

学位申請論文

新規 GGT 阻害薬 GGsTop の
抗癌剤副作用口内炎治療薬への応用

平成 31 年 3 月

東京理科大学大学院 薬学研究科

薬科学専攻 博士後期課程

島村 洋祐

要旨

口内炎は癌化学療法における副作用の一つであり、高い発症率と重篤な症状により患者の QOL 低下や抗癌治療の中止を引き起こすことが報告されている。しかし、抗癌剤副作用口内炎に対する有効な治療薬は見つかっていないのが現状である。本研究における主目的は、「癌化学療法時に発生する口内炎に対する新規治療薬の開発」であり、本論文は「序論（第 1 章）、新規治療薬探索のための抗癌剤副作用口内炎モデルマウスの作製（第 2 章）、候補薬物である GGsTop™ の治療効果検討（第 3 章）、総括（第 4 章）」で構成されている。

第 1 章

序論

現在の抗癌治療に用いられている方法は大別して外科療法、化学療法、放射線療法、免疫療法の 4 つである。これらの治療法の中で、癌化学療法は細胞周期の特定の期において癌細胞を傷害するものが一般的である。そのため、細胞分裂が活発な正常細胞は癌細胞と同様に傷害されてしまい、結果として様々な副作用を生じる。抗癌剤副作用として生じる口内炎は一般的な口内炎と比較して広範囲に現れ、疼痛のみならず、摂食障害、コミュニケーション障害、睡眠障害といった症状が引き起こされ、患者の QOL を低下させる。口内炎の悪化により患者の闘病意欲が低下し、抗癌治療を中断せざるを得ない例も報告されている。現在では十分な治療、予防効果が得られる方法が見つかっていない。ゆえに、口内炎の症状を予防、または迅速な治療を行うことは患者の QOL の改善、治療の中断を防ぐことにつながることから、早急に解決しなければならない問題であると考ええる。

第 2 章

癌治療時に発生する口内炎を模倣したモデルマウスの作製

現在、一般的に用いられているモデル動物はハムスター、ラットであり、いずれも放射線モデルが主流である。我々は、汎用性の高い動物であるマウスを用い、

さらに放射線の代わりに抗癌剤である 5-フルオロウラシルと酢酸によって疾病モデルを作製した。作製されたモデルマウスは既存薬であるトリアムシノロンアセトニド（TA）製剤によって治療することができ、更に、潰瘍面積及び尾静脈血液中の白血球数により治療効果を容易に評価することができた。また、TA 製剤はステロイド系抗炎症薬であるため、免疫抑制作用を有する。白血球数の測定結果は TA 製剤の免疫抑制効果を反映したものが得られた。これらの結果により、本研究において作製されたモデルマウスは癌化学療法時に発生する口内炎を再現し、新規治療薬の探索に有用であることが示された。

第 3 章

新規 GGT 阻害剤 GGsTop を用いた口内炎モデルマウスに対する治療効果検討

γ -グルタミルトランスペプチダーゼ（GGT）とは細菌から哺乳類まで、多くの生物に見られるヘテロ二量体酵素である。GGT は細胞外グルタチオン分解の初期段階を触媒し、細胞内グルタチオン生成を促進し、副産物として細胞外において活性酸素種（ROS）を生成する。GGT は、細胞の酸化還元バランスを媒介する上で中心的な役割を果たす。一方、GGT を阻害することで細胞外における ROS の抑制だけではなく、皮膚内においてはコラーゲン、エラスチン、熱ショックタンパク質 47 の産生を誘導することが報告されている。

GGsTop は、新たに発見された GGT 阻害剤である。GGsTop は化学的に安定で無毒であり、その GGT 阻害活性は従来 GGT 阻害剤として研究されてきたアシビシンの 100 倍以上であると報告されている。そこで、GGsTop であれば癌化学療法と併用投与が可能であり、口内炎の治療ができると考えた。本章では、第 1 章において開発した口内炎モデルマウスを用いて GGsTop の治療効果を検討した。また、治療メカニズムの解明を目的とし、治療期間における口腔粘膜中のコラーゲン分泌を、口腔粘膜切片を用いて組織学的に評価した。GGsTop が既存の口腔炎治療薬である TA 製剤よりも優れた治療効果を示すことを潰瘍面積の測定により確認した。また、白血球数の測定により、GGsTop は抗癌剤との併用投与が可能であることが示された。口腔粘膜切片の観察結果においても GGsTop 投与による組織の早期修復、コラーゲン分泌の促進が確認され、GGsTop の口内炎治療メカニズムの一つとしてコラーゲン産生促進作用が示唆された。

第4章 総括

抗癌剤 5-フルオロウラシルと酢酸を用いて作製した抗癌剤副作用口内炎モデルマウスは、容易に作製可能であり、潰瘍面積と白血球数の測定によって薬物の治療効果、抗癌剤との併用投与の可否を検討することが可能であることが示された。

また、新規 GGT 阻害剤 **GGsTop** は口内炎モデルマウスに対して既存の口内炎治療薬より優れた治療効果を持つだけでなく、免疫抑制作用を起こさず、抗癌剤との併用投与が可能であることが示された。更に、口腔粘膜切片を用いた組織学的評価により、**GGsTop** の口内炎治癒メカニズムの一つとして口腔粘膜におけるコラーゲン産生促進があることが示唆された。

目次

第 1 章 序論	- 1 -
1.1. 現在の癌治療	- 1 -
1.2. 癌化学療法	- 1 -
1.3. 癌化学療法における口内炎	- 3 -
1.4 抗癌治療中に発生する口内炎に関する研究の現状と課題.....	- 7 -
1.5 研究目的	- 7 -
第 2 章 癌治療時に発生する口内炎を模倣したモデルマウスの作製.....	- 8 -
2.1. 緒言	- 8 -
2.2. 実験材料・使用動物	- 11 -
2.3. 実験方法	- 12 -
2.4. 結果と考察	- 15 -
2.5. 結論	- 22 -
第 3 章 新規 GGT 阻害剤 GGsTop を用いた口内炎モデルマウスに対する治療効果検討.....	- 24 -
3.1. 緒言	- 24 -
3.2. 実験材料	- 27 -
3.3. 実験方法	- 28 -
3.4. 結果と考察	- 29 -
3.5. 結論	- 36 -
第 4 章 総括	- 37 -
謝辞	- 38 -
参考文献	- 39 -
論文目録	- 45 -

第 1 章

序論

1.1. 現在の癌治療

現在、癌治療で用いられている方法は手法として外科療法、薬物（化学）療法、放射線療法に大別される。これらの治療法のうち、外科療法と放射線療法は局所療法として主に原発巣に留まる癌細胞を標的として行われ、化学療法とは主に全身療法として転移癌のような局所療法では治療が不可能な場合に用いられる。臨床では、患者の状態に合わせてこれらの治療法の単独使用、または併用使用することによって治療が行われている。特に化学療法は、がんの進行度、感受性、患者の状態・希望、経済的理由などに応じて①固形癌全般に対する生存期間の延長、症状の緩和を目的とした延命化学療法、②急性骨髄性白血病、リンパ性白血病、リンパ腫などに対して根治を目的とした化学療法、③進行期の固形癌の外科手術後の再発転移を防ぐ術後補助化学療法、④手術不可能症例に対するダウンスレージングを図り、手術可能にすることや縮小手術を目指して行う術前化学療法、といった様々な適応法が存在する [1]。

1.2. 癌化学療法

1.2.1. 癌化学療法

癌化学療法とは患者へ投薬を行い、血液を介して全身に薬物を送達させ、癌細胞を殺滅する手法である。近年、化学療法剤（抗癌剤）の開発は著しく発展しており、世界で初めて抗癌剤が開発された 1942 年（ナイトロジェンマスタード）より 76 年経った現在においても新たな作用機序、標的部位を持つ抗癌剤が開発されている [2]。抗癌剤は大きく細胞傷害性抗癌剤と分子標的薬に分けることができ、細胞傷害性抗癌剤は癌細胞の短い細胞周期を利用し、DNA や RNA、タンパク質に作用することで細胞周期を阻害し、抗腫瘍効果を発現する [3]。分子標的薬は癌細胞の浸潤・増殖・転移に関わる分子を標的として、その情報伝達経路を遮断することで抗腫瘍効果を発現する [4]。現在では約 100 種類の化合物が抗癌剤として臨床に用いられているが、そのうち 8 割ほどが細胞傷害性抗癌剤である。これらの薬物を単体投与、もしくは併用投与することによって効果的な

癌細胞の駆逐を行っている。

1.2.2. 癌化学療法における副作用

しかし、細胞傷害性抗癌剤は細胞増殖能が高い癌細胞に対して強力な薬効を発揮する一方、細胞増殖能が高い正常細胞に対しても傷害を与えてしまう。細胞増殖能が高い正常細胞が存在する組織として造血器、消化管粘膜、毛根、生殖器が挙げられる [5]。また、通常の薬剤と比較して、効果発現と副作用発現との間の有効濃度域が狭いため、投与量、投与期間の厳重な管理を以てしても副作用を完全に回避することは極めて難しい (図 1) [6]。また、副作用は発症時期によって分類することができる (図 2) [7]。本論文では、抗癌剤副作用としては早期型に分類される口内炎に注目している。

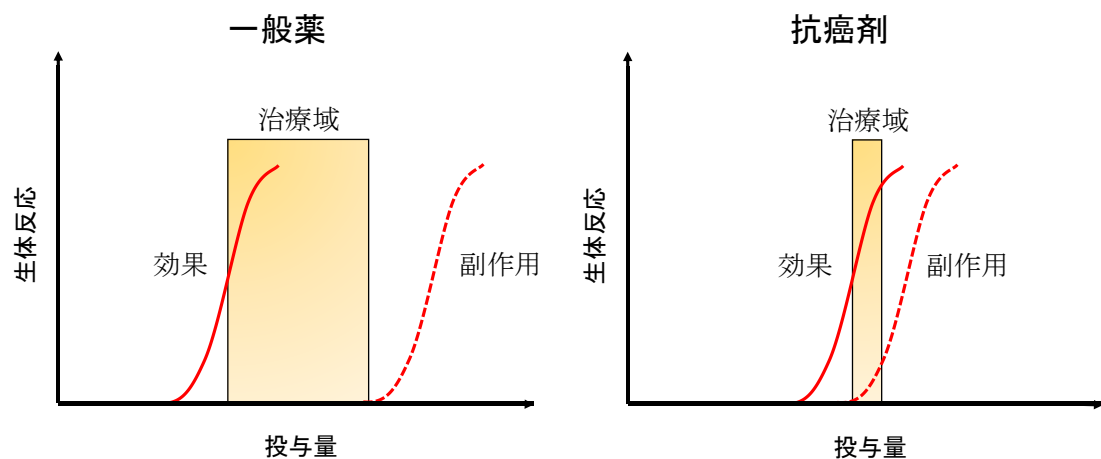


図 1. 一般薬と抗癌剤における用量反応曲線

即時型	早期型	遅延型	晩発型
<ul style="list-style-type: none"> ・アレルギー反応 ・アナフィラキシー ・インフュージョンリアクション ・血圧低下、頻脈、不整脈、めまい、発熱、血管痛、悪心・嘔吐 ・結膜炎、異味症 ・腎不全、出血性膀胱炎 	<ul style="list-style-type: none"> ・口内炎 ・白血球減少、血小板減少 ・脱毛 ・下痢 ・間質性肺炎 ・肝障害、神経障害 	<ul style="list-style-type: none"> ・貧血 ・色素沈着 ・心毒性 ・肺線維症 ・腎障害、神経障害 	<ul style="list-style-type: none"> ・二次発癌 ・白質脳症 ・性腺不全

図 2. 発症時期による副作用の分類

1.3. 癌化学療法における口内炎

1.3.1. 抗癌剤副作用口内炎

口内炎は化学療法、放射線療法を受ける患者に高頻度に認められる副作用である。細胞傷害性抗癌剤の場合は患者の 30~40%に起こり、幹細胞移植では 80%、頭頸部放射線療法では 100%に起こる [8,9]。口内炎の発生原因は大きく 2 つに分けられる。1 つ目は抗癌剤の直接作用による一次的原因である。抗癌剤や放射線は DNA 損傷によりシグナル伝達経路のアップレギュレーションやフリーラジカルの産生を引き起こし、TNF、IL- β 、IL-6 などの炎症性サイトカインを放出させ、結果として粘膜上皮の再生能力低下やアポトーシスが起きる。初期症状は頬粘膜の軟部組織の紅斑や軟口蓋の灼熱感であり、次いで軽度の痛みを伴う白斑が出現し、更に症状が進行すると上皮に痂皮が形成され、偽膜性の浅い潰瘍が多発し、生じた潰瘍が癒合して痛みの強い大きな病変となる。2 つ目は抗癌剤による白血球減少に伴う二次的原因である。抗癌剤による好中球減少期や放射線による唾液腺障害のため唾液分泌量減少状態においては口腔内が易感染状態に陥る。これにより、カンジダ菌によるカンジダ性口内炎や単純ヘルペスウイルス I 型によるヘルペス性口内炎が発症する [10, 11]。

1.3.2. 抗癌剤副作用口内炎が患者にもたらす影響

口内炎は前述したように抗癌剤による副作用の中では発症時期が早期型に分類され、具体的には抗癌剤投与後 2~10 日で発症し、好中球の回復に伴い症状が緩和されるが、約 2~3 週間ほど持続する [12]。また、抗癌剤に依らない一般的に生じる口内炎より広範囲に発症するため、疼痛、摂食障害、コミュニケーション障害、味覚障害、睡眠障害といった合併症を引き起こす [13]。これらの症状は、患者の QOL 低下のみならず、栄養状態の悪化、闘病意識低下による投薬中止、更には感染による発熱や死亡にまで至る（図 3） [1, 14]。症状はその重症度に応じた分類がされており、最も汎用されているものは National Cancer Institute-Common Terminology Criteria for Adverse Events（NCI-CTCAE）である（表 2, 図 4） [15, 16]。

