

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 11 日現在

機関番号：11301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893024

研究課題名(和文)唾液メタボローム解析と口腔細菌叢ゲノミクス解析による口腔粘膜炎発症メカニズム解明

研究課題名(英文)Elucidation of oral mucositis onset mechanism by saliva metabolome analysis and the oral flora genomics analysis

研究代表者

佐久間 陽子(sakuma, yoko)

東北大学・歯学研究科(研究院)・助教

研究者番号：90735531

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：頭頸部がん患者の強度変調放射線治療および化学療法時に生じる有害事象で多く発症する口腔粘膜炎の対処法は確立されていない。そこで、口腔粘膜炎の発症の要因に挙げられる口腔内細菌叢の遺伝的な検索方法を検討した。検体中の細菌遺伝子を直接評価する方法を選択することで、従来の方法では培養しにくい細菌についてもその量を定量することができ、従来の方法に比べ正確な細菌叢全体を把握することができる。

これにより、頭頸部がん患者の治療開始前、治療中後の正確な細菌叢を比較でき、口腔粘膜炎の発症の要因の一つと考えられる口腔細菌叢との関連が明確となり、口腔粘膜炎の発症・増悪因子とそのメカニズムへの解明の一助となる。

研究成果の概要(英文)：Oral mucositis is one of the major adverse events of Intensity-modulated radiation therapy and chemotherapy for patients with head and neck cancer. However, standard care for the oral mucositis has not been established. In this study, we examined a genetic search method of oral flora which is said to be the cause of oral mucositis. This method revealed more accurate overview of oral flora compared with conventional cultivation. Therefore, it is thought that the genetic search method might be useful to clarify exacerbating or causative factor of oral mucositis.

研究分野：周術期口腔支援

キーワード：頭頸部がん 放射線治療 化学療法 口腔粘膜炎

1. 研究開始当初の背景

手術が困難な頭頸部がんの治療には、解剖学的な構造が温存され、治療後の容貌変化、発生や咀嚼・嚥下機能などの低下が少ないことから、放射線治療・化学療法による同時併用療法が広く用いられ、治療成績も向上してきている。しかしながら、生存率および機能温存率が向上してきた一方で、放射線治療や化学療法に伴う有害事象も少なくない。近年、がんに限局して放射線治療を行うことで、有害事象を減少させる強度変調放射線治療 (IMRT) が注目されているが、同方法を用いても、口腔粘膜炎・味覚障害。ランパントカエリエスの口腔内有害事象の発症を抑制することは困難である。中でも口腔粘膜炎は、疼痛のみならず、重度の場合には開口障害、運動障害によって、摂食障害を来し、放射線治療を中止せざるを得ない状況へと追い込まれることから、大きな問題となっているが、その対処法は確立されていない。

口腔粘膜炎の発生機序は、未だはっきりとは解明されていないが、()放射線や抗がん剤によって、細胞内にフリーラジカル (活性酸素) が発生し、口腔粘膜を破壊、粘膜再生を阻害させる直接的要因と () 骨髄抑制による好中球減少などの免疫機能低下等による局所感染 (二次的作用) が考えられている。一方、口腔内清掃・口腔乾燥用含嗽剤の値用で、口腔粘膜炎症状が一時的に官界することは、多数の患者にて経験されており、この局所感染 (二次的作用) の影響は大きいものと推察される。

一方で、皮膚等に比べ口腔粘膜において炎症が劇的に多く発症することから、抗がん治療によって唾液の質や口腔細菌叢の変化することで感染しやすい口腔環境が生じ、局所感染 (二次的作用) が発症および増悪するものと考えられるが、詳細は明らかにされていない。

そこで、頭頸部がん治療前中後の唾液量、唾液の質、口腔内細菌叢、口腔粘膜の変化を検索し、口腔粘膜炎の発症・増悪因子とそのメカニズム解明に着想した。

2. 研究の目的

頭頸部がん患者の強度変調放射線治療 (IMRT) および化学療法時に生じる有害事象において最も多く発症するのが激しい痛みを生じる口腔粘膜炎であるが、その対処法は未だ確立されていない。局所感染という観点からその要因を考えると、唾液量、唾液の質、口腔内細菌叢、口腔粘膜状態が挙げられる。本申請研究では、唾液代謝のメタボローム解析により唾液の質、口腔内細菌叢のゲノクス解析により、口腔内細菌叢を構成する細菌を検索し、頭頸部がん治療前中後における変化を明らかにする。それにより、口腔粘膜炎の発症・増悪因子とそのメカニズムを解明し、抗がん剤治療中後の口腔粘膜炎の予防法および治療方法を確立する。本申請研

