

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月10日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590506

研究課題名（和文） ゲフィチニブによるざ瘡様皮疹の発症機構解明とその副作用軽減に向けた薬学基盤研究

研究課題名（英文） Molecular mechanisms of gefitinib-induced rash formation: Gefitinib augments lipogenesis and steroidogenesis in sebaceous glands

研究代表者

佐藤 隆 (SATO TAKASHI)

東京薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：90266891

研究成果の概要（和文）：

上皮成長因子受容体(EGFR)を標的とする抗ガン剤ゲフィチニブの代表的な副作用として痤瘡様皮疹がある。この副作用は患者の精神的ストレスを惹起して QOL を低下させる。しかし、ゲフィチニブによる痤瘡様皮疹の発症機構、すなわち皮脂腺における皮脂産生に対する薬剤の作用については全く不明である。本研究において、ヒトおよびハムスター皮脂腺由来の脂腺細胞を用いて、ゲフィチニブが皮脂腺に作用し、EGFR 下流の STAT シグナル阻害に起因した男性ホルモンの生合成促進に連動して皮脂産生を増強すること、経口投与のゲフィチニブが皮膚組織に移行し、毛包・皮脂腺系へ排出されることを初めて見出した。本研究成果は、ゲフィチニブによる痤瘡様皮疹の発症機構解明のみならず、その治療を受ける患者の QOL 改善または副作用防止に向けた新たな治療指針の策定にも貢献するものと期待される。

研究成果の概要（英文）：

A small-molecule tyrosine kinase inhibitor, gefitinib, which targets the ligand-binding domain of epidermal growth factor receptors, exhibits anti-tumorigenic activity in patients with advanced non-small cell lung cancer. Many patients treated with gefitinib develop an acne-like rash on the face and upper body. Although acne is characterized as a functional disorder in sebaceous glands and pilosebaceous units, there have been no reports to date that gefitinib may modulate sebum production in sebaceous glands. In the present study, a mass spectrometry analysis revealed that orally administrated gefitinib was detectable in a pustule from a patient treated with gefitinib but not ones from four acne patients. In addition, gefitinib augmented the production of triacylglycerols (TG), the major sebum component, and perilipin, a sebocytic differentiation marker, in human and hamster sebocytes. Furthermore, gefitinib facilitated steroidogenesis in both hamster and human sebocytes. Therefore, these results provide novel evidence that gefitinib exists in the hair follicle of the skin after its oral administration and directly facilitates sebum production by the augmentation of TG production. Moreover, the augmentation of sebum production is likely to due to the increases of androgen synthesis in sebocytes. These findings will help to increase the clinical understanding of the side effects of gefitinib, and improve the QOL of patients being treated with gefitinib.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
22年度	1,200,000	360,000	1,560,000
23年度	1,100,000	330,000	1,430,000
24年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・応用薬理学

キーワード：医薬品副作用・薬物相互作用

1. 研究開始当初の背景

上皮成長因子受容体チロシンキナーゼ(EGFR-TK)阻害を作用機序とする抗悪性腫瘍薬には、ゲフィチニブとエルロチニブ(商品名タルセバ[®])がある。両薬剤の副作用として皮膚障害、特に顔面や胸部などに高発現する痤瘡様皮疹があり、国内におけるその発症は約60-98%と報告されている。したがって、その副作用は患者に精神的苦痛を強い、かつ患者のQOLを低下させ、ガン治療そのものにも影響を与える。しかし、両薬剤による皮膚障害は国内外において臨床的に非常に注目されているものの詳細な副作用機構の解明には至っていなかった。また、皮疹治療には一般的にステロイド剤が汎用されているが、既知痤瘡治療薬(レチノイン酸製剤など)の有用性は全く言及されていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、日本人由来のヒト脂腺細胞を樹立し、その細胞においてゲフィチニブによる皮脂産生調節を生化学的・分子生物学的に検討し、また臨床薬剤師および皮膚科医との共同研究による薬剤の副作用情報、患者QOLおよび臨床所見の集積からEGFR-TK阻害剤の副作用機構を解明することを目的とする。さらに、既知痤瘡治療薬についてゲフィチニブの副作用軽減・防止作用を実験的に検証し、薬剤師、臨床医との連携のもとその治療薬の有用性情報をガン治療へフィードバックすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 脂腺機能解析モデルとしてのヒト脂腺細胞の樹立

