

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 27 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15002

研究課題名(和文)がん化学療法における分子標的薬誘発手足症候群の治療薬提言に向けた発症機序の解明

研究課題名(英文) Different etiologic mechanisms underlying HFS depending on the classes of anti-cancer agents

研究代表者

松原 和夫 (Matsubara, Kazuo)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：20127533

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では分子標的薬による皮膚障害の発症機序を解明するためヒト皮膚ケラチノサイト(HaCaT)を用いた検討を行った。細胞生存率は全ての薬物処置によって濃度依存的に減少した。Gefitinib及びerlotinibの処置によりcaspase-3の活性化、リン酸化Aktの抑制が惹起された。一方、sunitinib及びsorafenibではこのような変化は認められなかった。以上より、gefitinib及びerlotinibはAktのリン酸化を抑制し、caspase-3依存的な細胞死を、sunitinib及びsorafenibはcaspase-3非依存的な細胞障害を惹起することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The present study is designed to investigate mechanisms underlying epidermal growth factor receptor inhibitors (EGFRIs)- or multikinase inhibitors (MKIs)-induced Hand-Foot Syndrome (HFS) using a human keratinocyte cell line, HaCaT cell. We evaluated the effects of EGFRIs (gefitinib and erlotinib) or MKIs (sunitinib and sorafenib) on the viability of HaCaT cells using MTT assay. Each of the anti-cancer agents reduced the viability of Schwann cells in a concentration-dependent manner after either 24 or 48 h of treatment. The treatment with gefitinib and erlotinib significantly increased the expression of apoptosis marker caspase3, and reduced phosphorylated Akt (p-Akt) levels, which involves in cell survival, suggesting that EGFRIs might induce HFS via cell apoptosis mechanisms. In contrary, sunitinib and sorafenib failed to affect caspase3 and p-Akt levels. These findings clearly suggest the different etiologic mechanisms underlying HFS depending on the classes of anti-cancer agents.

研究分野：医療薬理学、薬理学

キーワード：抗がん剤副作用 手足症候群

1. 研究開始当初の背景

近年、がん細胞特有な分子を標的とする分子標的薬ががん化学療法のキードラックとなりつつあるが、その有害反応として HFS を高頻度に発症することが知られている。この HFS の主な症状は、四肢末端部におけるしびれ、感覚異常、発赤および腫脹であり、服用数日から数週間後に高頻度で発症する。これらの有害反応はがん化学療法における用量規定因子ともなっている。現在までに、細胞障害型抗がん剤であるドキシソルピシン誘発の HFS 発症においては、皮膚中の ROS などの活性酸素が深く関与することが知られている¹⁾。従って、HFS は皮膚細胞障害とそれに伴った侵害性疼痛に起因すると考えられてきた。しかし、HFS を発症する患者においては、皮膚症状に先立って知覚異常が発現することも珍しくなく、上述の仮説だけではそのメカニズムを説明することは難しい。このように HFS の発症機序は未だほとんど解明されておらず、そのため根治的治療法は存在しない。機序解明が大きく遅れている原因は、1) HFS の発症が知覚神経と皮膚への複雑かつ複合的な障害反応に起因していること、2) しびれや感覚異常の動物モデルおよびその評価法が確立されていないことにある。抗がん薬それぞれの HFS 発症機序を明らかにし、有効な治療薬を見いだすことが急務であると考えられる。

がん化学療法に使用される分子標的薬として、上皮成長因子受容体 (EGFR) 阻害剤 (ゲフェチニブおよびエルロチニブ) あるいはマルチキナーゼ阻害剤 (スニチニブおよびソラフェニブなど) が臨床適用されている。研究代表者らは、ヒト表皮ケラチノサイト由来細胞株である HaCaT 細胞に EGFR 阻害剤を処置することにより、アポトーシス依存的な細胞障害が誘導され、結果として HaCaT 細胞の増殖が抑制されることを確認した。それに対し、マルチキナーゼ阻害剤処置は、HaCaT 細胞増殖を抑制するものの、アポトーシス依存的な細胞障害を誘導しなかったことから、他の抗がん剤による HFS の発症機序とは大きく異なる可能性が考えられる。

