

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861830

研究課題名(和文)カテキンによる口腔粘膜炎発症予防

研究課題名(英文) Topical application of ointment containing 0.5% green tea catechins suppresses tongue oxidative stress in 5-fluorouracil administered rats

研究代表者

丸山 貴之 (Maruyama, Takayuki)

岡山大学・大学病院・助教

研究者番号：30580253

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：5-FUにより舌で産生される酸化ストレスに対する、カテキンの予防効果について検討した。ラットを生理食塩水+ワセリン群、5-FU+ワセリン群、5-FU+0.1%カテキン群、5-FU+0.5%カテキン群の4群に分け、5日間、5-FUを腹腔内投与し、ワセリンを舌下面に塗布した。その後、舌下面組織中の8-OHdG陽性細胞率を算出した。

5-FU+ワセリン群は、生理食塩水+ワセリン群と比較して、8-OHdG陽性細胞率が有意に高く、5-FU+0.5%カテキン群は有意に低かった。この結果より、0.5%カテキン配合ワセリンの粘膜への塗布が、酸化ストレスの減少を通して口腔粘膜炎予防に効果があることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to investigate the preventive effects of topical application of catechins on tongue oxidative stress induced by 5-FU administration in rats. Rats were divided into four groups of seven rats each: a negative control group (saline + ointment without catechins), a positive control group (5-FU + ointment without catechins), and two experimental groups (5-FU + ointment containing 0.1% or 0.5% catechins). Topical application of each ointment to the ventral surface of the tongue was performed once a day for 5 days. The level of 8-OHdG was determined to evaluate oxidative stress. The ratios of 8-OHdG positive cells were higher in the positive control group than in the negative control group. On the other hand, those in the 0.5% green tea catechin group, but not in the 0.1% green tea catechin group, were lower than the positive control group. Topical application of ointment containing 0.5% catechins could prevent tongue oxidative stress in 5-FU administered rats.

研究分野：予防歯科学

キーワード：がん 支持療法 口腔粘膜炎 化学療法 有害事象 口腔ケア 動物実験

1. 研究開始当初の背景

口腔粘膜炎はがん化学療法における有害事象の一つであり、化学療法を受ける患者の約40%に生じる。口腔粘膜炎は強い痛みを伴うため、経口摂取が困難となり、栄養状態不良による抗がん剤使用の変更や中断を余儀なくされることがある。したがって、化学療法中の口腔粘膜炎を予防することは、がん治療を円滑に進める上で重要である。

口腔粘膜炎の病理学的発生機序は、開始期、シグナル伝達・増幅期、潰瘍形成期、治癒期の4つからなる。抗がん剤を投与すると、口腔粘膜の基底細胞において活性酸素種が産生される。過剰に産生された活性酸素種により、酸化・抗酸化のバランスが崩れると、酸化ストレスが発生する。その後、酸化ストレスは核内因子κB (NF-κB) を活性化し、炎症性サイトカインの産生を誘導する。これにより、口腔粘膜炎が発生する。それゆえ、抗がん剤投与に伴う酸化ストレスを減少させることは、口腔粘膜炎発症予防に有効であると考えられる。

一方、緑茶中に含まれるカテキンは強い抗酸化作用を有している。したがって、カテキンを口腔粘膜に塗布することで、口腔粘膜基底細胞で発生した酸化ストレスを抑制すると考えられるが、その効果については不明である(図1)。

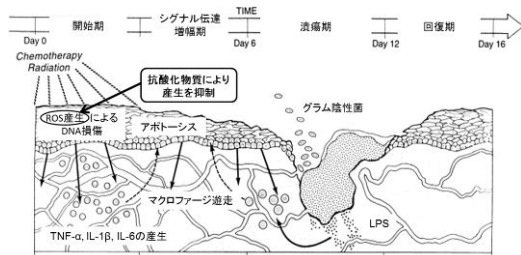


図1：抗酸化物質応用による口腔粘膜炎予防概念図 (Sonis, 1998 を改変)

