

令和 3 年 6 月 28 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K19152

研究課題名(和文) 口腔癌EGFR分子標的治療薬の心毒性・皮膚障害発生機構の解明と治療薬の開発

研究課題名(英文) Elucidation of cardiotoxicity and skin disorder occurrence mechanism of EGFR molecular-targeted therapeutic agents in oral cancer and development of therapeutic agents

研究代表者

喜田 晶洋(Kita, Akihiro)

千葉大学・大学院医学研究院・医員

研究者番号：60741816

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)：本研究では、セツキシマブの皮膚障害や心毒性を抑制し、抗腫瘍効果を維持あるいは増強する治療薬の開発を目的とした。抗腫瘍効果、皮膚障害、心毒性を発現するカスケードを同定し、扁平上皮細胞株、皮膚上皮細胞株、ヒト胎児腎細胞株を用いて同定した各カスケード群を候補遺伝子(p-38, c-fos)が担っていること、pathwayの分岐点の存在を明らかにした。さらに皮膚障害、心毒性のみを阻害する候補薬剤を同定(SB203580, flavaglines)し、抗腫瘍効果を弱めることなく皮膚障害、心毒性を抑制していることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

セツキシマブは頭頸部癌に対する社会保険で認められたEGFR分子標的薬であるが、激しい全身への多発発疹などの皮膚障害や心筋梗塞などの心毒性が主な副作用として挙げられ、副作用が治療自体の妨げになっていることも少なくはない。EGFRを標的とするため副作用が強いほど抗腫瘍効果が高いという一般見解を根底から覆し、抗腫瘍効果を維持あるいは増強し、皮膚障害や心毒性を抑制する治療薬が開発できれば、癌治療における患者のQOLを向上させ、社会復帰にも道を拓く可能性を有する、学術的にも社会的にも大きな意義をもつと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to develop a therapeutic drug that suppresses skin disorders and cardiotoxicity of cetuximab, and maintains/enhances its antitumor effect. We found novel cascades and target genes (p-38, c-fos) associated with antitumor effects, skin disorders, and cardiotoxicity in squamous cell lines, cutaneous epithelial cell lines, and human fetal kidney cell lines. Furthermore, we identified therapeutic drugs (SB203580, flavaglines) that suppress skin disorders and cardiotoxicity without diminishing the antitumor effect.

研究分野：分子生物学

キーワード：セツキシマブ EGFR

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

頭頸部癌に対し保険適応が認められている EGFR 分子標的薬はセツキシマブである。本来、分子標的薬は合併症を少なくし抗腫瘍効果が高いことを目的として開発されたが、セツキシマブの主な副作用として皮膚症状(激しい全身の多発発疹、爪囲炎)、心毒性(心筋梗塞など)が挙げられ、癌治療自体の妨げになっていることも稀ではない。しかし一般には 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るため、抗腫瘍効果を維持したまま副作用を抑制することが課題である。本研究では、EGFR を起点とするセツキシマブ作動ネットワークにおける皮膚毒性カスケードと心毒性カスケードが抗腫瘍カスケードと分岐することを利用して、皮膚症状や心毒性を抑制し且つ抗腫瘍効果を維持・増強する併用治療薬の開発を行う。

### 2. 研究の目的

「セツキシマブは EGFR が分子標的のため、組織障害は必要であり副作用の程度が強いほど抗腫瘍効果を得られる」という一般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セツキシマブとの併用治療薬の開発を目的とする。

### 3. 研究の方法

1) セツキシマブを口腔扁平上皮癌に作用させ、microarray-Pathway 解析により遺伝子ネットワーク上の抗腫瘍、心毒性、皮膚毒性の3種のカスケードを同定・確認する。

2) 遺伝子ネットワークにおいて、1)で解明した分岐点よりも下流で皮膚毒性カスケード、心毒性カスケードをブロックするための分子標的となる遺伝子を決める。さらに、それに対する制御薬剤を文献により検索・同定する。

#### 【皮膚毒性に関して】

3) 標的候補遺伝子 shRNA 導入により形質転換細胞を作成し、セツキシマブを作用させたときに抗腫瘍効果カスケードをブロックすることなく皮膚毒性カスケードを抑制することができるかを細胞生存計測で、各カスケード候補遺伝子群の発現状態を WB 法で確認する。

4) *in vitro* で HaCaT と fibroblast にセツキシマブと候補薬剤を併用投与し、細胞生存率計測により、皮膚障害効果が抑制されていることを確認すると共に、候補カスケード構成遺伝子の発現状態を調べ、抗腫瘍カスケードをブロックすることなく皮膚毒性カスケードを候補薬剤がブロックしていることを確認する。

