写や細胞分化など様々な生体反応に関与する。現在、癌治療の分子標的薬として臨床試験が進められており、我々も口腔癌由来細胞におけるPARP阻害剤とCDDPの相乗効果を2016年に報告している。また、PARPにはpro inflammatory agentとしての作用もあり、PARP阻害剤はNF- κ B、IL-1やTNF- α などの炎症性サイトカインを阻害して症状軽快に寄与することが報告されている。これらを考え併せると、「抗腫瘍薬誘発粘膜障害はPARP阻害剤によって軽減される」ことが期待できる。

2. 研究の目的

前述の背景を勘案して、我々は「PARP 阻害剤の併用投与が CDDP 誘発消化管粘膜障害を軽減させる」と仮説を立て、本研究において NF- κ B や炎症性サイトカイン等の発現レベル、粘膜免疫応答(TLR)への関与、菌叢への影響などの検証による抗腫瘍薬誘発粘膜障害のメカニズムの解明を目指すこととした。

PARP阻害剤によって、CDDPの抗腫瘍効果増強と副作用軽減の両方が得られることが判明すれば、消化管症状を誘発させる他の抗腫瘍薬においても同様の検証を行う学術的意義が発生する。さらに、PARP阻害剤によって変化(回復)する口腔内・腸内細菌叢の比率や菌種、粘膜免疫応答に関連する因子の発現の変化が明らかになれば、抗腫瘍薬誘発消化管粘膜障害ならびに粘膜免疫応答の破綻によって発症する疾患のメカニズム解明につながる可能性が期待でき、当該疾患発症の予防法や治療法の新たな展開につながる学術的意義・社会的意義が生じると考えられる。

3. 研究の方法

本研究では、CDDP・PARP阻害剤投与マウスを用いて、1) 消化管粘膜(口腔・腸管)の組織学的変化、2) 細菌叢(口腔内・腸内)の変化、3) 免疫応答関連因子の発現、4) その他の臓器の組織学的変化、ならびにこれらの相互関係を検証した。

(1) 体重の経時的推移の比較検証

検体採取:C57BL/6(6週令・オス)を用いて、1) CDDP群、2) PARP阻害剤群、3) CDDP・PARP阻害剤併用群、4) コントロール群を無作為に抽出、CDDP(2 mg/kg/BW)とPARP阻害剤(AZD2281, 25 mg/kg/BW)を3日毎に10回投与した(30日間)。 体重・飲水量・食餌量の計

測は毎週行った。

(2) 消化管粘膜の組織学的変化・消化管粘膜免疫応答関連因子の発現の経時的解析

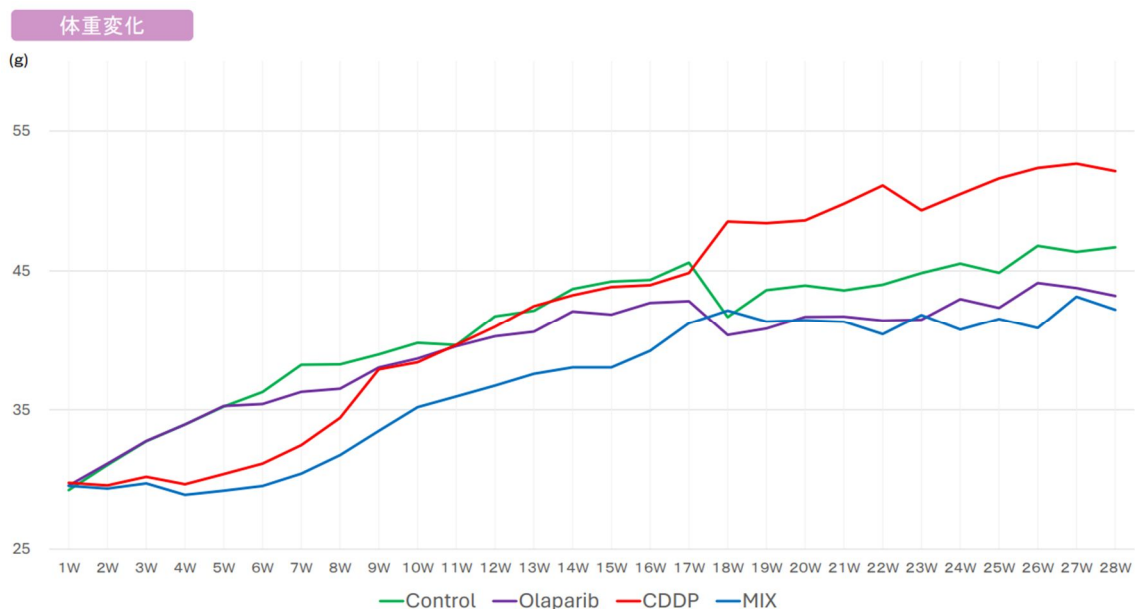
検体採取: 薬剤投与した3群とコントロール群の合計4群は、薬剤投与終了の1) 1ヶ月後、2) 3ヶ月後、3) 6ヶ月後にそれぞれ解析をおこなった。組織学的解析の対象臓器は、1) 空腸、2) 回腸、3) 大腸、菌叢解析の対象は大腸の糞便とした。

