

令和 2 年 6 月 3 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K17191

研究課題名(和文) 各種EGFR分子標的薬の共通合併症の発生機序の解明と軽減治療薬の開発

研究課題名(英文) Elucidation of occurrence mechanism of common complications of various EGFR molecular target drugs and development of therapeutic drug for alleviation.

研究代表者

小池 一幸 (Koike, Kazuyuki)

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10618060

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究にてEGFR分子標的治療薬の抗腫瘍効果に伴う皮膚および心障害カスケードを同定した。さらに抗腫瘍効果を減弱せず、各障害カスケードのみを阻害する候補薬剤を同定した。候補薬剤の機能を確認するため、上皮癌細胞培養系および腎細胞内外のマグネシウム定量の実験系を確立し検証を行った。分子標的治療薬とその候補薬剤を作用させた後では、皮膚障害および心障害を有意に抑制することが予想された。したがって、我々が同定した候補薬剤が分子標的治療薬の有害事象を克服する治療方法となる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではEGFR分子標的治療薬の抗腫瘍効果を発現する遺伝子カスケードや皮膚障害・心障害カスケードを同定し、抗腫瘍効果を減弱せずに各合併症を引き起こさない遺伝子パスウェイの分岐点が存在することを明らかにした。さらに抗腫瘍効果を減弱せず、各障害カスケードのみを阻害する候補薬剤を同定した。分子標的治療薬とその候補薬剤を作用させた後では、皮膚障害および心障害を有意に抑制することが予想された。以上より本研究にてEGFR分子標的治療薬の課題である皮膚・心障害をドラッグリポジショニングを用いて克服できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we identified novel cascades of skin and cardiac damages associated with epidermal growth factor receptor (EGFR) targeted therapy for cancers. We also found candidate drugs which reduced serious complications of EGFR targeted therapy but not antitumor effect. To confirm the functions of the candidate drugs, we used the epithelial cancer cell culture system and the magnesium quantification system in kidney cells. After treatment with the candidate drugs, the adverse events in skin and kidney cells were significantly decreased. Therefore, our data strongly suggested that these drugs might be therapeutic tools for EGFR targeted cancer therapy.

研究分野：分子生物学

キーワード：EGFR分子標的治療薬 ゲフィチニブ エルロチニブ セツキシマブ パニツムマブ 皮膚障害 心障害

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

癌に対して、現在 4 種類 (ゲフィチニブ、エルロチニブ、セツキシマブ、パニツムマブ) の EGFR に対する分子標的治療薬が用いられ、その有効性が高く評価されている。一方、皮膚症状、心障害などが高頻度で起こり、治療の妨げとなっている。副作用を抑制できれば他の抗癌剤よりも、はるかに良好な予後 (生存期間の延長、社会復帰など) が得られるものと考えられるが、一般には、正常上皮にも豊富に存在する EGFR を分子標的とするため、これらの障害が起こることは当然であり、現在まで、抗腫瘍効果を維持したまま副作用を抑制する治療法はあり得ないと考えられてきた。本研究では、この常識とも言える一般的見解を根底から覆し、皮膚症状や心毒性を抑制し、なおかつ抗腫瘍効果は維持あるいは増強する治療法 (治療薬) を開発することで、新たな治療戦略へと発展することが期待される。

2. 研究の目的

本研究では、4 種類の EGFR に対する分子標的治療薬 (ゲフィチニブ、エルロチニブ、セツキシマブ、パニツムマブ) の皮膚症状や心毒性を抑制し、抗腫瘍効果を維持あるいは増強する治療法 (治療薬) の開発を目的とする。

3. 研究の方法

- 1) 遺伝子パスウェイ解析ソフトを用いて、EGFR 分子標的治療薬の抗腫瘍効果を発現する遺伝子カスケード、合併症を発症する皮膚障害カスケード、心障害カスケードを同定する。
- 2) 扁平上皮癌細胞培養系、皮膚上皮細胞培養系、ヒト胎児腎細胞培養系を用いて、同定した抗腫瘍効果カスケード、皮膚障害カスケード、心毒性カスケードを候補遺伝子が担っていることを確認する。
- 3) 抗腫瘍効果を減弱せずに各合併症を引き起こさない遺伝子パスウェイの分岐点が存在することを明らかにする。
- 4) その分岐点の下流で、皮膚障害カスケードのみ、心障害カスケードのみを阻害する候補薬剤を同定する。
- 5) 候補薬剤に関して各分子標的治療薬の皮膚障害カスケード、心障害カスケードを抑制し、かつ MTS assay にて抗腫瘍効果を減弱しないことを、抗腫瘍効果を担っている遺伝子カスケードの発現状態により検証する。
- 6) ヒト胎児腎細胞に各分子標的治療薬及び候補薬剤を作用させ、細胞内、細胞外のマグネシウム定量を行い心障害の抑制が示唆されたことを確認する。