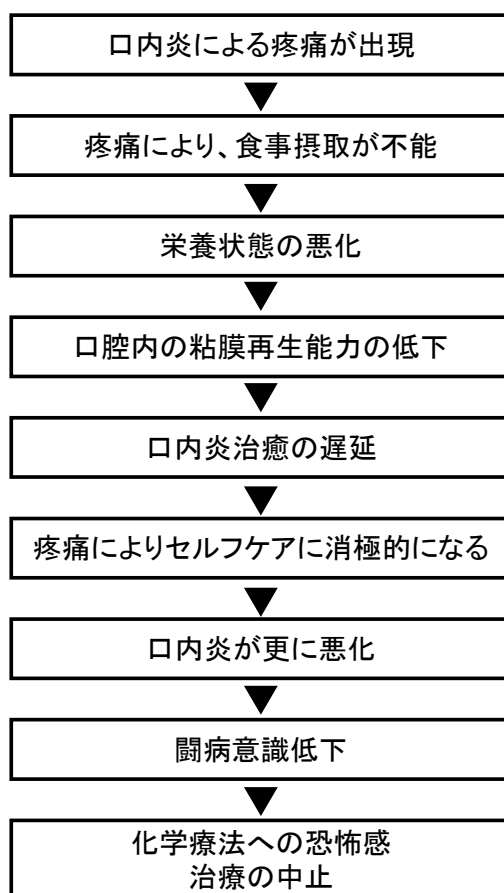


図 3. 口内炎による症状悪化スパイラル

表 2. CTCAE4.0 による副作用の重症度分類 [15]

有害事象	Grade 1	Grade 2	Grade 3	Grade 4	Grade 5
口腔粘膜炎	症状がない, または軽度の症状がある; 治療を要さない	中等度の疼痛; 経口摂取に支障がない; 食事の変更を要する	経 高度の疼痛; 経口摂取に支障がある	生命を脅かす; 緊急処置を要する	死亡
口腔知覚不全	軽度の不快感; 経口摂取に支障がない	中等度の疼痛; 経口摂取に支障がある	活動不能/動作不能の疼痛; 経管栄養またはTPNを要する	-	-
口腔内出血	軽症; 治療を要さない	中等度の症状がある; 内科的治療または小規模な焼灼術を要する	輸血/IVRによる処置/内視鏡的処置/待機的外科的処置を要する	生命を脅かす; 緊急処置を要する	死亡
口腔内痛	軽度の疼痛	中等度の疼痛; 身の回り以外の日常生活動作の制限	高度の疼痛; 身の回りの日常生活動作の制限	-	-
口内乾燥	症状があるが, 顕著な摂食習慣の変化がない (例: 口内乾燥や唾液の濃縮); 刺激のない状態での唾液分泌量が > 0.2 mL/min	中等度の症状がある; 経口摂取に影響がある (例: 多量の水, 潤滑剤, ピューレ状かつ/または軟らかく水分の多い食物に限られる); 刺激のない状態での唾液分泌量が 0.1-0.2 mL/min	十分な経口摂取が不可能; 経管栄養またはTPNを要する; 刺激のない状態での唾液分泌量が < 0.1 mL/min	-	-



図 4. 抗癌剤副作用口内炎の典型的な症例 [26]

左上：Grade 1、右上：Grade 2、左下：Grade 3、右下：Grade 4

1.3.3. 臨床における対策

現在、臨床においては予防・治療策として抗癌剤治療開始前に口腔内病巣の治療、プラークコントロール、ブラッシング指導、義歯の調整が、抗癌剤投与時にオーラルクライオセラピー（口腔内冷却療法）が、抗癌剤投与後の口内炎発生時に食事の工夫、含嗽剤の使用、粘膜保護剤・鎮痛剤・抗炎症薬・局所麻酔剤の投与、感染症治療が実施されているがいずれも口内炎を克服するには至っていない [17]。それゆえ、癌化学療法時に発生する口内炎に対する画期的治療法の開発は今後の癌治療をよりよいものとするためには避けられない課題であると言える。

1.4 抗癌治療中に発生する口内炎に関する研究の現状と課題

前述した通り、癌治療時に発生する口内炎治療法の開発は急務であるが、これまで多くの論文によって治療効果が示唆されている薬物が報告されているのにも関わらず、医薬品として開発されたもの、臨床において用いられているものは極僅かである。この背景として、再現性・客観性をもつモデル動物は作製法が少ない上、作製可能な機関が限られていることが大きな障壁となっていることが挙げられる [18]。新規治療薬及び治療法の探索・作用機序解明のためには臨床における症状を再現し、作製法に制約のないモデル動物の作出が不可欠である。

1.5 研究目的

本論文では、癌化学療法時に発生する口内炎治療を目的とした新規治療薬の開発を主目的とし、この目的を達成するために避けられない課題となる再現性・客観性のあるモデル動物の開発を行った（第2章）。また、既存の口内炎治療薬とは異なる作用機序を持つ GGsTop に着目し、これを第2章で作製したモデルを用いた治療効果を検討した（第3章）。最後に、第4章にて本研究の総括を述べる。

第 2 章

癌治療時に発生する口内炎を模倣したモデルマウスの作製

2.1. 緒言

抗癌剤副作用口内炎には一般的に発生する口内炎とは大きく異なる特徴が存在する。1 つ目は症状の持続期間が長い点である。抗癌剤副作用口内炎は発症から 2 週間から 3 週間ほど持続することが報告されている [12]。2 つ目は症状が口腔内全体に発症しうる点である [19,20]。3 つ目は 1 つ目の特徴である持続期間にも影響するが、口内炎を発症しつつも患者は免疫抑制下にある点である。

抗癌剤副作用口内炎を克服するため、これまで多くの研究者によってこれらの特徴を踏まえた抗癌剤副作用口内炎モデル動物の作製が行われてきた。抗癌剤の投与や抗癌剤の投与に加えて放射線照射や外傷（スクラッチや熱刺激）を与えることによって口内炎の作製が試みられているが、抗癌剤のみの投与では潰瘍が形成されず、抗癌剤投与と外傷の組み合わせで初めて潰瘍を形成するモデルが作られたものの、潰瘍の再現性が乏しく評価が困難であった [21-25]。抗癌剤と放射線照射の併用により再現性の良いモデルが得られているが、放射線照射を行うことのできる機関は限られており、モデル作製を行うことができる環境が少ないという欠点が存在する [18]。

どのモデルにおいても病変作製部位が舌部であることが多い。これは頬粘膜よりも舌部への操作の方が簡便であることに起因すると考えられる。しかし、舌部には表面に乳頭が存在し、内部には横紋筋である舌筋で占められており、頬粘膜とは組織の構造が非常に異なることから疾病モデルとして適切ではない。また、舌部への病変は見た目を観察し研究者の主観による評価を行うものが中心であり、定量的に症状を捉えることが難しいという欠点がある（図 5） [26]。

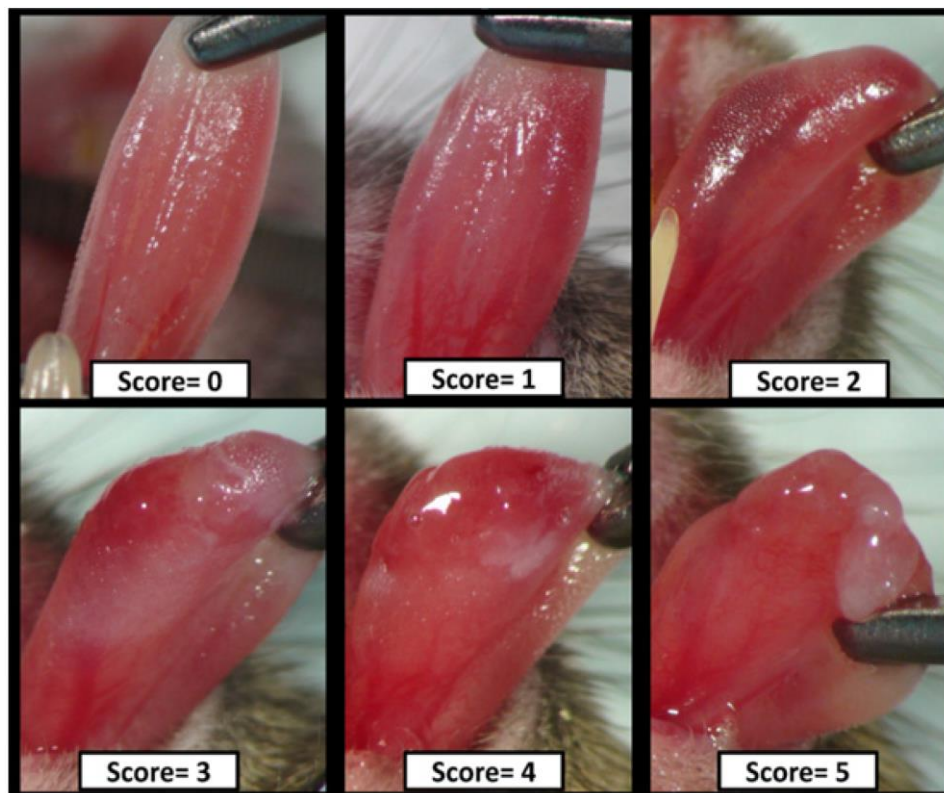


図 5. 舌部へ作製した病変に対するスコア評価 [26]

一方、頬粘膜に口腔内潰瘍を作製する抗癌剤副作用口内炎モデルでは主にハムスターを用いたものが報告されている [21]。ハムスターは頬袋を持ち、頬粘膜の露出が簡便であるため、モデル作製に適していることが理由として考えられる。しかし、ハムスターの頬粘膜の構造はヒトのそれとは大きく異なり、線維性の結合組織が層を形成し、血管が少なくリンパ管が豊富という特徴を持つ (図 6) [27,28]。この特徴を持つが故にハムスターを用いた口内炎モデルは不適であると考ええる。

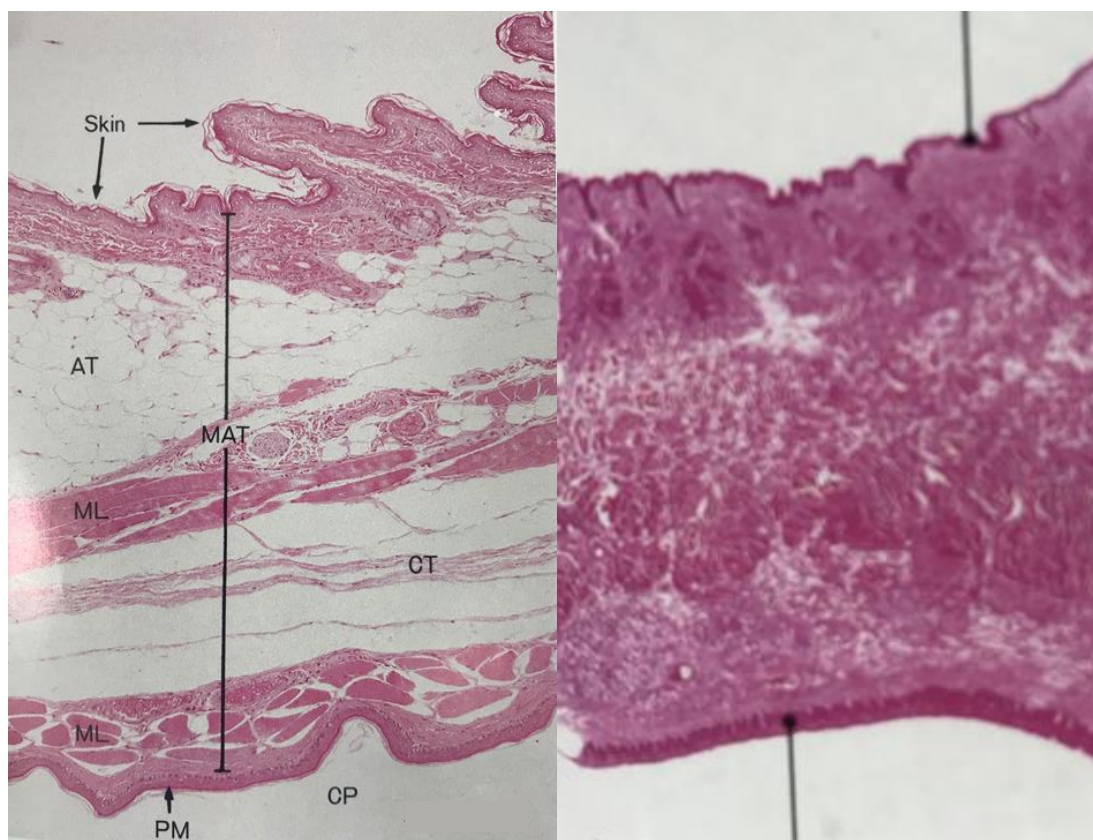


図 6. 頬粘膜組織構造 [27, 28]

左：ハムスター、右：ヒト、写真下側：粘膜上皮

我が研究室ではこれらの欠点を克服するために抗癌剤の投与と外傷の組み合わせで且つ再現性が良く、症状を定量的に評価できるような口腔内潰瘍を作製する手法を研究してきた。その結果、外傷を与える方法として酢酸が適していることが判明したが、当時の作製方法がモデルとして最適であるかどうかの検討はされていなかった。そこで、本章では抗癌剤副作用口内炎モデル作製の際に多く用いられてきた 5-フルオロウラシル (5-FU) の投与濃度、酢酸の投与量を変動させ、臨床における抗癌剤副作用口内炎を再現したモデルマウスの最適化を行った研究について述べる。