消化管の組織学的評価・粘膜免疫応答関連因子の発現の経時的解析: 採取した臓器は、まずヘマトキシリンエオジン染色による組織学的評価を行い、絨毛の長さをグループ別に比較検証した。またEGF, VEGF, PARP-1の免疫染色を行った。

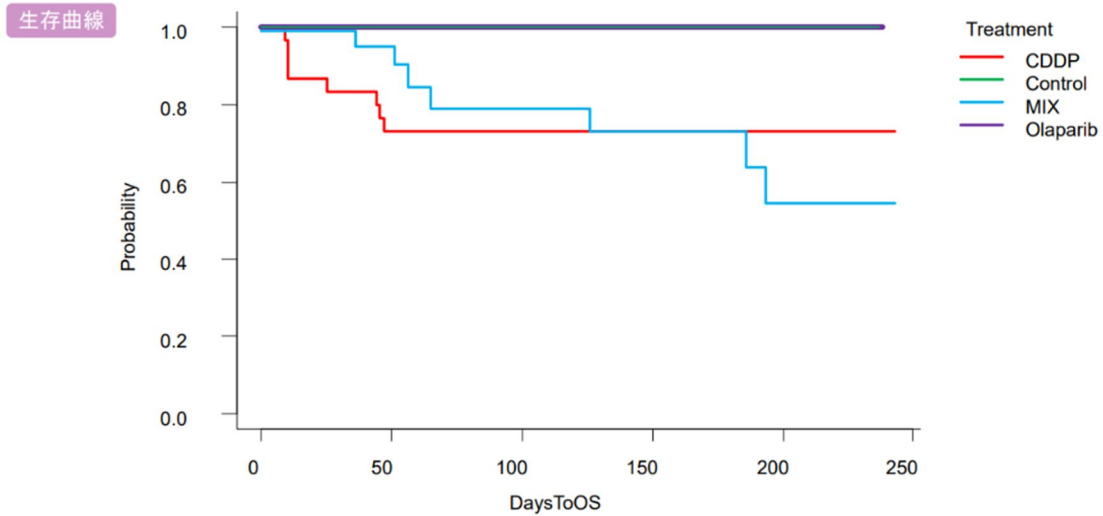
(3) 薬剤投与が腸内細菌叢へ及ぼす影響: 1) CDDP群、2) PARP阻害剤群、3) CDDP・PARP阻害剤併用群、4) コントロール群のマウスから採取した糞便からDNAを抽出し、次世代シーケンサーを用いてメタゲノム菌叢を解析した。その結果と、組織学的解析ならびに免疫応答関連因子の発現解析を経時的に比較検証し、CDDPならびにPARP阻害剤投与による腸内細菌叢の変化、血液検査データやその他臓器の変化との関連性を解析した。