4. 研究成果

(1). 遺伝子パスウェイ解析ソフトを用いて、EGFR 分子標的治療薬の抗腫瘍効果を発現する遺伝子カスケード、合併症を発症する皮膚障害カスケード、心障害カスケードを同定した。

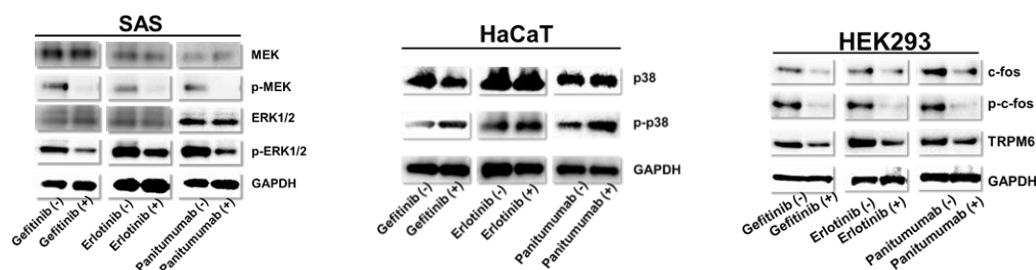
皮膚毒性のカスケードでは、EGFR を阻害することによって p38 のリン酸化が促進され、その下流にある炎症性サイトカインが活性化することを同定した。心毒性のカスケードでは、EGFR を阻害することにより HEK293 において c-FOS がダウンレギュレーションしていることを同定した。心毒性のメカニズムは MEK-ERK 経路が阻害されることで、c-FOS のリン酸化も阻害され、TRPM6 の発現が減弱することで、マグネシウムイオンの再吸収が阻害されて、低マグネシウム血症に陥るためと考えられた。

(2). 扁平上皮癌細胞培養系、皮膚上皮細胞培養系、ヒト胎児腎細胞培養系を用いて、同定した抗腫瘍効果カスケード、皮膚障害カスケード、心毒性カスケードを候補遺伝子が担っていることを確認した。

EGFR 分子標的薬を作用時に MEK-ERK のリン酸化の発現の減弱を認め、抗腫瘍カスケードは MEK-ERK のリン酸化経路が担っていることを確認した。(図 1)

分子標的治療薬作用下にて HacaT 細胞の p38 のリン酸化亢進、p38 のシグナル伝達の下流の炎症性サイトカイン 13 遺伝子について、mRNA レベルで有意な発現上昇を認め、皮膚障害カスケードを候補カスケードが担っていることを確認した。(図 2)

分子標的治療薬作用下にて HEK293 細胞の c-fos 発現、リン酸化抑制に続く TRPM6 の発現減弱を認め、心毒性カスケードを候補カスケードが担っていることを確認した。(図 3)

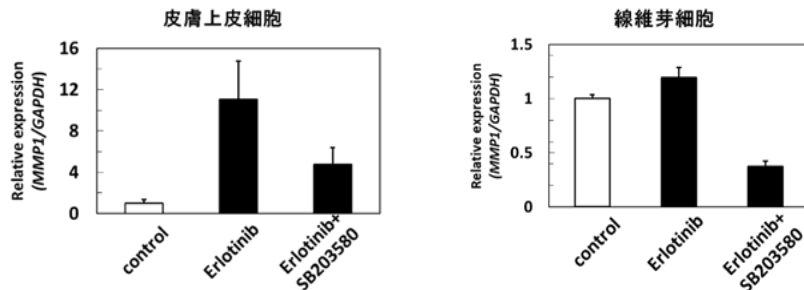


(図 1:MEK ERK タンパク質発現) (図 2:p38 のタンパク質発現) (図 3:c-fos のタンパク質発現)

(3). 抗腫瘍効果を減弱せずに各合併症を引き起こさない遺伝子パスウェイの分岐点が存在することを明らかにした。抗腫瘍効果を減弱せずに皮膚毒性を減弱する分岐点は、抗腫瘍カスケードとは別の経路である p38 のリン酸化が分岐点と考えられた。