2.2. 実験材料・使用動物

2.2.1. 試薬

5-FU は和光純薬工業から購入したものを生理食塩水（大塚製薬株式会社）に 8 mg/mL となるように溶解させた。酢酸（純度 \geq 99.7%）は和光純薬工業から購入したものを純水（Milli Q, MILLIPORE）と混合し 20%溶液とした。動物用イソフルランはマイラン製薬から購入した。チュルク染色液はナカライテスクより購入した。既存の口内炎治療薬として、トリアムシノロンアセトニド（TA）製剤であるケナログ[®]をブリストル・マイヤーズスクイブ株式会社より購入した。パラホルムアルデヒドは和光純薬工業から購入し、60°C 条件下で PBS に溶解させ、1 N 水酸化ナトリウム水溶液（和光純薬工業）を用いて完全に溶解させた。室温になるまで冷却後、pH 6.9 となるように 1 N 塩酸（和光純薬工業）を加える操作を経て 8%溶液を調製し、これを PBS と等量混合することで 4%ホルマリン液として用いた。スクロース（和光純薬工業）は PBS に溶解させ 10%溶液とした。凍結組織切片作製の際に用いた包埋剤 SCEM-（L1）、封入剤 SCMM-（R2）は株式会社 SECTION-LAB から購入した。その他の試薬は特級品を用いた。

2.2.2. 器具

マウスを開口状態で仰向けに固定するための開口器を自作した（図 7）。50 μ L ガラスシリンジはハミルトン社製のものを使用した。凍結切片用包埋容器及び凍結切片支持用フィルム type II C は株式会社 SECTION-LAB から購入した。その他、チューブやシリンジなどの器具は滅菌済みのものを使用した。

2.2.3. 動物

9 週齢雄性 ICR マウス（30~40 g；三共ラボサービス株式会社より購入）を 4 匹ごとにケージに分け一週間飼育し、環境ストレスを可能な限り取り除いた上で実験に用いた。飼育条件は温度 $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ 、明期 8~20 時、暗期 20~8 時で行い、食餌制限は行わなかった。全ての動物実験は飼育を含めて東京理科大学薬学部動物舎にて行い、東京理科大学の動物実験指針に従い承認を得て行った。



図 7. マウス開口器

2.3. 実験方法

2.3.1. 5-FU 投与量の決定

マウスを 5 つの群に分け、day -5, -3, -1 において、5-FU をマウスに投与量が 0, 30, 40, 50, 60 mg/kg となるようにそれぞれ腹腔内投与した。day -5, -2, 0 における白血球数の測定により、最も適切な投与量を決定した。白血球数の測定はまず、マウス尾静脈血液 2 μL をチュルク染色液 38 μL にて希釈し、十分に混合した後に 10 μL 中の白血球数を血球計算盤にてカウントし、カウント数と以下式を用いて算出した。

(白血球数 [$\times 10^3$ cells/ μL])

$$= \frac{(\text{カウント数})}{4} \times 10^4 [\text{cells/mL}] \times \frac{1}{10^3} [\text{mL}/\mu\text{L}] \times \frac{20}{10^3}$$

2.3.2. 酢酸投与量の決定

マウスを4つ群に分け、5-FUを方法2.3.1.によって決定された投与量である50 mg/kgを2.3.1.と同様の投与スケジュールに沿って投与し、day 0においてイソフルランにて麻酔したマウス左頬粘膜に対し、20%酢酸を31 G注射針を用いて10, 15, 20 μ Lそれぞれ注射した（図8）。day 3, 5, 8, 11, 14, 16, 18, 20, 22, 25, 28にて、イソフルラン麻酔下で開口状態での写真を撮影し、潰瘍面積を画像解析ソフトimage Jを用いて算出した。また、2.3.1.と同様の方法により白血球数を測定した。

2.3.3. 5-FUの有無による口腔内潰瘍の比較検討

control群、5-FU 50 mg/kgを投与した群、酢酸15 μ Lを投与した群、5-FU 50 mg/kgと酢酸15 μ Lの両方を投与した群に分け、潰瘍面積、体重、白血球数を測定した。

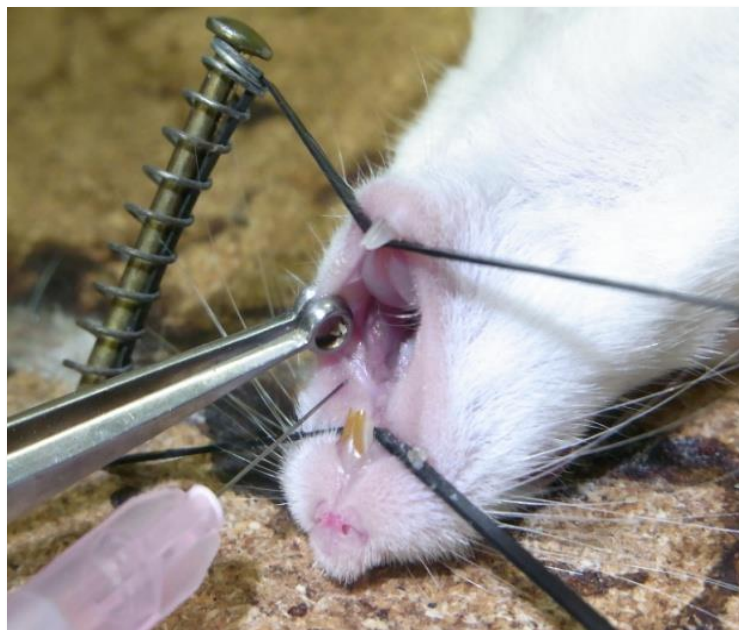


図8. 口腔粘膜への酢酸注射

2.3.4. 口腔粘膜組織切片を用いた組織学的評価

抗癌剤の投与、酢酸の投与による口腔粘膜への影響を組織学的に評価するために口腔粘膜組織切片の作製及びヘマトキシリンエオシン（HE）染色による形態観察を行った。

組織切片の作製において、まず、マウスをイソフルラン麻酔にて安楽死させた後、両側の頸動脈を鉗子にて止血した。胸部を切開し、心臓を曝露させた後、ペリスタポンプ、26G 注射針を用いて左心室から生理食塩水を 4 mL/min の流速で灌流し、ここで左頸動脈を切断することで脱血を行った。十分に脱血した後、4% パラホルムアルデヒド液を 2 mL/min の流速で 30 分灌流し、さらに同溶液中に 24 時間浸透させることにより頭部組織を固定した。

凍結組織切片の作製は川本法に基づいて行った [29]。ドライアイスを用いて n-ヘキサンを -80°C に冷却し、これによって頭部組織を凍結させた。予め -80°C に冷却しておいた包埋容器に包埋剤を注入し、頭部組織を包埋させた後に包埋剤を再度注入し、これを -80°C に冷却することで試料ブロックを作製した。これをクリオスタットにて組織を正面から垂直方向にスライスすることで凍結組織切片を得た。クリオスタットの刃はタングステン製のものを使用し、庫内 OT 温度を -30°C、CT 温度を -25°C に設定し、スライスの厚さは 4 μ m に設定した。

得られた組織切片に対し、HE 染色を行うことで 5-FU の投与および口内炎発症による粘膜組織の変化を観察した。HE 染色は、得られた組織切片に対し、カラッチヘマトキシリン溶液に 2 分 30 秒浸透後、純水で洗浄し、0.2% エオシン Y 溶液に 30 秒浸透させ、再度純水で洗浄し、十分に風乾させた後にキシレンを用いて封入し、紫外線照射によって固定するという手順によって行った。

2.3.5. 既存の口内炎治療薬を用いた治療効果検討

正常マウスおよび 5-FU 50 mg/kg と酢酸 15 μ L の投与によって作製したモデルマウスをケナログによって治療した。薬物投与スケジュールを以下に示す（図 9）。ケナログは軟膏剤であり、有効成分であるトリアムシノロンアセトニドが 15, 20, 25 μ mol となるように潰瘍部分に直接塗布投与した。投与は day 1 から一日一回行い、潰瘍が消失するまで行った。潰瘍面積、体重、白血球数を測定し、治療効果を評価した。

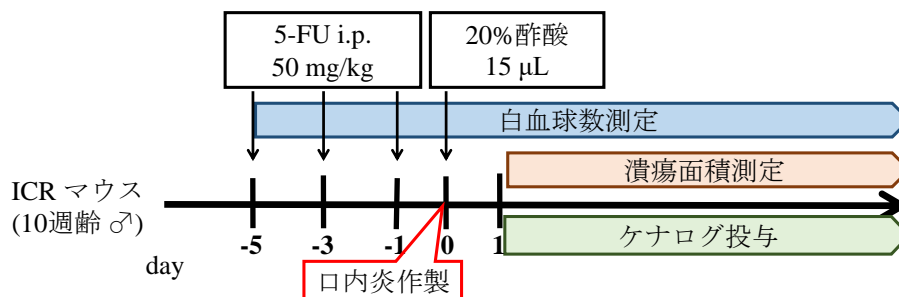


図 9. 抗癌剤副作用口内炎モデルマウスの作製及び治療スケジュール

2.4. 結果と考察

白血球数は 5-FU 投与量に対し、用量依存的に減少し、50 mg/kg 投与群において最も低い数値を示した (図 10)。また、5-FU 60 mg/kg を投与した群では生存率が悪く、本研究の趣旨に合わない判断した。5-FU は抗癌剤のうち代謝拮抗薬に分類され、癌細胞のような細胞分裂が盛んな細胞の DNA 合成を阻害することで薬効を発揮する [6]。そのため、正常細胞においても細胞分裂が活発に行われている細胞であれば同様の障害を受ける [5]。5-FU の代表的な副作用の 1 つである口内炎は骨髄抑制による免疫力の低下、口腔粘膜細胞への障害による粘膜防御機能の低下によって引き起こされることが報告されている [10, 11]。白血球数は炎症のマーカーとして重要であり、この結果から 5-FU の投与によってマウスに対して免疫抑制状態を誘発したと判断した。

潰瘍面積は酢酸投与量に応じて最大面積、持続期間の双方において増加し、10, 15, 20 μL 投与において最大面積がそれぞれ 10.20, 16.75, 21.75 mm^2 、自然治癒までの持続期間がおおよそ 11, 16, 28 日間であった (図 11)。最大面積をとるのは酢酸投与後 3~5 日目であり、その後 10, 15 μL 投与群においては、潰瘍は徐々に自然治癒したが、20 μL 投与群においては、組織の壊死が起こり、治癒が確認できない個体も観察された。白血球数は酢酸注射によって上昇したが潰瘍の消失とともに正常値へ回復した (図 12)。臨床において、抗癌剤副作用として発生する口内炎は発症後 2~3 週間持続することが報告されている [12]。また、一般的に生じる口内炎と比較して広範囲に生じることも報告されている [13]。これらの条件を最も再現していることから、酢酸の投与量は 15 μL が適正であるという結果を得た (図 13)。

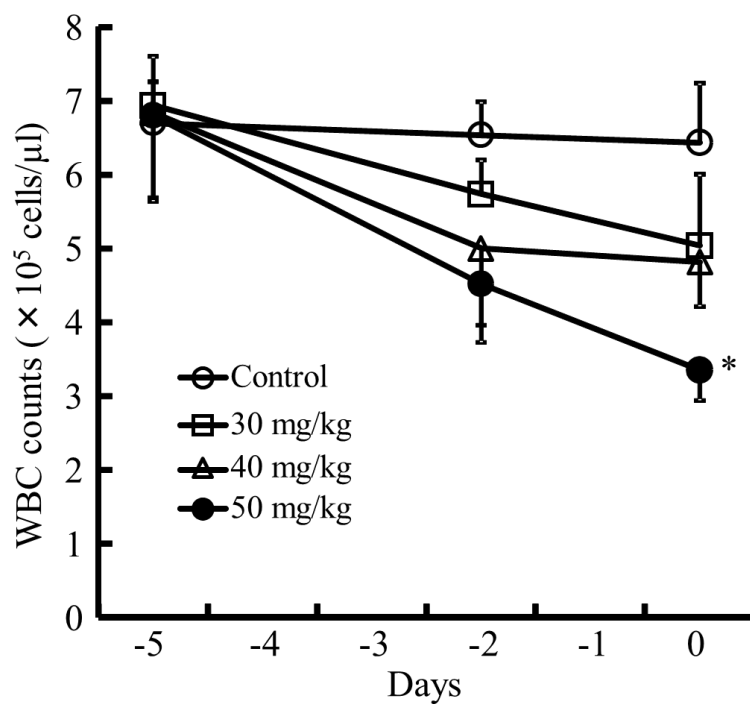


図 10. 5-FU 投与量による白血球数推移

(mean±SD, Dunnet-test, compared with Control group, * p<0.05)

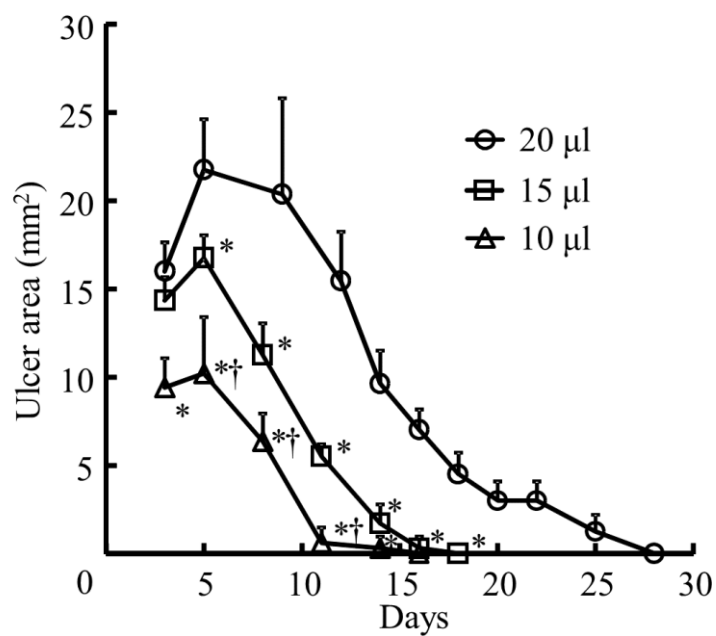


図 11. 酢酸投与量による潰瘍面積推移

(mean±SD, Tukey-test, * p<0.05 compared with 20 μL group, † p<0.05 compared with 15 μL group)

