

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 24 日現在

機関番号：12501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15731

研究課題名(和文)新規頭頸部癌分子標的治療薬セツキシマブの副作用軽減治療薬の開発

研究課題名(英文)Development of a novel medicine for reducing side effects for cetuximab, a new therapeutic agent for head and neck cancer

研究代表者

鶴澤 一弘 (UZAWA, KATSUHIRO)

千葉大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号：30302558

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)：セツキシマブは頭頸部癌に対して保険適応が認められた日本で唯一の分子標的治療薬であるが、心毒性や皮膚毒性など副作用がしばしば治療の妨げになっている。今回、我々はmicroarrayによる網羅的遺伝子解析と遺伝子パスウェイ解析により心毒性遺伝子パスウェイを同定した。このパスウェイについて遺伝子発現を効率良くコントロールする薬剤を明らかにし、in vitroおよびin vivoで抗腫瘍性を減弱せずに心毒性を抑制する方法を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Cetuximab is the only molecular targeting therapeutic agent in Japan that has been approved for medical insurance for head and neck cancer, but side effects such as skin toxicity and cardiotoxicity, often interfere with cancer treatments. In this study, we identified gene pathway associated with cardiotoxicity were detected by exhaustive gene analysis using microarray and gene pathway analysis. We clarified an agent that efficiently control gene expression on this pathway and a method to suppress cardiotoxicity without attenuating antitumor activity both in vitro and in vivo.

研究分野：医歯薬学

キーワード：セツキシマブ 頭頸部癌 副作用 心毒性 Flavagline

1. 研究開始当初の背景

セツキシマブは頭頸部癌に対して保険適応が認められた分子標的治療薬であるが、副作用として皮膚毒性や心毒性がある。心毒性は腎上皮細胞における Mg 再吸収不全に伴う電解質異常により生じることが示唆されている。これらの副作用が癌治療の妨げになることから、抗癌効果を維持したままこれらの副作用を抑制する治療法の開発が強く望まれる。我々は先行研究で、セツキシマブに対する3組6種類の薬剤感受性/耐性細胞株を独自に樹立し、セツキシマブ投与時の遺伝子発現状態を microarray で網羅的に分析して遺伝子パスウェイ解析ソフトで解析したところ、心毒性に関連する遺伝子パスウェイを確認した。

2. 研究の目的

本研究は、セツキシマブについて抗腫瘍性を減弱することなく心毒性を抑制する方法やその薬剤を同定することを目的とする。

3. 研究の方法

(1)副作用遺伝子パスウェイをもとに、心毒性を抑制する候補標的遺伝子を同定する。
心毒性は腎上皮細胞における Mg 再吸収不全に伴う電解質異常により生じるため、腎由来上皮細胞 HEK293 細胞を使用する。HEK293 にセツキシマブを作用させ、Mg 再吸収マーカーである TRPM6 の発現減弱を認める作用濃度・作用時間でマイクロアレイ解析を行う。解析結果から各候補標的遺伝子を同定する。

(2) in vitro の培養細胞についてセツキシマブ作用時における心毒性パスウェイにある候補標的遺伝子の蛋白発現を確認する。
心毒性について、セツキシマブ作用時における候補標的遺伝子の蛋白発現を Western Blotting 法で確認する。

(3)候補標的遺伝子について、遺伝子発現制御薬剤(阻害剤や賦活薬)を遺伝子パスウェイ解析ソフト(IPA)や文献を用いて検索同定する。

(4)in vitro の培養細胞において標的遺伝子発現制御薬剤を使用し、心毒性パスウェイに及ぼす効果を確認する。
セツキシマブを作用させた HEK293 細胞に標的遺伝子発現制御薬剤を使用し、心毒性パスウェイにある標的遺伝子の発現変化を Western Blotting 法、腎上皮細胞内外における Mg 量の定量をメタロアッセイマグネシウム測定 LS で確認する。

(5)in vitro の培養細胞において標的遺伝子制御候補薬剤投与によりセツキシマブによる抗腫瘍パスウェイが阻害されないことを確認する。
口腔扁平上皮癌(OSCC)を使用し、セツキシマブ

ブの抗腫瘍パスウェイである EGFR シグナル伝達経路でパスウェイ上の遺伝子が抑制されていることを確認する。

(6) in vivo において標的遺伝子制御候補薬剤投与により、ヌードマウス移植腫瘍に対する抗腫瘍性が減弱しないことを確認する。
標的遺伝子制御候補薬剤を担癌マウスに投与し、ヌードマウス移植腫瘍に対する抗腫瘍性が減弱しないことを確認する。

4. 研究成果

心毒性について

(1)副作用遺伝子パスウェイをもとに、心毒性を抑制する候補標的遺伝子を同定する。
腎由来上皮細胞 HEK293 にセツキシマブを作用させ、Mg 再吸収マーカーである TRPM6 が発現減弱する作用濃度・作用時間を明らかにした(図1)。

