

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：17501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791385

研究課題名(和文) 抗癌剤誘発脱毛に対する抗酸化物質 DHL - HisZnNa の有用性の検討

研究課題名(英文) The effect of sodium zinc dihydrolipoylhistidinate to treat chemotherapy induced alopecia

研究代表者

中嶋 健太郎 (NAKAJIMA, Kentaro)

大分大学・医学部・医員

研究者番号：10625255

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)：抗がん剤治療時の脱毛は患者のQOLを著しく低下させ治療コンプライアンスにも関わる。本研究は、抗がん剤誘発脱毛に対する新規抗酸化剤を用いた治療法の開発に関する、臨床応用を視野に置いた戦略的研究である。

われわれはこれまでに新規 リポ酸誘導体DHL-HisZnNa、新規ビタミンE誘導体ESeroS-GS、及びETS-GSが動物実験において、抗がん剤誘発脱毛を抑制することを示した。また、これら新規抗酸化剤は、抗がん剤のもつ抗がん作用を減弱することなく、むしろ抗酸化剤が抗腫瘍効果を有することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Hair loss in the anticancer drug treatment period affects the treatment compliance by lowering the QOL of patients. This is a strategic project which focuses not only basic but also places a view to clinical application. We have showed that novel α -lipoic acid derivatives, DHL-HisZnNa, vitamin E derivative ESeroS-GS, and the ETS-GS inhibited the anti-cancer agents induced alopecia. We revealed these novel antioxidants has anti-tumor effect rather, without attenuating the anti-cancer effect with the anti-cancer agent.

研究分野：医歯薬学

キーワード：乳がん 脱毛 腫瘍学

1. 研究開始当初の背景

(1) 学術的背景

リポ酸は生体内に元来備わっているビタミン様の物質であり、生体内エネルギー代謝、レドックス制御に重要な役割を果たしている。また、抗酸化作用、抗炎症作用といった多彩な作用をもつが、水に溶けにくく製剤として使えなかった。我々は、大分大学客員研究員の緒方一美博士との共同研究によって、

リポ酸誘導体 DHL-HisZn の合成に成功した後、その薬理作用について研究を行っている。

リポ酸誘導体 DHL-HisZn の第一の薬理作用は強力な抗酸化作用であり、活性酸素種 ROS ($\cdot\text{OH}$, 一重項酸素)、NO, HOCl 等を直接除去させる。DHL-HisZn はリポ酸 (ジヒドロリポ酸:DHL) の欠点である水溶性の低さ、時間経過で重合する、硫化水素を発生する等を改善させた化合物であり、リポ酸にアミノ酸を化合させ金属でキレートする事により、還元能を維持しつつ空気中でも安定な性質を有している。驚くべきことに、これまでの我々の培養細胞ならびに実験動物を用いた研究によって、DHL-HisZn は強い抗酸化作用 (活性酸素抑制効果) 以外にも、チロシナーゼ活性抑制作用、メラニン産生抑制効果、テストステロン-5 α -リダクターゼ阻害効果、機械的痛覚過敏モデルにおける鎮痛効果、肝、腎、心、脊髄において虚血再還流障害抑制効果ならびに抗がん剤による脱毛抑制効果を示すことを発見した。

