

氏名	宮井 久敬		
授与した学位	博士		
専攻分野の名称	歯学		
学位授与番号	博甲第5691号		
学位授与の日付	平成30年3月23日		
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科社会環境生命科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)		
学位論文の題目	Topical application of ointment containing 0.5% green tea catechins suppresses tongue oxidative stress in 5-fluorouracil administered rats (5-FU 投与による舌の酸化ストレスに対する 0.5% 緑茶カテキン含有軟膏の局所応用について)		
論文審査委員	飯田 征二 教授	岡元 邦彰 教授	西田 崇 准教授

学位論文内容の要旨

【緒言】

口腔粘膜炎は、がん化学療法中に現れる有害事象の一つであり、その発生率は約40%である (Villa & Sonis, 2015)。舌や頬粘膜に好発し、強い接触痛を認めるため、経口摂取の妨げとなり、がん化学療法中の中断を招くことがある。したがって、がん化学療法中の口腔粘膜炎の発生を予防することは、がん治療を円滑に進める上で重要である。口腔粘膜炎の発症には、酸化ストレスが関与する (Sonis, 2009)。抗がん剤の投与により組織中の活性酸素種が増加すると、Nuclear Factor- κ B (NF- κ B) などの核内転写因子が活性化され、Interleukin-1 β (IL-1 β) などの炎症性サイトカインを誘導することで、口腔粘膜炎が発生する。一方、カテキンは強い抗酸化作用を有する (Megan et al., 2011)。したがって、がん化学療法中の患者の口腔粘膜組織にカテキンを塗布すると、抗がん剤の投与により産生された酸化ストレスを抑制すると考えられる。本研究の目的は、5-フルオロウラシル (5-FU) 投与ラットの舌下面にカテキンを塗布し、舌組織中の酸化ストレスの抑制効果について検討することである。

【方法】

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 (対照群)」、「5-FU 投与+ワセリン塗布群 (ワセリン群)」、「5-FU 投与+0.1%カテキン配合ワセリン塗布群 (0.1%カテキン群)」、「5-FU 投与+0.5%カテキン配合ワセリン塗布群 (0.5%カテキン群)」に分けた。毎日1回、5日間連続して、腹腔内投与 (生理食塩水あるいは5-FU) と舌下面への塗布 (ワセリン) を行った。実験期間終了後に採血し、舌を摘出した。血液については、自動血球計数器を用いて、白血球数、赤血球数、ヘモグロビン値、血小板数を評価した。一方、舌組織については、8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG : 酸化ストレスの指標)、NF- κ B、IL-1 β の免疫染色を行い、陽性細胞率を求めた。カテキンの塗布効果を検証するために、舌下組織、舌中央組織、舌背組織の 8-OHdG 陽性細胞率を比較した。また、抗酸化転写因子である Nuclear factor erythroid 2-Related Factor (Nrf2) の核内移行を蛍光染色にて評価した。さらに、採取した舌組織を凍結破碎した後、RNA を抽出し、逆転写 PCR アレイを行い、舌組織中

の酸化・抗酸化関連発現変動遺伝子について検索した。群間の比較には、t 検定または一元配置分散分析を用いた。なお、本実験は岡山大学動物実験委員会の承認（OKU-2014423）を得て行われた。

【結果】

白血球数は、対照群に比べてワセリン群（ $p=0.002$ ）、0.5%カテキン群（ $p=0.003$ ）では有意に少なかった。8-OHdG 陽性細胞率について、舌下組織では、ワセリン群は対照群と比べて有意に高く

（ $p=0.015$ ）、0.5%カテキン群はワセリン群と比べて有意に低かった（ $p=0.029$ ）。一方、舌背組織では、ワセリン群は対照群と比べて有意に高かった（ $p=0.011$ ）が、0.5%カテキン群とワセリン群との間で有意な差はみられなかった。舌下組織のNF- κ B と IL- β 陽性細胞率については、ワセリン群が対照群と比べて有意に高く（各々 $p=0.011$ 、 $p=0.001$ ）、0.5%カテキン群がワセリン群と比べて有意に低かった（各々 $p=0.003$ 、 $p=0.014$ ）。また、Nrf2 核内移行率は、0.5%カテキン群がワセリン群と比べて有意に高かった（ $p=0.001$ ）。

舌組織中の酸化・抗酸化関連遺伝子について検索した結果、フェリチン重鎖 1、チオレドキシシン 1、スーパーオキシドジスムターゼ 1、ペルオキシレドキシシン 1、セレノプロテイン 1、ミオグロビン、カテプシン B1、グルタミン酸システインリガーゼ調整サブユニットといった抗酸化関連の遺伝子が、ワセリン群と比べて 0.5%カテキン群において 2 倍以上の発現比を認めた。

