

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 22 日現在

機関番号：32206

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08459

研究課題名(和文) 抗がん剤漏出による皮膚傷害機構の解明と治療法及び予防法の確立

研究課題名(英文) Elucidation of skin injury mechanism due to leakage of anticancer drug and establishment of treatment and prevention methods

研究代表者

浅野 哲 (Asano, Satoshi)

国際医療福祉大学・薬学部・教授

研究者番号：70568063

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：起壊死性抗がん剤が血管外漏出した際の急性の細胞傷害には、脂質過酸化による酸化ストレスの関与が示唆された。また、細胞骨格の破綻にチューブリンの機能障害が関与する可能性が示唆された。

微小管機能阻害性抗がん剤による細胞傷害性は、傷害が激しい場合には冷罨法が有効なことが示唆された。漏出した抗がん剤濃度が低い場合には温罨法処置も有効で、熱感受性タンパク質が誘導され、上皮系細胞を保護することが示唆された。また、細胞傷害によりIL-6の放出を促し炎症を誘発するが、ステロイド剤そのものにも臨床用量の濃度では傷害性があり、投与量に注意が必要である(臨床用投与量の100～10万倍希釈が適切)ことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

培養細胞を用いて分子レベルでの細胞傷害性機序の研究に関しては、通常用いる37℃による培養方法のみならず、冷罨法、温罨法に対応した23℃、41℃での培養法も確立しており、臨床で発生する傷害やケアの条件と質的に同じデータに基づく薬学研究であることも独創的な点である。本研究で得られた実証データは、確かなエビデンスに基づく皮膚傷害の予防と臨床でのケア・治療方法の創出に有用であり新規性の高い研究であると考えられる。臨床で認められる抗がん剤投与による有害事象(漏れ・血管炎・硬結)を実験的に再現し、実証研究と臨床研究を融合した本研究により臨床現場に有用な知見が得られ、がん患者のQOL向上に寄与すると考える。

研究成果の概要(英文)：The involvement of oxidative stress by lipid peroxidation was suggested to be involved in the acute cell injury when the vesicant anticancer drug was extravasated. In addition, it was suggested that tubulin dysfunction may be involved in the disruption of the cytoskeleton.

It was suggested that the cold compress is effective for the cytotoxicity of anti-microtubule function-inhibiting anti-cancer agents when the injury is severe. It was suggested that when the concentration of leaked anti-cancer drug is low, warming treatment is also effective and that heat-shock protein is induced to protect epithelial cells. In addition, although cytotoxicity promotes the release of IL-6 and induces inflammation, steroids themselves are also toxic at clinical dose concentrations, and the dose should be carefully monitored (the clinical dose of 100-1000 μg is suggested that 10,000-fold dilution is appropriate).

