

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：37111

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K16066

研究課題名（和文）EGFR阻害剤による皮膚障害抑制を目指した光に安定な活性型ビタミンK誘導体の開発

研究課題名（英文）Photostable vitamin K derivatives for prevention of skin rash induced by EGFR inhibitors

研究代表者

後藤 将太郎（Shotaro, Goto）

福岡大学・薬学部・助教

研究者番号：70825108

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 1,100,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、活性型ビタミンK（VKH）誘導体の皮膚外用剤としての有用性とEGFR阻害剤による皮膚障害に対する効果を評価した。VKH誘導体はキノン型VKの欠点であった光分解性および光毒性を改善しており、さらにヒト表皮角化細胞株（HaCaT細胞）へのVKH送達性はキノン型VKと同等以上であることを示した。またHaCaT細胞へのEGFR阻害剤により、CCL5が増加した。VKおよびVKH誘導体は炎症性ケモカインCCL5の発現を抑制し、VKH誘導体はVKと同等以上の抑制効果を示した。このことから、VKH誘導体の皮膚適用は、キノン型VKの治療効果を高めるための有用な方法であることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗癌剤として使用されているEGFR阻害剤は、副作用として皮膚障害が好発する。重度の障害は治療薬の減量や中断を招くため、徹底した管理が必要となる。既存のビタミンKのクリーム製剤が皮膚障害に有効との報告があるが、その機序は不明であり、光分解および光毒性の懸念もあった。我々はVKH誘導体が既存のVKよりも光に安定かつ、EGFR阻害剤により誘発される炎症性ケモカイン CCL5を抑制することを発見し、より効果的な皮膚障害予防法を見出した。本研究の成果は、VKH誘導体がEGFR阻害剤により惹起されるCCL5を効果的に抑制できる新規の治療薬としての発展が期待される。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to assess the effectiveness of external preparations of active form vitamin K (VKH) derivatives in treating skin rash caused by EGFR inhibitors. The study found that VKH derivatives can address the photo-degradability and photo-toxicity issues associated with quinone-type VK. Additionally, VKH derivatives were found to facilitate the delivery of intracellular VKH to HaCaT cells, as compared to VK. Furthermore, VK and VKH derivatives were found to suppress the expression of inflammatory chemokine CCL5, a factor induced by EGFR inhibitors in HaCaT cells. Interestingly, the suppressive effect of VKH derivatives was equal or higher than that of VK. These findings suggest that the topical application of VKH derivatives could be an effective strategy to enhance the therapeutic efficacy of VK.

研究分野：製剤設計学，薬物送達学

キーワード：ビタミンK プロドラッグ 光毒性 光分解 EGFR阻害剤 皮膚障害 ケモカイン CCL5

1. 研究開始当初の背景

近年のがん治療は、分子標的薬の登場により大きな治療効果を期待できるようになった一方で、これまでの細胞障害性抗がん剤とは異なる副作用が出現するようになった。上皮成長因子受容体 (epidermal growth factor receptor ; EGFR) 阻害剤に代表されるゲフィチニブ、エルロチニブ、セツキシマブなどの肺癌や結腸癌の治療に使用される分子標的薬は、皮膚障害の副作用の出現頻度が極めて高く、重度の皮膚障害は患者の身体的精神的苦痛を伴い、QOL や治療コンプライアンスに大きく影響する。そのため皮膚障害に対する徹底した管理が必然となるが、これまでに確立された治療法および予防法はなく外用ステロイド剤や抗菌剤による対症療法が中心である。しかしながら薬剤の長期使用に伴う薬剤耐性と副作用に注意を要することや、依然として重度の皮膚障害に苦しむ患者が多くいることから、より効果的な治療法が切望されている。最近になり、キノン型である VK の局所製剤が臨床試験において EGFR 阻害剤誘発性皮膚障害の重症度を軽減したことが報告された。しかしながらキノン型である VK は光に不安定なだけでなく光毒性を示すため、皮膚外用剤としての使用は適さない。さらに皮膚障害抑制機序についても不明なままである。

2. 研究の目的

光分解性と光毒性を克服すると同時に、効率的に皮膚へ VKH を送達できる候補化合物を合成し、その化合物を用いて、EGFR 阻害剤が誘発する皮膚障害に対する抑制効果を評価することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) VKH 誘導体候補化合物の合成

VKH の 1,4 位水酸基に導入する修飾基を変えながら、複数の VKH 誘導体候補化合物を合成した。合成した候補化合物は質量分析、¹H-NMR、元素分析、HPLC に供し、同定を行なった。