2. 研究の目的

近年、外的刺激に応答して皮膚に分布する知覚神経が活性化することで、その近傍に局在する樹状細胞が活性化され、炎症性サイトカイン依存的に皮膚炎症を引き起こされることが報告された²⁾。これらの知見に基づき研究代表者らは、分子標的薬の HFS 発症機序を以下の通りに想定している。1) EGFR 阻害剤は表皮細胞のアポトーシス依存的な炎症反応を引き起こし、侵害性疼痛を惹起する。2) マルチキナーゼ阻害剤は、皮膚組織中の細胞分裂パターンを制御する基底細胞の増殖抑制により皮膚細胞の恒常性を低下させるとともに、直接的な知覚神経異常ならびに神経-免疫細胞相互作用を亢進させることで

皮膚炎症を惹起する。

本研究では、上述の作業仮説に基づき、分子標的薬による HFS 培養細胞実験系および動物モデルを確立して、その分子機構を検討し、有効な治療薬を探索することを第一の目的とする。特にマルチキナーゼ阻害剤の HFS 動物モデルにおいては、行動評価だけでなく各感覚神経線維特異的な神経活動変化を指標とした客観的評価系を確立することで、しびれや感覚異常の本質を分子レベルから解明することを目的とする。

1) 培養細胞株および初代培養細胞実験系において各種分子標的薬の細胞障害メカニズムを解析する。

2) 各種分子標的薬による HFS 病態モデルの確立と皮膚障害ならびに各感覚神経線維の活動異常の分子機構の解析を行う。(マルチキナーゼ阻害剤の HFS モデルにおいては、知覚神経/免疫細胞の相互作用に着目して分子機構を検討する。)

3. 研究の方法

(1) 細胞培養と薬物処置

HaCaT は 10%ウシ胎児血清含有 DMEM を用い、37℃、5% CO₂ 環境下で維持した。24-well plate あるいは 60 mm dish に 1.6 x 10⁴ cells/cm² で播種し、24 時間後に薬物処置を行った。薬物は EGFRIs である gefitinib 及び erlotinib、MKIs である sunitinib 及び sorafenib を用いた。

(2) 細胞の生存率評価

細胞生存率は MTT assay により評価した。薬物処置 48 時間後の細胞に対して、3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) を添加し、560 nm における吸光度を測定した (対照波長: 630 nm)。

(3) Total RNA 抽出と Real-time PCR

薬物処置した細胞を RNeasy[®] Mini Kit (QIAGEN 社) を用いて RNA 抽出を行った。次に Total RNA を用い逆転写反応を行い、鋳型 cDNA を合成した。その後、TaqMan[®] Fast Advanced Master Mix (Life technology 社) を用い、TaqMan[®] プローブ法により mRNA の定量を行った。

(4) Western Blotting

薬物処置した細胞を 1% Triton X-100 を含む lysis buffer 中で可溶化した。SDS-PAGE によりタンパク質を分離した後 PVDF 膜に転写し、各抗体と反応させ化学発光により検出した。

(5) HTF モデルマウスの作製および各種実験

マウスに gefitinib あるいは erlotinib を

反復経口投与し(モデル1:それぞれ50mg/kg、9日間連日経口投与;モデル2:50mg/kg、5日経口投与2日休薬を1クールとして4クール繰り返し)、手足症候群モデルマウスの作製を試みた。また、von Frey フィラメント(0.008、0.02、0.04、0.07、0.16、0.4および1.0g)を用いたup-down法による痛覚過敏反応の評価を行った。また、ペントバルビタール50mg/kgを腹腔内投与することにより、マウスを麻酔し、開腹後、PBSおよび4%PFAを経心灌流させ、脱血および固定を行った。固定後のマウスから後肢表皮を回収し、4%PFAを用いて後固定を4時間行った。後固定終了後、15%スクロース溶液に置換し、坐骨神経の脱水を行った。脱水後の坐骨神経は包埋後、-80で凍結させ、その後切片を作製した。こうして得られた組織標本を用いて、マクロファージマーカーIba1あるいは細胞増殖マーカーKi67による免疫染色を行い、後肢表皮へのマクロファージ浸潤あるいは表皮基底膜の細胞増殖変化を検討した。さらに、同組織標本を用いて、ヘマトキシリン・エオジン染色(HE染色)およびマッソントリクローム染色を行い、組織障害について評価した。