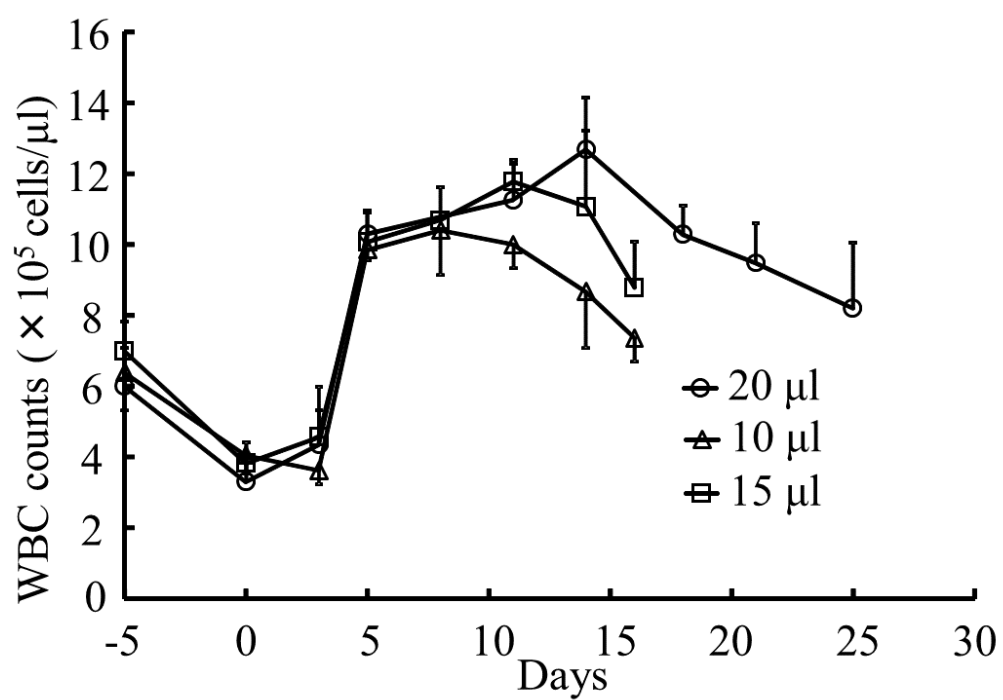


図 12. 酢酸投与時の白血球数推移

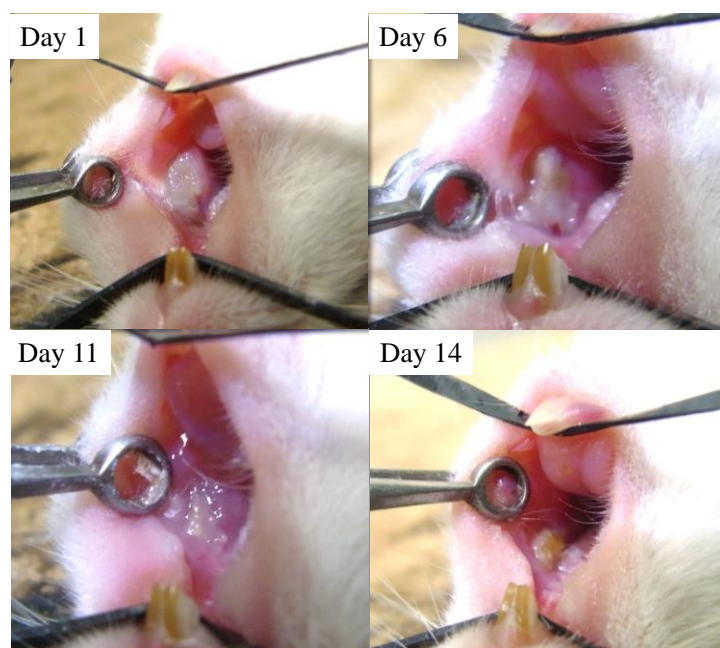


図 13. 作製した口内炎の外観

5-FU と酢酸の両方を投与した群では、酢酸のみを投与した群と比較して、口内炎症状を悪化させることが確認された。酢酸のみの投与では最大面積が 11.25 mm²、自然治癒までの持続期間が 12 日間であったのに対し、5-FU を更に投与することで最大面積が 16 mm²、自然治癒までの持続期間が 16 日間となった（図 14）。体重の推移からも 5-FU と酢酸の併用により症状が重篤化したことが示された（図 15）。5-FU の有無により潰瘍の最大面積、自然治癒までの期間に差が生じたのは、免疫抑制状態であるため創傷治癒過程初期における炎症反応が抑制されてしまったためであると考えられる。

口腔粘膜組織の観察により 5-FU の投与により単球様細胞の消失、酢酸の投与により粘膜上皮の状態悪化を確認した（図 16）。5-FU と酢酸を併用することで単球様細胞の消失及び粘膜上皮の破壊の両方の効果を確認できたことから、これらの作用は互いに独立して生じており、前述した 5-FU の前投与により酢酸注射時に生じる潰瘍の重症化が起こる原因として単球様細胞の消失が示唆された。

ケナログの塗布投与により、作製したモデルマウスの持つ潰瘍の最大面積、治癒までの持続期間ともに用量依存的に減少した。特に、ケナログ 25 µmol 投与群では、治癒までの持続期間を無治療群と比較して 4 日短縮させるだけでなく、day 5 における潰瘍面積のピークを抑えていた（図 17）。また、体重もケナログの投与によって改善された（図 18）。一方、TA 製剤の塗布投与によって白血球数は減少が確認され、この値は無治療群の自然治癒時の白血球数と比べて大きく下回るものになった（図 19）。ケナログの有効成分である TA はステロイドであり、免疫抑制下での使用は推奨されていないため、抗癌剤副作用発生時に治療薬として用いることは推奨されていない [10]。本研究において作製したモデルマウスに対してもステロイドを始めとした免疫抑制を作用機序とする治療薬の使用は危険であることを示した。

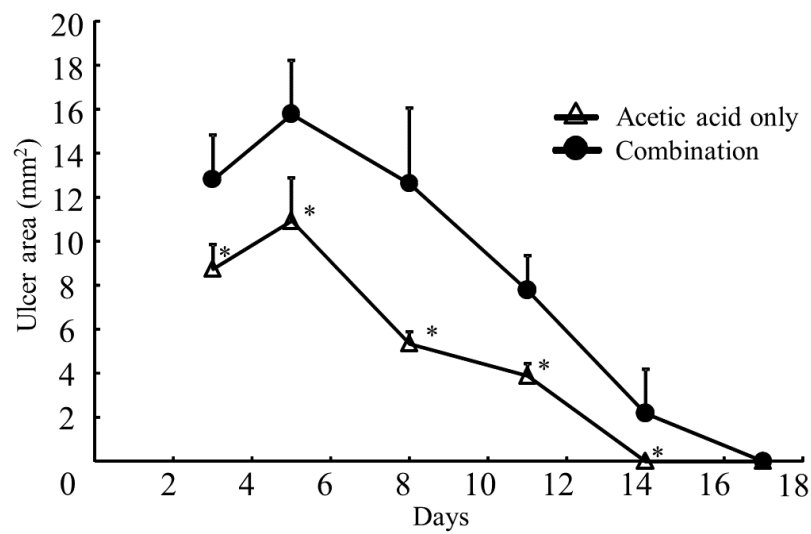


図 14. 5-FU 有無による潰瘍面積の変化

(mean±SD, t-test, * p<0.05)

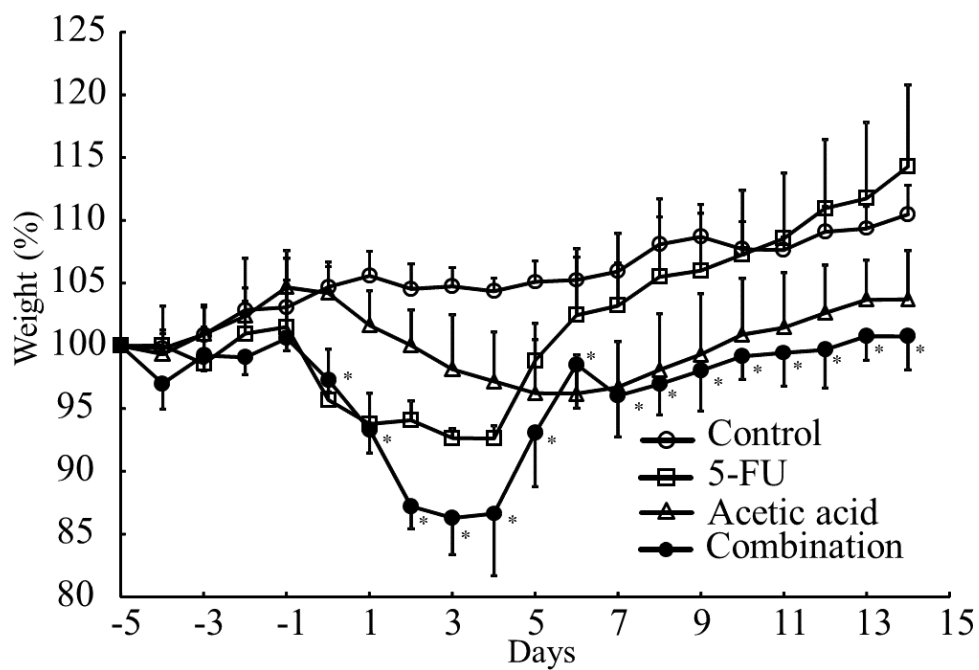


図 15. 5-FU 有無による体重変化

(mean±SD, Dunnet-test, compared with Control, * p<0.05)

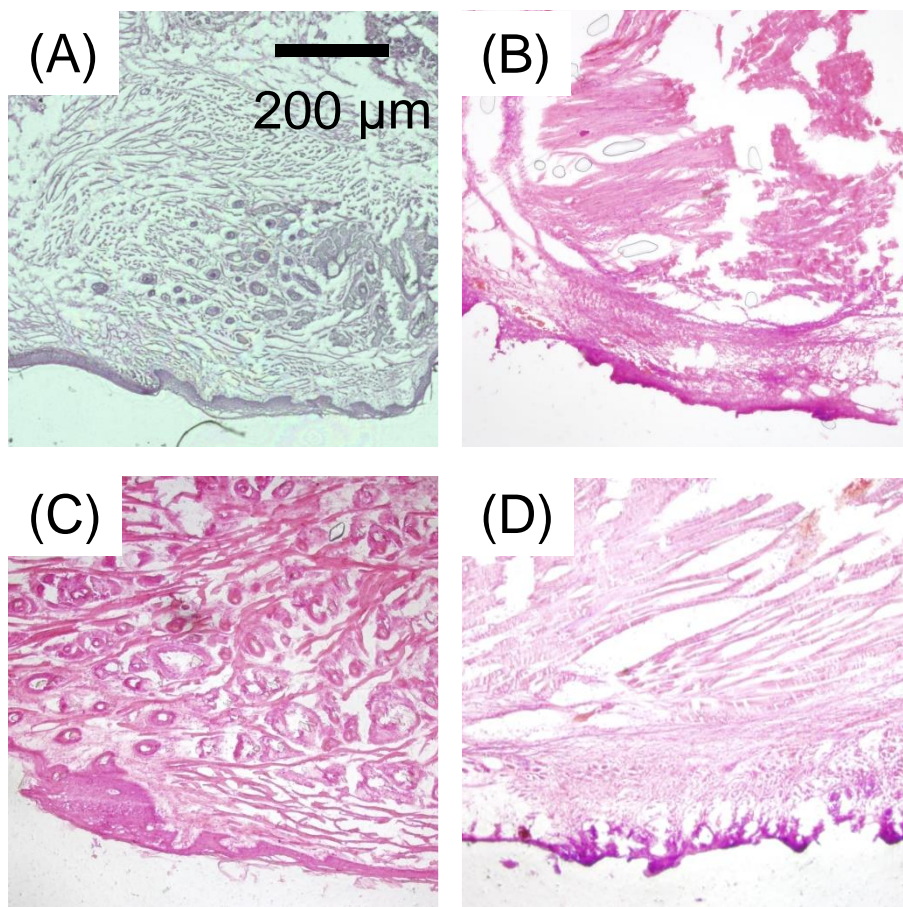


図 16. 5-FU 及び酢酸注射時の口腔粘膜組織 (HE 染色)

(A) 正常マウス、(B) 5-FU 単独投与 (day 2)、
(C) 酢酸単独投与 (day 2)、(D) 5-FU+酢酸投与 (day 15).