(2) VKH 誘導体の光分解性・光毒性の評価

光分解性は、太陽光と同じ照射スペクトルを有する擬似太陽光照射装置を用いて、皮膚適用時の自然環境に近い条件下で VKH 誘導体を照射し、残存濃度を LC-MS/MS を用いて測定することで光分解性を評価した。光毒性は、皮膚角化細胞である HaCaT 細胞に VKH 誘導体を添加し、紫外線 (UVA) を照射した。その時に発生する細胞内 ROS 量を細胞内 ROS 検出蛍光プローブ (H2DCFDA) を用いて測定した。さらに、照射後の細胞生存率を細胞由来の ATP を定量できる CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay を用いて測定し、光毒性を総合的に評価した。

(3) VKH 誘導体の皮膚細胞への VKH 送達性の評価

ヒト表皮角化細胞 (HaCaT) に VK および VKH 誘導体を添加し、経時的に細胞を回収した。抽出処理後、細胞内に送達された VKH を LC-MS/MS を用いて測定し、VKH 送達量を評価した。

(4) EGFR 阻害剤により皮膚細胞中で誘発される炎症性関連因子発現量の評価

HaCaT 細胞に EGFR 阻害剤である Gefitinib, Erlotinib, Cetuximab を濃度別に添加し、24 時間培養後細胞を回収した。リアルタイム RT-PCR 法によって、炎症関連因子の mRNA 発現量を評価した。

(5) 皮膚障害モデル細胞に対する VKH 誘導体の効果評価

前項目の評価から、使用する EGFR 阻害剤の濃度を決定し、発現上昇が見られた炎症関連分子が、VKH 誘導体を使用することで正常化するかをリアルタイム RT-PCR 法によって評価した。

(6) GGCX のノックダウンによる炎症性関連分子への影響

HaCaT 細胞に siGGCX を Lipofectamine 2000 を用いてトランスフェクションを行なった。24 時間後に細胞を回収して、リアルタイム RT-PCR 法によって目的遺伝子の発現を評価した。

4. 研究成果

VKH 誘導体として VK₁ (Phylloquinone, PK) の活性体である Phyllohydroquinone (PKH) のエステル型誘導体, PKH-1, 4-bis-*N,N*-dimethylglycinate hydrochloride (PKH-DMG), PKH-1,4-bis-hemi-succinate (PKH-SUC) および VK₂ (Menaquinone-4, MK-4) の活性体である Menahydroquinone-4 (MKH) のエステル型誘導体, MKH-1, 4-bis-*N,N*-dimethylglycinate hydrochloride (MKH-DMG), MKH-1,4-bis-hemi-succinate (MKH-SUC) を合成し、使用した。

(1) 光分解性の評価

エタノール 溶液中の PK, MK-4, PKH-DMG, MKH-DMG, PKH-SUC および MKH-SUC の人工太陽光に照射により変化する残存濃度を測定したところ、いずれの化合物も擬一次反応速度式に従って減少した。PKH-DMG と PKH-SUC の半減期は、PK と比較しそれぞれ 40 倍、4.5 倍長く、また MKH-DMG と MKH-SUC の半減期も、MK-4 と比較しそれぞれ 50 倍、3 倍長くなったことから、VKH 誘導体はキノン型 VK よりも光に対する安定性が高いことが明らかとなった。

(2) 光毒性の評価

ヒト表皮角化細胞株である HaCaT 細胞を用いて、UVA を照射したキノン型 VK と VKH 誘導体による細胞内 ROS 生成と細胞生存率を評価した (Fig.1)。UVA 照射によりキノン型 VK は、細胞内 ROS 量が増加し、それに続く細胞毒性を示した一方で、VKH 誘導体は細胞内 ROS 量の増加および細胞毒性を示さなかった。以上の結果、VKH 誘導体は光毒性を有する可能性が低いことが明らかとなった。

