

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：17102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06477

研究課題名(和文) 上皮成長因子受容体阻害薬によるざ瘡様発疹における芳香族炭化水素受容体の活性化

研究課題名(英文) Activation of aryl hydrocarbon receptor-nuclear factor erythroid 2-related factor 2 axis by epidermal growth factor receptor inhibitors: a possible mechanism for acneiform eruption

研究代表者

辻 学 (Tsuji, Gaku)

九州大学・大学病院・講師

研究者番号：20423551

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,800,000円

研究成果の概要(和文)：上皮成長因子受容体阻害薬(Epidermal growth factor receptor inhibitors: EGFRIs)はがんの治療に有効であるが、副反応としてざ瘡様発疹症を来し、EGFRIsの投与を中断せざるを得ない場合がある。ざ瘡様発疹症の機序については不明点が多く、我々はaryl hydrocarbon receptor (AhR)とnuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2)の活性化がこの機序に関与していないかを研究した。EGFRIsはAhR-Nrf2の活性化をより強力に誘導し、ざ瘡様発疹症を発症する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Epidermal growth factor receptor inhibitors (EGFRIs) in the treatment for carcinomas cause acneiform eruption; however, its mechanism remains unknown. Because activation of aryl hydrocarbon receptor (AhR)-nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) axis regulates keratinocyte differentiation and sebaceous gland activity, we hypothesized that activation of AhR-Nrf2 axis by EGFRIs might be involved in the development of acneiform eruption. We administrated gefitinib (GEF) to normal human epidermal keratinocytes (NHEKs) and SEB-1 cells, a human sebocyte cell line. GEF induced up-regulation of CYP1A1 expression in NHEKs and SEB-1 cells, which was enhanced by 6-formylindolo (3,2-b) carbazole (FICZ), an AhR ligand. GEF induced up-regulation of Nrf2 in NHEKs and production of sebum in SEB-1 cells, which was enhanced by FICZ. Collectively, acceleration of AhR-Nrf2 axis and sebaceous lipogenesis by EGFRIs may be important during acneiform eruption.

研究分野：皮膚科学

キーワード：芳香族炭化水素受容体

1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍の治療において、腫瘍細胞の増殖・浸潤に關与する分子の活性化を抑える分子標的治療薬は、現在、薬物治療において標準的な治療になりつつある。分子標的治療薬の投与によって一定期間の悪性腫瘍の病勢のコントロールが得られるようになる一方で、分子標的治療薬に特有な有害事象が報告されている。皮膚科の診療においては、分子標的治療薬に伴う皮膚障害を診察する機会が数多く、その皮膚障害の程度によっては治療を中断せざるを得ず、また患者の QOL (Quality of Life) が著しく低下させてしまうケースも少なくない。

悪性腫瘍に多く発現する上皮成長因子受容体 (Epidermal Growth Factor Receptor : EGFR) の活性化は腫瘍細胞の増殖・浸潤を促進することから、この EGFR を阻害する EGFR 阻害薬 (低分子化合物・抗 EGFR 抗体) は、現在では、肺がん (小細胞癌以外のもの) (Herbst RS, et al., Nat Rev Cancer. 2004 4:956-65)、膵臓がん、大腸がん、頭頸部がんの治療においてよく用いられる分子標的治療薬の 1 つである。この EGFR 阻害薬による皮膚の有害事象は数多く報告されており、その多くの程度はグレード 1-2 であるが、中にはグレード 3 以上のものも報告されている。また、皮膚への影響が強ければ強いほど、EGFR 阻害薬の悪性腫瘍に対する治療効果も高い可能性が指摘されており (Wacker B et al., Clin Cancer Res. 2007 13:3913-21.)、EGFR 阻害薬による皮膚の有害事象のコントロールは、EGFR 阻害薬を用いた治療の中で今後ますます重要になると考えられる。