ヒト脂腺代替モデルであるハムスター脂腺細胞に加え、日本人由来脂腺細胞を樹立するために、虎の門病院皮膚科より提供されたヒト背部皮膚組織より脂腺を単離、培養した。

(2) 皮脂の定量的解析

細胞内皮脂量は、皮脂の主成分であるトリアシルグリセロール(TG)を指標に、その量をTG-EN カイノスキット(カイノス社製)およびoil red O染色法にて解析した。

(3) EGFR, リン酸化タンパク質と脂肪滴形成促進因子ペリリピンの産生調節

細胞膜および細胞内のEGFRおよびペリリピンの産生は、それぞれに特異的な

抗体を用いたウエスタンブロット(WB)法にて解析した。また、EGFRを含むリン酸化タンパク質については、リン酸化EGFR抗体を用いたWB法およびProteome ProfilerTM Array Human Phospho-Kinase Array kitにて解析した。

(4) 遺伝子発現解析

ステロイドホルモン合成関連酵素[コレステロール側鎖切断酵素(CYP11A), 5 α -reductase]などの遺伝子発現は、real-time RT-PCR法にて標的分子の特異的なプライマーを用いて解析した。

(5) 男性ホルモン産生の解析

テストステロンおよびジヒドロテストステロン(DHT)量を、Testosterone EIA kitおよびDHT ELISA kitを用いて定量した。

(6) ゲフィチニブの皮膚移行性の解析

ゲフィチニブ投与ハムスターの皮膚組織およびゲフィチニブ服用患者由来皮膚中における薬剤の存在を質量分析法により解析した。

(7) 統計処理

Fisherの多変量分散分析法により各処理間の有意差検定を実施した。

4. 研究成果

(1) ゲフィチニブによる皮脂産生促進作用

ゲフィチニブは細胞内TG量を濃度依存的に増加することが判明した(図1)。また、この皮脂産生促進作用はガン治療における患者血中のゲフィチニブ相当濃度(0.08-2.5 μ M)において観察された。さらに、ペリリピン産生が遺伝子およびタンパク質レベルで促進されることが判明した(Fig. 2)。したがって、ゲフィチニブは脂腺細胞のTGおよびペリリピン産生を促進することが初めて明らかとなった。

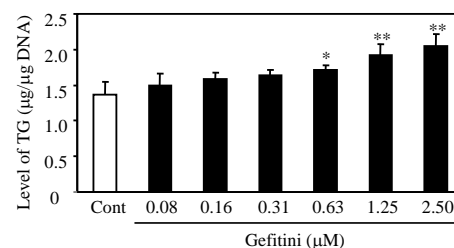


図1 ハムスター脂腺細胞におけるゲフィチニブによるTG産生促進作用

未処理群, Cont. *p<0.05, **p<0.01.

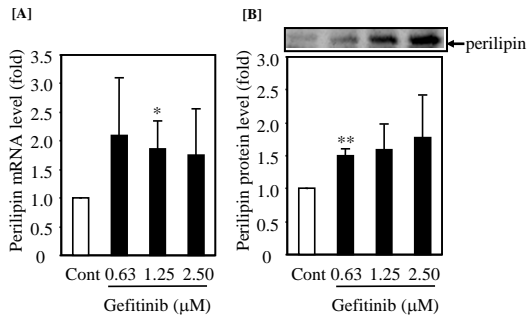


図 2 ハムスター脂腺細胞におけるゲフィチニブによるペリリピン産生促進作用

[A]: RT-PCR による遺伝子発現解析. [B]: WB 法によるペリリピンタンパク質の検出. 未処理群, Cont. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

(2) 脂腺細胞におけるゲフィチニブによる EGFR シグナル阻害作用

ハムスター脂腺細胞は恒常的に EGFR を発現していることが判明した(図 3). また, ゲフィチニブを処理した脂腺細胞では種々のリン酸化タンパク質の発現が未処理群と比べ減少した(>20%抑制) (図 4). 中でも EGFR の下流に位置し, 細胞の増殖や分化調節に関与することが知られている STAT2, 3, 5a, 5b, 5a/b および 6 のリン酸化が抑制されていることが判明した. したがって, ハムスター脂腺細胞においてゲフィチニブは STAT ファミリーのリン酸化阻害により EGFR シグナルを抑制することが示唆された.