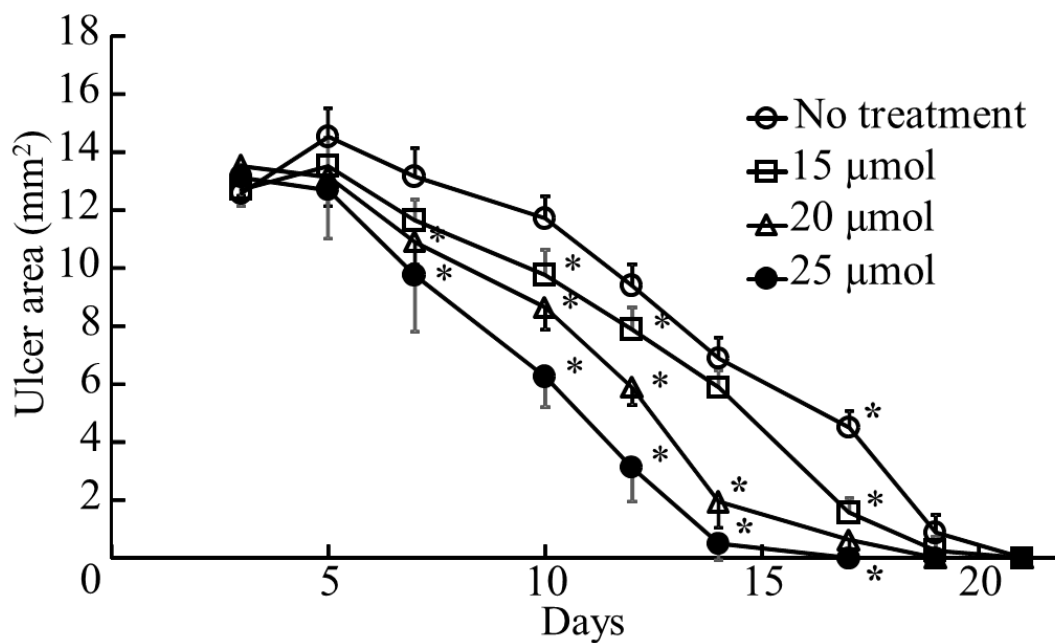


図 17. ケナログ投与時の潰瘍面積推移

(mean±SD, Dunnet-test, compared with No treatment group, * p<0.05)

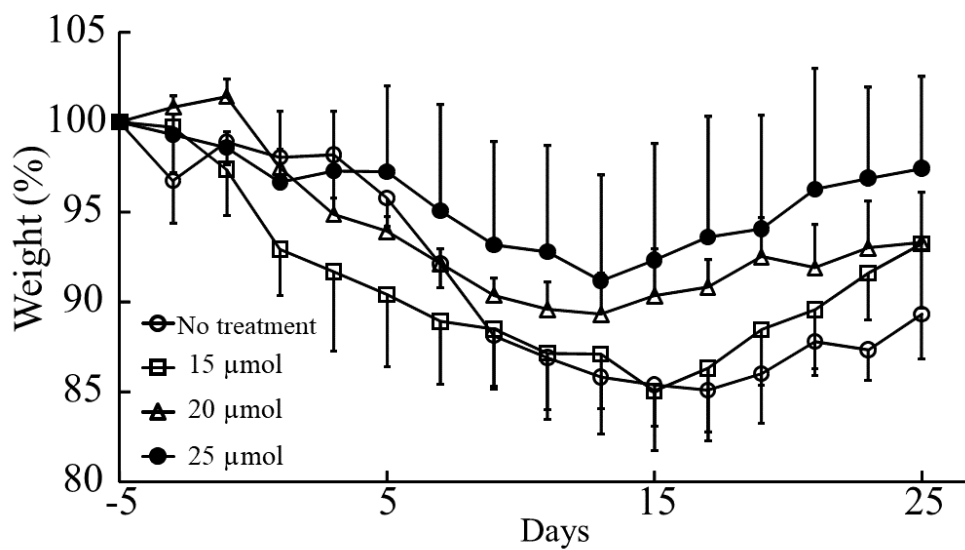


図 18. ケナログ投与時の体重変化

(mean±SD)

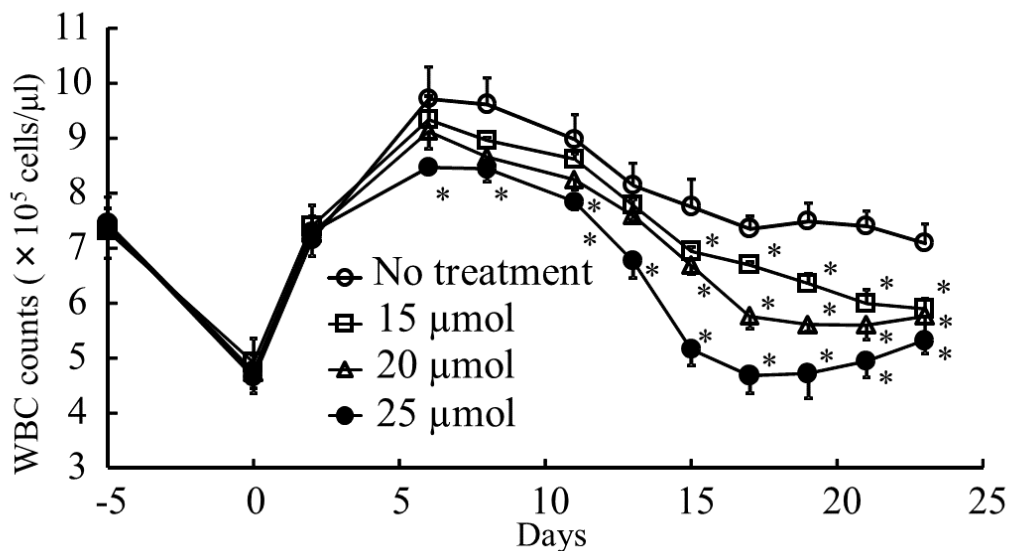


図 19. ケナログ投与時の白血球数推移

(mean±SD, Dunnet-test, compared with No treatment group, * p<0.05)

2.5. 結論

癌化学療法において発生する口内炎は、発症から治癒までの期間が長い、広範囲に炎症が起こる、炎症が起こっているのにも関わらず免疫抑制状態であるという特徴を持つ。これらの特徴を踏まえ、且つ再現性が良く、客観的な評価を行うことが可能な疾病モデル動物の開発は抗癌剤・放射線併用による方法でしか行われてこなかった。そこで、本章では汎用性の高い動物であるマウスに対し、抗癌剤と酢酸を投与することで抗癌剤副作用口内炎の特徴を再現し、客観的評価が可能な新規疾病モデルの作製を試みた。

本章において作製した抗癌剤副作用口内炎モデルマウスはこれまで作製されてきたモデルとは異なり、目視ではっきりと認識できる潰瘍を生じる。本モデルでの主な評価項目は潰瘍面積及び治療期間、体重、白血球数の3つである。潰瘍面積及び潰瘍の持続期間が一樣であるため、薬物による治療効果を比較することが簡便であり、体重からもマウスの健康状態を推測することが可能である。白血球数の推移によってモデルの炎症状態が反映される。これらの評価系によっ

て本モデルは薬物の治療効果だけでなく抗癌剤との併用可否を検討することができる。

トリアムシノロンアセトニド製剤であるケナログが用量依存的に治療効果を示したことから、本章で作製した口内炎様潰瘍は既存の口内炎治療薬で治療することが可能であることが示された。また、トリアムシノロンアセトニドによる免疫抑制効果を白血球数の測定により確認した。これらの結果が本研究の目的である、抗癌剤副作用口内炎に対して抗癌剤と併用可能且つ治療効果を持つ新規治療薬することが期待される。

第3章

新規 GGT 阻害剤 GGsTop を用いた口内炎モデルマウスに対する治療効果検討

3.1. 緒言

γ -グルタミルトランスぺプチダーゼ(GGT)は γ -グルタミルトランスフェラーゼとも呼ばれ、分子量約 40,000 の大サブユニットと分子量約 20,000 の小サブユニットが非共有結合的に結合したヘテロ二量体酵素である [30]。細菌から哺乳類まで生物に広く見られる GGT は、活性中心を細胞の外側に向けた状態で細胞の表面に局在している膜結合型酵素の一種であり、高度に糖鎖修飾されている [31]。臨床的には薬物や過度のアルコール摂取によって肝臓での GGT 発現及び血中への漏出が顕著に起こるため、アルコール依存症や肝疾患のマーカー酵素として健康診断に汎用されている [32]。GGT はグルタチオン (GSH) の γ -グルタミル結合(イソペプチド結合)を加水分解するほぼ唯一の酵素で、Glu と Cys-Gly を生成する一方、各種アミノ酸やジペプチド、アミン類を受容体 X として γ -グルタミル転移生成物 (γ -Glu-X) を与える (図 20, 21) [33, 34]。

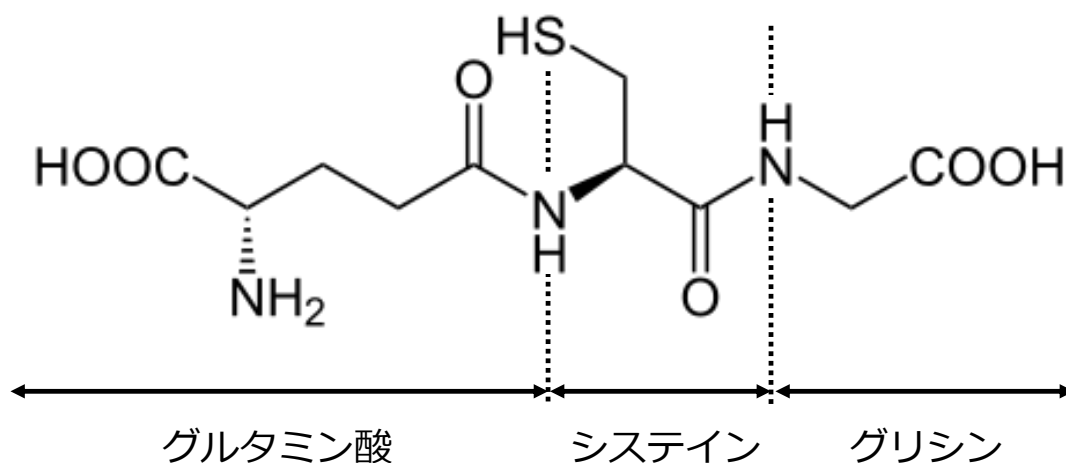


図 20. GSH 構造

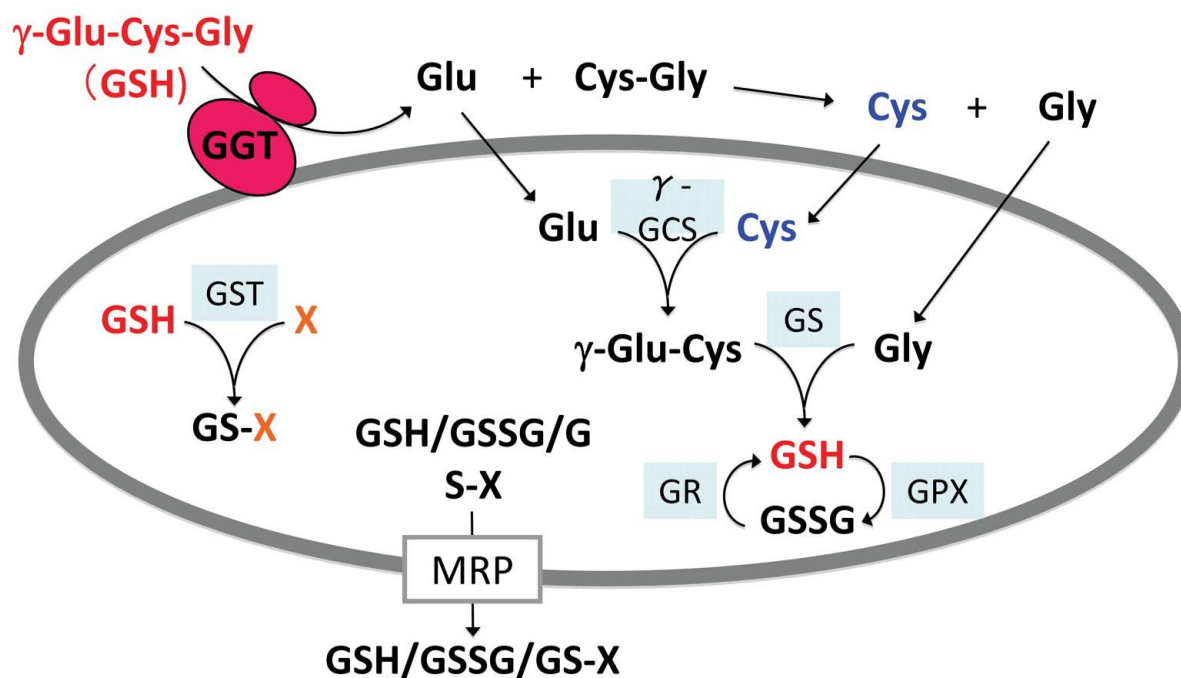


図 21. GGT の GSH 分解機構 [34]

GGT の基質特異性は広く、様々な構造の GSH 抱合体や γ グルタミルアミドに作用すること、加水分解だけでなく、多くの受容体への γ グルタミル転移活性があることから転移酵素として分類されている。GGT は細胞の GSH 生合成に必要な Cys を供給すること、GSH を介した生体異物の解毒代謝の初期段階を担うことにより、生体のレドックスバランスや酸化ストレスに影響を与えている [35-37]。また、このことから酸化ストレスを引き金とした多くの疾患に関与していると考えられており、GGT に関連した医学論文は非常に多く報告されている。例えば、アテローム性動脈硬化症や心筋梗塞、狭心症などの心血疾患に関する疫学調査では GGT 活性の上昇が危険因子であることが報告されている [38]。また、癌細胞では GGT を高発現するものが多く、抗癌剤や放射線療法に対する耐性獲得や転移活性に GGT が関係していること [39] や、炎症メディエーターであるロイコトリエン C4 (LTC₄) から LTD₄ への変換を GGT が触媒しており、グルタチオン代謝との関連から喘息との関係も報告されている [40]。

GGT は細胞外 GSH から細胞内へ Cys を供給することから実質的に細胞内の GSH 生合成を促進する抗酸化酵素と考えられる。しかし、一方で副産物である Cys-Gly は非常に高い反応性をもつチオール化合物であり、生理的条件下で Fe³⁺

を Fe^{2+} に酸化する過程で酸素を還元し活性酸素種 (ROS) を生成する [41, 42]。このため、GGT 活性の増大はかえって酸化ストレスを亢進させる原因となっている。これに対して、GGT を阻害することが ROS の抑制、コラーゲン、エラスチンの産生を誘導することが報告されている [43]。

抗癌剤副作用口内炎はこれまで述べたように、ROS の産生における組織破壊が主な原因である。そこで ROS の抑制に働き、且つ、粘膜組織の基礎となるコラーゲン、エラスチンの産生誘導を起こす GGT 阻害は新たな口内炎治療薬になるのではないかと考えた。

これまでに GGT 阻害剤として、アシビシン[(αS , $5S$) - α -amino-3-chloro-4, 5-dihydro-5-isoxazoleacetic acid] が広く使用されている (図 22) [42]。アシビシンは 1970 年代から GGT 阻害剤として用いられ始めた化合物だが、阻害作用が不可逆的であること、安価で入手が容易であることから現在でも最もよく使用されている [43]。しかし、アシビシンは元々、*Streptomyces sviveus* の産生する抗生物質としてグルタミンアミドドランスフェラーゼ類に広く作用し、これらの酵素の活性中心である Cys のチオール基と共有結合を作り、酵素を不可逆的に失活させる [44-46]。そのため、多くのグルタミン依存性の酵素を阻害し、プリン、ピリミジン塩基や、アミノ酸、アミノ酸生合成を阻害し、結果として強い細胞毒性、中枢神経毒性を示す。これらの作用から、GGT はアシビシン本来の標的酵素ではなく、偶然阻害されてしまっていると考えられている [47, 48]。アシビシンはその毒性のため本研究においては用いることができないと結論した。

