

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：11101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861907

研究課題名(和文) 化学療法誘発口腔粘膜炎症制御に向けたRIG-Iとがん関連線維芽細胞の機構解明

研究課題名(英文) The study on RIG-I and cancer associated fibroblast function for the regulation of mucositis induced by chemotherapy

研究代表者

久保田 耕世 (Kubota, Kosei)

弘前大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10529689

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではRIG-Iを介した感染防御機構を応用し、化学療法誘発口腔粘膜炎症の新規治療開発に向けた基礎的研究を行った。がん関連線維芽細胞モデルを製作し、ドセタキセルとLPSやpoly ICを添加し、RIG-I、自然免疫応答関連遺伝子や炎症性サイトカインのmRNA発現を検討し、cDNAマイクロアレイを施行した。線維芽細胞とがん関連線維芽細胞を比較したところ、自然免疫応答能に違いが認められた。TLR-3や4の発現は線維芽細胞に比較しがん関連線維芽細胞で発現低下しているのに対し、RIG-Iの発現上昇が認められた。がん関連線維芽細胞においてRIG-Iは化学療法誘発口腔粘膜炎症の機序の一部役割が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to establish new therapy of oral mucositis induced by chemotherapy. The model of cancer associated fibroblast was built out and stimulated with docetaxel, LPS and poly IC, and examined the expression of RIG-I, innate immune system related gene and inflammatory cytokines mRNA. The cDNA microarray was performed. The comparison between fibroblast and cancer associated fibroblast indicated difference of innate immune systems. The expression of TLR -3 and -4 was decreased in cancer associated fibroblast compared to fibroblast, whereas the expression of RIG-I was increased. RIG-I in cancer associated fibroblast may have some roles in pathogenesis of oral mucositis induced by chemotherapy

研究分野：医歯薬学

キーワード：歯学 遺伝子 口腔粘膜炎症

### 1. 研究開始当初の背景

近年口腔癌治療において、化学療法や化学放射線療法の治療効果は向上しているが、重篤な口腔粘膜炎症の出現は必発であり、その治療に苦慮する事も多い。

化学療法の直接作用による口腔粘膜炎症の機序については、Sonis ら(Nat Rev Cancer 2004)が報告しており、潰瘍形成前のシグナル期に各種サイトカインの産生、潰瘍期に細菌・ウイルスが関与し、粘膜炎症が増悪し治療が遅れると考えられている。

申請者は、口腔粘膜の代表的な構成細胞である歯肉線維芽細胞の免疫応答能に関し研究を行ってきた。その結果、細菌感染やウイルス感染において病原体認識レセプターの1つである Retinoic acid-inducible gene-I (RIG-I)が、感染防御における初期免疫応答で重要な役割を担っていることが明らかになった(Sakaki et al, Oral Microbiol Immunol 2005, Kubota et al. Oral Microbiol Immunol 2006. )。また、科学研究費「化学療法誘発口腔粘膜炎症の革新的治療法の開発へ向けた R I G - I の機能解析(平成 23・24 年度 4,160 千円)」の交付を受け、口腔粘膜炎症の発症機序における歯肉線維芽細胞と RIG-I の役割を解析してきた。その結果、RIG-I の初期免疫応答能は、発症機序における細菌・ウイルスの認識(潰瘍期)とサイトカイン産生(シグナル期)における役割を担っていることが示唆された。

臨床的には腫瘍近傍の口腔粘膜炎症の治療が遅延し、腫瘍が消滅後も粘膜炎症が残ることが多い。近年、腫瘍微小環境でのがん関連線維芽細胞が注目され、腫瘍細胞との相互作用で浸潤・転移等で重要な役割が明らかとなってきた。これらのことから、腫瘍近傍粘膜の構成細胞である、がん関連線維芽細胞が化学療法誘発口腔粘膜炎症の修復期への遅延に関与している可能性に申請者は着目した。そこで申請者は化学療法誘発口腔粘膜炎症に

おけるがん関連線維芽細胞と歯肉線維芽細胞の相互作用・RIG-I 遺伝子などの免疫応答能の差異を解析し、新規化学療法誘発口腔粘膜炎症の治療法開発の基礎研究への着想に至った。