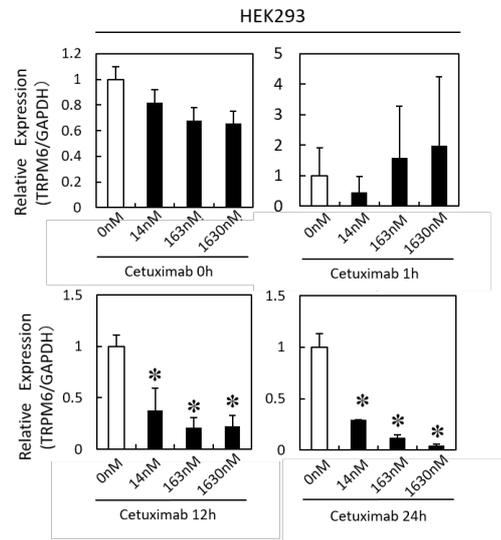


図1 セツキシマブの作用時間と作用濃度

マイクロアレイ解析を行ったところ、Mg 再吸収経路上(心毒性パスウェイ)で TRPM6 の上流に存在する遺伝子 c-fos が発現減弱することを認めた。

(2) in vitro の培養細胞においてセツキシマブ作用時における心毒性パスウェイにある候補標的遺伝子の蛋白発現を確認する。
セツキシマブ作用時、HEK293 細胞では TRPM6 上流に存在する c-fos の発現減弱を認めた(図2)。

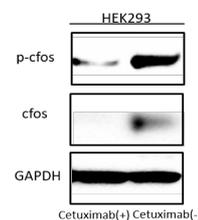


図2 セツキシマブ作用時のタンパク発現

(3)候補標的遺伝子について、遺伝子発現制

御薬剤（阻害剤や賦活薬）を遺伝子パスウェイ解析ソフト（IPA）や文献を用いて検索同定する。

検索の結果、TRPM6 促進剤として Flavagline を同定した (PLoS One. 2015 Mar 16;10(3) :e0119028)。

(4) in vitro の培養細胞において標的遺伝子発現制御薬剤を使用し、心毒性パスウェイに及ぼす効果を確認する。

HEK293 細胞に Flavagline を作用させて、細胞内外における Mg を定量化して細胞の Mg 再吸収を評価した。Flavagline を作用させたところ、細胞外 Mg が減少して細胞内 Mg が増加し、Mg 再吸収亢進を認めた(図 3)。

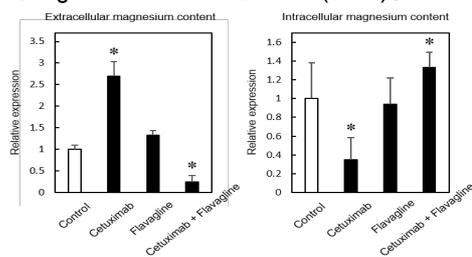


図 3 細胞内外 Mg 定量化

(5) in vitro の培養細胞において標的遺伝子制御候補薬剤投与によりセツキシマブによる抗腫瘍パスウェイが阻害されないことを確認する。

セツキシマブの抗腫瘍パスウェイである EGFR シグナル伝達経路上にある遺伝子 MEK について評価した。OSCC 株である SAS 細胞について MEK のリン酸化抑制が制御候補薬剤によって阻害されていないことを確認した(図 4)。

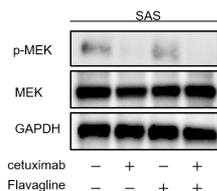


図 4 阻害剤作用時の抗腫瘍パスウェイ

更に MTS assay を用いて、制御候補薬剤によりセツキシマブによる抗腫瘍性が阻害されないことを確認した(図 5)。

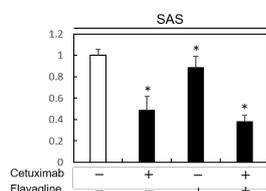


図 5 MTS assay

(6) in vivo において標的遺伝子制御候補薬剤投与により、ヌードマウス移植腫瘍に対する抗腫瘍性が減弱しないことを確認する。

SAS 細胞をヌードマウスに接種した。この担癌マウスをコントロール群、セツキシマブ作

用群、制御候補薬剤作用群、併用群の 4 群に分けて腫瘍体積を測定したところ、制御候補薬剤によるセツキシマブの効果を阻害していないことを確認した(図 6)。

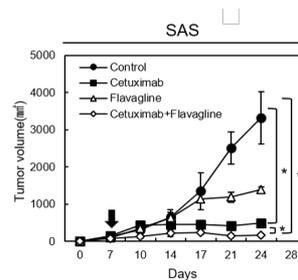


図 6 in vivo における抗腫瘍性の確認

[まとめ]

セツキシマブによる抗腫瘍性を減弱させずに心毒性を抑制する方法とその薬剤を同定した。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 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 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

鵜澤 一弘 (UZAWA KATSUHIRO)

千葉大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号：30302558

(2)研究分担者

坂本 洋右 (SAKAMOTO YOUSUKE)
千葉大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：50541745

肥後 盛洋 (HIGO MORIHIRO)
千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60724383

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

()