

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月 31日現在

機関番号：13401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791997

研究課題名（和文） 放射線・化学療法で誘発される口内炎のエピジェネティック変化に対する治療法の検討

研究課題名（英文） Study on treatment for epigenetic alternation of oral mucosa keratinocytes in radiotherapy- and chemotherapy-induced oral mucositis.

研究代表者

飛田 尚慶（TOBITA TAKAYOSHI）

福井大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：00336174

研究成果の概要（和文）：頭頸部癌に対する放射線・化学療法で発症する口内炎は、粘膜上皮細胞の DNA が直接放射線や化学療法剤で損傷を受ける他に、後天的な遺伝子発現の傷害、いわゆるエピジェネシスによるものと考えられる。エピジェネシスの治療法としてヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)阻害剤の使用が研究されているが、本研究では、ヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)阻害剤のトリコスタチン A がどの程度粘膜上皮細胞の損傷を抑制するかについて、無血清培地で培養した単層培養口腔粘膜上皮細胞上で検討した。7名の口腔外科外来小手術の被験者から口腔粘膜を採取し、初代培養を行った後、2継代まで可能な細胞2株を用いて実験を行った。化学療法剤の CDDP を投与し粘膜上皮細胞の増殖抑制試験を行った。結果は CDDP 100 μ M 投与群で細胞増殖抑制効果が得られた。次にトリコスタチン A の細胞増殖抑制試験を実施した。一回目ではトリコスタチン A 100nM を投与した時、50%の増殖率抑制が認められたが、2, 3回目では70%～80%の幅で抑制効果に差が生じ、安定した濃度が得られなかった。またトリコスタチン A 100nM の濃度に固定して2GyのX線照射を行い、コロニー形成能を調べたが、コロニーは全く認められなかった。また同濃度のトリコスタチン A を作用させた後に CDDP 100 μ M を投与し、同様のコロニー形成能実験を行った。結果は放射線と同様にコロニー形成能を認めなかった。今回は得られた試料数が少なかったため、以降の研究は継続出来なかったが、トリコスタチン A の濃度の再検討およびトリコスタチン A 以外の HDAC 阻害剤での検討も必要と思われた。

研究成果の概要（英文）：Other than the direct effect of ionizing radiation and cytotoxic effect of chemotherapeutic agent to oral cancer, damage of DNA in healthy oral keratinocyte is thought by acquired interruption of genetic expression; epigenetic alternation in the radiation and chemotherapy-induced oral mucositis. The effect of histone deacetylase (HDAC) inhibitor is studied for epigenetic therapy. In this study, the effect of trichostatinA, having a suppressing effect of damaged cell DNA by X-ray irradiation and chemotherapeutic agent, was investigated using monolayer culture system of oral keratinocyte in serum free medium. Oral mucosa samples were taken from seven subjects receiving from minor oral surgery. From these samples, only two cell lines were able to establish and used for this experiment. Cisplatin (CDDP) was applied in the medium and colony forming assay was done. Result showed that 100 μ M of CDDP inhibited cell growth. Next growth-arrest assay was done by trichostatinA. In the first study, 50% of growth inhibition was seen when 100nM of trichostatinA was applied in the medium. But growth inhibitory ratio was not stable at a rate of 70 to 80 percent in the second and third study, optimum concentration of trichostatinA was not obtained. After applying 100nm of trichostatinA in the medium and cultured for 24 hours, cells were irradiated at 2Gy of X-ray. Colony

forming assay was done after irradiation but no colonies were seen. After applying the same concentration of trichostatinA, CDDP was administered in the medium and cultured for 24 hours, then colony forming assay was done. Result was the same as assay of X-ray irradiation and no colonies were seen.