究により頭頸部がん患者の口腔機能管理を向上させることで、治療中後に口腔粘膜炎に悩むことなく、本来の治療目的を達成することが可能となり、患者の QOL の向上に繋がることが目的である。

3. 研究の方法

頭頸部がん患者の治療前、中後の口腔内細菌叢の変化を評価する為に、遺伝的な口腔細菌叢の検索方法を習得する。本研究では、臨床での細菌の動態を正確に把握するため、従来広く使用されてきた細菌培養法ではなく、検体中の細菌遺伝子を直接評価する t-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis: 末端標識制限酵素断片多方分析) 法を活用した。制限酵素は DNA の特定の塩基配列部位を切断する性質をもつ酵素である。末端蛍光標識したプライマーセットで鋳型 DNA を PCR 増幅し、制限酵素による消化後、フラグメント解析する方法であり、この方法では、すべての生物をもつ small subunit of ribosomal RNA (SSU rRNA) を標的とし、配列データベースから制限酵素切断部位の予測をたてている。このため、各ピークの強度、位置、数により由来する細菌種・群を特定しやすく、従来の方法と比較し、正確な細菌叢全体を把握することができる。

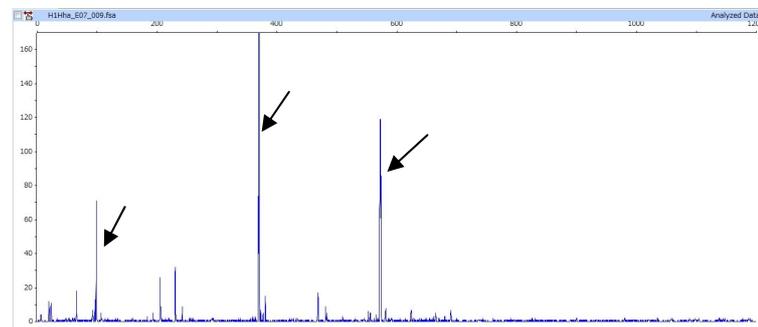
本研究では、検体を健常者の歯肉溝から採取した歯垢 (プラーク) とした。採取した歯垢に存在する細菌叢を評価するため t-RFLP 法を使用、その際の制限酵素を Hha、Msp、Aie、Hae、Rsa とし、それぞれの制限酵素によって解析を行った。

4. 研究成果

t-RFLP 法を用いた歯垢細菌の解析結果各制限酵素による解析結果を下記図表にて示す。ピーク部位を矢印で示し、由来する細菌種・群が明らかとなった。

(1) 健常者歯垢細菌の解析結果

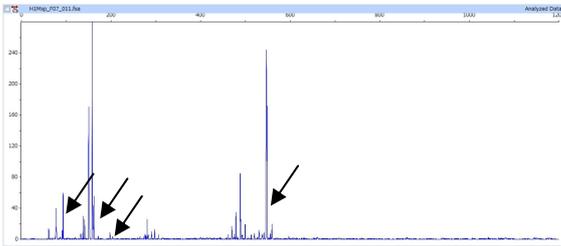
制限酵素: Hha



< 図 1 >

- * 1 (矢印左) *Campylobacter. rectus*
Campylobacter. gracilis
- * 2 (矢印中央) *Actinomyces. meyeri*
Actinobaculum sp.
- * 3 (矢印右) *Selenomonas. infelix*

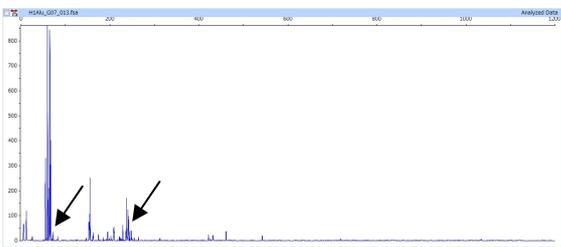
制限酵素：Msp



< 図 2 >

- * 1 (矢印左) Actinomyces. meyeri
- * 2 (矢印中央左) Actinobaculum sp.
- * 3 (矢印中央右) Selenomonas. infelix
- * 4 (矢印右) Campylobacter. rectus
Campylobacter. Gracilis

制限酵素 Aie



< 図 3 >

- * 1 (矢印左) Campylobacter. rectus
Campylobacter. gracilis
Actinomyces. meyeri
Selenomonas. infelix
- * 2 (矢印右) Actinobaculum sp.