(2) DHL-HisZnNa の脱毛治療への応用

我々は、これらの多くの作用のうちで、抗がん剤脱毛に対する抑制効果に着目し、脱毛予防剤への応用を目指している。これまでに、活性酸素種は毛包メラノサイトのアポトーシスと DNA 損傷を引き起こし、脱毛を誘発することが知られている。そこで我々は、抗がん剤脱毛に対するリポ酸誘導体 DHL-HisZn の効果をラットモデルを用いて検討した。生後 8 日目の Wistar ラットの腹腔内に抗がん剤 Ara-C を 7 日間連続投与すると全身の脱毛が誘発されるが、DHL-HisZn 投与群では Ara-C 誘発脱毛が明らかに抑制された。皮膚組織を組織学的に検討したところ、Ara-C 投与で生じる毛根組織の破壊が、明らかに抑制され、炎症反応も抑制されていた。脱毛のメカニズムは不明のことが多いが、毛根の破壊の抑制が確認されたことは、DHL-HisZn が抗がん剤による脱毛予防に有効であることを強く示唆している。今後、他の抗がん剤による脱毛にも効果があるのか、また脱毛予防に加えて脱毛してしまった後の投与で発毛に影響を及ぼすか否か (発毛効果) を検討する必要がある。

2. 研究の目的

本研究は、抗がん剤の副作用である脱毛の抑制を目標とした DHL-HisZn を製剤化するための基礎研究である。

3. 研究の方法

以下は研究計画時の構想である。達成度としては、当初の予定より遅れている。並行して行われている臨床試験に力を入れているためである。

(1) Ara-C 以外の抗がん剤による脱毛にも効果があるか?

生後 8 日の Wistar ラットに抗がん剤 (タキソール、シスプラチン、アドリアマイシン、マイトマイシン C、イリノテカン) を 15 mg/kg/day で 7 日間、腹腔内投与を行い脱毛を誘発する。また、治療群として、DHLHZN の腹腔内投与群 (100、10、1、0.1、0.01 mg/kg/day) と塗布群 (ワセリンを基剤とし、0、0.5、1、5、10%) を設定し、12 日間投与する。13 日目に犠死させ、治療効果判定を行うが、肉眼的脱毛の評価は、動物実験用 Score (Alopecia score) で比較するとともに、皮膚組織の摘出 (病理組織学的解析) を行う。また、DHLHZN の塗布群に関しては、背部全面塗布と背部片側塗布群、腹部全面塗布群に分け、DHLHZN の脱毛抑制効果が、全身性に及ぶのか、投与局所に限定するのかを詳細に検討する。

(2) 脱毛後投与での発毛効果の解明

各抗がん剤投与開始後、肉眼的脱毛が確認された時点 (Ara-C では、抗がん剤投与開始後 5~6 日目) と、脱毛がピークに達した時点 (Ara-C では、抗がん剤投与終了後 2~4 日目)、それぞれの時点から、DHLHZN の腹腔内投与、塗布による治療を開始し、12 日間の投与を行う。検討項目は、上記の方法に準じる。

(3) 脱毛予防効果メカニズムの解明

a) 抗がん剤投与後の毛根細胞のトランスクリプトーム解析とパスウェイ解析によるシグナル伝達解析

抗がん剤 (ラットにタキソール、シスプラチン、アドリアマイシン、マイトマイシン C、イリノテカ) 投与前後のラット皮膚組織から laser-captured microdissection (LCM) を用いて毛根細胞を切り取り、total RNA を抽出する。100ng の total RNA を用いて Agilent 社のマイクロアレイで解析する。

- ・ バイオアナライザー (Agilent 社製) を用いて抽出した RNA の質を評価。
- ・ microRNA labeling reagent and Hyb kit

を用いて microRNA をラベルし、ハイブリダイズする。アレイを wash 後、レーザー スキャナーでシグナルを検出する。

- GeneSpring GX ソフトウェア (Agilent) で発現プロファイルを作成し、抗がん剤投与により発現変化する RNA を検出する。
- 次に pathway 解析ソフトを用いて得られたトランスクリプトームデータからどのようなシグナル伝達経路が活性化あるいは消退化するのかを解析して、毛根細胞の障害に関わるシグナルを同定する。

