

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：32710

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24593015

研究課題名(和文)放射線治療に伴発する口腔粘膜及び唾液腺障害に対するメラトニンの予防及び治療効果

研究課題名(英文)Preventive effect of melatonin against radiation-induced mucosal injury

研究代表者

徳山 麗子(TOKUYAMA, Reiko)

鶴見大学・歯学部・助教

研究者番号：20380090

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：概日リズム調節ホルモンであるメラトニンは種々の組織で産生されており、われわれはこれまでに唾液腺においても産生・分泌されていることを報告してきた。またメラトニンには多くの生理作用があり、強い抗酸化作用を有することも知られている。そこで今回、放射線照射に伴う口腔粘膜障害に対し、メラトニンがその予防効果を有するか否かにつき検討したところ、放射線照射による組織障害がメラトニン投与群で軽減されていた。このことから放射線照射に伴う口腔粘膜障害に対し、メラトニンが予防効果を有している可能性が強く示唆された。

研究成果の概要(英文)：Melatonin is secreted by the pineal gland primarily during the night. Its secretion is controlled by the light:dark cycle. Melatonin is also produced and secreted in various extrapineal organs, and we reported in salivary gland, too. Melatonin has a variety of physiological actions, particularly, free-radical scavenging and antioxydation. In this study, to elucidate the possibility of preventive effect of melatonin against radiation-induced mucosal injury, we examined the affect of melatonin on damaged tissues of oral mucosa of radiated mice. As a result, melatonin prevent the damages of oral tissues. From these facts, we have explored the possibility that melatonin have preventive effect against radiation-induced mucosal injury.

研究分野：外科系歯学

キーワード：メラトニン 放射線障害 口腔粘膜

1. 研究開始当初の背景

超高齢社会が進行しつつあるわが国では、今後も悪性腫瘍の罹患率が上昇し、頭頸部領域、特に口腔癌の発症も増加していくものと考えられる。口腔癌を含めた悪性腫瘍に対する治療においては、手術療法に加えて、患者が高齢となることから、化学療法や放射線療法の適応となる症例も増加することが予想される。これらの治療に伴って発症する重篤な口腔粘膜障害や唾液腺障害は、患者の QOL を低下させるのみならず、治療の達成度をも左右する重要な因子となる。今後ますます多くの国民がこのような治療の対象となると予想されることから、悪性腫瘍の治療、特に放射線治療に伴う口腔粘膜障害および唾液腺障害の発症予防、進行抑制、さらには効果的治療のための手段を確立しておくことが喫緊の課題といえる。

放射線治療は、正常組織と腫瘍組織の放射線に対する感受性・反応性の差を利用して行う治療である。放射線による細胞死には**分裂死(増殖死)と間期死(アポトーシス)**があり、細胞死を引き起こす**放射線の標的は核内染色体の DNA** である。代表的な放射線治療に用いられる X 線では、**電離した放射線がフリーラジカル(OH・)を産生し、これが DNA にダメージを与え、また、酸素が多く存在する環境では H₂O との反応でフリーラジカルがより多く発生する。すなわち活性酸素やフリーラジカルが、腫瘍組織を攻撃するのが放射線治療の代表的作用機序で、これは腫瘍組織のみならず、正常組織にもダメージを与えることとなる。**しかし、前述したように実際の放射線治療においては細胞周期 G₂、M 期で放射線感受性が高く、低酸素細胞では放射線抵抗性であることなど腫瘍組織と正常組織の放射線感受性の差を利用して、正常組織に可能な限り障害が及ばないように治療が行われる。しかしながら、頭頸部領域、特に口腔癌に対する放射線治療では、照射野に口腔粘膜および唾液腺が必然的に含まれることから、ほとんどの症例で口腔粘膜障害や唾液腺障害が発生する。

口腔粘膜の最表層を形成する口腔粘膜上皮層においては、基底層での有糸分裂によって作られた細胞が基底層から角化層(表層)へと向かって移動し、剥がれ落ちた細胞を補填するという連続した活発な細胞新生のシステムにより、その構造を維持している。このような細胞再生系組織は高放射線感受性で急性の放射線障害として口内炎などの口腔粘膜障害が出現する。また、唾液腺は、漿液細胞、粘液細胞、筋上皮細胞からなる分泌終末