2. 研究の目的

本研究の目的は、抗がん剤投与ラットにおいて、舌組織で産生される酸化ストレスがカテキンにより抑制されるかどうかについて、検討することである。

3. 研究の方法

本研究は、岡山大学動物実験委員会の承認 (OKU-2014423) を得て行われた。

(1) 研究デザイン

8週齢 Wistar 系雄性ラット 28 匹を、「生理食塩水投与 + ワセリン塗布」群 (NC 群)、「抗がん剤投与 + ワセリン塗布」群 (対照群)、「抗がん剤投与 + 0.1%カテキン配合ワセリン塗布」群 (0.1%カテキン群)、「抗がん剤投与 + 0.5%カテキン配合ワセリン塗布」群 (0.5%カ

テキン群) の 4 群に分けた。1 日 1 回、5 日間連続して、吸入麻酔下において、NC 群には生理食塩水を、その他の 3 群には 20mg/kg の 5-フルオロウラシル (5-FU) (和光純薬工業、大阪) 含有生理食塩水を腹腔内投与した。同時に、NC 群と対照群にはワセリンを、0.1%カテキン群には 0.1%カテキン配合ワセリンを、0.5%カテキン群には 0.5%カテキン配合ワセリンを舌下面に塗布し、5 分後に綿球にて除去した。カテキン軟膏は緑茶抽出物 (和光純薬工業、大阪) を混和して作製した。なお、緑茶抽出物には、エピガロカテキンガレート 70.5%、エピカテキンガレート 22.0%、エピカテキン 5.5%、エピガロカテキン 1.0% が含まれている。5 日間の実験終了後、翌日にジエチルエーテルで屠殺し、舌を摘出した。また、心臓より血液を採取した (図 2)。

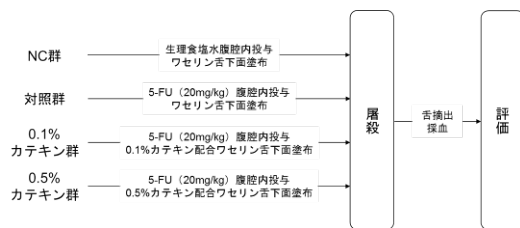


図2：研究のフローチャート

(2) 免疫組織学的評価

摘出した舌は、1 日間ブアン固定を行った後、パラフィン包埋を行い、厚さ 2μm の組織切片を作成した。その後、ヘマトキシリンエオジン染色、および免疫染色を行った。

免疫染色は、酸化ストレスマーカーである 8-ヒドロキシデオキシグアノシン (8-OHdG) (Chemicon International, USA)、炎症性サイトカインであるインターロイキン 1β (IL-1β) (Serotec, UK)、NF-κB (Abcam, USA) について行った。3,3'-ジアミノベンジジン四塩酸塩により陽性細胞を染色した後、陽性細胞数をカウントし、全細胞に対する陽性細胞率を求めた。

(3) リアルタイム逆転写 PCR 法による遺伝子発現の検索

舌組織から RNA を抽出後、逆転写を行った。その後、リアルタイム PCR を行った。酸化ストレスおよび抗酸化防御に関する 84 種類の遺伝子発現の検索には、RT2 Profiler PCR Array (Qiagen, Germany) を用いた。対照群の遺伝子発現量に対する 0.5%カテキン群の遺伝子発現量の比率について計測した。

(4) 転写因子 Nrf2 の核内移行に関する組織学的評価

抗酸化防御に関わる転写因子 Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) の核内移行を評価するために、蛍光染色を行った。

(5) 血液学的評価

抗がん剤による全身の影響を評価するた

めに、白血球数、赤血球数、ヘモグロビン量、血小板数を計測した。

(6)統計学的評価

各群の比較には一元配置分散分析、または Student の t 検定を用いた。有意水準は 5%とした。

4. 研究成果

(1)組織学的評価

実験期間終了後、各群において舌下面に発赤や潰瘍はほとんどみられなかった。また、ヘマトキシリンエオジン染色において、炎症性細胞浸潤や上皮基底細胞の破壊はほとんどみられなかった。