b) Bio-Plex を用いたシグナル伝達経路の解析

上記と同様に抗がん剤投与前後のラット皮膚組織切片から毛根細胞を切り取り、蛋白を抽出する。抽出した蛋白質より、Bioplex を用いて、シグナル伝達に関わるシグナル分子のリン酸化レベルを網羅的に解析する。これによって各種抗がん剤による脱毛がどのようなシグナル伝達に依存しているのか、また、抗がん剤の種類により脱毛に関連したシグナルの伝達が違うか否かについて解明する。更に、DHLHzn 投与群の毛根細胞のシグナル変化を解析し、DHLHzn 投与による脱毛防止の可能性並びにメカニズムについて詳細に検討を行う。

c) アポトーシスに与える影響

毛母細胞、皮脂線細胞のアポトーシスの各段階に見られる現象を検出し、統合して解析することで、抗がん剤誘発性脱毛の時間経過に沿ったアポトーシスの Staging を行う。

- ごく初期段階に認められる細胞膜の変化を Annexin V binding assay を用いて測定。
- ミトコンドリア依存性アポトーシスの初期段階に見られるミトコンドリアの膜電位の変化を BD Mitoscreen Kit を用いて測定。
- アポトーシス初期に一貫して観察される活性型 Caspase-3 を測定。
- アポトーシス後期におけるエンドヌクレアーゼの活性化による DNA の断片化を、BD APO direct Kit を用いて、フローサイトメトリーで測定。

4. 研究成果

われわれはこれまでに新規 リポ酸誘導体 DHL-HisZnNa、新規ビタミン E 誘導体 ESeroS-GS、及び ETS-GS が動物実験において、抗がん剤誘発脱毛を抑制することを示した。また、これら新規抗酸化剤は、抗がん剤のもつ抗がん作用を減弱することなく、むしろ抗酸化剤が抗腫瘍効果を有することを明らかにした。

1. DHL-HisZnNa

- (1) ヒト乳がん細胞を用いた vitro の系で、DHL-HisZnNa はパクリタキセル(5-50 μ M)の抗腫瘍効果に影響せず
- (2) DHL-HisZnNa はヒト大腸がん HT-29 細胞、マウス皮下腫瘍モデルで細胞増殖抑制効果を示した (非アポトーシス性の細胞周期停止効果)

2. ESeroS-GS

- (1) ラット抗がん剤誘発脱毛モデルに DHL-HisZnNa を皮膚塗布した結果、脱毛が抑制された
- (2) ヒト胃がん細胞 (MKN45, MKN45P, MKN7, KatolIII) に対し濃度依存性に増殖抑制効果を示した
- (3) 正常細胞 (ヒト繊維芽細胞) へは作用せず

3. ETS-GS

- (1) 胃がん細胞 (MKN45P) に濃度依存性に増殖抑制効果を示した (図 1)。機序としては、Caspase3/7、3MA、電子顕微鏡所見の結果からオートファジーの関与が示唆されている) (図 2, 3)