部の腺房と、ここにおいて産生された唾液を調整し、それを口腔へ運ぶ導管系(介在部導管、線条部導管、導管)により構成され、恒常的に唾液を産生・分泌している。唾液腺は細胞拡張系組織と分類され、中等度放射線感受性で、急性期には唾液分泌障害が、遅発期には腺そのものの萎縮や機能消失が出現する。いずれも、**障害のメカニズムは放射線治療による活性酸素などのフリーラジカルによる DNA の損傷が原因であり、これら正常組織における放射線治療に伴う障害の発症予防・進行抑制・治療にはフリーラジカルによる DNA 損傷を防ぐことが重要になる**と考えられる。

一方、**メラトニン**は、主に夜間、松果体より分泌される概日リズム調節ホルモンで、1958年 Lerner らによって分離・精製された。概日リズムの調節以外にも現在までに、体温調節作用、抗性腺作用に起因するとされる季節繁殖動物の性周期の調節、老齢マウスの生存率を高める抗老化作用、リンパ球や単球に作用してインターフェロンやインターロイキン 2,4,6 などのサイトカインの産生を促す免疫賦活作用、MCF-7 などの乳癌細胞の増殖を抑制するという抗腫瘍作用、さらには**フリーラジカルスカベンジャーとして強い抗酸化作用を持つ**ことが知られている。加えて、これまでにわれわれは顎口腔領域に関連して、メラトニンがヒトやマウスの骨形成を促進する作用を有していること (J.Pineal Res. 42:231-239, 2007)、メラトニン受容体がヒト、マウスおよびラットの歯に存在し、メラトニンが歯の形成・発育に関与している可能性があること (Histochem. Cell Biol. 133(5):577-584, 2010) を報告してきた。近年メラトニンは松果体だけでなく、網膜や水晶体、卵巣、消化管、免疫系細胞といった種々の臓器や組織においても合成・分泌され局所的に作用していることが報告されてきている。唾液中においてもメラトニンの存在が確認されており、これに関連してわれわれは、唾液腺にメラトニン合成酵素である arylalkylamine N-acetyltransferase (AANAT) および hydroxyindole-O-methyltransferase (HIOMT) が発現していることをはじめ確認し、**唾液中のメラトニンが唾液腺によって合成・分泌され、その強い抗酸化作用や免疫賦活作用をもって、唾液腺自体、さらには口腔粘膜に対して何らかの生理的役割を担っている可能性を報告してきた** (Histochem. Cell Biol. 135(4):389-396, 2011)。

以上のことから、唾液中に生理的に存在し、唾液腺や口腔粘膜に何らかの生理的役割を持つと考えられるメラトニンを

応用し、その極めて強い抗酸化作用を利用することによりフリーラジカルに起因する口腔粘膜障害や唾液腺障害の発症予防、進行抑制あるいは治療を図ることができる可能性があると考えられた。事実、これまでに放射線照射前にメラトニンを投与したマウスでは、放射線照射に伴う腸管障害が一部軽減されたという報告がある。これは口腔粘膜と同様の細胞再生系組織である腸管上皮に、メラトニンが放射線防護的に作用したことを示すものであり、われわれの仮説を裏付けるものであると考えた。このような観点から本研究では、放射線照射による口腔粘膜障害および唾液腺障害に対してメラトニンが発症予防、進行抑制、治療作用を持つかどうかにつき検討を行うこととした。本研究を遂行することにより、口腔癌の放射線治療に伴う口腔粘膜障害および唾液腺障害に対する治療薬としての可能性が明らかとなり、超高齢社会を迎え今後増加するであろう口腔癌の放射線治療に伴う副作用を防止し、わが国国民のQOLの維持・向上に大きく貢献し得ると考えられたため、以下の目的の下、研究を進めた。