【考察】

5-FU 投与ラットの舌下組織では、8-OHdG、NF- κ B、IL-1 β 陽性細胞数の増加を認めた。抗がん剤の腹腔内投与により、局所組織の酸化ストレスが上昇する（Chung et al., 2012）。また、酸化ストレスの上昇は NF- κ B を活性化し、NF- κ B は炎症誘発性核転写制御因子として炎症の促進に働く（Manish et al., 2014）。本研究において、5-FU の腹腔内投与により、舌組織中の酸化ストレスが上昇した。これにより NF- κ B による炎症誘発がみられたと考えられる。

カテキンを塗布すると、酸化ストレスダメージが抑制される（Lawrence, 2009; Maruyama et al., 2010）。本研究において、カテキン塗布部位に局限して 8-OHdG の酸化ストレスの上昇が抑制された。また、Nrf2 の核内移行により、Nrf2 制御系の抗酸化因子が活性化される（Bai et al., 2017）。チオレドキシシン 1 やスーパーオキシドジスムターゼ 1、ペルオキシレドキシシン 1 は、抗酸化作用を及ぼす（Hansen et al., 2007; Saitoh et al., 1998）。以上より、カテキンを塗布すると、Nrf2 系抗酸化因子が活性化され、抗酸化関連発現変動遺伝子が活性化されたと示唆される。

【結論】

抗がん剤投与ラットにおいて、舌下組織への 0.5%カテキン配合ワセリンの塗布により、Nrf2 系抗酸化因子を活性化し、舌下組織中の酸化ストレスを抑制した。

論文審査結果の要旨

口腔粘膜炎は、がん化学療法中の有害事象の一つである。舌や頬粘膜に好発し、強い接触痛を認め、経口摂取の妨げとなり、がん化学療法の中断を招くことがある。したがって、口腔粘膜炎の発症を予防することは、治療を円滑に進めるうえで重要である。口腔粘膜炎の発症には、酸化ストレスが関与する。抗がん剤の投与により組織中の活性酸素種が増加すると、Nuclear Factor- κ B (NF- κ B)などの核内転写因子が活性化され、炎症性サイトカインを誘導することで、口腔粘膜炎が発症する。一方、カテキンは強い抗酸化作用を有する。そこで、口腔粘膜組織へカテキンを塗布すると、抗がん剤の投与により産生された口腔粘膜組織中の酸化ストレスを抑制できるのではないかという仮説を立てた。本研究の目的は、5-フルオロウラシル (5-FU) 投与ラットの舌下面にカテキンを塗布し、舌組織中の酸化ストレスの抑制効果について検討することである。

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 (対照群)、5-FU 投与+ワセリン塗布群 (ワセリン群)、5-FU 投与+0.1%カテキン配合ワセリン塗布群 (0.1%カテキン群)、5-FU 投与+0.5%カテキン配合ワセリン塗布群 (0.5%カテキン群) に分けた。5-FU をラット腹腔内に投与後、毎日 1 回、5 日間連続して、ワセリンまたはカテキン配合ワセリンを舌下面への塗布を行った。実験期間終了後、採血及び舌組織を摘出した。舌組織については、8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG : 酸化ストレスの指標)、NF- κ B、Interleukin-1 β (IL-1 β) の免疫染色を行い、陽性細胞率を求めた。また、抗酸化転写因子である Nuclear factor erythroid 2-related factor (Nrf2) の核内移行について、蛍光免疫染色にて評価した。さらに、採取した舌組織を凍結破碎した後、RNA を抽出し、リアルタイム PCR array を行い、舌組織中の酸化・抗酸化に関連した遺伝子について検索した。また、血液については、白血球数、赤血球数、ヘモグロビン値、血小板数を評価した。

舌下部の 8-OHdG 陽性細胞率、NF- κ B 陽性細胞率および IL-1 β 陽性細胞率については、ワセリン群が対照群と比べて有意に高く、0.5%カテキン群がワセリン群と比べて有意に低かった。また、Nrf2 核内移行率は、0.5%カテキン群がワセリン群と比べて有意に高かった。舌組織中の酸化・抗酸化に関連した遺伝子については、抗酸化関連物質であるフェリチン重鎖 1、チオレドキシシン 1、スーパーオキシドジスムターゼ 1、ペルオキシレドキシシン 1、セレノプロテイン 1、ミオグロビン、カテプシン B1、グルタミン酸システインリガーゼ調整サブユニットの遺伝子において、0.5%カテキン群がワセリン群と比べて 2 倍以上の発現上昇を認めた。また、白血球数は、対照群と比べてワセリン群、0.5%カテキン群で有意に少なかった。

5-FU の腹腔内投与により、舌組織中の酸化ストレスが増加し、NF- κ B の核移行の亢進、炎症性サイトカインの発現上昇が認められ、舌に炎症が誘発されることが示された。一方、カテキンの塗布により、舌組織中の抗酸化転写因子である Nrf2 が活性化され、抗酸化作用に関連した遺伝子群が発現したと考えられた。この結果より、5-FU 投与によって誘発される舌組織の炎症は、カテキンの酸化ストレスの抑制効果により軽減されることが示された。

本論文は、がん化学療法に伴う口腔粘膜炎の予防法の一つを見出した重要な知見である。よって、審査委員会は本論文に博士 (歯学) の学位論文としての価値を認める。