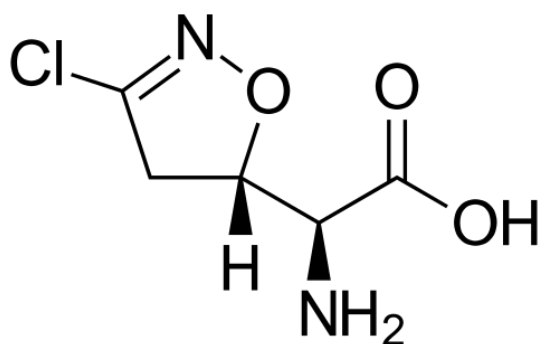


図 22. アシビシン構造式

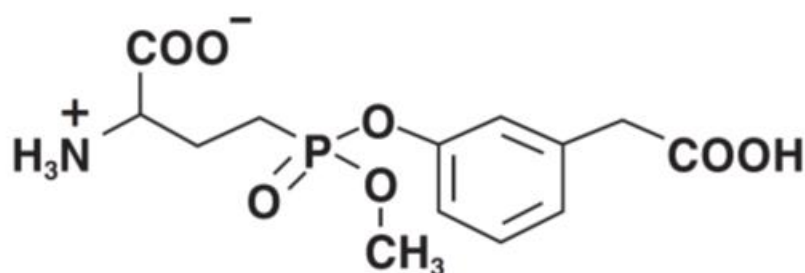


図 23. GGSTop 構造式

GGSTop [2-amino-4-([3-(carboxymethyl)phenyl](methyl)phosphono)butanoic acid] は新たに開発された GGT 阻害剤である (図 23) [49, 50]。単純な構造で水溶性が高く、脱離能が低いため化学的に安定であるのにも関わらずその GGT 阻害活性はアシビシンの 100 倍以上である [49, 50]。一方、アシビシンの問題点とされていたグルタミンアミドトランスフェラーゼに対する阻害活性が全く見られないという特徴を持つ [49, 50]。更に、GGSTop は高濃度においても毒性を示さず、微生物を用いた変異原性試験においても陰性であったことが報告されている [51]。また、GGSTop は前述した GGT 阻害によって報告されていた ROS の抑制、皮膚におけるコラーゲン、エラスチン合成の誘導の他、熱ショックタンパク質 47 の発現誘導、角化細胞誘導の作用が報告されている [52, 53]。

本章ではこの GGSTop に着目し、第 2 章で作製した抗癌剤副作用口内炎モデルマウスに対する治療効果検討を行った結果について述べる。

3.2. 実験材料

GGSTop はナールスコーポレーション株式会社より提供を受けた。GGSTop 原末 50 mg を純水 4.950 mL に溶解させ 1% (w/w) 溶液とした。また、これを希釈することで 0.5% (w/w) 溶液を得た。これらの濃度はマウスへ投与した際の GGSTop 量がそれぞれ 1.0、0.5 μmol になるようにしたものである。更に、塗布投与用として GGSTop 原末 33.1 mg に対し、乳糖 (和光純薬工業より購入) 966.9 mg と混合し、モデルマウスへ投与した際の GGSTop 量が 1.0 μmol となるように

賦形を行った。抗癌剤副作用口内炎モデルマウスの作製、評価及び口腔粘膜組織切片の作製および染色に用いた試薬、器具に関しては第 2 章で用いたものと同じものを用いた。また、コラーゲン染色に用いた Collagen stain kit はコラーゲン研修会社製のものを購入した。

3.3. 実験方法

3.3.1. GGsTop 投与による治療効果検討

第 2 章と同様の手順で抗癌剤副作用口内炎モデルマウスを作製した。酢酸投与の翌日から、1 日 1 回 p100 マイクロピペットを用いて 0.5% (w/w) 及び 1% (w/w) GGsTop 溶液 33.3 μ L を潰瘍部位に 1 回滴下投与した。これによる GGsTop 投与量それぞれ 0.5、1.0 μ mol である。この処置は潰瘍の治癒が終わるまで行った。潰瘍面積、白血球数、体重測定は第 2 章と同様に行った。

3.3.2. 口腔粘膜組織切片を用いた組織学的評価

口腔粘膜組織切片は、control 群、GGsTop 粉末で治療した口内炎発症群、PBS で処置した口内炎発症群を用いて作製した。凍結組織切片の作製法は第 2 章と同様である。得られた組織切片を、HE 染色およびコラーゲン染色により粘膜組織の変化を観察した。コラーゲン染色キットはコラーゲタンパクと非コラーゲタンパクをそれぞれ赤色、緑色に染色するものであり、得られたサンプルに対し染色液 200 μ L を滴下し 30 分後に純水で洗浄し、封入を行った。

3.4. 結果と考察

GGsTop の投与は、用量依存的に最大潰瘍面積および処置期間を短縮した (図 24, 25)。体重も GGsTop の投与によって改善された (図 26)。白血球数は正常値を維持していた (図 27)。HE 染色を行った口腔粘膜組織切片の結果も、GGsTop 投与が無処置群と比較して早期回復を促進することが確認された (図 28)。これらの結果より、GGsTop が口内炎に対する治療効果を有するだけでなく、抗癌剤と組み合わせて使用できることが示された。5-FU などの抗癌剤は免疫抑制作用を引き起こすため、口内炎治療用の抗炎症薬は組み合わせて使用すること推奨されていない。しかし、GGsTop は免疫抑制作用を有していないため、抗癌剤の副作用として口内炎に対する有効な新規治療薬であると考えられる。

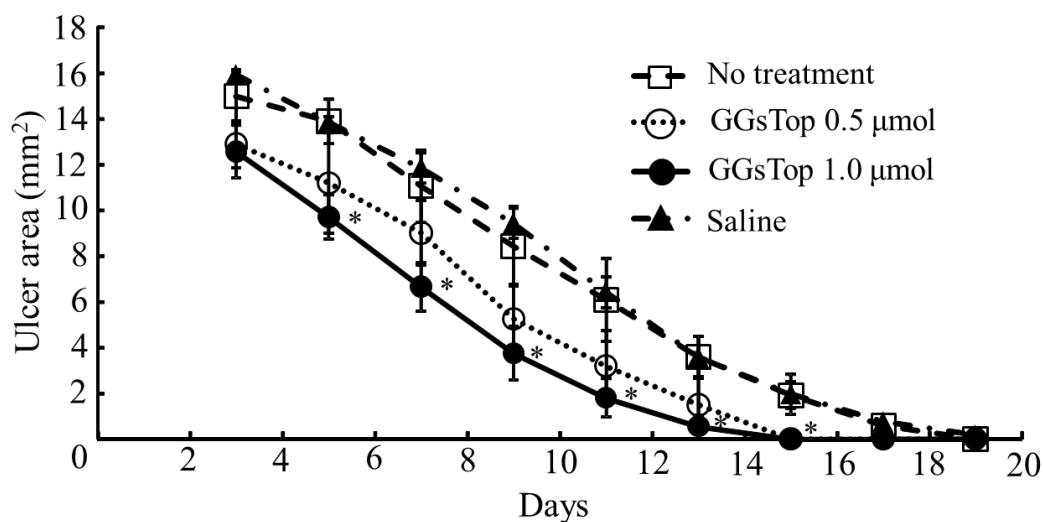


図 24. GGsTop 投与による潰瘍面積推移

(mean±SD, Dunnet-test, compared with No treatment group, * p<0.05)

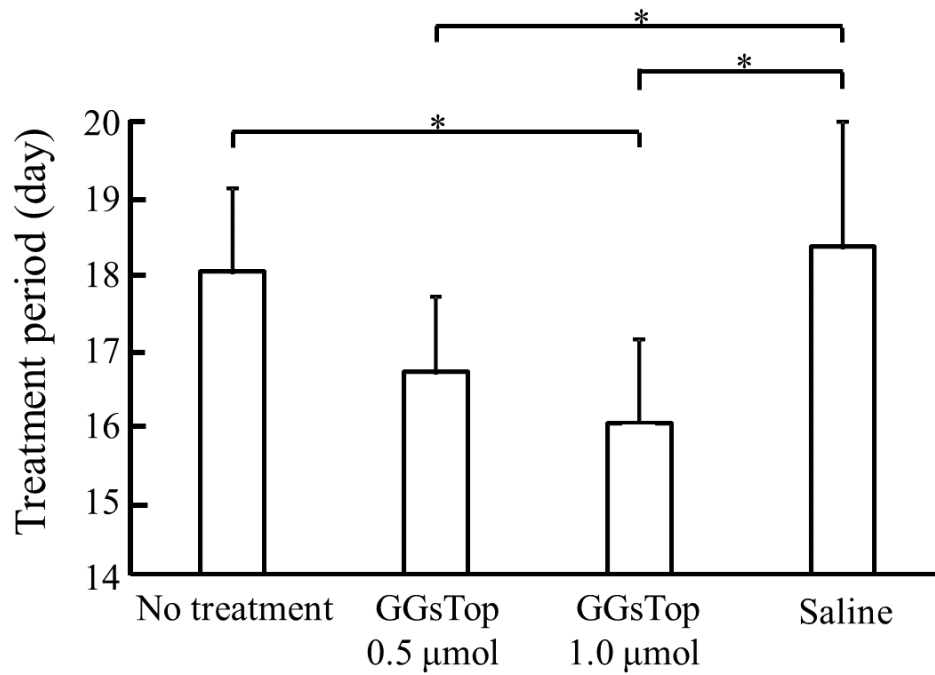


図 25. GGsTop 投与による治療期間

(mean±SD, Tukey-test, * p<0.05)

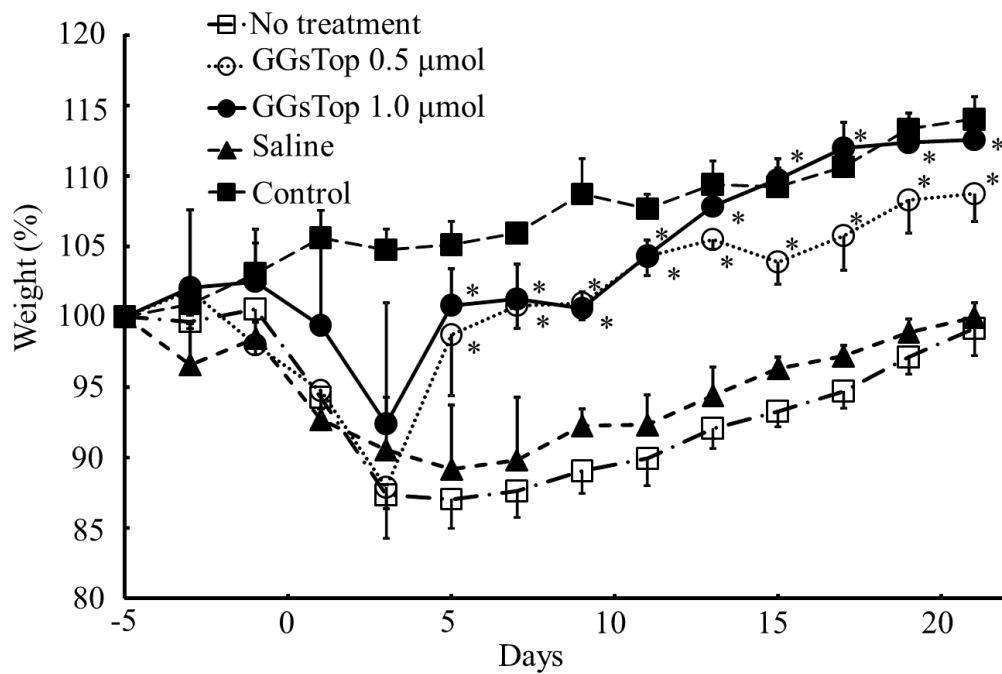


図 26. GGsTop 投与による体重変化

(mean±SD, Dunnet-test, compared with No treatment group, * p<0.05)

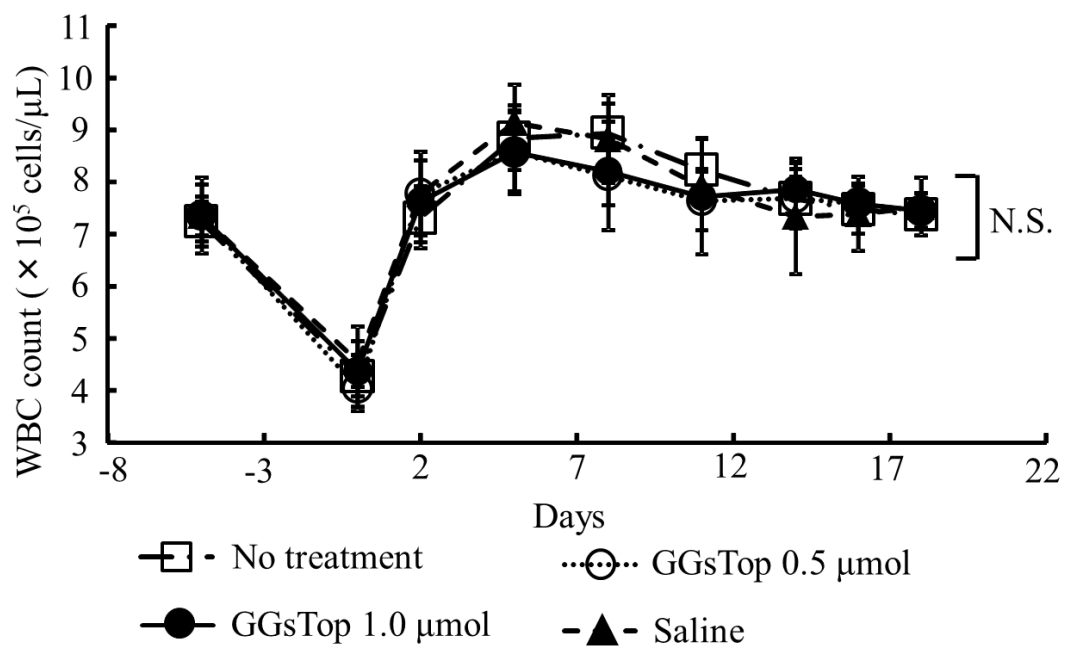


図 27. GGsTop 投与による白血球数推移

(mean \pm SD, Dunnet-test)