2. 研究の目的

本研究では放射線治療に伴う口腔粘膜障害および唾液腺障害の発症予防、進行抑制、治療にメラトニンをを用いることが可能かどうかを検討することを目的とした。具体的には、(1)マウス(ICRなど)を対象として、放射線照射を行う。この際、照射前にメラトニン腹腔内投与群および非投与群の2群に分け、放射線障害を確認する。すなわち急性期における口腔粘膜障害および舌障害、遅発期における唾液腺障害がメラトニンの腹腔内投与により発症予防可能かどうかにつき検討する。(2)腹腔内投与に経口投与を追加し、(1)と同様の検討を行い、メラトニンの経口投与が予防に有効か否かにつき検討する。(3)照射前投与に加えて、照射中から照射終了後もメラトニンを腹腔内投与もしくは経口投与を継続することで放射線照射による口腔粘膜障害および唾液腺障害の進行を抑制することが可能かどうかにつき検討する。以上についての、照射とメラトニン投与のタイミング、またメラトニンの投与量、投与経路について検討を重ね、より侵襲の少ない、より効果的な方法を検討する。(4)口腔粘膜上皮細胞および唾液腺細胞、皮膚上皮細胞などを用いて、*in vitro*におけるメラトニンの放射線防護効果についても併せて検討し、さらには抗酸化作用の程度についても検討することで、メラトニ

ンの治療薬としての可能性を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1)放射線照射による口腔粘膜および唾液腺における障害の検討

6週齢の、ICRマウスを対象に、実際に放射線(X線)を照射し、頬粘膜や舌などの口腔粘膜および唾液腺に発症する障害を詳細に検討した。具体的には、照射量及び回数を3Gy×4回総計12Gy、3Gy×5回総計15Gy、3Gy×6回総計18Gy、単回12Gy、単回15Gy、単回18Gyの6群に分け、それぞれの照射方法により障害の発症頻度や程度が変化するか否かにつき検討する。このとき、口腔粘膜については照射後5、7、10、14日目の比較的急性期に、唾液腺については照射後30、45日後の遅発期にその障害を組織学的に検討する。また、上皮のそれぞれの分化段階で発現するマーカーであるinvolucrin、transglutaminase、keratin1、4、10、13および14、filaggrin、defensin、caspase3および14などにつき免疫組織化学的に検討することで、放射線障害時の発現パターンを解析する。この検討により、口腔粘膜に障害の現れやすい照射量および方法とその時期、唾液腺に障害の現れやすい照射量および方法とその時期を決定し、本条件を以下の検討に用いる。

(2)放射線照射前メラトニン投与による放射線性口腔粘膜障害および唾液腺障害の発症予防効果の検討

放射線照射30分前に、メラトニン100mg/kgをマウスに腹腔内投与し、1.で決定した放射線照射条件、すなわち単回15Gyで照射を施行し、急性期における口腔粘膜障害の発症予防効果および遅発期における唾液腺障害の発症予防効果の有無について組織学的に検討した。さらに、メラトニン非投与群と投与群間で放射線障害の発症に差があれば、それらの組織を用いて(1)に述べたような上皮細胞に対するマーカーを用いて免疫組織化学的に検討する。さらにTUNEL染色などにより細胞のアポトーシスを、抗8-OHdG抗体を用いてDNA損傷を、抗neuroketal抗体や抗4-hydroxynonenal抗体を用いて脂質の酸化ダメージを、抗SOD1抗体や抗nNOS抗体、抗HIF1α抗体を用いてタンパク質の酸化ダメージを免疫組織化学的に検討することで、メラトニン投与による放射線副作用発症予防効果の発現のメカニズムを解析した。

(3)放射線照射前および照射後メラトニン投与による放射線性口腔粘膜障害および唾液腺障害の発症予防、進行抑制、治療効果の検討

放射線照射 30 分前に、メラトニン 100mg/kg をマウスに腹腔内投与し、(2)と同様に照射を施行し、照射後にもメラトニンの経口投与を継続し、急性期における口腔粘膜障害の発症予防、進行抑制、治療効果および遅発期における唾液腺障害の発症予防、進行抑制、治療効果の有無につき組織学的に検討した。さらに(2)と比較することで、メラトニンの投与期間やタイミングによる発症予防や進行抑制、治療効果の差について検討し、効果的なメラトニンの投与経路と投与期間について解析した。また、それらの組織を用いて(1)に述べたような上皮マーカーおよび(2)に述べたような酸化ストレスの指標となる因子に対する抗体を用いて免疫組織化学的に検討することで、メラトニン投与による放射線防護効果の発現メカニズムを解析した。