4. 研究成果

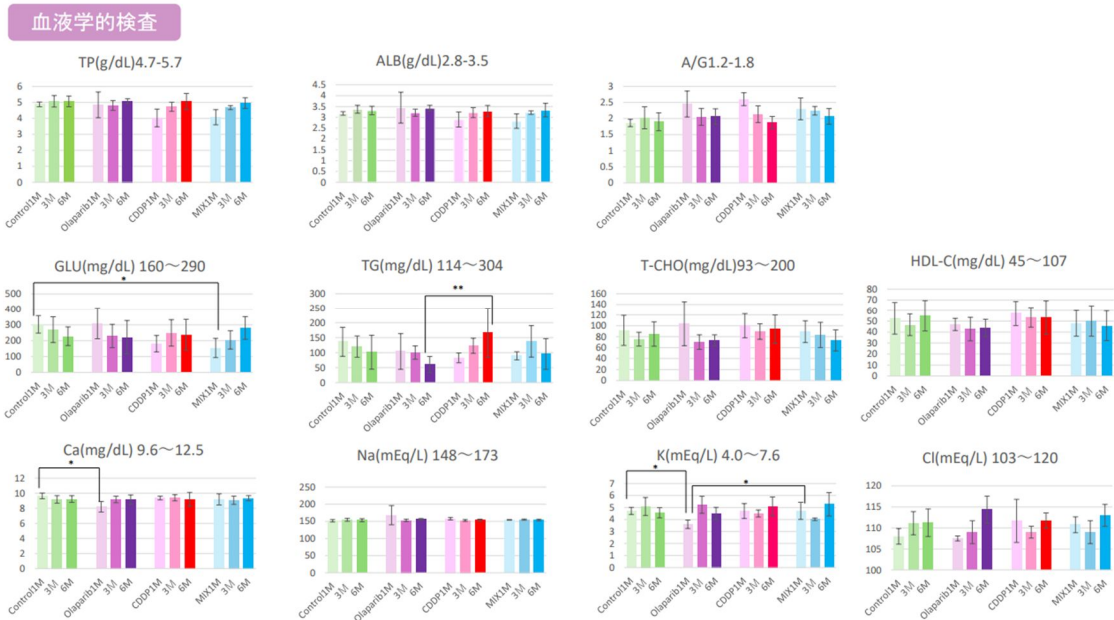
(1) 体重の変化について、薬剤投与開始 10 週目までは併用群の体重増加率が有意に低かったが、18 週目を過ぎたころから、シスプラチン投与群の体重増加率が有意に高くなった。



(2) その理由の1つに生存率が関与していると考えている。コントロール群・オラパリブ投与群にはほとんど死亡例が認められなかったのに対し、シスプラチン投与群では、薬剤投与すぐからの死亡が顕著にめだち、併用群が続いている。従って、薬剤投与開始 10 週目ぐらいまではシスプラチン投与による為害作用が強く、体重増加率の低下や死亡率につながっていたと示唆される。18 週以降の体重増加については、シスプラチン投与によってセレクションがかかり、シスプラチンの為害作用を乗り越えた強い個体が残存、そのため体調の回復にともなって体重増加が顕著になったと示唆される。

