

令和元年5月16日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19452

研究課題名(和文) EGFR-TKIによる皮膚障害機構の解明と克服

研究課題名(英文) Adapalene abrogates erlotinib-induced skin disorder by regulating proinflammatory cytokine production from human epidermal cells

研究代表者

田村 大介 (TAMURA, Daisuke)

神戸大学・医学部附属病院・非常勤講師

研究者番号：80646597

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、エルロチニブ誘導性の皮膚障害に対するアダパレンの治療効果および作用メカニズムを明らかにすることである。エルロチニブによる皮膚障害はエルロチニブとTNF、IL1およびHaCaT細胞を使って再現した。まずエルロチニブを投与した時のサイトカインの変化として、CCL2、CCL27およびIL8の有意な発現上昇が見られた(P<0.05)。次にエルロチニブ誘導性のI κ Bとp65のリン酸化はアダパレンにより抑制された。また、NF κ Bを阻害するRARの発現がアダパレンにより増加していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

EGFRチロシンキナーゼ阻害剤による皮膚毒性は頻度が高く、EGFRチロシンキナーゼ阻害剤の中止理由としても重要な有害事象の一つであるが、現在のところ、有効な治療法が少ない。本研究により、アダパレンの皮膚障害に対する有効性が明らかとなり、EGFRチロシンキナーゼが奏功しているものの、皮膚障害のために減量または中止せざるを得ない患者に対して大きな福音となり、生存率の改善に寄与することが期待される。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to elucidate the functional mechanism of adapalene in erlotinib-induced skin disorder. Erlotinib-induced skin toxicity was experimentally introduced into human skin keratinocyte (HaCaT) by using erlotinib with TNF and IL1. Effects of adapalene on the production of proinflammatory cytokine were analyzed by qRT-PCR. Effects of adapalene on the NF κ B signaling pathway were analyzed by using a western blot. Effects of epithelial repair function of adapalene were analyzed by wound healing assay. The mRNA levels of proinflammatory cytokines such as CCL2, CCL27, and IL8 in HaCaT were significantly suppressed by adapalene (P<0.05). Western blot suggested that erlotinib-induced phosphorylation of I κ B and p65 were decreased by adapalene. The expression of RAR which inhibits NF κ B pathway was increased by adapalene. In conclusion, these suggest that adapalene may be a possible candidate for the treatment of skin disorder induced by EGFR-TKI.

研究分野：呼吸器内科

キーワード：アダパレン エルロチニブ 非小細胞肺癌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 上皮成長因子受容体チロシンキナーゼ阻害剤 (EGFR TKI) と皮膚障害

肺がんは本邦でのがん関連死の第一位の原因であり、その克服は世界的に大きな課題となっている。非小細胞肺がんの治療においては、2009年にEGFR TKIがEGFR遺伝子に変異を有する非小細胞肺がんに劇的な効果をもたらすことが示されてから、治療法に大きな進展がみられた。しかし、EGFR TKIでは従来の殺細胞性抗がん剤と異なる有害事象が報告されており、その使用の障害や使用患者におけるQOL(Quolity of Life)を大きく損なうことになっている。EGFR TKI使用に伴う有害事象としては、皮膚障害、下痢、倦怠感、嘔気、肝障害があげられるが、なかでも皮膚障害の頻度は最も多く、EGFR TKIを使用した非小細胞肺がん患者の3分の2以上で認められるとされている。EGFR TKI使用に伴う皮膚障害は致死的なものではないが、皮膚障害は毒性に伴うEGFR-TKI使用中断の最も大きな理由となっており(Cancer. 116:3916-3923,2010)。その制御はEGFR TKI使用における最大の課題のひとつである。しかし、EGFR TKIの皮膚障害に対する治療法は、現在のところ確立したものはない。ステロイド剤の外用、免疫抑制剤の外用、局所麻酔、免疫抑制剤の全身投与などが試みられているが、いままでのところ十分なエビデンスは得られていない。