4. 研究成果

本研究では、EGFRsであるgefitinibとerlotinib、MKIsであるsunitinibとsorafenibを用い、HaCaT細胞に及ぼす影響と誘導される分子の違いについて検討を行った。

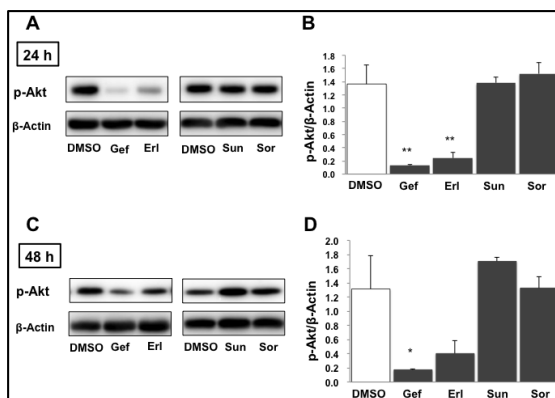


図1 各薬物処置がAkt及びリン酸化Akt(p-Akt)に与える影響
HaCaT細胞にgefitinib(Gef)、erlotinib(Erl)、sunitinib(Sun)あるいはsorafenib(Sor)を24時間(A,B)あるいは48時間(C,D)を処置して、Akt及びリン酸化Aktのタンパクレベルを評価した。

MTT assayの結果より、細胞生存率は全ての薬物処置によって濃度依存的に減少した。またgefitinib及びerlotinibの処置によりcaspase-3の活性化が認められ、これらの薬物はリン酸化Aktも抑制することが判明した(図1)。既報では、EGFRをRNAiにより発現

抑制した状態でgefitinibを処置しても、Aktのリン酸化が抑制される事が報告されている⁸⁾。Aktのリン酸化は細胞の生存・増殖に必要な分子として広く知られており、これらの結果から、HaCaT細胞においてgefitinib及びerlotinibはEGFR非依存的にAktのリン酸化を抑制し、最終的にcaspase-3依存的な細胞死を起こしている可能性が示唆された。また、gefitinib及びerlotinibをヒト由来肺上皮細胞A549に処置した場合、caspase-3の活性化は認められないことが報告されており³⁾、これらの反応はHaCaT細胞においてのみ起きている現象であることが示唆された。

一方、sunitinib及びsorafenibではcaspase-3の活性化は認められず、Akt及びリン酸化Aktにも変化は認められなかった(図1)。よってこれらの薬物はAktシグナルに対して影響しない可能性が考えられ、caspase-3非依存的な細胞障害または増殖抑制により、濃度依存的に細胞生存率が低下した可能性が考えられた。以上のことから、HaCaT細胞にEGFRsまたはMKIsを処理したとき、双方とも濃度依存的に細胞生存率が低下するにもかかわらず、誘導される分子が異なることがわかり、これらの違いが臨床所見の違いと関連している可能性が示唆され、今後、更なる検証が必要であると考えられた。