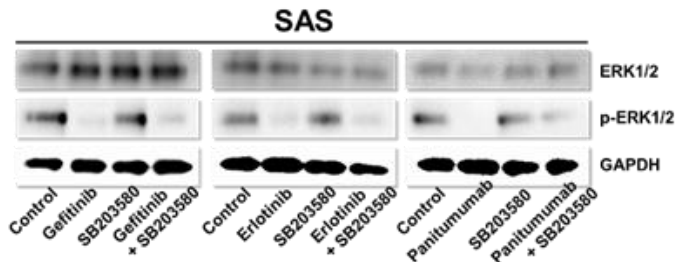
(4). その分岐点の下流で、皮膚障害カスケードのみ、心障害カスケードのみを阻害する候補薬剤を同定した。p38MapK の阻害剤には SB203580 という薬剤を同定した。P38 を不活化することによって内在化した EGFR が細胞膜に表在化し、抗腫瘍効果の増強も期待される薬剤である。TRAM6 の増強剤はフラバグリンという薬剤を同定した。抗癌作用 (肝癌細胞株や直腸癌細胞株の増殖を阻害) や強力な心臓保護 (心筋細胞におけるドキシソルビシン誘発アポトーシス抑制)、抗炎症 (マウスにおいて大腸炎の改善) 等報告ある薬剤である。

(5). 候補薬剤に関して各分子標的治療薬の皮膚障害カスケード、心障害カスケードを抑制し、かつ MTS assay にて抗腫瘍効果を減弱しないことを抗腫瘍効果を担っている遺伝子カスケードの発現状態により検証した。皮膚上皮細胞培養系、線維芽細胞系において皮膚障害抑制候補薬剤である SB203580 作用下にて、各分子標的治療薬の皮膚障害カスケード、心障害カスケードを抑制することを確認した。(図 4) また扁平上皮癌細胞培養系において ERK のリン酸化は抑制され(図 5)、MTS assay の結果より各種 EGFR 分子標的薬の抗腫瘍カスケードは阻害されないことを確認した。(図 6) Flawagline 作用下においても ERK のリン酸化は抑制されており(図 7)、MTS assay の結果より各 EGFR 分子標的薬の抗腫瘍カスケードは阻害されないことを確認した。(図 8) また cyclinD1 に関して、Flawagline 単独投与ではコントロールと比較して明らかな差を認めなかったが、分子標的薬と併用時はより発現が減弱しており、抗腫瘍効果の増強の可能性が考えられた。



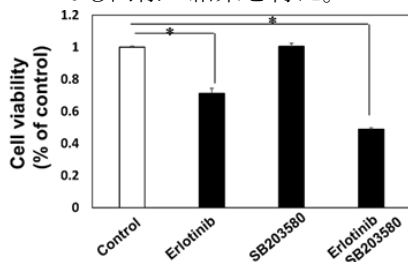
(図 4: Erlotinib 作用下での p38 の下流の炎症性サイトカイン MMP1 mRNA の発現)

他 MMP12、MMP13、CCL2、CCL3L、CXCL6、CXCL10、IL1RN、IL6、CCR7、CCL5、A100A9、さらに Panitumumab、Gefitinb 作用下についても同様の結果を得た。これより皮膚上皮細胞培養系において皮膚障害抑制候補薬剤である SB203580 作用下にて、各分子標的治療薬の皮膚障害カスケード、心障害カスケードを抑制することを確認した。

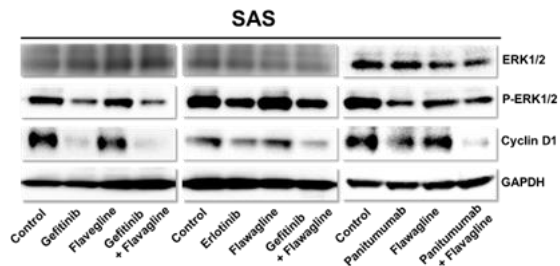


(図 5: SB203580 作用下のタンパク発現)

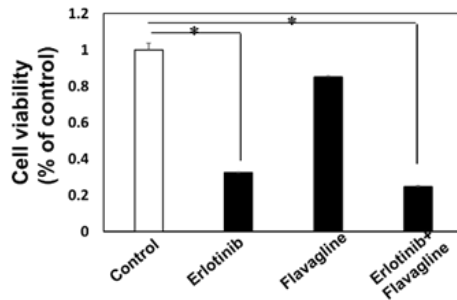
扁平上皮癌細胞培養系において Erlotinib 作用下さらに皮膚障害抑制候補薬剤である SB203580 作用下にて、ERK のリン酸化は抑制されることを確認した。さらに Panitumumab、Gefitinb 作用下についても同様の結果を得た。