(2) アダパレンによる皮膚障害の改善

我々は、ステロイド軟膏の外用などでもコントロールできなかったEGFR TKIで生じた皮膚障害に対してアダパレン(ディフェリンゲル)を用いることで改善を認めた症例を経験した。アダパレンは本邦では尋常性ざ瘡に対する使用が認可されており、EGFR TKI誘導性の皮膚障害でざ瘡をきたすものに対しては使用が可能である。アダパレンの作用機序としてレチノイン酸受容体(RAR)に結合し、遺伝子転写促進を誘導することによりレチノイド様作用を示すことが知られている。EGFR受容体抗体薬の使用により生じる皮膚障害に対してレチノイン酸の内服が奏功を示すという報告がなされている(Acta Derm Venereol.88:84-86, 2008)。レチノイン酸はレチノイン酸受容体(RARs)に結合し、核内に移行することでその効果を発現するとされている。RARsには、 α 、 β 、 γ の3つのサブタイプが存在するが、表皮で強く発現しているのは α 、 β の2つとされている。アダパレンはこれらのRARsに結合するレチノイド様作用を有するナフタレンカルボン酸誘導体であり、レチノイン酸よりも有意に強くRAR α 、RAR β に結合することが示されている(British J of Dermatology.139:3-7,1998)。我々はこうした生理活性に着目して、EGFR-TKIによる皮膚障害に対してアダパレンを使用することを検討し、実際の患者で奏功することを確認した(第99回日本肺癌学会関西支部会)。

(3) EGFR TKIによる皮膚障害の機序

EGFR TKIによる皮膚障害に対する現在までに提唱されている発症機序としては以下のものが挙げられる。EGFR TKIの標的となるEGFRは正常皮膚組織においても上皮系細胞などに広く分布しているため、EGFR阻害剤の投与により皮膚のEGFRの活性が著しく阻害されると、ケラチノサイトの角化異常が起こり、角質の菲薄化や不完全角化が生じる(Nat Rev Cancer.6:803-812,2006)。それに加えて、CCL2、CCL5、CXCL10、CCL18などの上皮細胞から産生されるケモカインによる炎症が起こり、様々な皮膚障害が惹起されると考えられている。この炎症を抑制する目的でステロイド軟膏やテトラサイクリン系抗菌薬の全身投与が使用されるが、その効果は限定的である。

2. 研究の目的

アダパレンの作用機序についてはこれまで報告がない。アダパレンの作用機序を明らかにすることで、EGFR TKI誘導性皮膚障害の発生機序についても新たな知見が得られることが期待され、またアダパレンの適正使用も可能になると考えられる。皮膚障害のコントロールはEGFR-TKIの有効使用にもつながり、肺がん治療の改善に直結することが考えられる。以上より我々は、EGFR TKIによる皮膚組織での炎症に対するアダパレンの抗炎症機構を明らかにすることを目的として本研究を行った。

3. 研究の方法

アダパレンの薬理作用についてin vitroの系でヒト表皮角化細胞を用いた実験で評価する。EGFR TKI投与により生じる()炎症性サイトカインの産生促進、()抗菌ペプチド、接着因子などの上皮防御因子の産生低下などの変化について、アダパレンの付加による変化を検討し、アダパレンの薬理作用を明らかにする。その後、薬理作用の機序について炎症性サイトカインの産生への影響の点から解析する。アダパレンの作用点であるレチノイン酸受容体(RAR)と炎症性サイトカインの転写を司るNF κ Bの相互作用を解析することで、アダパレンの作用機序を明らかにする。

(1) アダパレンによるEGFR-TKI誘導性炎症性サイトカインの抑制効果の解析

(2) アダパレンによる上皮防御因子産生効果の解析

(3) アダパレンによる上皮修復機能の解析

本研究では、HaCaT細胞を用いてin vitroの実験系によりアダパレンの薬理作用を明らかにする。現在のところ、EGFR-TKI投与による皮膚障害を再現した動物モデルは存在しない。また、マウスにEGFR-TKIを投与し続けても、ヒトと同じような皮膚障害は生じないことが明らかになっているため、in vitroの系を用いてアダパレンの薬理作用を明らかにする方針を選択した。

アダパレン付加による炎症性サイトカインの抑制作用の解析

HaCaT 細胞に EGFR-TKI としてエルロチニブ 1 μM, 10 μM を投与し、炎症性サイトカインの産生の評価を行う。アダパレンの濃度としては、以前の報告 (British J of Dermatology. 139:3-7, 1998) で RARs との結合能を評価した実験結果から 25 nM を刺激濃度とする。評価する炎症性サイトカインとしては CCL2, CCL5, CXCL14, CCL27, CXCL27, IL-8 (CXCL8) を選択し、qRT-PCR によりこれらのケモカインの産生の抑制があるかどうかを評価する。