(4) 口腔粘膜上皮細胞に対する放射線照射による影響の検討

in vitro において、増殖期の口腔粘膜上皮細胞に放射線照射を行い、その増殖に対する影響について検討した。また、コンフルエント後に放射線照射を行うことで、その分化機能に対する影響についても上皮の分化マーカーである involucrin, transglutaminase, keratin1, 4, 10, 13 および 14, filaggrin, defensin, caspase3 および 14 などの mRNA 発現およびタンパク質発現を解析することで検討する。これにより口腔粘膜上皮細胞の増殖と分化機能に影響のある放射線照射量と照射回数を決定した。

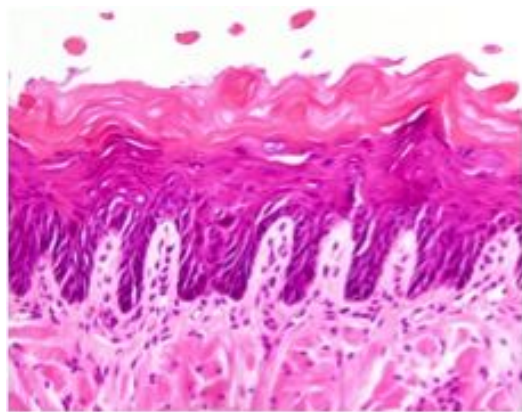
(5) メラトニン投与による口腔粘膜上皮細胞への放射線障害の防護効果の検討

口腔粘膜上皮細胞を培養する際にメラトニンを 0, 1, 10, 50, 100, 200 μ M の各濃度で添加し、(4)により決定された放射線照射を行うことで、放射線障害による口腔粘膜上皮細胞の増殖に対する影響を軽減できるか否かについて検討した。また、口腔粘膜上皮細胞を培養する際にコンフルエント後に同様にメラトニンを添加することで、放射線障害による口腔粘膜上皮細胞の分化に対する影響を軽減できるか否かについて(1)に示したような上皮細胞に対するマーカーの mRNA 発現およびタンパク質発現を解析することで検討した。また、TUNEL 染色などにより細胞のアポトーシスを、8-OHdG の蓄積を ELISA で解析することで DNA 損傷を、抗 DNP 抗体を用いたウエスタンブロットを利用してタンパク質の C 末端の酸化ダメージを、抗 CMH₂DCFDA 抗体を用いた FACS を利用して細胞内のフリーラジカルの蓄積を検討することで、メラトニン添加による放射線障害の防護効果の発現メカニズム

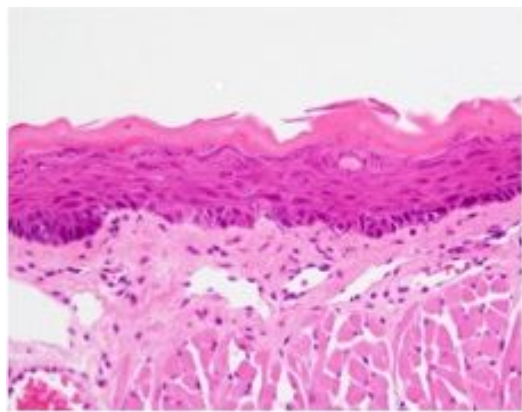
を解析する。

4. 研究成果

まず、ICR マウスに各種の照射量、回数 of X 線を照射したところ、舌、頬粘膜、唾液腺などに放射線照射の障害が組織学的にはっきりと観察されたのは、単回 15Gy 照射であった。今回の検討においては、この照射量と回数でのメラトニンによる防護効果の有無の検討を行うこととした。なお、この際の性状な舌および照射後の舌を以下に示す。