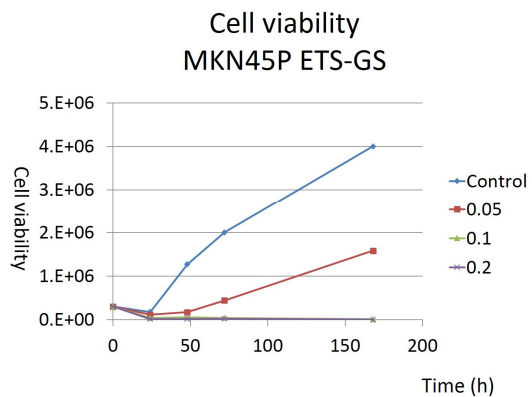


図 1 ETS-GS による胃がん細胞 MKN45P に対する細胞増殖抑制効果

Caspase 3/7活性 MKN45P ETS-GS

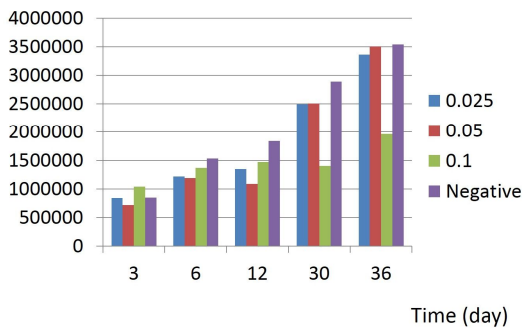


図2 ETS-GS 0.1mM では、Caspase 3/7の上昇は見られない。
非アポトーシス性の細胞死

3メチルアデニン添加 MKN45P ETS-GS

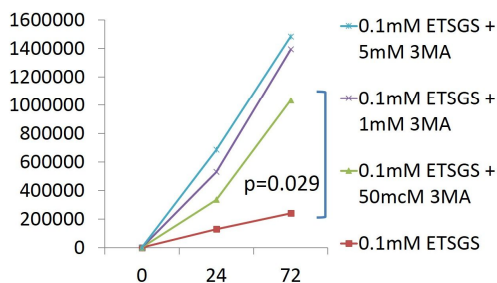


図3 いずれの3MAの濃度でも「ETS-GSによるMKN45Pの増殖抑制」が抑制されている

(2) 正常細胞（ヒト繊維芽細胞）へは作用せず

上記、動物実験、基礎研究のデータに加え、毒性試験等もパスしている。本製剤を使用した臨床試験は2013年に登録を開始し、順調に登録数が増え、2015年5月に予定の100名の登録を終了した。今後、経過観察を経てデータを解析し、結果を公表予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 9 件)

Shimode A, Inomata M, Anti-Glycation Activity of Alpha-Lipoic Acid Derivatives and Vitamin E Derivatives, ANTI AGING MEDICINE, 査読あり 10(3), 2014, 42-54

麻生 結子、古賀 寛教、河野 洋平、新規合成 α -リポ酸誘導体はチロシナーゼ活性を抑制しメラニン産生を低下させる, FRAGRANCE JOURNAL, 査読あり, 2, 2013, 1-4

Kawano Y, Ohta M, Eguchi H, Iwashita Y, Inomata M, Increased oxidative stress may lead to impaired adaptive cytoprotection in the gastric mucosa of portal hypertensive rat, J Gastroenterol Hepatol 査読あり, 28(4), 2013, 639-644

Hiratsuka T, Inomata M, Phototherapy with artificial light suppresses dextran sulfate sodium-induced colitis in a mouse model, J Gastroenterology and Hepatology, 査読あり, 29(4), 2014, 749-56

Sugita S, Inomata M, Kono Y, Effect of the new synthetic vitamin E derivative ETS-GS on radiation enterocolitis symptoms in a rat model, Oncol Lett, 査読あり, 6(5), 2013, 1229-1233

Hiratsuka T, Inomata M, Kono Y, DHL-TauZnNa, a newly synthesized α -lipoic acid derivative, induces autophagy in human colorectal cancer cells, Oncol Rep, 査読あり, 29(6), 2013, 2140-6

Hiratsuka T, Inomata M, Hagiwara S, Kono Y, Bolus injection of newly synthesized vitamin E derivative ETS-GS for the treatment of acute severe ulcerative colitis in a mouse model. New vitamin E derivative for acute severe UC, Int J Colorectal Dis, 28(3), 2013, 305-11

Kono Y, Inomata M, A newly synthetic vitamin E derivative, E-Ant-S-GS, attenuates lung injury caused by cecal ligation and puncture-induced sepsis in rats, Surgery, 査読あり, 151(3), 2012, 420-426

Kono Y, Inomata M, Antiproliferative effects of a new α -lipoic acid derivative, DHL-HisZnNa, in HT29 human colon cancer cells in vitro, Expert Opinion On Therapeutic Targets, 査読あり, 16(S1), 2012, S103-109

〔学会発表〕(計 11 件)