EGFR 阻害薬による皮膚の有害事象としては、特徴的なものとして、皮膚の乾燥 (乾燥肌)、爪の周りの炎症 (爪囲炎)、ニキビ様の発疹 (ざ瘡様発疹) の 3 つが挙げられる。EGFR は皮膚の主要な構成細胞である表皮細胞にも発現し、EGFR 阻害薬によって正常な表皮細胞

の成長も妨げられる。そのため、表皮細胞の成長に障害を来たした場合には、皮膚のバリア機能が低下することで、乾燥肌になることが考えられている。また、爪下の表皮細胞に障害を来たした場合には、爪の成長が遅れ、さらに傷の治りが遅くなることで、爪囲炎を来す機序が考えられている。ざ瘡様発疹の発症の機序については、表皮細胞に加えて皮脂を産生する脂腺細胞が EGFR の阻害によって何らかの影響を受けていると考えられているが、その詳細な機序については不明な点が多い。また、治療としてステロイド外用が推奨されているが、ステロイド外用の副作用としてざ瘡を生じることが知られており、その治療に難渋する症例も少なくない。申請者の所属する研究室では、EGFR 阻害薬による皮脂の増加が、ざ瘡様発疹の発症に關与することを臨床研究で明らかにした (Nakahara T, et al., Onco Targets Ther. 2015 Jan 28; 8:259-63)。そこで、申請者は EGFR 阻害薬が表皮細胞・脂腺細胞にどのように作用するのか、またどのような機序で皮脂を増加させ、最終的にざ瘡様発疹の発症となるのかについての機序を解明したいと考えている。さらに、得られた知見に基づき、EGFR 阻害薬によるざ瘡様発疹の治療法を確立したいと考えている。

2. 研究の目的

申請者は、表皮細胞における芳香族炭化水素受容体 (aryl hydrocarbon receptor: AhR) と転写因子である Nrf2 (Nuclear factor erythroid-derived 2-like 2) の機能について研究を進めており、AhR を介した Nrf2 の活性化が皮膚の炎症の制御において重要な働きをすることを報告した (Tsuji G et al., J Invest Dermatol. 2012 132:59-68)。AhR はダイオキシンに対する受容体として同定された受容体であり、テトラクロロジベンゾジオキシン (tetrachlorodibenzodioxin: TCDD) やポリ塩化ビフェニル (polychlorinated

biphenyl: PCB) といったダイオキシン類の中毒による AhR の活性化は、脂腺における皮脂の増加を来し、塩素ざ瘡という特徴的なざ瘡を来することが報告されている。この機序に関しては、AhR の活性化とともに Nrf2 の活性化によって毛包(毛穴)が開大し、面皰を形成することが発症に深く関与することが報告されている(Schäfer M et al., EMBO Mol Med. 2014 6:442-57)。また、最近の報告では、AhR と EGFR はともに核内の共因子である p300 タンパクを介して標的遺伝子の発現の調節を行うため、EGFR の活性化と AhR の活性化は競合することが明らかにされている(Sutter CH et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 111:4266-71)。そこで、申請者は、EGFR 阻害薬は AhR の活性化を強めることで、皮脂の産生を増加させ、さらに Nrf2 の活性化することにより毛包が開大し、最終的にざ瘡様発疹を発症するのではないかと予想している。現在、生体内に存在し AhR を活性化する物質として、必須アミノ酸であるトリプトファンが分解されることで生成される FICZ(6-Formylindolo(3,2-b)carbazole) が同定されている。この FICZ は紫外線によって細胞内のトリプトファンが分解されることでも生じるが、皮膚の常在菌であるマラセチア属という真菌も産生することが報告されている(Furue M et al., Arch Dermatol Res. 2014 306:769-79)。EGFR 阻害薬によるざ瘡様発疹が顔面という紫外線に暴露される部位に多いことや、マラセチアはざ瘡の原因菌の1つである(代表的疾患としてマラセチア毛包炎がある)ことに着目し、FICZ によって AhR が活性化された皮膚の細胞(表皮細胞及び脂腺細胞)を用いて、EGFR 阻害薬が AhR を介した皮脂の産生と Nrf2 の活性化を増強するかどうかを今回の研究期間内に明らかにしたい。

