

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：32206

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460232

研究課題名(和文) 起壊死性抗がん剤の皮膚傷害メカニズムの解明と臨床ケアの確立

研究課題名(英文) Elicitation of skin injury mechanism vesicant anticancer agents and establishment of clinical care

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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：起壊死性抗がん剤である微小管機能阻害薬の血管外漏出によりしばしば認められる重篤な皮膚傷害のメカニズムを明らかにし、皮膚傷害の適切な予防とケアについて検討した。ヒト由来の培養細胞を用いた研究により、曝露初期から認められる急性期の細胞傷害には、酸化ストレスと微小管の断片化による細胞骨格の崩壊が関与すると考えられた。冷罨法(23℃)に相当する培養条件下では細胞傷害性は有意に抑制された。副腎皮質ホルモン剤を添加することによりIL-6の発現が抑えられ炎症反応の抑制が期待されるが、ステロイド剤そのものにも細胞傷害性が出現するため、適正な用量のコントロールが必要であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We clarified the mechanism of severe skin injury which is frequently observed by extravasation of microtubule function inhibitors, which are vesicant anticancer agents, and investigated appropriate prevention and care of skin disorder. Studies using cultured cells derived from human were thought to involve oxidative stress and collapse of cytoskeleton due to microtubule fragmentation in acute phase cell injury observed from the early stage of exposure. Cytotoxicity was significantly suppressed under the culture conditions corresponding to the cold compress (23℃). Adding an adrenocortical hormone agent suppresses the expression of IL-6 and is expected to suppress the inflammatory response, but cytotoxicity also appears in the steroid agent itself, so it is necessary to control the proper dose should be used.

研究分野：医療系薬学

キーワード：起壊死性抗がん剤 皮膚障害 罨法 酸化ストレス ヒートショックプロテイン 細胞骨格 アポトーシス 微小管機能阻害薬

1. 研究開始当初の背景

現在の我が国における薬物治療は高度化及び多様化の一途をたどっており、特に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の発生頻度は0.5~6.5%との報告もあり(引用文献1)、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、新たに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、ピ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。血管外漏出による皮膚障害を引き起こす要因については、薬液のpHや浸透圧、薬剤の持つ特性などに依存すると言われているが、病態学的に検証した研究報告はなく、科学的根拠の裏付けがない状態で、経験の中で継承的にケアを実施している。さらには、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る。起壊死性抗がん剤の皮膚傷害メカニズムを明らかにすることは、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。

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)、およびピ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。

(1)起壊死性抗がん剤による細胞傷害性のメカニズムと経時的变化: SF-TY細胞にPTX、DOC、VNRの臨床用薬液とその10、100倍希釈溶液を経時的に48時間まで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24時間曝露し、細胞を回収して超音波破碎し、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。微小管機能阻害薬の臨床用薬液とその希釈溶液を0~96時間まで経時的に曝露し、アポトーシスの指標であるDNA断片化を、ELISA法を用いて定量した。VNRの臨床用薬液の10倍、20倍希釈溶液を10、30分および1、4、8、24時間曝露し、 α -チューブリンの免疫染色を実施した。

(2)タキサン系抗がん剤における主薬と添加剤による細胞傷害メカニズム:SF-TYにPTX、DOC、及びそれぞれの添加剤であるポリオキシエチレンヒマシ油+エタノール、ポリソルベート80+エタノールのみを含む薬液を72時間まで経時的に曝露した。また、HUV-EC-C細胞には2時間曝露した。

(3)起壊死性抗がん剤の血管外漏出による細胞傷害性及び電法の効果: HepG2細胞を用いて、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℃での細胞培養系をカルチャーパルC02を用いて確立し、それぞれの条件下で微小管機能阻害薬の臨床用薬液とその希釈溶液を24時間曝露し細胞傷害性を比較した。それぞれの温度条件下において、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の定量を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。

(4)ビノレルピンによる皮膚傷害に対する副腎皮質ホルモン剤の抑制効果: ヒト皮膚線維芽細胞(SF-TY細胞)に、副腎皮質ホルモン剤である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。

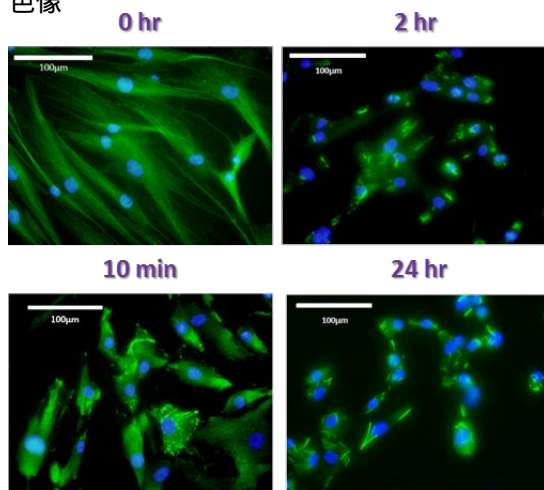
ヒト肝がん細胞であるHepG2細胞に、VNRと同時にHDCの臨床用薬液の10、000倍希釈溶液を24時間曝露し、細胞内マロンジアルデヒド(MDA)濃度を定量した。