8-OHdG 陽性細胞は舌組織にみられた。対照群は NC 群と比較して、8-OHdG 陽性細胞率が有意に高かった ($P=0.015$)。また、0.5%カテキン群は対照群と比較して、8-OHdG 陽性細胞率が有意に低かった ($P=0.029$)。しかし、対照群と 0.1%カテキン群の間には有意な差は認められなかった。(図 3A)

一方、舌中央における 8-OHdG 陽性細胞率は、対照群は NC 群と比較して高く、0.1%カテキン群および 0.5%カテキン群は対照群と比較して低かったが、有意な差は認められなかった(図 3B)。また、舌背部における 8-OHdG 陽性細胞率は、対照群は NC 群と比較して統計学的有意に高かった($P=0.011$)。また、0.1%カテキン群および 0.5%カテキン群は対照群と比較して低かったが、有意な差は認められなかった(図 3C)。

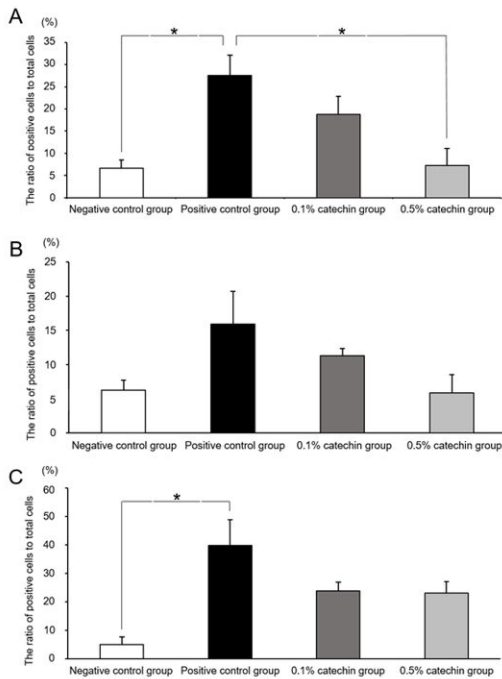


図 3 : 8-OHdG 陽性細胞率の比較 (A : 舌下面、B : 舌中央、C : 舌背部)

NF- κ B および IL-1 β 陽性細胞についても舌組織にみられた。対照群は NC 群と比較して、NF- κ B および IL-1 β 陽性細胞率が有意に高かった ($P=0.011$ および $P=0.001$)。また、0.5%カテキン群は対照群と比較して、NF- κ B および IL-1 β 陽性細胞率が有意に低かった ($P=0.003$ および $P=0.014$)。しかし、対照群と 0.1%カテキン群の間には有意な差は認められなかった(図 4)。

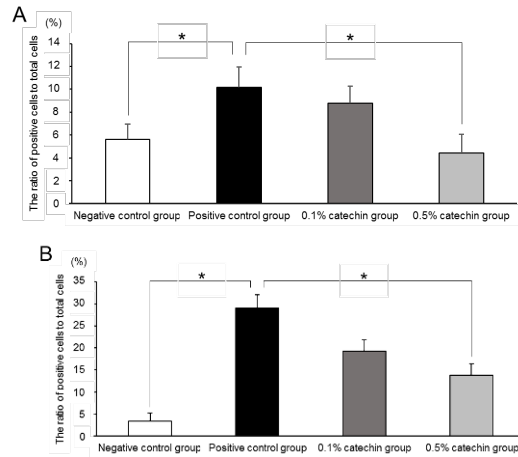


図 4 : NF- κ B、IL-1 β 陽性細胞率の比較 (A : NF- κ B、B : IL-1 β)