徳丸 治、水溶性 リポ酸誘導体 DHL-His.Zn のラジカル除去能：ESR による検討、第 4 回 癌、炎症と抗酸化研究会、2013 年 11 月 16 日、別府湾ロイヤルホテル (大分県速見郡)

若山 愛海、水溶性 リポ酸誘導体 DHL-Tau.Zn のラジカル除去能：ESR による検討、第 4 回 癌、炎症と抗酸化研究会、2013 年 11 月 16 日、別府湾ロイヤルホテル (大分県速見郡)

Li-Wen Hsu, Therapeutic Potential of α -Lipoic Acid Derivative DHL-HisZn in Allergy、第 4 回 癌、炎症と抗酸化研究会、2013 年 11 月 16 日、別府湾ロイヤルホテル (大分県速見郡)

杉田 諭、中嶋 健太郎、平塚 孝宏、猪股 雅史、リポ酸誘導体 DHLHZn はラットのオキサリプラチン誘導末梢神経障害を改善する、第 113 回日本外科学会定期学術集会

2013.4.11-13 福岡国際会議場 (福岡県福岡市)

杉田 諭、放射線性腸炎に対する新規ビタミン E 誘導体を用いた新しい治療の開発 放射線照射モデルにおける有効性、消化器疾患セミナー 2013.4.26 大分県医師会館 (大分県大分市)

Nakajima K, Inomata M, Kono Y, New antioxidants, the vitamin E derivatives, improve anti-cancer drug-induced alopecia and inhibit various kinds of cancer growth, 7th World Congress for Hair Research 2013.5.4-6 Edinburgh (U.K.)

Inomata M, Nakajima K, Kono Y, The α -lipoic acid derivative, sodium zinc

dihydrolipoylhistidinate(DHLHZn), reduces chemotherapy-induced alopecia in a rat model and inhibit various kinds of cancer growth, 7th World Congress for Hair Research 2013.5.4-6 Edinburgh (U.K.)

杉田 諭、中嶋 健太郎、平塚 孝宏、猪股 雅史、新規抗酸化剤は抗癌剤誘発脱毛を予防する！頭皮の創傷治癒メカニズムに迫る 第 43 回日本創傷治癒学会 2013.11.14-15 別府湾ロイヤルホテル (大分県速見郡)

圓福 真一郎、平塚 孝宏、中嶋 健太郎、猪股 雅史、Dextran sulfate sodium (DSS) 誘発性大腸炎モデルマウスに対する光線療法の有用性、第

43 回日本創傷治癒学会

2013.11.14-15 別府湾ロイヤルホテル (大分県速見郡)

平塚 孝宏、猪股 雅史、デキストラン硫酸ナトリウム大腸炎に対する光線照射の治療効果 炎症性腸疾患に対する光線を用いた新規治療法の開発 第 3 回癌・炎症と リポ酸研究会プログラム 2012 年 11 月 10 日 ゆふいん山水館 (大分県由布市)

杉田 諭、中嶋 健太郎、平塚 孝宏、猪股 雅史、新規 リポ酸誘導体 DHLHZn のオキサリプラチン誘導末梢神経障害に対する抑制効果；ラットモデルにおける検討、第 42 回日本創傷治癒学会 2012 年 12 月 3 日 道民活動センタービル (北海道札幌市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中嶋 健太郎 (NAKAJIMA, Kentaro)

大分大学・医学部・医員

研究者番号：10625255

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

猪股 雅史 (INOMATA, Masafumi)
大分大学・医学部・教授
研究者番号：60315330

河野 洋平 (KONO, Yohei)
豊後大野市民病院・外科
研究者番号：90572008

平塚 孝宏 (HIRATSUKA, Takahiro)
大分大学・医学部・病院特任助教
研究者番号：20600886

杉田 諭 (SUGITA, Satoshi)
大分医療センター・外科
研究者番号：20625470

麻生 結子 (ASO, Yuiko)
大分大学・医学部・研究員
研究者番号：60635358