研究分野：医療系薬学

キーワード：起壊死性抗がん剤 罨法 酸化ストレス 細胞骨格 ヒートショックプロテイン 微小管阻害薬 チューブリン ステロイド剤

1. 研究開始当初の背景

現在の我が国におけるがん化学療法に用いられる抗悪性腫瘍薬はめざましい進歩を遂げている。がん化学療法の真のエンドポイントは、ただ腫瘍を縮小及び根治にまで進めるだけでなく、患者のQOLを良好に保ち、予想される副作用を軽減することである。しかしながら、臨床においては抗がん剤による血管外漏出による皮膚傷害は無視できない有害事象となっている。そのため、皮膚傷害を生じた患者は、がんという強い不安や副作用の他に、新たな傷害による苦痛に耐えながら治療を行わなくてはならない状況に陥る。起壊死性抗がん剤の漏出時の対応は様々で、多くの場合は患部を冷やすのがよいとされているが、ビンカアルカロイドの場合は逆に加温する温電法(40前後)がよいとされている。我々の研究では、研究開始当初までに以下のことを明らかにしている。微小管機能阻害薬を培養細胞に曝露した場合、脂質過酸化により生じるマロンジアルデヒドの細胞内濃度が顕著に増加したことにより、起壊死性抗がん剤が血管外漏出した際の急性の細胞傷害には、脂質過酸化による酸化的ストレスが関与する。ビンカアルカロイド系抗がん剤のビノレルピン(VNR)では、細胞内チューブリンの重合阻害が曝露初期より認められ、細胞骨格の破綻にチューブリンの機能障害が関与する可能性が示唆された。タキサン系抗がん剤に含まれる添加剤(ヒマシ油、界面活性剤、等)が抗がん剤曝露初期(曝露後8時間まで)の細胞毒性に大きく関与している。さらに、主薬の細胞毒性発現には酸化ストレスに加えて、それ以外の毒性メカニズムも存在する可能性が示唆された。冷電法および温電法に相当する条件として、23、41における培養系を確立し、抗がん剤曝露実験を行った結果、タキサン系およびビンカアルカロイド(VNR)による細胞傷害性は、組織傷害が激しい場合には冷電法が、傷害が軽度の場合には冷電法に加えて温電法も有効なことが示唆された。起壊死性抗がん剤による酸化的ストレス並びに細胞内微小管の重合阻害による細胞傷害は、23の実験条件下で抑制されるため、傷害発生後直ちに冷電法を行うことにより、組織の壊死を抑制できると考えられた。また、微小管機能阻害薬の血管外漏出がIL-6(傷害等の刺激を受けることにより産生されるサイトカイン)の放出を促し、ヒトの皮膚組織における初期の炎症反応の進行に関与する可能性が示唆された。起壊死性抗がん剤であるビノレルピン(VNR)の血管外漏出による皮膚傷害の治療に副腎皮質ホルモン剤の皮下投与や塗布が用いられているが、単に副腎皮質ホルモン剤の抗炎症効果を期待して実施されているものであり、その治療効果についてはまだ確立したものとは言えない。しかも、副腎皮質ホルモン剤の皮下注射用製剤は存在せず、静脈注射用の製剤を適切な投与量の検討を行うことなくそのまま若しくは僅かに希釈した濃度で傷害部位に皮下投与しているのが実態である。その投与方法の設定に明確な根拠は無く、投与により却って傷害を悪化させた報告もある。

今までの経験の中で継承的にケアを実施され、このことが原因で医療不信や治療に対する不安感の増大など、がん治療において致命的な事態を招く危険性をはらんでいた。しかし、上記の研究で血管外漏出による皮膚傷害を引き起こすメカニズムについて、いくつかの要因が病態学的に検証され、科学的根拠の裏付けが取れてきた状態である。さらに研究を積み重ねた臨床上の処置により、起壊死性抗がん剤の皮膚傷害が改善されるメカニズムを科学的に検証することは、その傷害を予防するための方策と臨床ケアを確立するために必要不可欠なテーマである。

2. 研究の目的

本研究は、がん化学療法を行っている患者でしばしば認められる、抗がん剤による皮膚傷害の予防と臨床ケアの確立を目的とする。これを達成するために、多様な副作用を有する抗がん剤の皮膚傷害の発生メカニズムと特性を基礎研究により解明する。得られた知見に基づき、その傷害を予防するための方策と臨床ケアを確立するため、ヒト培養細胞を用いた実証研究を実施し、確かなエビデンス(実証データ)に基づき、がん化学療法に伴う皮膚傷害を回避する方策を確立するとともに、真に有用な臨床ケアを創出してがん患者のQOLの向上を目的とした研究である。現在までに明らかになってきた細胞傷害のメカニズムの研究をもとに、科学的根拠に基づいた臨床での対処方法を確立する。

3. 研究の方法

本研究では、起壊死性抗がん剤としてタキサン系抗がん剤であるパクリタキセル(PTX)、ドセタキセル(DOC)、およびビンカアルカロイドのビノレルピン(VNR)を用い、臨床用薬液を適宜希釈して培養細胞に曝露した。また、細胞傷害性を確認する細胞として、ヒト皮膚線維芽細胞(SF-TY)、ヒト肝細胞がん細胞(HepG2)、ヒト血管内皮細胞(HUV-EC-C)を用いた。また、細胞生存率の測定は、生細胞に存在する酵素活性を指標としたCell Counting Kit-8を用いて検討した。また、細胞の培養条件として、37での通常の培養に加え、冷電法を想定した23、温電法を想定した41での細胞培養系についてカルチャーパルCO2を用いて確立し、起壊死性抗がん剤の電法による細胞傷害メカニズムの研究に用いた。