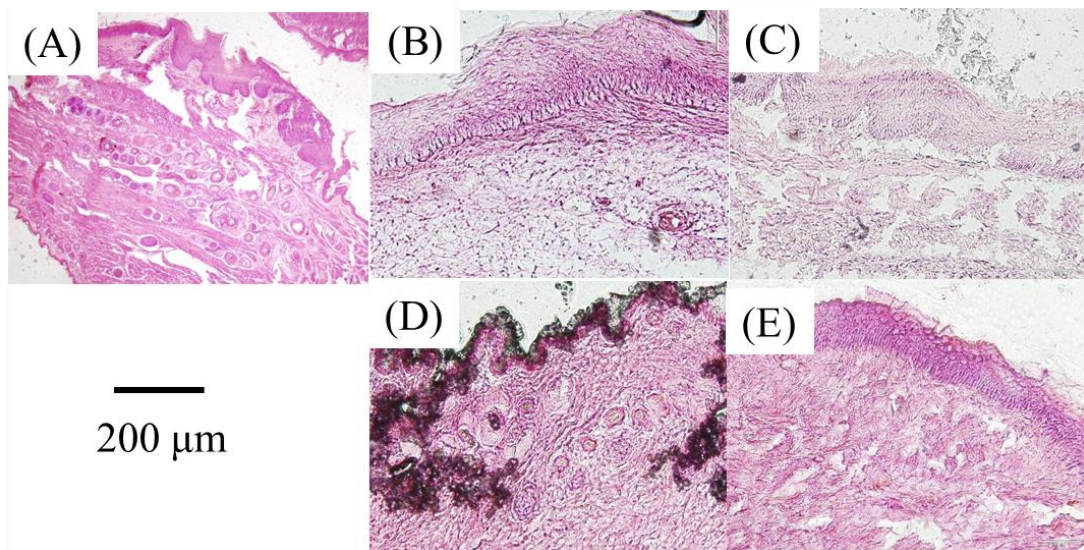


図 28. GGsTop 投与時の口腔粘膜組織（HE 染色）

(A) 正常マウス、(B) 口内炎モデル無治療群 (day 3)、
 (C) 口内炎モデル無治療群 (day 15)、(D) 口内炎モデル GGsTop 1.0 μmol 投与群 (day 3)、
 (E) 口内炎モデル GGsTop 1.0 μmol 投与群 (day 15).

GGsTop は選択的 GGT 阻害剤であるとともに化学的に安定で無毒である。GGsTop は、GGT 阻害を介して皮膚のコラーゲン、エラスチン、熱ショックタンパク質 47、およびグルタチオンの産生を促進すること、抗酸化物質である GSH の生成、表皮ケラチノサイト遊走、皮膚バリア機能の改善、保湿を促進することが報告されている [52, 53]。これらの作用の中で潰瘍治癒に最も影響を与えると考えられるコラーゲン産生が GGsTop によって促進されるかを検討したところ、GGsTop の投与により口腔粘膜におけるコラーゲン産生が促進されることが確認された (図 29)。コラーゲンは、粘膜を構成する主成分の 1 つである。コラーゲンの産生が促進されるにつれて、炎症により損傷を受けた粘膜は迅速に修復されたと考えられる。本研究では粘膜修復と最も密接に関連しているコラーゲン産生を調べたが、GGsTop による抗酸化作用に関する報告は多数あり、GGsTop が炎症中にのみグルタチオンの量を増加させることによって酸化ストレスを減少させ、喘息の発症を抑制したことや、GGT 活性および ROS 産生を阻害することにより、虚血/再灌流誘発性腎障害を予防したことが報告されている [54, 55]。これらの報告から、抗酸化活性による炎症の粘膜保護が本研究での抗癌剤副作用口内炎モデルにも適用されるであろうと推定する。

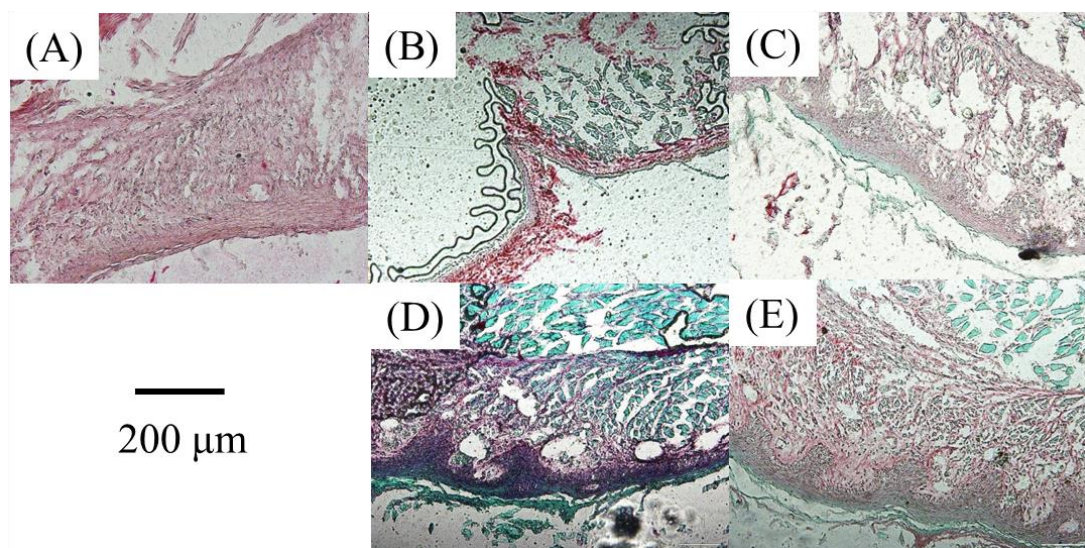


図 29. GGsTop 投与時の口腔粘膜におけるコラーゲン分布

(A) 正常マウス、(B) 口内炎モデル無治療群 (day 3)、
 (C) 口内炎モデル無治療群 (day 15)、(D) 口内炎モデル GGsTop 1.0 μmol 投与群 (day 3)、
 (E) 口内炎モデル GGsTop 1.0 μmol 投与群 (day 15).

赤色: コラーゲタンパク、緑色: 非コラーゲタンパク

また、GGsTop の治療効果の結果は、ケナログを用いた治療効果と同等であった（図 30）。しかし、ケナログではステロイド性抗炎症作用により白血球数の過度な低下が引き起こされたのに対し、GGsTop は正常に白血球数を維持した（図 31）。この結果からも、GGsTop が口内炎の新規治療薬に充分なり得ることが示唆されている。

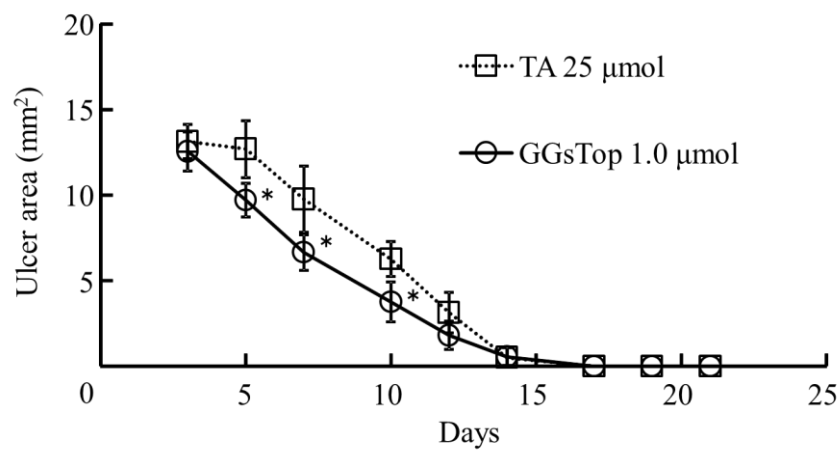


図 30. TA 製剤と GGsTop における潰瘍面積推移の比較

(mean±SD, T-test, * p<0.05)

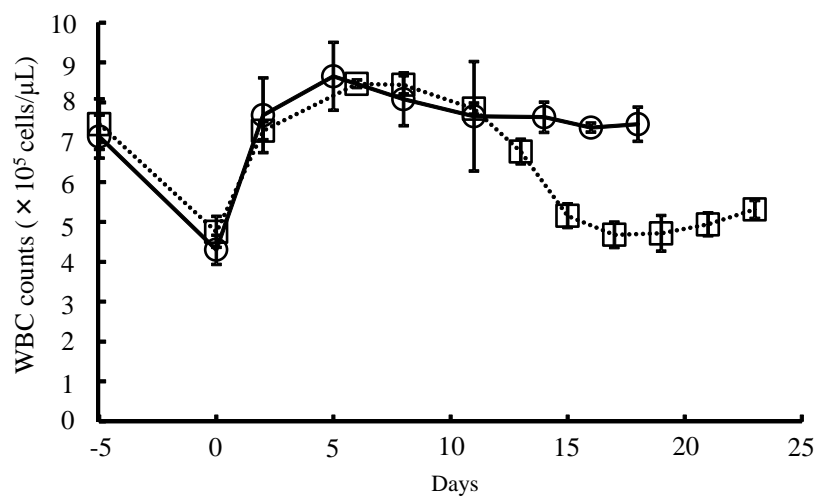


図 31. TA 製剤と GGsTop における潰瘍面積推移の比較

3.5. 結論

GGsTop は、潰瘍面積の推移から口内炎に対する治療効果を持つこと、白血球数推移から抗癌剤との併用投与が可能なことが示された。

また、口腔粘膜組織切片を HE 染色した結果から GGsTop は組織の回復を早めること、コラーゲン染色の結果からコラーゲン合成の誘導を促進することが示された。これらの結果と他の論文の報告から GGsTop は GGT 阻害を通じて口内炎治療効果を発現していることが示唆された。しかし、GGT 阻害による抗酸化物質 GSH の誘導を通じた ROS の抑制、エラスチン合成誘導、熱ショックタンパク質 47 の発現促進など、口内炎治療効果に関連すると考えられる作用機序の全ては明らかにできていない。今後の研究にて更に詳細な検討が必要である。

一方、GGsTop は以前の口内炎治療薬であるケナログと同等の治療効果を示した。対して、白血球数については過剰な抑制を起こさなかった。したがって、GGsTop は抗癌剤副作用口内炎の治療薬として非常に有用であることが示唆された。

第4章

総括

癌化学療法時に発生する口内炎は抗癌剤が直接口腔粘膜細胞に傷害を与える一次作用と、抗癌剤による免疫抑制を介した細菌・ウイルスへの感染によって炎症が起こる二次作用により、一般に生じる口内炎と比較して持続期間が長い、広範囲に発生する、といった特徴を持つ。しかし、既存の口内炎治療薬の使用を始めとした、現在行われている治療では口内炎を克服することはできていない。患者の QOL 低下や投薬中止を回避するために、新規口内炎治療薬を開発することは急務である。一方、上記の特徴を持つ口内炎を再現したモデル動物は作製法が少なく、その中でも最も再現性のよい手法は放射線を用いるものであり、作製可能な機関に限られるという欠点があった。

これらの背景を踏まえ、本研究ではまず始めに、5-FU と酢酸をマウスに投与することによって新規疾病モデルを開発した。このモデルは、病変である口腔内潰瘍を目視で定量的に評価することが可能であり、動物種として汎用性が高いマウスを用いていること、操作に特殊な器具・装置を用いないことにより、利便性・経済性に長けている。本モデルは抗癌剤副作用口内炎に対する新規治療薬の探索に非常に有益であると筆者は考える。

次に、本研究では先述した疾病モデルを用いて、近年開発された GGT 阻害薬である GGsTop が、抗癌剤副作用口内炎に対する新規治療薬として有用であることを示した。GGsTop は化学的に安定且つ無毒性であり、その GGT 阻害活性は従来用いられてきた GGT 阻害薬であるアシビシンの 100 倍以上である。また、GGsTop は ROS の抑制、皮膚線維芽細胞におけるコラーゲン、エラスチンの誘導が報告されている。本研究ではコラーゲン誘導に焦点を当て実際に口腔粘膜においてコラーゲン誘導が促進されていることを確認した。今後は、口内炎治癒に関わる、コラーゲン誘導以外の作用機序を解明する必要がある。

謝辞

本研究は新潟薬科大学 寺田 弘 教授、ならびに東京理科大学薬学部 牧野 公子 教授のもと行った研究の成果であります。研究室配属時から6年、研究に対するものの考え方から精神面まで御指導、御鞭撻を賜りました両教授に心より感謝の意を表します。また、研究室という組織として活動していく上で御助言を頂いた竹内 一成 助教、技術的な御指導、御討論をして頂いた廣田 慶司 博士、中嶋 武尚 先生、田中 大之氏、日頃から特に精神面での支えになって頂いた島田 洋輔 博士、田中 華子氏、田中 菜穂子氏、試薬を提供して頂いた株式会社ナールスコーポレーションの皆様にご感謝申し上げます。

最後に、多くの御助言、御協力を頂き、各々の研究分野に囚われず切磋琢磨に議論を行ってくれた旧薬効物理化学研究室内の皆様、薬品物理化学研究室内の皆さんに心より感謝致します。