3. 研究の方法

表皮細胞及び脂腺細胞の AhR-Nrf2 シグナル

の活性化を評価するため、ヒト培養表皮細胞 Normal human epidermal keratinocyte: NHEK) とヒト脂腺細胞株(SEB-1)を用いて実験を行う。AhR を FICZ によって刺激し、NHEK 及び SEB-1 における AhR-Nrf2 シグナルが活性化されるか、さらに EGFR 阻害薬(ゲフィチニブ、エルロニチブ、EGFR に対する中和抗体)によってこの AhR-Nrf2 シグナルが増強するかを検討する。また、SEB-1 細胞において FICZ による AhR の刺激が皮脂の増加を来すかを検討し、さらに EGFR 阻害薬によって皮脂の産生がさらに増加するかを検討する。さらに、NHEK 及び SEB-1 における AhR-Nrf2 シグナルが EGFR 阻害薬によって増強された場合には、毛包の開大と面皰の形成を促進する遺伝子である small proline-rich protein 2 (Sprr2d)、secretory leukocyte peptidase inhibitor (Slpi)の発現が増加するかを検討する。AhR-Nrf2 シグナル依存性であるかは siRNA(small interfering RNA)トランスフェクションを用いて選択的に AhR または Nrf2 の発現を低下させ、検討を行う。

4. 研究成果

【EGFR 阻害薬による NHEK 及び SEB-1 における AhR シグナル活性化への影響】

AhR は定常状態では細胞質に存在し、活性化すると核内へ移行し、標的遺伝子である CYP1A1 を誘導する。そこで、NHEK 及び SEB-1 に FICZ(10 nM-1 µM)を投与し、抗 AhR 抗体を用いた免疫蛍光染色で AhR の細胞内局在を調べ、AhR の核内移行を確認した。また、CYP1A1 の発現をリアルタイム PCR 及びウェスタンブロットで mRNA・タンパクレベルで評価した。さらに、EGFR 阻害薬を併用した場合に、CYP1A1 の発現が増強されるか、mRNA・タンパクレベルで評価した。EGFR 阻害薬によって FICZ 誘導性の CYP1A1 の発現の増強が認められた。

さらに、EGFR 受容体阻害薬による皮脂の増加に AhR シグナルの活性化は関与するかについ

て研究を行った。
SEB-1 に対して、FICZ の投与を行い、AhR シグナルの活性化により皮脂の増加を来すか、Oil O Red を用いて細胞内脂質を染色して評価した。また EGFR 阻害薬を用いた場合に、FICZ による皮脂の産生がさらに増加するかを検討した。この現象が AhR を介しているか検証するため、siRNA トランスフェクションにより AhR の発現が低下した SEB-1 を用いた。FICZ によって皮脂の産生が増加し、AhR が低下した状態では FICZ によって皮脂の産生が増加しないこと、また EGFR 阻害薬によって皮脂の産生が増加しないことを確認した。

【EGFR 受容体阻害薬による AhR-Nrf2 シグナルの活性化への影響】

申請者は NHEK において抗真菌薬であるケトコナゾール(ketoconazole:KCZ)が AhR を介して Nrf2 シグナル (AhR-Nrf2) を活性化することを報告し、KCZ による Nrf2 の活性化には AhR が必須であることが明らかとなっている (Tsuiji G et al., J Invest Dermatol. 2012 132:59-68)。そこで EGFR 阻害薬が AhR を介して Nrf2 シグナルも活性化するかを検討した。