(1) 微小管機能阻害剤の細胞傷害に対する冷電法及び温電法の効果： HepG2およびSF-TY細胞にPTX、DOC、VNRの臨床用薬液とその2~1000倍希釈溶液を23、37、41で24時間曝露し細胞生存率を測定した。酸化ストレスの有無の検討のため、微小管機能阻害薬のLC50付近の希釈溶液を23、37、41で24時間曝露し、細胞を回収して超音波破砕し、細胞内マロンジアルデヒド(MDA)濃度を測定した。また、酸化ストレス時に細胞保護のために産生

されるカタラーゼ、グルタチオン、メタロチオネインの定量も同時に行った。

(2) VNR 暴露温度による細胞内 HSP70 及び HSP90 α 濃度の変動と細胞生存率に対する効果：それぞれの温度条件下において、HepG2 および SF-TY を臨床用量の 100 倍希釈した VNR と 24 時間培養後に熱感受性タンパク質(Heat shock protein:HSP)の一種である HSP70 と HSP90 を ELISA 法を用いて定量した。また、阻害剤(それぞれ KNK437、17-DMAG)を添加して VNR による細胞傷害性を比較検討した。

(3) タキサン系抗がん剤では、可溶化のためにエタノールや界面活性剤などの添加剤が用いられているが、血管外漏出による皮膚傷害に関して、その添加剤の影響について HUV-EC-C および HepG2 を用いて検討した。

(4) VNR の微小管阻害作用による細胞骨格の経時的変化の解析と冷罨法の効果：SF-TY を用いた α -チューブリンおよび α -アクチンの免疫染色によりビノレルピン(VNR)の細胞周期に依存しない微小管阻害の進行を解析した。VNR(臨床用薬液の 10 倍希釈溶液)を 37 および 23 の条件下で 48 時間まで経時的に曝露し、免疫染色を行った。

(5) SF-TY に、ヒドロコルチゾンコハク酸エステルナトリウム(HDC)の臨床用薬液の希釈溶液を 24 時間曝露し、細胞生存率を測定した。SF-TY 細胞に VNR と同時に HDC の臨床用薬液の希釈溶液を 24 時間曝露し、培養上清中 IL-6 濃度及び細胞生存率を測定した。HepG2 (ヒト肝がん由来)細胞に、VNR と同時に HDC の臨床用薬液の 10⁻⁴ 倍希釈溶液を 24 時間曝露し、細胞内マロンジアルデヒド(MDA)濃度を定量した。

4. 研究成果

(1) 起壊死性抗がん剤による細胞傷害性のメカニズムと冷罨法及び温罨法の効果：起壊死性抗がん剤を HepG2 ならびに SF-TY に曝露した場合、両細胞共に 23 での VNR 曝露による細胞生存率は 37 に比べ、ほぼ全ての VNR 濃度において高値を示した。37 と比較して 23 では、ほぼ全ての VNR 濃度で細胞生存率の低下が抑制され、冷罨法の有効性が認められた。一方、両細胞共に 41 での VNR 曝露による細胞生存率は 37 に比べて 41 では VNR 濃度が低濃度(局所濃度が臨床濃度の 100 倍希釈以上)になるに伴って細胞生存率が上昇する傾向を示し、これは細胞種によらず同様に認められた。このことから、起壊死性抗がん剤が漏出した際には、局所を冷やすす冷罨法がいずれの条件でも適切な処置法であることが示唆された。

(2) タキサン系およびピンカルカロイド(VNR)による細胞傷害性は、組織傷害が激しい場合には冷罨法が、傷害が軽度の場合においては冷罨法に加えて温罨法も有効なことが示唆された。VNR の血管外漏出による皮膚傷害に対する温罨法処置においては、HepG2

細胞で熱感受性タンパク質(HSP)、HSP70 及び HSP90 が誘導され、上皮系細胞に対しては細胞保護作用に大きく関与することが示唆された。一方、間葉系細胞である線維芽細胞(SF-TY)では、41 での培養および抗がん剤の曝露により HSP の発現上昇が HepG2 と同様に認められるものの、HSP70 の誘導を阻害しても細胞生存率の変化は認められなかった。このことから、温罨法においては、細胞の種類により細胞保護作用の様式が異なる可能性が示唆された。