### 2. 研究の目的

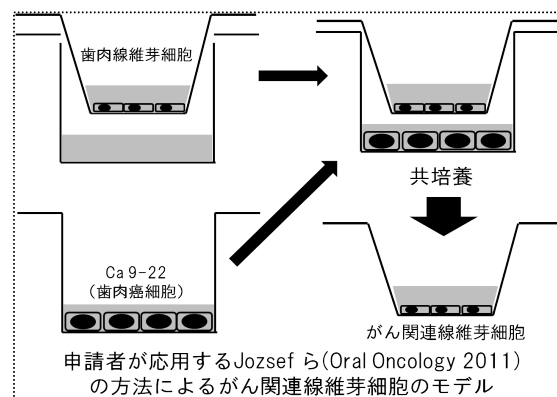
申請者はこれまで化学療法誘発口腔粘膜炎症の発症機序における RIG-I の役割について研究を行ってきた。その研究結果をもとに以下の点を期間内に明らかにし、がん関連線維芽細胞と RIG-I の化学療法誘発口腔粘膜炎症における役割とその機序を解明し、画期的な新規治療法へと展開できる基礎的研究を行う事が目的である。

- 1) 歯肉癌細胞と歯肉線維芽細胞を共培養し、がん関連線維芽細胞モデルを作成、培養する。
- 2) がん関連線維芽細胞の RIG-I や TLR-3,4 などの初期免疫応答能や、IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 などの炎症性サイトカイン, MMPs, VEGF 等の遺伝子発現・タンパク産生について検討する。

### 3. 研究の方法

#### 1) がん関連線維芽細胞モデルの確立

Ca9-22(歯肉癌)の口腔癌細胞由来細胞株を使用した。歯肉癌細胞と歯肉線維芽細胞を培養用ディッシュで培養した後、Jozsef ら(Oral Oncology 2011)の方法に従い、共培養ディッシュで1週間共培養を行い、がん関連線維芽細胞モデル(以下 CAF)を作成する。



2) 歯肉癌由来がん関連線維芽細胞モデルと正常歯肉線維芽細胞の比較

1)の方法によりがん関連線維芽細胞モデルを作成の後、Total RNA を回収し、一本鎖cDNA を合成、また、タンパク回収を行った。その後、 $\alpha$ -SMA , TLR-3,-4, COX-2, VEGF, interleukin, MMPs を定量 PCR や、western blot で検討した。

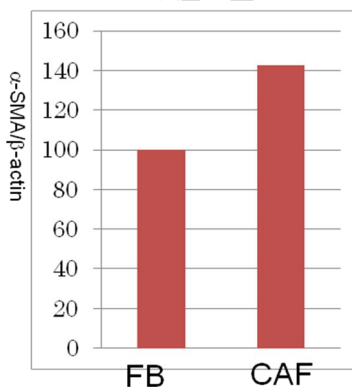
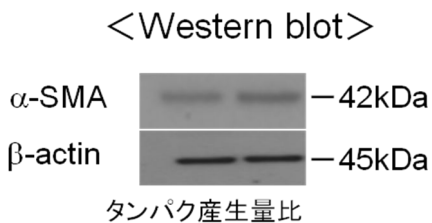
3) cDNA マイクロアレイによる化学療法誘発口腔粘膜炎でのがん関連線維芽細胞の役割を検討。

これまでの結果より、抗悪性腫瘍剤ドセタキセルを添加後のがん関連線維芽細胞に LPS (細菌感染を想定) polyIC (ウイルス感染を想定) を添加し、一定時間の培養の後、一本鎖 cDNA を合成し cDNA マイクロアレイで自然免疫応答能を中心に解析した。