#### 【心毒性に関して】

5) 心毒性カスケードと抗腫瘍カスケードの分岐点から下流の遺伝子を分子標的として、分子標的遺伝子の shRNA 導入により形質転換細胞を作成し、セツキシマブを作用させたときに抗腫瘍カスケードをブロックすることなく心毒性カスケードを抑制することができるかを各カスケード構成遺伝子の WB 法にて確認する。

6) *in vitro* で口腔扁平上皮癌細胞にセツキシマブと候補薬剤を併用投与し、細胞生存計測と WB 法にて抗腫瘍効果カスケードがブロックされていないことを確認する。

7) 心毒性カスケードに関し、*in vivo* で口腔扁平上皮癌細胞をマウスに移植し、セツキシマブと候補薬剤を併用投与して、血中の Mg<sup>2+</sup>値の低下の抑制効果を確認して、抗腫瘍効果をブロックすることなく、心毒性が抑制される可能性があることを確認する。

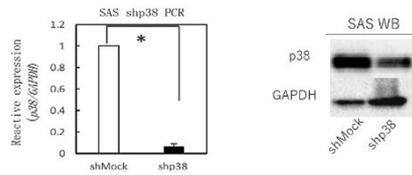
8) マウスにセツキシマブを作用させ血中 Mg<sup>2+</sup>濃度が実際に低くなることと心毒性の候補カスケード構成遺伝子群の発現状態を確認する。薬剤濃度をあげて Mg<sup>2+</sup>濃度が低下し、標的遺伝子発現抑制が起こることも確認する。

### 4. 研究成果

1) 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 pathway 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、心毒性では c-fos の発現減弱(に伴う TRPM6 の発現の抑制)が分岐点と考えられた。

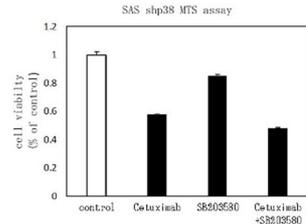
2) その分岐点の下流で、皮膚障害カスケードのみ、心障害カスケードのみを阻害する候補薬剤を同定した。p38MAPK の阻害剤には SB203580 という薬剤を同定した。p38 を不活化することによって内在化した EGFR が細胞膜に表在化し、抗腫瘍効果の増強も期待される薬剤である。心毒性カスケードの分岐点である TRAM6 の増強剤は flavaglines という薬剤を同定した。抗癌作用(肝癌細胞株や直腸癌細胞株の増殖を阻害)や強力な心臓保護(心筋細胞におけるドキシソルビシン誘発アポトーシス抑制)、抗炎症(マウスにおいて大腸炎の改善)等報告ある薬剤である。

3) 口腔扁平上皮癌細胞、HaCaT、fibroblast に皮膚毒性標的候補遺伝子 p38shRNA 導入をリポフェクション法にて行った。口腔扁平上皮癌細胞では mRNA レベル、タンパクレベルで p38 の発現抑制を確認したが、HaCaT において発現抑制は確認できなかった。また、fibroblast においては使用したプロモーターが不適合であり導入が困難であった。



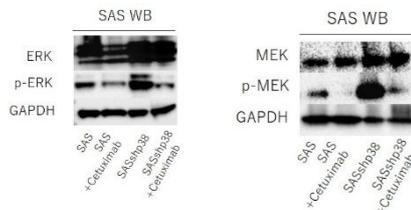
(図1: 口腔扁平上皮癌細胞において p38shRNA 導入を mRNA レベル、タンパクレベルで確認。)

p38shRNA 導入した口腔扁平上皮癌細胞株にセツキシマブを 24H 作用させ、shRNA 導入により抗腫瘍効果を阻害していないことを細胞生存計測にて確認した。(図2)



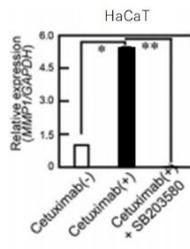
(図2:p38shRNA 導入した口腔扁平上皮癌細胞での MTS assay による抗腫瘍効果の確認。)

また、セツキシマブを作用させた形質転換口腔扁平上皮癌細胞株に抗腫瘍カスケードである MEK-ERK のリン酸化を抑制していることを WB 法にて確認した。(図3)

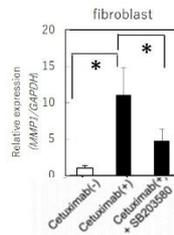


(図3:p38shRNA 導入した口腔扁平上皮癌細胞における抗腫瘍カスケードを確認。)