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経時的变化: 抗がん剤曝露により、曝露初期より強い細胞傷害性を示すと共に、回復後24時間以降に遅発性の細胞傷害遅発性の細胞傷害性が認められた。対照群に対して、抗がん剤曝露群では、いずれも有

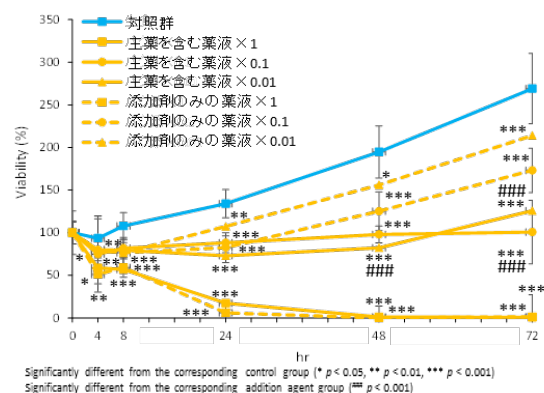
意な MDA 値の上昇が認められた。同時に生体内抗酸化物質であるカタラーゼ、グルタチオン、メタロチオネインの産生も増加したため、起壊死性抗がん剤の細胞傷害性のメカニズムの一つとして、酸化的ストレスの関与が示唆された。いずれの抗がん剤においても曝露 48 時間後にアポトーシスが増加し、遅発性細胞傷害には抗がん剤の薬理作用が関与することが明らかとなった。微小管機能阻害薬の曝露により、微小管の断片化と細胞死が認められた。VNR では曝露直後より微小管の断片化がみられ、曝露 10 分で対照群の約 1/70 の長さであった。VNR 曝露直後より微小管の断裂および細胞骨格の崩壊が始まることから (図 1) VNR の薬理作用が初期の細胞傷害性に関与することが示唆された。

図 1 VNR 曝露後の α -チューブリンの免疫染色像



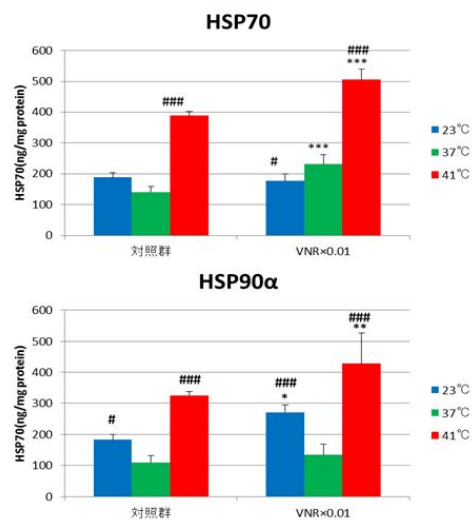
(2) タキサン系抗がん剤における主薬と添加剤による細胞傷害メカニズム：タキサン系抗がん剤は水に難溶性であるため、注射用水に刺激性の添加剤が含まれている。添加剤のみの薬液の曝露でも、曝露 24 時間後以内に細胞傷害率が約 80%に達したため、PTX 及び DOC の血管外漏出において、急性期の細胞傷害にはこれらに含まれる添加剤の関与が大きいことが示唆された。一方で、主薬を含む製剤では細胞毒性が長時間持続することから、遅発性の細胞傷害における添加剤の関与は低いことが示された (図 2: PTX の例)。

図 2



Significantly different from the corresponding control group (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)
Significantly different from the corresponding addition agent group (### $p < 0.001$)

HUV-EC-C 細胞においても曝露 2 時間で同様の結果が得られたため、これらの抗がん剤は、投与ミス等による血管外漏出が無い場合でも、血管内皮に傷害を与えることにより、血管外漏出を引き起こす可能性が示唆された。(3) 起壊死性抗がん剤の血管外漏出による細胞傷害性及び毒法の効果：タキサン系ならびにビンカルカロイド (VNR) による細胞傷害性は、いずれの曝露濃度においても 23 の培養条件下では有意な抑制が認められた。一方、41 の培養条件下では、臨床用量では細胞傷害性の悪化が認められ、100 倍希釈以上の濃度では細胞傷害抑制効果が得られた。HSP70、HSP90 とともに温度変化により産生が増加し、特に 41 培養条件で顕著な増加が認められた。また、VNR を曝露することによってその傾向はさらに顕著となった (図 3) 図 3



significantly different from the corresponding control group (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)
significantly different from the corresponding 37°C group (# $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$)