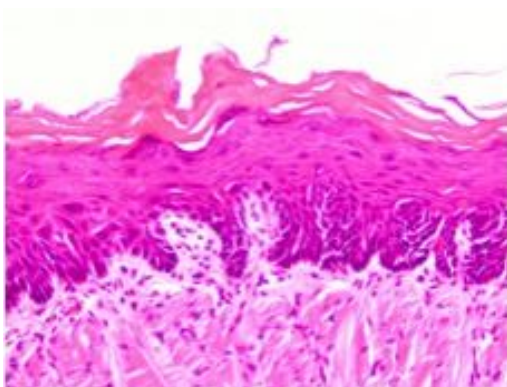
正常舌
基底細胞の配列不正等なく変性細胞や上皮の萎縮等も認められない



X 線 15Gy 照射後の舌
細胞間橋が曖昧となり、基底層では細胞腫大、核の濃染が見られ、N/C 比の上昇、配列の乱れが認められる。また、上皮に多核細胞やケラトヒアリン顆粒様構造物が散見され、変性細胞が認められ、全体的に上皮が萎縮していることがわかる。また粘膜固有層における毛細血管の拡張、舌筋空隙の浮腫化も認められ、これらは放射線照射による障害と考えられる。

そこで、この条件下で、照射前 30 分で、コントロール群には Vehicle を、メラトニ

ン群には 100mg/kg のメラトニンを経口投与し、さらにその後の飼育期間には、メラトニン 50 mg/ml を含む飲料水を与えた。その結果、メラトニン群ではコントロール群と比較して、組織の放射線照射による障害が軽減され、正常組織に比較的近い像を示した。このことから、メラトニン投与による放射線防護効果が強く示唆された。



メラトニン投与群の舌組織

部分的に放射線障害は認められるが、上皮層の厚みは維持され、基底層の乱れもわずかで、コントロール群と比較して放射線障害は抑制され、正常群により近い像を示している。

これらの舌や頬粘膜などの組織を用いて TUNEL 染色を行った結果、正常群に比較してコントロール群でアポトーシス細胞数が有意に多く、またメラトニン投与群では正常群よりは多いものの、コントロール群と比較してアポトーシス細胞数は有意に減少していた。このことから、メラトニン投与により放射線誘発アポトーシスを抑制できることが明らかになった。

また、このメカニズムについて詳細に検討するため、口腔粘膜上皮細胞を用いてメラトニンの細胞増殖に対する効果について検討したところ、通常培養下にメラトニンを添加するとメラトニンは口腔粘膜上皮細胞の増殖を抑制することが明らかとなった。そこで、放射線照射時にメラトニンを添加してその増殖能の変化について検討したところ、メラトニン非添加では口腔粘膜上皮細胞はその増殖能が照射により低下するのに対し、メラトニン添加した細胞群では、その増殖能の低下が押さえられる傾向が見られた。

さらに、分化に対するメラトニンの影響について検討したところ、放射線照射前にメラトニンを添加した群でもコントロール群でも、上皮細胞関連分子の遺伝子発現に大きな変化は認められず、分化に対するメラトニンの効果による放射線防護効果についてはさらなる検討が必要であることが示唆された。

以上の結果から、放射線治療に併発する口腔粘膜障害にメラトニンの投与が効果的である可能性が強く示唆された。今後の臨床応用を目指したさらなる検討を進めていく予定である。

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)

〔学会発表〕(計 1 件)

大久保充、徳山麗子、他、放射線性口腔粘膜障害に対するメラトニンの予防効果、第 59 回日本口腔外科学会総会・学術大会、2014 年 10 月 17 日～19 日、幕張メッセ(千葉県千葉市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

徳山 麗子 (TOKUYAMA Reiko)

鶴見大学・歯学部・助教

研究者番号：20380090

(2) 研究分担者

里村 一人 (SATOMURA Kazuhito)

鶴見大学・歯学部・教授

研究者番号：80243715

本田 雅規 (HONDA Masaki)

日本大学・歯学部・准教授

研究者番号：70361623