4. 研究成果

1) がん関連線維芽細胞モデルの確立

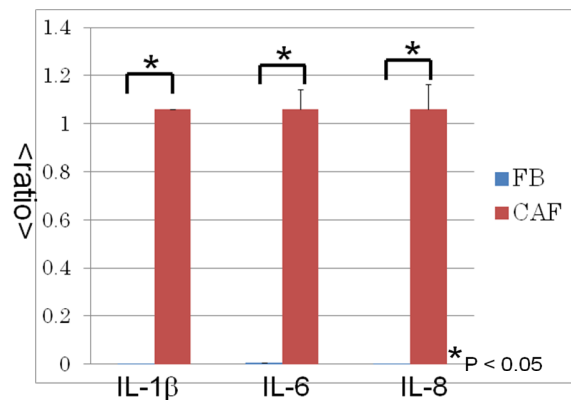
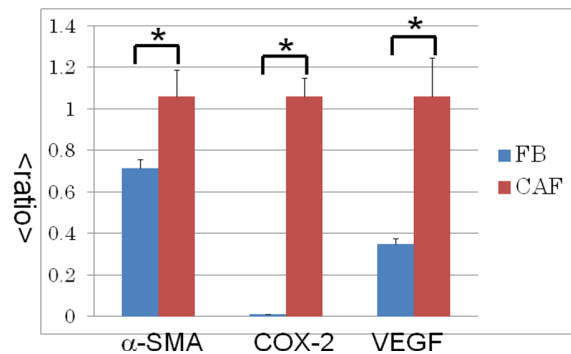
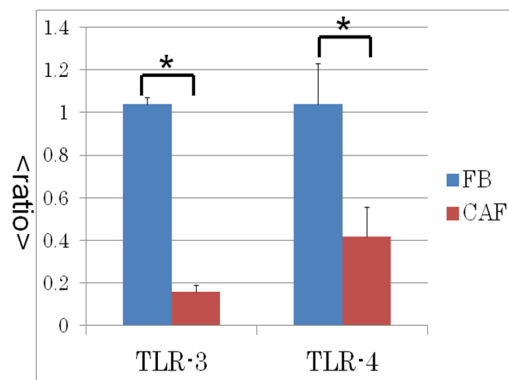
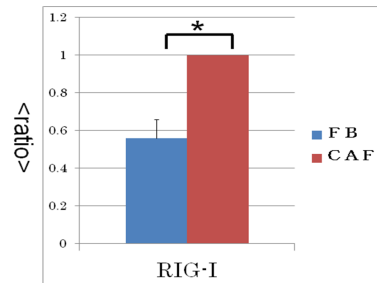
がん関連線維芽細胞モデルを作成し、マーカーとされる $\alpha$ -SMA を検討したところ、発現の上昇が認められた。



2) 歯肉癌由来がん関連線維芽細胞モデル

(CAF)と正常歯肉線維芽細胞(FB)の比較検討

FB と CAF について自然免疫応答能と各種サイトカインについて定量 PCR で比較検討したところ、以下の結果を得た。



縦軸: Target gene/18SrRNA mRNA expression fold increase (ratio)



3. Narita N. , Matsumiya T. , Kon T. , Hayakari R. , Ito R. , Kubota K. , Sakaki H. , Furudate K. , Yoshida H. , Imaizumi T. , Kobayashi W. , Kimura H.

Production of Growth-related Oncogene Protein- $\alpha$  in A Human Oral Squamous Cell Carcinoma Cell Line Stimulated with Tumor Necrosis Factor - $\alpha$  : Role in Tumor Angiogenesis and Tumor Proliferation.

Hirosaki Med. J. 65(2-4):147-155, 2014.  
査読有

4. Ito R., Kubota K., Sakaki H., Sato H., Kon T., Furudate K., Kobayashi W., Kimura H. A case of congenital ranula: The importance of timely and precise treatment.

J Oral Maxillofac Surg Med Pathol in press. 査読有

5. Kubota K. ,Furudate K. ,Nakagawa H. , Sakaki H. , Kobayashi W. , Kimura H.

Sjögren's syndrome with marked swelling of major salivary glands related to localized AL amyloidosis:A case report and literature.

J Oral Maxillofac Surg Med Pathol in press. 査読有

〔学会発表〕(計 3件)

1. 久保田 耕世, 佐藤 寿, 伊藤 良平, 古舘 健, 小松 賢一, 小林 恒, 木村 博人: 動注化学放射線療法における口腔管理と口腔粘膜炎に対する疼痛管理の検討. 第 58 回(公社)日本口腔外科学会総会・学術大会, 2013 年 10 月 12 日(福岡市)

2. 久保田 耕世 , 中川 祥 , 伊藤良平 , 古

舘 健 , 榊 宏剛 , 小林 恒 , 木村博人: 動注化学放射線療法における口腔管理の有用性について. 第 59 回(公社)日本口腔外科学会総会・学術大会, 2014 年 10 月 18 日(千葉市).

3. 久保田 耕世 , 中川 祥 , 今 敬生 , 小林 恒 , 木村博人: 正常歯肉線維芽細胞とがん関連線維芽細胞の比較検討. 第 33 回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会, 2015 年 1 月 29 日(奈良市).

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

久保田 耕世 (KUBOTA KOSEI)

弘前大学・医学部附属病院・助教

研究者番号 : 10529689