Nrf2 も AhR 同様に定常状態では細胞質に存在し、活性化されると核内へ移行し、下流の標的遺伝子である解毒系酵素 (quinone oxidoreductase 1: Nqo1) を誘導する。そこで、NHEK 及び SEB-1 に FICZ を投与し、免疫蛍光染色で Nrf2 の核内移行を確認した。また、Nrf2・Nqo1 の誘導をリアルタイム PCR 及びウェスタンブロットで mRNA・タンパクレベルで評価した。さらに、FICZ と EGFR 阻害薬を併用した場合に、Nrf2 及び Nqo1 の発現が増強されるか、mRNA・タンパクレベルで評価した。この現象が EGFR 阻害薬による AhR シグナルの増強によるものかを確かめるために siRNA トランスフェクションにより AhR の発現が低下した NHEK 及び SEB-1 を用いた。AhR の発現が低下していると EGFR 阻害薬によ

る FICZ 誘導性の Nrf2 及び Nqo1 の発現増強は認められないことを確認した。

さらに、Nrf2 シグナル活性化によって毛包が開大し、面皰を形成する変化を来すかを検討した。

これまでに AhR を介して Nrf2 が活性化されると Nrf2 の標的遺伝子として、small proline-rich protein 2 (Sprr2d)、secretory leukocyte peptidase inhibitor (Slpi)、epigen (Epgn) の発現が増加することが報告されている。Sprr2d の増加は、毛包表皮の肥厚、脂腺組織の増生、Sprr2d の増加は毛包表皮の過度の角化を来すことから、これらの変化によって毛包が開大し、面皰を形成する可能性が示唆されている (Schäfer M et al., EMBO Mol Med. 2014 6:442-57)。EGFR 阻害薬が AhR シグナルを増強し、Nrf2 シグナルを活性化することが明らかとなったため、FICZ によって NHEK 及び SEB-1 における Sprr2d、Slpi の発現が上昇するかとともに、EGFR 阻害薬によって Sprr2d、Slpi の発現がさらに増強されるかを検討し、これらが増強されることを確認した。

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 3 件)(全て査読あり)

Palladium and platinum nanoparticles activate AHR and NRF2 in human keratinocytes-implications in vitiligo therapy.

Tsuiji G, Hachiya A, Takemura M, Kanemaru T, Ichihashi M, Furue M
J Invest Dermatol. (in press)

Potential role of the OVOL1-OVOL2 axis and c-Myc in the progression of cutaneous squamous cell carcinoma.

Ito T, Tsuji G, Ohno F, Nakahara T, Uchi H, and Furue M. Modern Pathology 2016 (in press)

Activation of the OVOL1-OVOL2 Axis in the Hair Bulb and in Pilomatricoma.

Ito T, Tsuji G, Ohno F, Uchi H, Nakahara T, Hashimoto-Hachiya A, Yoshida Y, Yamamoto O, Oda Y, Furue M. Am J Pathol. 2016 Apr;186(4):1036-43.

[学会発表](計2件)

Gaku Tsuji, Akiko Hachiya, Mari Oda, Masaki Takemura, Takeshi Nakahara, Hiroshi Uchi, and Masutaka Furue AHR regulates FLG expression via OVOL1 in human keratinocytes: A plausible relationship between FLG and OVOL1 in atopic dermatitis. Asia-Pacific Combined Dermatology Research Conference 2016 2016, 8/25-28, Noosa, Queensland, Australia

Gaku Tsuji, Takeshi Nakahara, Hiroshi Uchi, Chikage Mitoma and Masutaka Furue. Activation of aryl hydrocarbon receptor-nuclear factor erythroid 2-related factor 2 axis by epidermal growth factor receptor inhibitors: a possible mechanism for acneiform eruption. 45TH ANNUAL ESDR MEETING. 2015/9/9-12, ROTTERDAM, THE NETHERLANDS

[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:

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 辻 学(Tsuji Gaku)
九州大学・大学病院・講師

研究者番号: 20423551

(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

()