Unfortunately, sample numbers were too little to continue this experiment. I supposed to need to reconsider the concentration of trichostatinA and usage of other HDAC inhibitor.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2010年度 | 2,000,000 | 600,000 | 2,600,000 |
| 2011年度 | 600,000 | 180,000 | 780,000 |
| 総計 | 2,600,000 | 780,000 | 3,380,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：口腔外科学一般

1. 研究開始当初の背景

頭頸部癌治療法の一つとして従来から放射線治療や抗がん剤による化学療法が行われている。しかし、これらの治療法は治療期間中に重篤な口内炎を発症するため、患者自身に大きな身体的・肉体的ストレスを与えることになる。放射線や化学療法剤による口腔粘膜上皮細胞は自身の DNA 損傷のほかに、核内ヒストンやプロモーターの転写活性へも障害が生じる、エピジェネティックな変化の結果とも考えられる。この細胞のエピジェネティック変化に対する治療法の一つとしてヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤を用いることが近年注目されている。HDAC 阻害剤は放射線・化学療法剤で破壊された DNA の修復を促進させる機能を有している。

2. 研究の目的

本研究は、HDAC 阻害剤の一つであるトリコスタチン A が放射線・化学療法誘発性口内炎の抑制に、どの程度効果を示すかを、無血清培地で培養した単層培養口腔粘膜上皮細胞上で調べることを目的とした。

3. 研究の方法

A. 細胞培養

埋伏智歯抜歯等の口腔外科小手術で余剰となった歯肉から、口腔粘膜角化細胞を分離し、無血清培地(EpiLife®)にて培養した。三継代した細胞を実験に用いた。なお余剰歯肉は、事前に福井大学医学部倫理審査委員会への実験許可申請を行い、承認を得た後、患者から文書化した同意書を得て採取した。

B. 口腔粘膜角化細胞への化学療法剤投与および放射線照射

化学療法剤としてシスプラチン(CDDP)を用いた。CDDP は $1\mu\text{M}$, $10\mu\text{M}$, $100\mu\text{M}$, $250\mu\text{M}$, $500\mu\text{M}$ の濃度へ培地を用いて調整した後、70%コンフルエントの細胞へ投与し 24 時間培養した。放射線照射装置は福井大学アイソトープ実験施設内にある X 線照射器を用いた。放射線照射量は過去の論文から(Int J Oral Maxillofac Surg. 156; 761,2001)、2Gy/回と設定して照射した。

C. 口腔粘膜角化細胞の分裂能試験

シスプラチン投与後の細胞をトリプシン処理した後、 $25\text{個}/\text{cm}^2$ になる様に細胞数を調整し、60mm ディッシュへ細胞を播種した。放射線照射群も 2Gy 照射の後同様の細胞数に調整し、60mm ディッシュ上へ播種した。約 7 日～12 日細胞を培養し 15 個以上の細胞で構成されたコロニーを顕微鏡下で観察しコロニー数をカウントした。90-well プレートを用いて細胞を 70%コンフルエントまで培養した後、上記の濃度に調整した CDDP で 24 時間処理した後培地交換し更に 24 時間培養し、MTT Assay を行った。

D. トリコスタチン A の至適濃度試験

トリコスタチン A を 100nM , 300nM , 1000nM に調整し、70%コンフルエントの細胞へ投与した。24 時間処理の後培地を交換し

更に 24 時間培養した。培養後トリプシン処理を行い、C で行ったコロニー形成能試験を実行した。

E. トリコスタチン A と放射線および化学療法剤との併用試験

トリコスタチン A 100nM の濃度で 24 時間培養後、新鮮な培地に交換して 2Gy の X 線照射を行った。また 100nM のトリコスタチン A で 24 時間処理後 CDDP100 μ M 濃度に調整した培地を加え、24 時間培養した。X 線および CDDP 処理後の細胞をトリプシン処理後、25 個/cm²に調整して 60mm 培養ディッシュ上へ播種し培養してコロニー形成能試験を行った。