(3) タキサン系抗がん剤であるパクリタキセル(PTX)及びドセタキセル(DOC)に含まれている添加剤は、添加剤のみでも酸化ストレスを誘発し、ヒト血管内皮細胞(HUV-EC-C)に対しても短時間の曝露で細胞傷害性を示すことが明らかとなった。また、これらの添加剤に含まれる濃度のエタノールは血管内皮への細胞傷害性を示さず、界面活性剤のポリオキシエチレンヒマシ油及びポリソルベート 80 が細胞傷害へ関与している可能性が示唆された。さらに、PTX 及び DOC が引き起こす酸化ストレスには主薬自体も関与して増強していることが明らかとなった。そして、この酸化ストレスは、冷罨法によって有意に抑制された。

(4) VNR の細胞骨格の微小管阻害作用に対する冷罨法の効果：VNR の曝露直後から一部の細胞の微小管が極端に短縮された像が認められ、数時間かけてほぼ全体の細胞で短縮が認められた。冷罨法では、VNR の微小管重合阻害の進行を曝露初期の段階から遅らせ、曝露後 4 時間までの寄与が大きいと考えられた。一方でアクチンフィラメントに対しての曝露初期の影響は少なく、

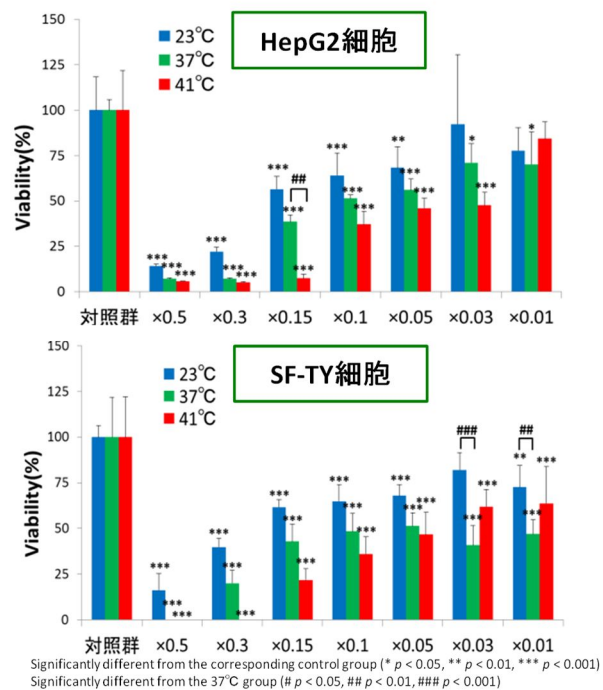
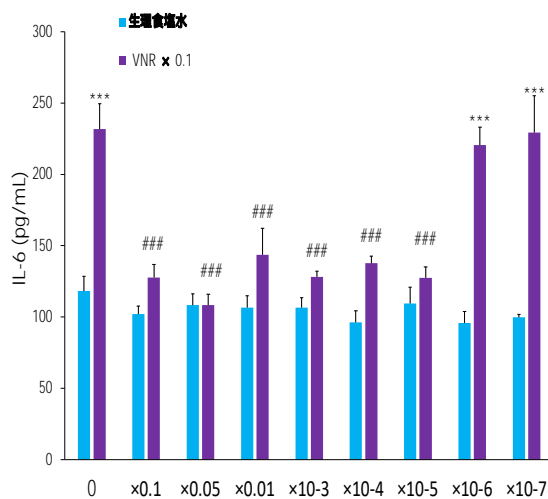


Fig.1 VNR 曝露による細胞生存率に対する温度の影響

VNRによる細胞内微小管重合阻害は、急性期の細胞傷害における細胞形態の破綻に先んじて生じると考えられた。その重合阻害は冷電法によって遅延・抑制されることが示唆され、necrosisおよびapoptosisの誘導を抑制することが示唆された。