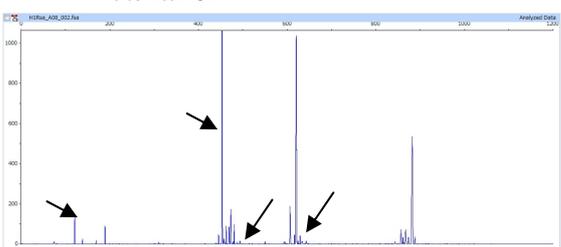
制限酵素：Hae



< 図 4 >

- * 1 (矢印左) Selenomonas. infelix
- * 2 (矢印中央) Actinomyces. meyeri
Actinobaculum sp.
- * 3 (矢印右) Campylobacter rectus
Campylobacter gracilis

制限酵素：Rsa

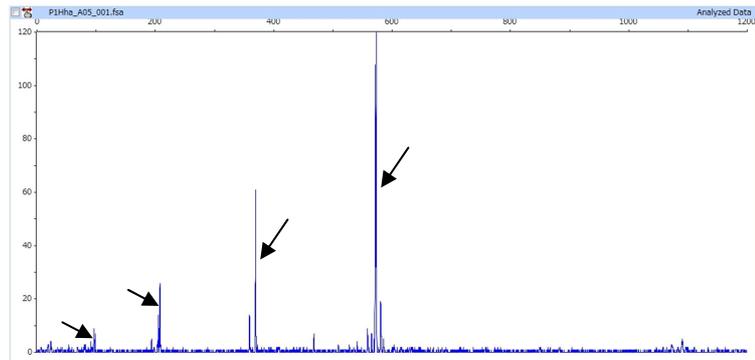


< 図 5 >

- * 1 (矢印左) Actinobaculum sp.
- * 2 (矢印中央左) Actinomyces. meyeri
Actinobaculum sp.
- * 3 (矢印中央右) Selenomonas. infelix
- * 4 (矢印右) Actinomyces. Meyerii

(2) 歯周病者歯垢細菌の解析結果

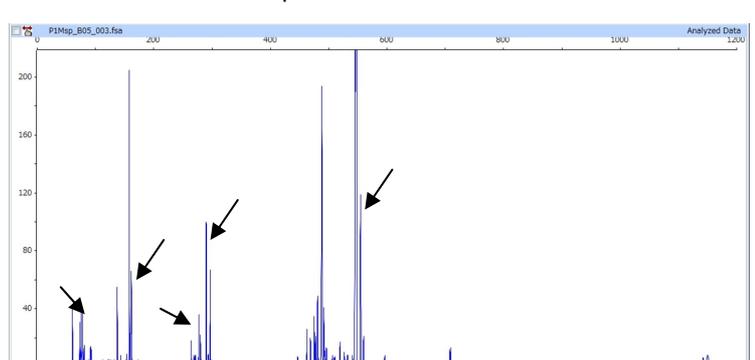
制限酵素：Hha



< 図 6 >

- * 1 (矢印左) Campylobacter sp.
Bacteroides-like sp.
- * 2 (矢印中央左) Synergistes sp.
Deferribacteres sp.
Synergistes sp.
- * 3 (矢印中央右) Actinobaculum sp.
- * 4 (矢印右) Gemella. haemolysans
Streptococcus. oralis
Streptococcus. parasanguinis
Streptococcus sp.
Mogibacterium sp.
Eubacteriaceae sp.

制限酵素：Msp



< 図 7 >

- * 1 (矢印左) Gemella. haemolysans
Streptococcus. mitis
- * 2 (矢印中央左) Synergistes sp.
Synergistes. genomsp. C1
- * 3 (矢印中央) Deferribacteres sp.
Synergistes sp.
- * 4 (矢印中央右) Selenomonas-like sp.
- * 5 (矢印右) Streptococcus. cristatus
Streptococcus. infantis
Streptococcus. mitis (bv2)
Streptococcus. pneumoniae

Streptococcus sp.
Streptococcus. Oralis

上記結果に示したように、t-RFLP法を使用することで健常者ならびに歯周病者から採取した歯垢の口腔内細菌種・群を特定し、細菌叢全体を把握することで、比較することが可能であることが確認された。この方法を用いることで、今後は頭頸部がん患者の治療前、中、後の口腔内細菌叢を把握し、その比較が可能であることが示された。

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 0件)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

佐久間 陽子 (SAKUMA, Yoko)

東北大学 歯学研究科(研究院)・助教

研究者番号：90735531