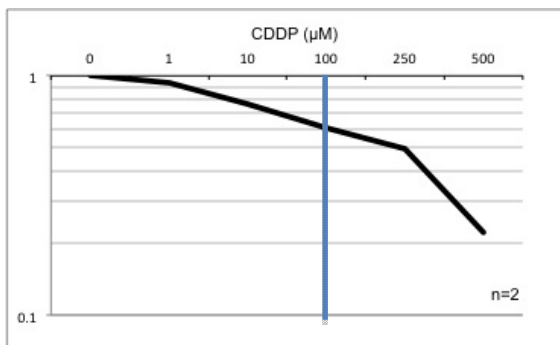
4. 研究成果

・細胞培養

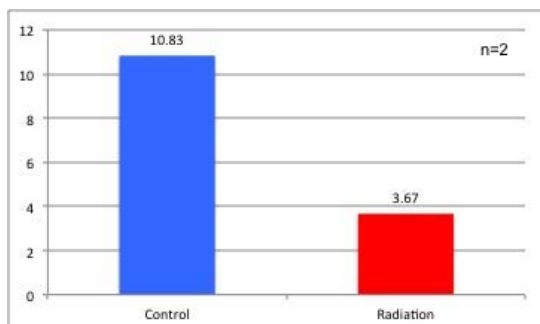
口腔粘膜採取に同意を得た 7 名からサンプルを採取し、口腔粘膜角化細胞の培養を試みた。結果は実験に用いることが出来るまで培養可能であったサンプル(3 継代目まで培養)は 2 サンプルのみであり、他の 5 サンプルは初代培養時にバクテリア汚染が生じたため、細胞を破棄した。2 サンプルを用いて次の実験を行った。

・口腔粘膜角化細胞の CDDP および X 線照射による細胞分裂能の検討

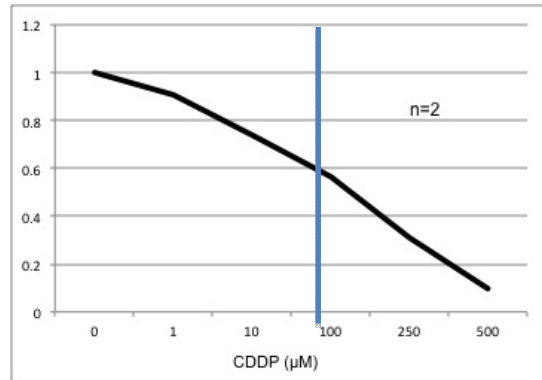
CDDP 投与後のコロニー形成能試験では CDDP 100 μ M で 50%細胞増殖抑制効果を得られた。



一方 X 線 2Gy の照射では約 40%近い増殖抑制効果を示した。

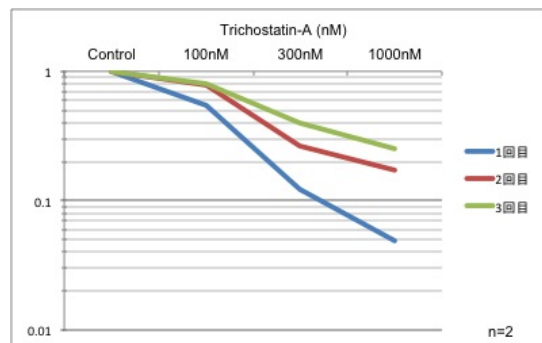


また CDDP による細胞活性抑制効果は CDDP 100 μ M で 50%抑制効果を示した。



・トリコスタチン A の至適濃度の検討

実験は 3 回行った。1 回目では 100nM のトリコスタチン-A で 50%の増殖抑制を認めた。しかし、2,3 回目では 100nM の濃度では 70-80%の増殖抑制しか示さなかった。



・トリコスタチン A の放射線および化学療法剤に対する効果

100nM のトリコスタチン A を投与した培地で 24 時間培養後、2Gy の放射線および 100 μ M の CDDP で処理した。その後コロニー形成能試験を行ったが、X 線/CDDP 投与群のどちらも、コロニーの形成を認めなかった。

以上の結果から、X 線および CDDP で増殖能を半分に抑制した条件で、さらに 100nM のトリコスタチン A を投与した場合、細胞増殖能を逆に奪ってしまうことが判明した。以上より本実験では、トリコスタチン A の濃度が高すぎるのか、X 線および CDDP の濃度が高すぎるのかを再度検討することが必要と考えられた。また、トリコスタチン A 以外の薬剤も使用して、同様の試験を行う必要があると思われた。

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 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

なし

6. 研究組織

・研究代表者

飛田 尚慶 (TOBITA TAKAYOSHI)

福井大学・医学部附属病院・講師

研究者番号 : 00336174