(5) VNR 血管外漏出に起因した皮膚傷害に対する副腎皮質ホルモン剤の抑制効果： HDCの臨床用薬液濃度の 10^{-1} ～ 10^{-7} 倍希釈溶液により、有意な細胞生存率の低下が認められた。HDCの 10^{-4} ～ 10^{-7} 倍希釈溶液では、VNRによる細胞生存率の低下が有意に抑制された。また、VNRによるIL-6濃度の増加は、HDCの 10^{-1} ～ 10^{-5} 倍希釈溶液の添加により有意に抑制された。VNRによるMDA濃度の増加は、HDCの 10^{-4} 倍希釈溶液により、対照群レベルまで有意に抑制された。以上の結果より、HDCは臨床用薬液の 10^{-2} 倍希釈溶液より高濃度では、細胞傷害性を示すことが明らかとなった。一方で、HDCの 10^{-4} 倍希釈溶液程度の低濃度でも、VNRによる細胞傷害性や炎症反応を抑制することが示唆された。以上より、臨床でVNRによる皮膚傷害の治療に用いられている副腎皮質ホルモン注射剤は皮膚傷害の治療に有用であるが、現行よりも低濃度へと見直す必要性が考えられた。ステロイド剤(HDC)そのものにも臨床用量の濃度では細胞傷害性があり、薬剤の投与量に注意が必要である。細胞傷害性を示さず、IL-6を抑制するステロイド剤の濃度は、局所投与薬液濃度の 10^{-2} ～ 10^{-5} 倍希釈であり、臨床における薬液調整の目安となることが示唆された。



臨床用量に対する HDC の濃度

Significantly different from the saline-control group (*** p < 0.001)

Significantly different from the corresponding adrenocorticosteroid nontreatment control group (### p < 0.001)