また、これらの薬物が近年Aktとの関連が示唆されている分子シャペロンであるGRP78に影響を与えるか否かを検討したところ、gefitinib及びerlotinibの処置により、GRP78のmRNA量が減少した。gefitinib及びerlotinib処置において、リン酸化Aktの減少とGRP78の減少の時間が異なる点を考慮すると、Aktのリン酸化抑制を受けて、GRP78の発現量低下が起こった可能性が考えられるが、詳細な分子メカニズムについては今後更なる検討が必要である。また、細胞保護分子であるGRP78がgefitinib及びerlotinib処置により低下していることから、GRP78の発現量を上昇させることでgefitinib及びerlotinib誘発細胞死を抑制することが考えられ、GRP78は治療のターゲットとなり得る可能性が示された。近年、細胞障害を起こすことなくGRP78のみを特異的に誘導する化合物Bip inducer X (BIX)が見出されており¹⁰⁾、本研究で得られた知見より、gefitinib及びerlotinibによって起こる皮膚障害の治療薬となり得る可能性が考えられた。今後は、GRP78を強制発現させた場合及びBIXを添加した場合のgefitinib及びerlotinib誘発細胞死に対する効果について、更なる検討を行う必要性がある。

一方、sorafenib処置24時間後においてわずかにGRP78発現量が上昇した。この原因の一つとして、一過性に細胞にストレス(小胞体ストレス)が生じ、その防御機構としてGRP78発現量が上昇したと考えられるが、48時間で定常状態に戻っていることを考慮すると、防

御機構の働きにより小胞体ストレスから回復した可能性が考えられた。

次に、gefitinibあるいはerlotinibを反復経口投与し(モデル1:それぞれ50mg/kg、9日間連日経口投与;モデル2:50mg/kg、5日経口投与2日休薬を1クールとして4クール繰り返し)、手足症候群モデルマウスの作製をし、触覚アロディア、皮膚障害、免疫細胞の浸潤などが惹起されているかについて検討を行った。しかしながら、いずれの群においても疼痛閾値の変化、HE染色・マッソントリクローム染色によって評価した皮膚状態の変化、ならびにやIba1陽性マクロファージの浸潤、後肢表皮基底層におけるKi67陽性増殖細胞数の変化といった組織科学的な変化は全く認められなかった。過去にHFS動物モデルの確立およびそれらを用いた行動実験を行っている論文はほとんどなく、げっ歯類においてHFSモデル作製を行うことは非常に困難であると思われる。今後もHFSモデル動物の作製およびそれらを用いた解析については継続して行っていく予定である。

<引用論文>

1) Yokomichi *et al.*, Pathogenesis of Hand-Foot Syndrome induced by PEG-modified liposomal Doxorubicin. *Human Cell*, 2013, 26(1):8-18.

2) Riol-Blanco L *et al.*, Nociceptive sensory neurons drive IL23-mediated psoriasiform skin inflammation. *Nature*, 2014, 510(7503):157-61.

3) Koyama S *et al.*, Gefitinib and Erlotinib Lead to Phosphorylation of Eukaryotic Initiation Factor 2 Alpha Independent of Epidermal Growth Factor Receptor in A549 Cells. *PLOS ONE*, 2015, 10: e0136176.

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2件)

小島奈津美ら. 分子標的薬による皮膚障害の発症機序解明, 第65回日本薬学会近畿支部総会(大阪), 2015年10月

小柳円花ら. シュワン細胞に着目したタキサン系あるいは白金系抗がん剤誘発発症神経障害の発症機序の相違, 2016神経科学会(神奈川), 2016年7月

[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

松原 和夫(MATSUBARA, Kazuo)
京都大学医学研究科・教授
研究者番号: 20127533

(2)研究分担者

中川 貴之(NAKAGAWA, Takayuki)
京都大学医学研究科・准教授
研究者番号: 30303845

今井 哲司(IMAI, Satoshi)
京都大学医学研究科・講師
研究者番号: 80468579

大村 友博(OMURA, Tomohiro)
京都大学医学研究科・助教
研究者番号: 00439035

中川 俊作(NAKAGAWA, Shunsaku)
京都大学医学研究科・助教
研究者番号: 50721916

金子 周司(KANEKO, Shuji)
京都大学薬学研究科・教授
研究者番号: 60177516
(平成28年度まで)

(3)連携研究者

(4)研究協力者