(2)リアルタイム逆転写 PCR 法による遺伝子発現の検索

酸化ストレスおよび抗酸化防御に関する 84 種類の遺伝子のうち、対照群と 0.5%カテキン群の間で 2 倍以上の発現比を認めたのは、ferritin、thioredoxin、superoxide dismutase 1、peroxiredoxin、selenoprotein P、myoglobin、cathepsin B、glutamate cysteine ligase modifier subunit の 8 種類であった。

(3)転写因子 Nrf2 の核内移行に関する組織学的評価

0.5%カテキン群は対照群と比較して、核内の Nrf2 レベルが有意に高かった ($P=0.002$) (図 5)。

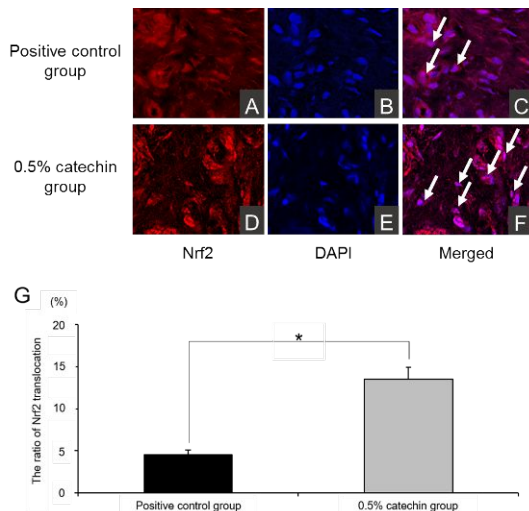


図 5 : 転写因子 Nrf2 の核内移行率の比較

(4)血液学的評価

対照群および 0.5%カテキン群の白血球数は、NC 群と比較して有意に低かった ($P=0.002$ および $P=0.003$)。また、対照群および 0.5%カテキン群の赤血球数、血小板数、ヘモグロビン量は、NC 群と比較して低かったが、有意な差は認められなかった (表 1)。

表 1 : 血液学的評価

	NC群	対照群	0.5%カテキン群
白血球数 ($\times 10^3 / \mu\text{L}$)	90.7 \pm 24.2	49.1 \pm 11.8*	45.8 \pm 15.3*
赤血球数 ($\times 10^4 / \mu\text{L}$)	808 \pm 42	796 \pm 32	712 \pm 78
ヘモグロビン量 (g/dL)	17.1 \pm 0.8	16.6 \pm 0.9	15.2 \pm 1.7
血小板数 ($\times 10^4 / \mu\text{L}$)	97.6 \pm 27.8	97.2 \pm 21.7	67.1 \pm 23.7

* $P < 0.05$: NC 群との比較

(5)考察

舌下面組織において、対照群の 8-OHdG 陽性細胞率は NC 群と比較して高かった。8-OHdG は酸化ストレスの指標の一つとして、一般的に認められている。この結果より、5-FU の腹腔内投与により、舌下面組織中の酸化ストレスが産生されたことを示している。一方、0.5%カテキン群の 8-OHdG 陽性細胞率は、対照群と比較して低かった。このことから、0.5%カテキンは 5-FU により産生される酸化ストレスを抑制することが示唆された。

一方、舌中央および舌背部における 8-OHdG 陽性細胞率は、0.5%カテキン群において変化しなかった。本研究では、舌下面にカテキン配合ワセリンを塗布している。したがって、塗布されたカテキンは舌中央や舌背部には浸透せず、塗布した部分に局限して効果を示すことが明らかとなった。

NF- κ B の発現は 0.5%カテキン群において抑制されていた。NF- κ B は酸化還元感受性があり、内皮や血管の平滑筋細胞中の活性酸素種を標的とする炎症性核転写因子である。この結果より、0.5%カテキンは NF- κ B を抑制することで、酸化ストレスが誘導する炎症性反応を寛解させることが示唆された。また、0.5%カテキン群は対照群と比較して、IL-1 β の発現量が低かった。このことは、0.5%カテキンは炎症性サイトカインを阻害することを示している。以上のことから、0.5%カテキンを舌下面に塗布することは、酸化ストレスおよび炎症性サイトカイン産生を抑制し、化学療法中における舌下面組織の保護に有効であることが示唆された。