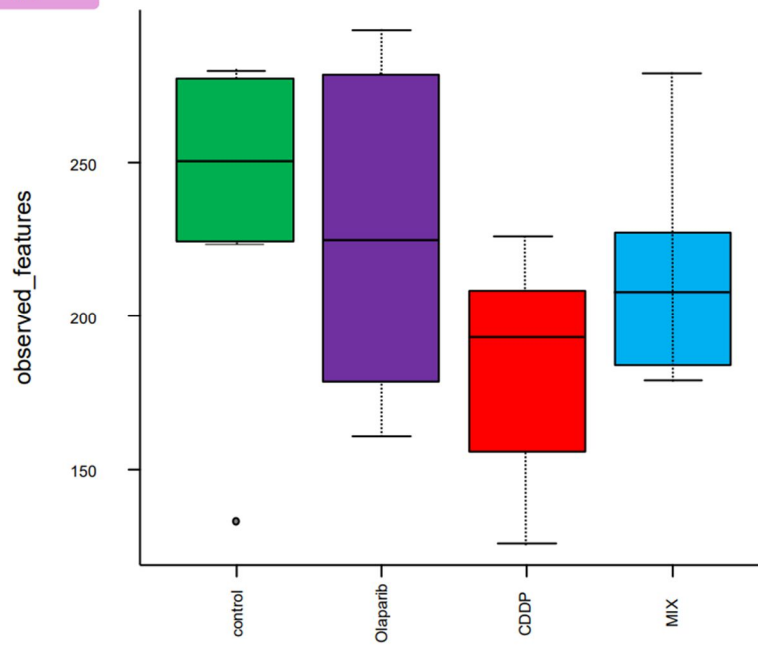


(3) 血液検査の結果より、オラパリブ単独投与群では、カリウムとカルシウムイオン濃度がコントロール群より有意に低下すること、併用群ではグルコース濃度が有意に低下することが分かった。



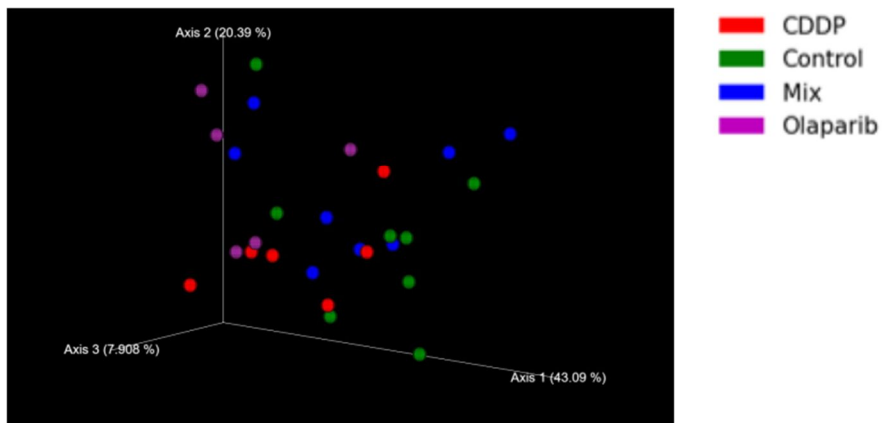
(4) 腸内細菌の菌叢解析の結果、シスプラチンの多様性が有意に、そして顕著に低いことが分かった。そのため、シスプラチンの投与によって、マウス腸内細菌の多様性が失われると考えられる。併用群においては、シスプラチンよりも多様性が保たれていることから、コントロール群やオラパリブ投与群と比較すると多様性が乏しいものの、シスプラチン単独投与による多様性喪失が緩和されたと示唆される。

α多様性 1M



(5) 多様性に関しては、4群間で明らかな有意差は認められなかったことから、個々の菌叢の多様性は喪失しているものの、それぞれの群では類似した菌叢を有することが示唆された。

β多様性 3M



5. 主な発表論文等

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

| | |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名 Nakamura Nanami, Fujihara Hisako, Kawaguchi Koji, Yamada Hiroyuki, Nakayama Ryoko, Yasukawa Masaaki, Kishi Yuta, Hamada Yoshiki, Masutani Mitsuko | 4. 巻 23 |
| 2. 論文標題 Possible Action of Olaparib for Preventing Invasion of Oral Squamous Cell Carcinoma In Vitro and In Vivo | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences | 6. 最初と最後の頁 2527 ~ 2527 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms23052527 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計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 |
|-----------|--|------------------------------------|----|
| 研究 分担者 | 熊谷 賢一 (Kumagai Kenichi) (10518129) | 東京大学・医学部附属病院・助教 (12601) | |
| 研究 分担者 | 川口 浩司 (Kawaguchi Koji) (50277951) | 鶴見大学・歯学部・准教授 (32710) | |
| 研究 分担者 | 濱田 良樹 (Hamada Yoshiki) (70247336) | 鶴見大学・歯学部・教授 (32710) | |
| 研究 分担者 | 大島 朋子 (Oshima Tomoko) (50233101) | 鶴見大学・歯学部・教授 (32710) | |

6. 研究組織（つづき）

| | 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 |
|-------------------|---|--|----|
| 研究 分 担 者 | 伊藤 由美 (Ito Yumi) (00176372) | 鶴見大学・歯学部附属病院・講師 (32710) | |

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 |
|---------|---------|
| | |