(図 6: 分子標的薬投与時における SAS 細胞の MTS assay) 各種 EGFR 分子標的薬の抗腫瘍カスケードは阻害されないことを確認した。

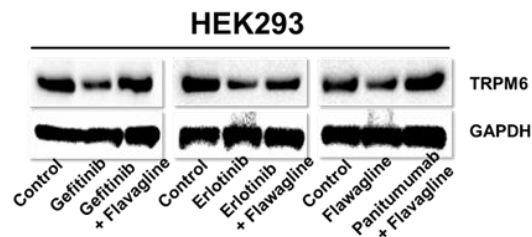


(図 7: ERK 系における Flawagline 作用下のタンパク質発現) Flawagline 作用下でも ERK のリン酸化は抑制されていることを確認した。



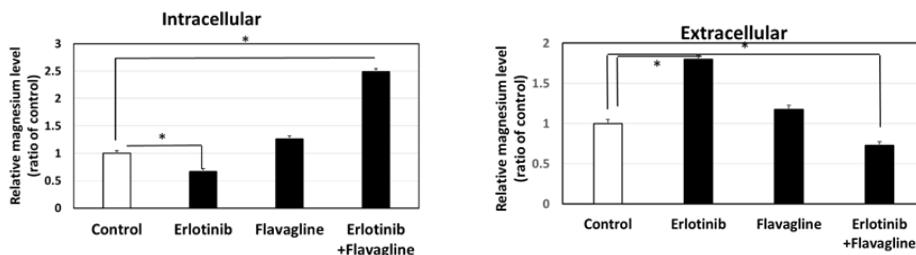
(図 8:分子標的薬投与時における SAS 細胞 MTS assay 結果。Panitumumab、Gefitinb 作用下についても同様の結果を得た。) MTS assay より各 EGFR 分子標的薬の抗腫瘍カスケードは阻害されないことを確認した。

(6). ヒト胎児腎細胞 (HEK293) に各分子標的治療薬及び候補薬剤を作用させ、細胞内、細胞外のマグネシウム定量を行い心障害の抑制が示唆されたことを確認した。HEK293 において各分子標的治療薬及び候補薬剤を作用させた際、TRPM6 の発現減弱効果を阻害する事を確認した。(図 9)



(図 9 Flavagline による EGFR 分子標的薬の心毒性への影響の評価)

さらに Flavagline 作用時の Mg 再吸収についてメタロアッセイにて評価した。各分子標的治療薬と Flavagline の併用投与にて、細胞内の Mg 濃度の上昇、および細胞外の Mg 濃度の低下を確認した。(図 10、図 11)



(図 10.11 各分子標的治療薬と Flavagline の併用投与における細胞内外の Mg 濃度の評価 Panitumumab、Gefitinb 作用下についても同様の結果を得た。)

(7). まとめ

本研究では、4 種類の EGFR に対する分子標的治療薬 (ゲフィチニブ、エルロチニブ、セツキシマブ、パニツムマブ) の皮膚症状や心毒性を抑制し、抗腫瘍効果を維持あるいは増強する治療法 (治療薬) の開発を目的とした。EGFR 分子標的治療薬の抗腫瘍効果を発現する遺伝子カスケード、合併症を発症する皮膚障害カスケード、心障害カスケードを同定し、扁平上皮癌細胞培養系、皮膚上皮細胞培養系、ヒト胎児腎細胞培養系を用いて、同定した抗腫瘍効果各カスケードを候補遺伝子が担っていることを確認した。さらに抗腫瘍効果を減弱せずに各合併症を引き起こさない遺伝子パスウェイの分岐点が存在することを明らかにし、その分岐点の下流で、皮膚障害カスケードのみ、心障害カスケードのみを阻害する候補薬剤を同定した。そして候補薬剤に関して各分子標的治療薬の皮膚障害カスケード、心障害カスケードを抑制し、かつ MTS assay にて抗腫瘍効果を減弱しないことを、抗腫瘍効果を担っている遺伝子カスケードの発現状態により検証した。さらにヒト胎児腎細胞に各分子標的治療薬及び候補薬剤を作用させ、細胞内、細胞外のマグネシウム定量を行い心障害の抑制が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----