アダパレンによる上皮防御因子産生促進効果の解析

EGFR-TKI 投与により表皮防御因子産生の阻害が起きることが明らかにされており (Nature. 387:861, 1997) EGFR-TKI 誘導性皮膚障害を悪化させる表皮感染症の原因となっていることが知られている。こうした因子として、抗菌ペプチドの HBD3 (human α -defensin-3), cathelicidin LL37, ribonuclease7 (RNase7) が知られており、本研究においてもこれらの分子について qRT-PCR を用いて、アダパレン付加による変化を評価する。また、他の上皮防御因子として、細胞間接着因子が挙げられる。接着因子として E-cadherin, claudin-1, claudin-3, occludin があるが、EGFR-TKI 投与によるこれらの因子の障害の程度を qRT-PCR で評価し、アダパレン付加による改善の程度を評価する。

Cell migration assay 系を用いたアダパレンによる細胞の遊走能の解析

アダパレンによる細胞の遊走能への関与の評価として、cell migration assay により細胞の遊走能を評価する。具

(4) アダパレンの薬理作用機序の解析

アダパレンによる抗炎症効果の作用機序の解明を行う。アダパレンは RAR に結合することでレチノイド様作用を示す薬剤である。表皮細胞が EGFR-TKI 刺激を受けたときに細胞内の RAR がどのように変化するのかについては、今までのところ報告はない。RAR はアダパレンと結合すると核内へ移行し、その機能を発揮することが知られている。

炎症性サイトカインの転写をコントロールしている核内転写因子の NF κ B は EGFR-TKI の刺激で誘導されることががん細胞を用いた実験では明らかにされており (Cancer Discovery. 1:200-202, 2011) RAR と NF κ B の相互作用を解析することで、アダパレンの薬理機序の解明を目指す。

EGFR-TKI 刺激による NF κ B, RAR の発現解析

EGFR-TKI により HaCaT 細胞を刺激して、p50, p65, RAR の発現をウェスタンブロット法により評価する。また、アダパレンの付加によりそれらのタンパクの発現に変化が生じるかを観察することにより、アダパレン投与に伴う NF κ B の挙動を検討する。

アダパレン付加による NF κ B 活性への影響の解析

EGFR-TKI による NF κ B 活性について NF κ B のコンポーネントである p65 サブユニット活性を細胞核内タンパクを用いて測定する TransAMTM キット (Active Motif) により測定し、アダパレン付加によりその活性が抑えられるかを評価する。NF κ B の活性が抑えられたとすれば、アダパレンによる RAR の活性化により NF κ B の活性が抑えられたことが示唆される。

更に NF κ B の活性について免疫染色法を用いて評価する。NF κ B が活性化されると、そのコンポーネントである p65 が核内へ移行することが知られている。p65 の核内移行を免疫染色により観察し、アダパレン付加によりその移行が阻害されるかどうかを観察することでアダパレンの NF κ B への作用を評価する。また RAR についても免疫染色を行うことで、細胞内局在を調べ、その活性を評価する。

4. 研究成果

(1) アダパレンによる EGFR TKI 誘導性の炎症性サイトカインの上昇抑制効果

エルロチニブ刺激 24 時間後の炎症性サイトカインの変化とアダパレンの効果を図 1 に示す。

	Ctrl	E	E+A
CCL2	0	2.5	0.8
CCL3	0	1.8	2.5
CCL5	0	-3.7	9.7
CCL18	0	0.5	0.0
CCL27	0	-0.5	-1.1
CXCL1	0	0.3	-1.0
CXCL9	0	N/D	N/D
CXCL14	0	-1.0	-3.3
CX3CL1	0	-1.0	0.8
IL-8	0	4.7	4.2
IL-10	0	0.3	2.0

図 1. アダパレンによる炎症性サイトカインの抑制効果

Ctrl: control, E: エルロチニブ, E+A: エルロチニブ + アダパレン

エルロチニブにより炎症性サイトカイン、CCL2、CCL27、IL-8の上昇が、24時間後に認められ、アダパレンはそれらの発現を有意に抑制した(それぞれ、 $P < 0.01$ 、 $P < 0.02$ 、 $P < 0.01$)。