8 種類の抗酸化に関連する遺伝子において、対照群と 0.5%カテキン群の間で 2 倍以上の発現比を認めた。これらのうち、thioredoxin-1 は apoptosis signal-regulating-kinase 1 の阻害を介して、抗アポトーシス作用をもつ酸化還元感受性の抗酸化タンパクである。また、Superoxide dismutase はスーパーオキシドラジカルの除去に参与する抗酸化酵素である。さらに、peroxiredoxin 1 は NF- κ B に直接関与することで細胞死を抑制する抗酸化酵素である。本研究の結果より、カテキンの局所塗布

は舌組織の抗酸化能を高め、5-FU の投与によって生じる舌下面の酸化ストレスを減少させることに参与していると考えられる。

Nrf2 は、組織中における抗酸化防御機構において重要な役割を果たす酸化還元感受性因子である。酸化ストレスのない状態において、Nrf2 は Kelch-like ECH-associated protein (Keap1) により抑制されているが、酸化ストレス状態においては、Nrf2 は Keap1 の抑制から解放されて活性化され、核内に移行し、抗酸化反応元素と結合する。本研究では、0.5%カテキン群は対照群と比較して、Nrf2 の核内移行が多く認められた。このことから、カテキンは Nrf2 シグナル経路の増強を通じて、舌下面の抗酸化能を高めていると示唆される。

対照群および 0.5%カテキン群は、NC 群と比較して白血球数が有意に低かった。赤血球数、血小板数、ヘモグロビン量についても低い傾向にあった。これらの結果は、5-FU の投与により、骨髄抑制が生じていることを示している。また、臨床上、骨髄抑制状態においては、口腔粘膜炎が発生しやすい。しかし、今回の研究においては口腔粘膜炎の病態は示さなかった。口腔粘膜炎の惹起に関する過去の研究では、50mg/kg の 5-FU を 4 日間連続して腹腔内投与していた。一方、今回の研究では一般臨床における化学療法にならい、20mg/kg の 5-FU を 5 日間連続して腹腔内投与した。本研究に用いた 5-FU 濃度では、このモデルにおける粘膜炎を惹起するのに十分な濃度ではなかったのかもしれない。

カテキンは抗酸化能を有する天然成分である。過去の研究では、 α リポ酸やアロエベラが化学療法に伴う口腔粘膜炎の重症化予防に効果があるとの報告がある。本研究および過去の研究結果は、化学療法に伴い生じる酸化ストレスを抗酸化物質によりコントロールするというコンセプトを支持するものである。一方、抗酸化物質は化学療法に伴う口腔粘膜炎に対して効果がない、という報告もある。この点についてはさらなる研究が必要である。

結論として、0.5%カテキン配合軟膏の局所塗布は、5-FU を腹腔内投与したラットにおいて、Nrf2 のシグナル経路の増強を通じて、舌の酸化ストレスを抑制することが示された。

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 1 件)

Hisataka Miyai, Takayuki Maruyama, Takaaki Tomofuji, Tetsuji Azuma, Toshiki Yoneda, Hirofumi Mizuno, Manabu Morita. Effect of Catechin on 5-fluorouracil-induced Tongue

Oxidative Stress. 94th General Session & Exhibition of the IADR. (22-25th June, 2016, Seoul)

小林暉政、宮井久敬、丸山貴之、友藤孝明、東哲司、米田俊樹、杉浦嘉雄、江國大輔、森田学 抗がん剤投与ラットへのカテキン局所塗布による抗酸化作用の検討 第 27 回近畿・中国・四国口腔衛生学会総会 (2016 年 10 月 2 日、大阪)

〔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〕
ホームページ等：なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

丸山 貴之 (MARUYAMA, Takayuki)
岡山大学病院新医療研究開発センター・助教
研究者番号：30580253