平成31年 2月20日

島村 洋祐

参考文献

- [1] 佐々木常雄、岡本るみ子、新がん化学療法ベスト・プラクティス、照林社（2008）
- [2] Gilman A. The initial clinical trial of nitrogen mustard. *Am J Surg.* May;105:574-8. (1963)
- [3] Ciardiello F, Tortora G. EGFR antagonists in cancer treatment. *N Engl J Med.* Mar 13;358(11):1160-74. (2008)
- [4] Dancey JE, Chen HX. Strategies for optimizing combinations of molecularly targeted anticancer agents. *Nat Rev Drug Discov.* Aug;5(8):649-59. (2006)
- [5] Lalla RV, Sonis ST, Peterson DE. Peterson. Management of oral mucositis in patients with cancer. *Dent Clin North Am* 52(1): 61–77,viii (2008)
- [6] Matsumoto K, Katsumata N, Yamanaka Y, Yonemori K, Kohno T, Shimizu C, Andoh M, Fujiwara Y. The safety and efficacy of the weekly dosing of irinotecan for platinum- and taxanes-resistant epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* Feb;100(2):412-6. (2006)
- [7] Lu W, Matulonis UA, Doherty-Gilman A, Lee H, Dean-Clower E, Rosulek A, Gibson C, Goodman A, Davis RB, Buring JE, Wayne PM, Rosenthal DS, Penson RT. Acupuncture for chemotherapy-induced neutropenia in patients with gynecologic malignancies: a pilot randomized, sham-controlled clinical trial. *J Altern Complement Med.* Jul;15(7):745-53. (2009)
- [8] Panahi Y, Ala S, Saeedi M, Okhovatian A, Bazzaz N, Naghizadeh MM. Allopurinol mouth rinse for prophylaxis of fluorouracil-induced mucositis. *Eur J Cancer Care* 19(3):308-312 (2010)
- [9] Rubenstein EB, Peterson DE, Schubert M, Keefe D, McGuire D, Epstein J, Elting LS, Fox PC, Cooksley C, Sonis ST. Clinical practice guidelines for the prevention and treatment of cancer therapy-induced oral and gastrointestinal mucositis. *Cancer* 100(9):2026-2046, (2004)
- [10] 福岡正博、ワシントンがん治療マニュアル、メディカルサイエンスインターナショナル（2010）
- [11] Rajesh V. Lalla, Stephen T. Sonis, and Douglas E. Peterson. Management of

Oral Mucositis in Patients with Cancer. Dent Clin North Am. January; 52(1): 61–viii. (2008)

- [12] Lauritano D, Petruzzi M, Stasio D, Lucchese A. Clinicaleffectiveness of palifermin in prevention and treatment of oral mucositis in children with acutelymphoblasticleukaemia: a case-controlstudy. Int J Oral Sci. (2013)
- [13] Javadzadeh Bolouri A, Pakfetrat A, Tonkaboni A, Aledavood SA, Fathi Najafi M, Delavarian Z, Shakeri MT, Mohtashami A. Preventing and Therapeutic Effect of Propolis in Radiotherapy Induced Mucositis of Head and Neck Cancers: A Triple-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Trial. Iran J Cancer Prev 8(5): e4019 (2015)
- [14] Hurria A, Browner IS, Cohen HJ, Denlinger CS, deShazo M, Extermann M, Ganti AK, Holland JC, Holmes HM, Karlekar MB, Keating NL, McKoy J, Medeiros BC, Mrozek E, O'Connor T, Petersdorf SH, Rugo HS, Silliman RA, Tew WP, Walter LC, Weir AB 3rd, Wildes T. Senior adult oncology: Clinical practice guidelines in oncology. J Natl Compr Canc Netw 10(2): 162–209 (2012)
- [15] International Journal of Clinical Oncology Vol.9 SuppIII:1-82 (2004)
- [16] 厚生労働省、重篤副作用疾患別対応マニュアル (2009)
- [17] Lalla RV, Bowen J, Barasch A, Elting L, Epstein J, Keefe DM, McGuire DB, Migliorati C, Nicolatou-Galitis O, Peterson DE, Raber-Durlacher JE, Sonis ST, Elad S. MASCC/ISOO clinical practice guidelines for the management of mucositis secondary to cancer therapy. Cancer 120(10):1453-1461 (2014)
- [18] 金井正光、臨床検査法堤要 (改訂第 33 版)、金原出版 (2010)
- [19] Bian L, Han G, Zhao CW, Garl PJ, Wang XJ. The role of Smad7 in oral mucositis. Protein Cell 6(3): 160–169 (2015)
- [20] Scully C, Sonis S, and Diz PD: Oral mucositis. Oral Dis 12: 229-41, (2006)
- [21] Chaveli-López B: Oral toxicity produced by chemotherapy: A systematic review. J Clin Exp Dent 6: e81-90 (2014)
- [22] Yoshino F, Yoshida A, Nakajima A, Wada-Takahashi S, Takahashi SS, and Lee MC: Alteration of the redox state with reactive oxygen species for 5-

- fluorouracil-induced oral mucositis in hamsters. PLoS One 8(12): e82834 (2013)
- [23] Koohi-Hosseiniabadi O, Andisheh-Tadbir A, Bahadori P, Sepehrimanesh M, Mardani M, and Tanideh N: Comparison of the therapeutic effects of the dietary and topical forms of Zizyphus jujuba extract on oral mucositis induced by 5-fluorouracil: A golden hamster model. J Clin Exp Dent 7(2): e304-9 (2015)
- [24] Cotrim AP, Yoshikawa M, Sunshine AN, Zheng C, Sowers AL, Thetford AD, Cook JA, Mitchell JB, and Baum BJ: Pharmacological protection from radiation \pm cisplatin-induced oral mucositis. Int J Radiat Oncol Biol Phys 83: 1284-1290, (2012)
- [25] de Araújo AA, Varela H, de Medeiros CA, et al. Azilsartan reduced TNF- α and IL-1 β levels, increased IL-10 levels and upregulated VEGF, FGF, KGF, and TGF- α in an oral mucositis model. PLoS One 10(2): e0116799. (2015)
- [26] Chen P, Mancini M, Sonis ST, Fernandez-Martinez J, Liu J, Cohen EE, Toback FG. A Novel Peptide for Simultaneously Enhanced Treatment of Head and Neck Cancer and Mitigation of Oral Mucositis. PLoS One. 2016 Apr 6; 11(4): e0152995. (2016)
- [27] 伊東信行、カラーアトラス実験動物組織学、ソフトサイエンス社 (1986)
- [28] 岩永敏彦、木村俊介、小林純子、新編カラーアトラス組織・細胞学、医歯薬出版 (2017)
- [29] Kawamoto T. Use of a new adhesive film for the preparation of multi-purpose fresh-frozen sections from hard tissues, whole-animals, insects and plants. Arch Histol Cytol 66(2):123-43 (2003)
- [30] Taniguchi N, Ikeda Y. gamma-Glutamyl transpeptidase: catalytic mechanism and gene expression. Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol. 72: 239-78. (1998)
- [31] Tate SS, Meister A. gamma-Glutamyl transpeptidase from kidney. Methods Enzymol. 113: 400-19. (1985)
- [32] Whitfield JB. Gamma glutamyl transferase. Crit Rev Clin Lab Sci 38(4):263–355, (2001)

- [33] Perry IJ, Wannamethee SG, Shaper AG. Prospective study of serum gamma-glutamyltransferase and risk of NIDDM. *Diabetes Care* 21(5):732-737, (1998)
- [34] Hanigan MH. Gamma-glutamyl transpeptidase: redox regulation and drug resistance. *Adv Cancer Res* 122:103-141, (2014)
- [35] Pompella A, Corti A, Paolicchi A, Giommarelli C, Zunino F. γ -glutamyltransferase, redox regulation and cancer drug resistance. *Curr Opin Pharmacol* 7(4):360–366, (2007)
- [36] Zhang H, Forman HJ. Redox regulation of γ -glutamyl transpeptidase. *Am J Respir Cell Mol Biol* 41(5):509-515, (2009)
- [37] Lee DH, Jacobs DR Jr. Is serum gamma-glutamyltransferase a marker of exposure to various environmental pollutants? *Free Radic Res* 43(6):533–537, (2009)
- [38] Ruttmann E, Brant LJ, Concin H, Diem G, Rapp K, Ulmer H; Vorarlberg Health Monitoring and Promotion Program Study Group. Gamma-glutamyltransferase as a risk factor for cardiovascular disease mortality: an epidemiological investigation in a cohort of 163,944 Austrian adults. *Circulation*. Oct 4;112(14):2130-7 (2005)
- [39] Pompella A, De Tata V, Paolicchi A, Zunino F. Expression of gamma-glutamyltransferase in cancer cells and its significance in drug resistance. *Biochem Pharmacol*. Jan 12;71(3):231-8. (2006)
- [40] Mayatepek E, Okun JG, Meissner T, Assmann B, Hammond J, Zschocke J, Lehmann WD. Synthesis and metabolism of leukotrienes in gamma-glutamyl transpeptidase deficiency. *J Lipid Res*. May;45(5):900-4. (2004)
- [41] Dominici S, Paolicchi A, Corti A, Maellaro E, and Pompella A. Prooxidant reactions promoted by soluble and cell-bound gamma-glutamyltransferase activity. *Methods Enzymol* 401:484-501, (2005)
- [42] Dominici S, Paolicchi A, Lorenzini E, Maellaro E, Comporti M, Pieri L, Minotti G, Pompella A. gamma-Glutamyltransferase-dependent prooxidant reactions: a factor in multiple processes. *Biofactors* 17(1-4):187-198, (2003)
- [43] Sverdrup FM, Yates MP, Vickery LE, Klover JA, Song LR, Anglin CP, Misko

- TP. Protein geranylgeranylation controls collagenase expression in steoarthritic cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 18(7):948-955, (2010)
- [44] Tamura K, Hayashi N, George J, Toshikuni N, Arisawa T, Hiratake J, Tsuchishima M, Tsutsumi M. GGsTop, a novel and specific γ -glutamyl transpeptidase inhibitor, protects hepatic ischemia-reperfusion injury in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 311(2):G305-312, (2016)
- [45] Chittur SV, Klem TJ, Shafer CM, Davisson VJ. Mechanism for acivicin inactivation of triad glutamine amidotransferases. *Biochemistry*. Jan 30;40(4):876-87. (2001)
- [46] Hidalgo M, Rodriguez G, Kuhn JG, Brown T, Weiss G, MacGovren JP, Von Hoff DD, Rowinsky EK. A Phase I and pharmacological study of the glutamine antagonist acivicin with the amino acid solution aminosyn in patients with advanced solid malignancies. *Clin.Cancer Res* 4(11): 2763–2770, (1998)
- [47] Joyce-Brady M, Hiratake,J. Inhibiting glutathione metabolism in lung lining fluid as a strategy to augment antioxidant defense. *Curr Enzym Inhib* 7(2):71–78, (2011)
- [48] Earhart RH, Neil GL. Acivicin in 1985. *Adv Enzyme Regul* 24:179–205, (1985)
- [49] Han L, Hiratake J, Kamiyama A, Sakata K. Design, synthesis, and evaluation of gamma-phosphono diester analogues of glutamate as highly potent inhibitors and active site probes of gamma-glutamyl transpeptidase. *Biochemistry* 46(5):1432–1447, (2007)
- [50] Han L, Hiratake J, Tachi N, Suzuki H, Kumagai H, Sakata K. Gamma-(monophenyl)phosphono glutamate analogues as mechanism-based inhibitors of gamma-glutamyl transpeptidase. *Bioorg.Med Chem* 14(17):6043–6054, (2006)
- [51] Kamiyama A, Nakajima M, Han L, Wada K, Mizutani M, Tabuchi Y, Kojima-Yuasa A, Matsui-Yuasa I, Suzuki H, Fukuyama K, Watanabe B, Hiratake J. Phosphonate-based irreversible inhibitors of human γ -glutamyl transpeptidase (GGT). GGsTop is a non-toxic and highly selective inhibitor with critical

- electrostatic interaction with an active-site residue Lys562 for enhanced inhibitory activity. *Bioorg Med Chem*. Nov 1;24(21):5340-5352. (2016)
- [52] Kojima-Yuasa A, Hayashi R, Han L, Watanabe B, Hiratake J, Matsui-Yuasa I. A γ -glutamyl transpeptidase (GGT) inhibitor enhances collagen and elastin synthesis. *J Jpn Cosmet Sci Soc* 36(2):93–100, (2012)
- [53] Watanabe B, Morikita T, Tabuchi R, Kobayashi R, Li C, Yamamoto M, Koeduka T, Hiratake J. An improved synthesis of the potent and selective γ -glutamyl transpeptidase inhibitor GGsTop together with an inhibitory activity evaluation of its potential hydrolysis products. *Tetrahedron Lett* 58:3700–3703, (2017)
- [54] Tuzova M, Jean JC, Hughey RP, Brown LA, Cruikshank WW, Hiratake J, Joyce-Brady M. Inhibiting lung lining fluid glutathione metabolism with GGsTop as a novel treatment for asthma. *Front Pharmacol* 5:179, (2014)
- [55] Yamamoto S, Watanabe B, Hiratake J, Tanaka R, Ohkita M, Matsumura Y. Preventive effect of GGsTop, a novel and selective γ -glutamyl transpeptidase inhibitor, on ischemia/reperfusion-induced renal injury in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 339(3):945-951, (2011)

論文目録

主論文を構成する論文

1. A Mouse Model for Oral Mucositis Induced by Cancer Chemotherapy

(抗癌剤副作用口内炎モデルマウスの作製)

YOSUKE SHIMAMURA, ISSEI TAKEUCHI, HIROSHI TERADA and KIMIKO
MAKINO

Anticancer Research, Vol. 38, No. 1, pp. 307-312 (2018 年 1 月)

DOI: 10.21873/anticanres.12223

2. Therapeutic Effect of GGsTop, Selective Gamma-glutamyl Transpeptidase Inhibitor, on a Mouse Model of 5-Fluorouracil-induced Oral Mucositis

(抗癌剤副作用口内炎モデルマウスに対する選択的 GGT 阻害剤 GGsTop の治
療効果検討)

YOSUKE SHIMAMURA, ISSEI TAKEUCHI, HIROSHI TERADA and KIMIKO
MAKINO

Anticancer Research, Vol. 39, No. 1, pp. 201-206 (2019 年 1 月)

DOI: 10.21873/anticanres.13098

参考論文

なし