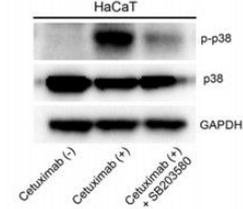
4). 候補薬剤とセツキシマブの併用投与で HaCaT, fibroblast において p38 リン酸化下流の炎症性サイトカインの1つである MMP1 の発現が抑制されていることを確認した。(図4、5、6)



(図4:HaCaT におけるセツキシマブ作用下で MMP1 mRNA の発現)



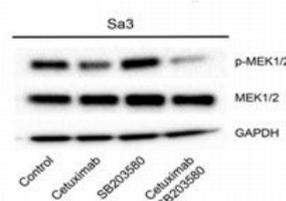
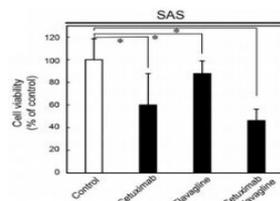
(図5: fibroblast におけるセツキシマブ作用下で MMP1 mRNA の発現)



(図6:SB203580 作用下で p38 リン酸化が抑制)

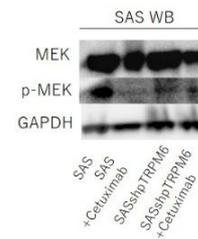
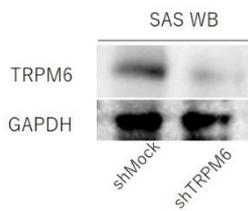
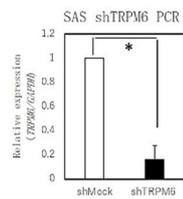
他 MMP12, MMP13, CCL2, CXCL3, CXCL6, CXCL10, IL1RN1, IL6, CCR7, CCL5, s100A9, s100A12 ついても同様の結果を得た。これより HaCaT, fibroblast において皮膚毒性抑制候補薬剤である SB203580 作用下にて、セツキシマブの皮膚毒性カスケードを抑制することを確認した。

また、口腔扁平上皮癌細胞における p38 阻害剤である SB203580 作用下において、セツキシマブとの併用投与下でも抗腫瘍効果を阻害しないことを細胞生存計測で、抗腫瘍カスケードである MEK のリン酸化を阻害していることを WB 法で確認した。(図7)



(図7:口腔扁平上皮癌細胞における SB2203580 併用投与における抗腫瘍効果の確認)

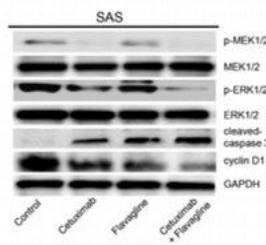
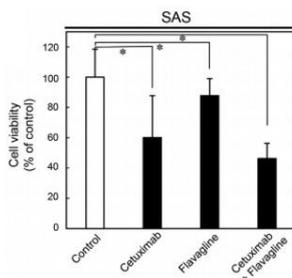
5) 心毒性標的候補遺伝子である TRPM6 に対しリポフェクション法にて shRNA 導入を口腔扁平上皮癌細胞、ヒト胎児腎細胞 293(HEK293)に行った。口腔扁平上皮癌細胞では mRNA レベル、タンパクレベルで発現抑制を確認した(図 8)が、HEK293 では fibroblast 同様プロモーター不適の観点から導入が困難であった。TRPM6shRNA 導入した口腔扁平上皮癌細胞株において、セツキシマブを作用させ、MEK のリン酸化が抑制されていることを確認した。(図 9)



(図 8:shTRPM6 の導入を mRNA、タンパクレベルで確認。)

(図 9:抗腫瘍カスケードの確認)

6) 候補薬剤に関してセツキシマブとの併用投与で抗腫瘍効果を減弱しないことを、細胞生存計測と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。(図 10)flavaglines 作用下においても ERK のリン酸化は抑制されており、細胞生存計測の結果よりの抗腫瘍カスケードは阻害されないことを確認した。



細胞生存計測と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。(図 10)flavaglines 作用下においても ERK のリン酸化は抑制されており、細胞生存計測の結果よりの抗腫瘍カスケードは阻害されないことを確認した。

(図 10: flavaglines 併用投与における抗腫瘍効果の確認)

7)8)セツキシマブはマウスに効果を発揮しないため、*in vivo*におけるマウスの実験は見送った。

9)本研究では、セツキシマブの皮膚毒性や心毒性を抑制し、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。セツキシマブ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毒性カスケード、心毒性カスケードを同定し、口腔扁平上皮癌細胞株、HaCaT、HEK293 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 pathway 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、皮膚毒性カスケードのみ、心毒性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皮膚障害カスケード、心毒性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。

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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------