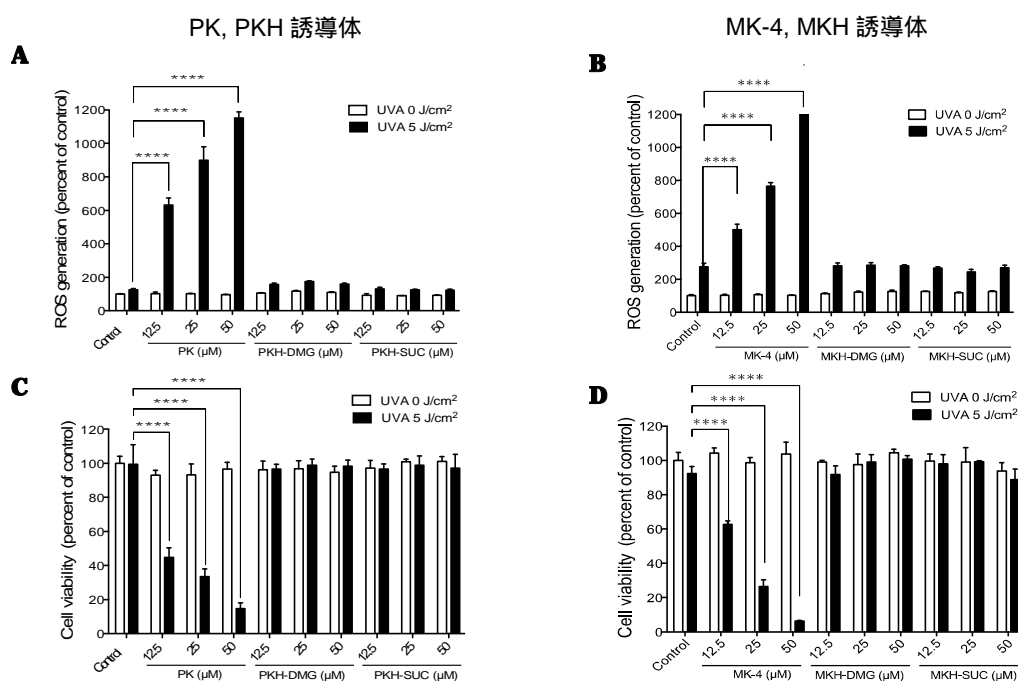


Fig.1 HaCaT 細胞における UVA 照射 (5 J / cm²) キノン型 VK および VKH 誘導体による細胞内 ROS 生成と細胞生存率への影響. PK および PKH 誘導体による細胞内 ROS 生成 (A) と細胞生存率 (C). MK-4 および MKH 誘導体による細胞内 ROS 生成 (B) と細胞生存率 (D).

(3) VKH 誘導体の皮膚細胞への VKH 送達性の評価

VKH 誘導体が皮膚由来細胞において VKH プロドラッグとして機能するかを確認するために、HaCaT 細胞への VKH 送達性を評価した。VKH は空気中で容易に酸化されやすく、正確に測定することは困難である。そのため、細胞内において VKH が GGCX の補因子として機能したのちに化学量論的に生成する VKO 濃度を VKH 送達性の指標として用いた。PK, MK-4 により生成する VKO をそれぞれ PK エポキシド (PKO), MK-4 エポキシド (MKO) として示した (Fig.2)。PKH-DMG および PKH-SUC 添加群の AUC_{PKO} (0-72h) は、PK 添加群よりもそれぞれ 0.741 倍および 22.9 倍高かった (Fig.2A)。一方、MKH-DMG および MKH-SUC 添加群の AUC_{MKO} (0-72h) は、MK-4 添加群よりもそれぞれ 1.02 倍および 1.64 倍高かった (Fig.2B)。以上の結果から、VKH 誘導体は、キノン型 VK と同等以上の VKH 送達性を有する VKH のプロドラッグとして機能することが明らかとなった。

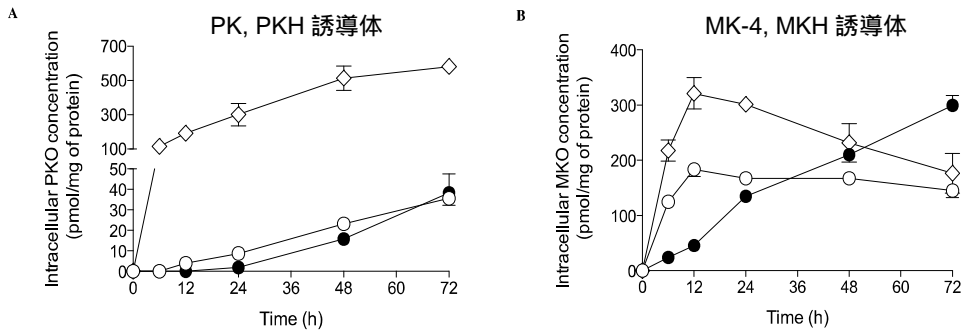


Fig.2 HaCaT 細胞におけるキノン型 VK および VKH 誘導体 (5 μ M) 添加後の細胞内 VKO 濃度の経時変化. (A) ○: PK, ●: PKH-DMG, ◇: PKH-SUC 添加後の PKO 濃度. (B) ○: MK-4, ●: MKH-DMG, または ◇: MKH-SUC 添加後の MKO 濃度.