Fig.2 VNRによるIL-6放出に対する副腎皮質ホルモン剤の抑制効果

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計22件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高石雅樹, 田村雄志, 山室愛子, 花田彩香, 佐川匠, 武田利明, 浅野哲
2. 発表標題 微小管機能阻害薬による血管外漏出誘発と皮膚傷害メカニズム (Induction of extravasation by antimicrotubule agents and mechanism of skin lesions)
3. 学会等名 第46回日本毒性学会学術年会, 徳島
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 浅野哲, 佐々木恵, 平賀建, 東條航大, 武田利明, 高石雅樹
2. 発表標題 ビノレルピンの細胞傷害に対する冷罨法の抑制効果とそのメカニズムに関する研究
3. 学会等名 医療薬学フォーラム2019 / 第27回クリニカルファーマシーシンポジウム, 広島
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 浅野哲, 山室愛子, 田村雄志, 菊地隆真, 武田利明, 高石雅樹
2. 発表標題 ビノレルピンの血管外漏出に起因した皮膚傷害に対する副腎皮質ホルモン剤の抑制効果
3. 学会等名 医療薬学フォーラム2019 / 第27回クリニカルファーマシーシンポジウム, 広島
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 飯屋崎光, 藤田康介, 山室 愛子, 花田彩香, 小島佳奈, 武田利明, 高石雅樹, 浅野哲
2. 発表標題 ビノレルピンの細胞傷害に対する温罨法の抑制メカニズムに関する研究。(Study on mechanisms of suppressive effect of warm compress against cytotoxicity by vinorelbine)
3. 学会等名 第140回日本薬学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田村亮太, 飯屋崎光, 小島佳奈, 武田利明, 高石雅樹, 浅野哲
2. 発表標題 ビノレルビンの細胞傷害に対する冷電法の抑制メカニズムの検討。(Examination of mechanisms of suppressive effect of cold compress against cytotoxicity by vinorelbin)
3. 学会等名 第140回日本薬学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高石雅樹, 田村雄志, 山室愛子, 花田彩香, 佐川匠, 武田利明, 浅野哲
2. 発表標題 微小管機能阻害薬による血管外漏出誘発と皮膚傷害メカニズム
3. 学会等名 第46回日本毒性学会学術年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 浅野哲, 佐々木恵, 平賀建, 東條航大, 武田利明, 高石雅樹
2. 発表標題 ビノレルビンの細胞傷害に対する冷電法の抑制効果とそのメカニズムに関する研究
3. 学会等名 医療薬学フォーラム2019 / 第27回クリニカルファーマシーシンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 浅野哲, 山室愛子, 田村雄志, 菊地隆真, 武田利明, 高石雅樹
2. 発表標題 ビノレルビンの血管外漏出に起因した皮膚傷害に対する副腎皮質ホルモン剤の抑制効果
3. 学会等名 医療薬学フォーラム2019 / 第27回クリニカルファーマシーシンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田村亮太, 飯屋崎光, 小島佳奈, 武田利明, 高石雅樹, 浅野哲
2. 発表標題 ビノレルピンの細胞傷害に対する冷電法の抑制メカニズムの検討
3. 学会等名 第140回日本薬学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 飯屋崎光, 藤田康介, 山室 愛子, 花田彩香, 小島佳奈, 武田利明, 高石雅樹, 浅野哲
2. 発表標題 ビノレルピンの細胞傷害に対する温電法の抑制メカニズムに関する研究
3. 学会等名 第140回日本薬学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高石雅樹, 浅野哲
2. 発表標題 タキサン系抗がん剤による血管外漏出誘発と皮膚傷害における添加剤の関与。
3. 学会等名 第8回国際医療福祉大学学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 浅野哲, 高石雅樹
2. 発表標題 起壊死性抗がん剤漏出による皮膚障害の毒性メカニズムの解明と予防・治療方法の検討。 - 微小管阻害薬の細胞傷害における細胞内チューブリン合成阻害の関与について - 。
3. 学会等名 第8回国際医療福祉大学学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高石雅樹、藤田康介、平賀建、佐々木恵、山室愛子、武田利明、浅野哲
2. 発表標題 起壊死性抗がん剤の細胞傷害性に対する曝露温度の影響
3. 学会等名 フォーラム2018衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 太田咲梨、山室愛子、佐々木恵、武田利明、高石雅樹、浅野哲
2. 発表標題 タキサン系抗がん剤の血管外漏出誘発及び皮膚傷害に対する添加剤の影響
3. 学会等名 第139回日本薬学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 東條航大、平賀建、武田利明、高石雅樹、浅野哲
2. 発表標題 微小管阻害薬による細胞骨格破壊に対する冷電法の抑制効果
3. 学会等名 第139回日本薬学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高石雅樹、山室愛子、田村雄志、菊地隆真、武田利明、浅野哲
2. 発表標題 ビンレルピンによる細胞傷害に対する副腎皮質ホルモン剤の抑制効果 (Suppression of adrenal corticosteroids on the cytotoxicity caused by vinorelbine)
3. 学会等名 第44回日本毒性学会学術年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 高石雅樹、浅野哲
2. 発表標題 微小管機能阻害薬の血管外漏出が引き起こす皮膚傷害に対する温罨法及び冷罨法の抑制効果
3. 学会等名 第7回国際医療福祉大学学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 浅野哲、高石雅樹
2. 発表標題 起壊死性抗がん剤漏出による皮膚傷害の毒性メカニズムの解明と予防・治療方法の検討 - 微小管機能阻害薬による皮膚傷害に関与する添加剤の影響について -
3. 学会等名 第7回国際医療福祉大学学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 加藤颯, 佐々木恵, 平賀建, 武田利明, 高石雅樹, 浅野哲
2. 発表標題 微小管阻害薬の細胞傷害における細胞骨格破壊の関与 (Involvement of cytoskeletal disruption in cytotoxicity of anti-microtubule agent)
3. 学会等名 第138回日本薬学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐々木恵, 平賀建, 武田利明, 高石雅樹, 浅野哲
2. 発表標題 微小管阻害薬の細胞傷害に対する冷罨法の抑制効果 (Suppressive effect of cold compress on cytotoxicity of antimicrotubule agent)
3. 学会等名 第138回日本薬学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田口亜依, 佐々木恵, 平賀建, 武田利明, 高石雅樹, 浅野哲
2. 発表標題 マイトマイシンCによる細胞傷害に対するチオ硫酸ナトリウム水和物およびメタロチオネインの抑制効果 (Suppressive effect of Sodium thiosulfate hydrate and metallothionein against cytotoxicity by Mitomycin C)
3. 学会等名 第138回日本薬学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 平賀建, 佐々木恵, 武田利明, 高石雅樹, 浅野哲
2. 発表標題 マイトマイシンCの細胞傷害に対する冷電法の抑制効果 (Suppressive effect of cold compress on cytotoxicity of Mitomycin C)
3. 学会等名 第138回日本薬学会大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	高石 雅樹 (TAKAISHI MASAKI) (50453410)	国際医療福祉大学・薬学部・講師 (32206)	
連携研究者	武田 利明 (TAKEDA TOSHIAKI) (40305248)	岩手県立大学・看護学部・教授 (21201)	