HSP70 または HSP90 の阻害剤を添加することによって 41 における 100 倍希釈 VNR 曝露時の細胞傷害抑制作用が消失したことより、同条件下の細胞保護作用には HSP が関与することが示唆された。

(4) ビノレルピンによる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 ~ 100 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。そして、HDC の半数致死濃度 (LC50) は、臨床用薬液の約 1/20 の濃度であり、臨床用薬液の 100 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。HDC の臨床用薬液濃度の 10,000 ~ 10,000,000 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。このとき、VNR による IL-6 濃度の増加は、HDC の臨床用薬液濃度の 10 ~ 100,000 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 の臨床用薬液の 10,000 倍希釈溶液により、コントロールレベルまで有意に抑制された。HDC の極めて低濃度では、細胞傷害性を示さずに

IL-6 の放出や MDA 増加を抑制した。

以上の結果より、起壊死性抗がん剤の血管外漏出時の細胞傷害メカニズムには、脂質過酸化による酸化ストレスと細胞骨格の崩壊が関与することが示唆された。また、タキサン系抗がん剤に含まれる刺激性の強い添加剤のみでも酸化ストレスによる初期の細胞傷害性が誘発されることが示唆された。また、漏出後 24 時間以降の遅発性細胞傷害には抗がん剤の薬理作用に起因したアポトーシスが関連すると考えられた。冷電法の条件における抗がん剤の曝露実験では、臨床薬液濃度曝露を含むいずれの濃度でも細胞傷害抑制効果があることから、臨床でのケアには冷電法が有効であることが示唆された。漏出薬液が希釈され、臨床用薬液の 100 倍希釈以上の場合には温電法も効果があると考えられるが、この時の細胞保護作用には HSPs の分子種が関与することが示唆された。起壊死性抗がん剤の血管外漏出後に認められる局所炎症や壊死性変化には、炎症性サイトカインである IL(インターロイキン)-6 及び 8 が深く関与していると考えられており、炎症初期の重要なメディエーターとして知られている。適切な濃度の HDC では IL-6 の発現が抑制されることから、抗がん剤の血管外漏出時のケアに有効であると考えられるが、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極度に高濃度である可能性が示唆され、現行よりも低濃度へと見直す必要性が考えられた。

〔引用論文〕

1) 渡辺他:がん診療レジデントマニュアル、医学書院、322-326、2005.

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 0 件)

〔学会発表〕(計 27 件)

- (1)藤田康介、山室愛子、花田彩香、武田利明、高石雅樹、浅野哲:ピノレルピンによる皮膚傷害に対する HSP70 の細胞傷害抑制作用への関与。第 137 回日本薬学会大会、仙台、2017
- (2)原あや乃、武田利明、高石雅樹、浅野哲:皮膚傷害メカニズムに対するピノレルピンの微小管重合阻害作用の関与。第 137 回日本薬学会大会、仙台、2017
- (3)日浦綾菜、田村雄志、山室愛子、花田彩香、武田利明、高石雅樹、浅野哲: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。第 137 回日本薬学会大会、仙台、2017
- (4)浅野哲: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。第 6 回国際医療福祉大学学会学術大会、栃木、2016
- (5)高石雅樹、築瀬詩織、小島佳奈、武田

利明、浅野哲:注射用全身麻酔剤の血管外漏出が引き起こす皮膚障害における細胞傷害メカニズム。第 43 回日本毒性学会学術年会、名古屋、2016

(6)高石雅樹、井上大輝、小杉山迪子、菊地隆真、武田利明、浅野哲:タキサン系抗がん剤における皮膚障害に対する添加剤の関与。第 43 回日本毒性学会学術年会、名古屋、2016

(7)井上大輝、菊地隆真、花田彩香、武田利明、高石雅樹、浅野哲:タキサン系抗がん剤における主薬と添加剤による細胞傷害メカニズム。第 136 回日本薬学会大会、横浜、2016 年 3 月 27 日(日本薬学会年会要旨集(CD-ROM)、2016)

(8)山室愛子、小島佳奈、花田彩香、武田利明、高石雅樹、浅野哲:ピノレルピンによる細胞傷害に対する HSPs の細胞保護作用。第 136 回日本薬学会大会、横浜、2016

(9)田村雄志、山室愛子、井上大輝、武田利明、高石雅樹、浅野哲:微小管機能阻害薬の細胞傷害における IL-6 の放出と副腎皮質ホルモン剤による効果。第 136 回日本薬学会大会、横浜、2016

(10)浅野哲、高石雅樹:起壊死性抗がん剤(ピノレルピン)の皮膚傷害に対するヒートショックプロテインの影響。第 5 回国際医療福祉大学学会学術大会、栃木、2015

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)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

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

武田 利明(TAKEDA、Toshiaki)
岩手県立大学・看護学部・教授
研究者番号:40305248

(4)研究協力者

高石 雅樹(TAKAISHI、Masaki)
国際医療福祉大学・薬学部・講師