(4) EGFR 阻害剤により皮膚細胞中で誘発される炎症性関連分子の発現

EGFR 阻害剤は、皮膚細胞の成長停止とアポトーシスをもたらす、皮膚構築のプロセスに障害を与えるだけでなく、ケモカインなどの炎症性ケモカインを誘導することが報告されている。これらケモカインは、好中球、単球、リンパ球を動員と活性化を促し、さらにより多くのエフェクターサイトカインを放出することで、皮膚障害の重症化に拍車をかける。そこで、本研究で使用する HaCaT 細胞においても炎症性関連分子の発現増加をするか確認したところ、Gefitinib, Erlotinib, Cetuximab の処理により、濃度依存的に CCL5 mRNA 発現が増加した。以降、使用する EGFR 阻害剤の濃度を、Gefitinib 1 μ M, Erlotinib 1 μ M, Cetuximab 100 μ g/ml に決定した。

(5) EGFR 阻害剤誘発性皮膚障害モデルに対する VKH 誘導体の効果

VKH 誘導体として VKH 送達性が比較的高い MKH 誘導体を使用し、比較対照として MK-4 および PK を用いた。HaCaT 細胞に 3 μ M の MK-4, PK, MKH 誘導体を 24 時間処理し、その後 EGFR 阻害剤を 24 時間添加したところ、EGFR 阻害剤により増加した CCL5 mRNA 発現は MK-4 および MKH 誘導体で有意に減少し、MKH 誘導体は MK-4 と比較し同等以上の効果を示した。一方で PK の減少効果はほとんど見られなかった。

(6) GGCX のノックダウンによる炎症性関連分子への影響

次に、CCL5 発現抑制効果に MKH が関与するかを検討するため、ビタミン K 依存性タンパク質 (VKDP) の翻訳後修飾 (Gla 化) に着目した。VKDP は γ -Glutamyl carboxylase (GGCX) により Gla 化されることでその機能を発揮することができ、補因子として VKH が必須である。そこで、GGCX をノックダウンすることで VKDP の Gla 化を抑制した結果、GGCX mRNA 発現減少と共に、CCL5 mRNA 発現が増加した。このことから、CCL5 の発現抑制には、VKDP の Gla 化が関与しており、VKH は GGCX の補因子としての機能を介して、CCL5 発現抑制効果を示したことが示唆された。

本研究の結果から VKH 誘導体はキノン型 VK の光不安定性および光毒性を克服し、皮膚細胞へ VKH を十分に送達できる VKH のプロドラッグとして機能することが明らかとなった。また、VKH 誘導体は、EGFR 阻害剤により HaCaT 細胞で誘導される炎症性関連因子のうち CCL5 の発現を抑制することが明らかとなり、その機構として VKDP の Gla 化が必要であることが示唆された。VKH 誘導体は、特別な遮光管理を必要とせず、キノン型 VK よりも安全に VKH を皮膚送達できる皮膚障害予防薬としての用途が期待できる。さらに製剤化開発のために、今後 in vivo 実験での病態モデルへの効果評価を実施する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Goto Shotaro, Setoguchi Shuichi, Nagata-Akaho Nami, Terada Kazuki, Watase Daisuke, Yamakawa Hirofumi, Toki Erina, Koga Mitsuhsisa, Matsunaga Kazuhisa, Karube Yoshiharu, Takata Jiro	4. 巻 155
2. 論文標題 Ester derivatives of phyllohydroquinone effectively deliver the active form of vitamin K1 topically, owing to their non-photosensitivity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 European Journal of Pharmaceutical Sciences	6. 最初と最後の頁 105519 ~ 105519
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ejps.2020.105519	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Goto Shotaro, Setoguchi Shuichi, Matsunaga Kazuhisa, Takata Jiro	4. 巻 -
2. 論文標題 Overcoming the Photochemical Problem of Vitamin K in Topical Application	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Intech open	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5772/intechopen.99310	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 後藤 将太郎, 瀬戸口 修一, 渡瀬 大輔, 寺田 一樹, 山川 博文, 土岐 衣梨奈, 古賀 允久, 松永 和久, 加留部 善晴, 高田 二郎
2. 発表標題 皮膚適用を企図するフィロヒドロキノン（活性型ビタミンK1）エステル誘導体の光安定性と皮膚送達性の評価
3. 学会等名 日本薬剤学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 ケモカインCCL5発現抑制剤	発明者 高田, 松永, 加留部, 松尾, 古賀, 瀬戸口, 後藤	権利者 学校法人 福岡大 学
産業財産権の種類、番号 特許、2022-03736	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------