(2) アダパレンの上皮防御因子産生に与える効果
アダパレン投与は上皮防御因子の産生に影響がなかった。

(3) アダパレンの細胞の遊走能へ与える影響の評価。
エルロチニブによって促進された細胞遊走に、アダパレンは抑制作用を示さなかった(図2)。

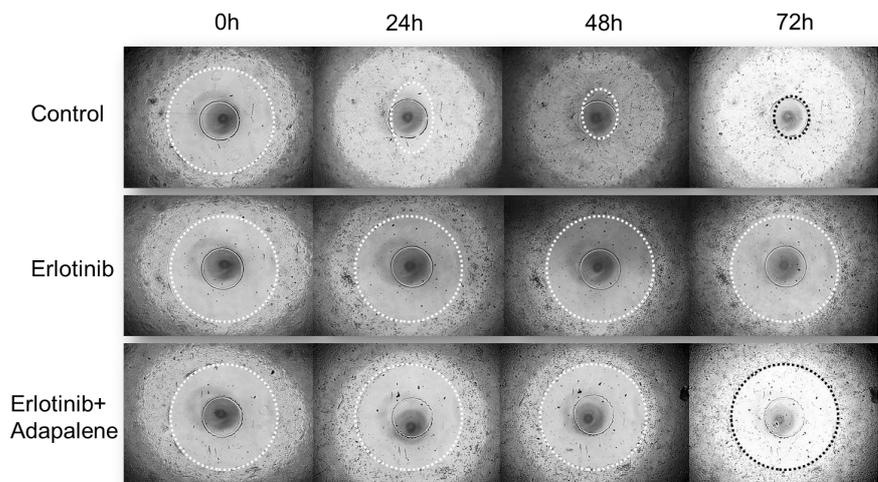


図2. アダパレンの細胞遊走に与える影響

(4) アダパレンの薬理作用機序

アダパレンを投与したことによる I κ B や p65 のリン酸化をウェスタンブロッティングにより解析したところ、アダパレン投与によりリン酸化の抑制が認められた。また、NF κ B を阻害する RAR の発現がアダパレン投与により亢進していた(図3)。

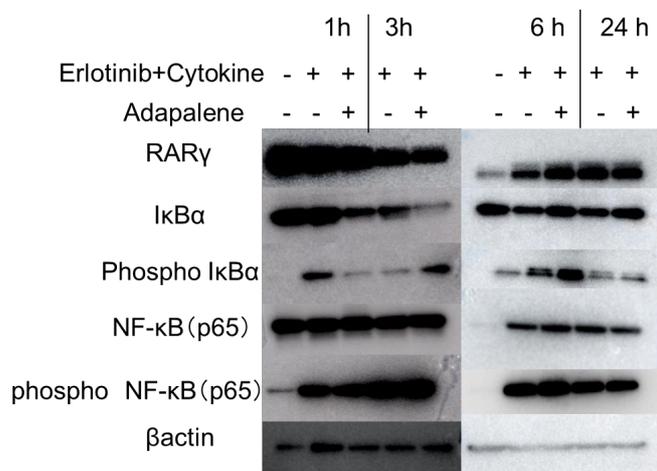


図3. NF κ Bシグナルへ与えるアダパレンの影響

以上の結果より、NF κ Bシグナルを介してアダパレンがEGFR-TKI誘導性の皮膚障害を改善する可能性が示唆された。皮膚障害の克服により、肺癌患者の生存率がさらに改善することが期待される。

5. 主な発表論文等

[学会発表](計 2 件)

Miwa Nanako, Tatsuya Nagano, Daisuke Tamura, Ryota Dokuni, Kanoko Umezawa, Naoko Katsurada, Kyosuke Nakata, Masatsugu Yamamoto, Motoko Tachihara, Hiroshi Kamiryo, Kazuyuki Kobayashi, Yoshihiro Nishimura. Adapalene abrogates erlotinib-induced skin disorder by regulating proinflammatory cytokine production from human epidermal cells. 28 th ERS international congress. 2018.

三輪 菜々子、永野 達也、立原 素子、堂國 良太、梅澤 佳乃子 桂田 直子、田村 大介、中田 恭介、山本 正嗣、上領 博、小林 和幸、西村 善博、EGFR-TKI誘導性皮膚障害に対するアダパレンの作用機序の解明、第 59 回日本呼吸器学会学術講演会、2019 年

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.med.kobe-u.ac.jp/resp/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：永野 達也

ローマ字氏名：NAGANO, Tatsuya

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。