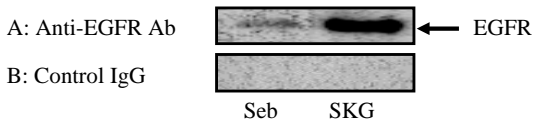


図 3 ハムスター脂腺細胞における EGFR の同定

SKG, ヒト扁平上皮がん細胞. Seb, ハムスター脂腺細胞.

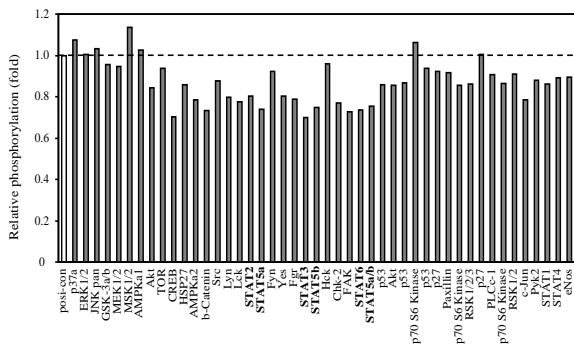


図 4 ゲフィチニブを処理したハムスター脂腺細胞における細胞内リン酸化タンパク質の網羅的解析

(3) ハムスター脂腺細胞におけるゲフィチニブによるステロイドホルモン合成促進作用

ハムスター脂腺細胞においてステロイドホルモン合成の律速酵素である CYP11A, 5α-DHT の合成酵素である 5α-reductase type-1 の遺伝子発現がゲフィチニブにより濃度依存的に促進された(図 5). また, 両酵素の発現増加に連動してハムスター脂腺細胞におけるテストステロンおよび DHT の産生がゲフィチニブにより濃度依存的に増加した(図 6). これらの結果より, ゲフィチニブはハムスター脂腺細胞における CYP11A および 5α-reductase type-1 の遺伝子発現増加に起因して男性ホルモンの産生を促進することが示唆された.

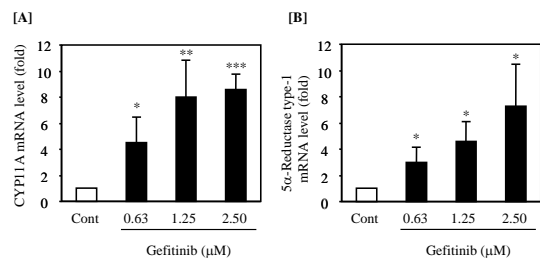


図 5 ハムスター脂腺細胞におけるゲフィチニブによるステロイドホルモン合成酵素の遺伝子発現促進作用

未処理群, Cont. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

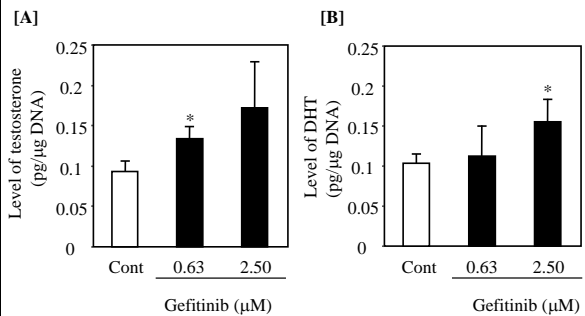


図 6 ハムスター脂腺細胞におけるゲフィチニブによるテストステロンおよび DHT 産生促進作用

未処理群, Cont. * $p < 0.05$.

(4) ヒト脂腺細胞におけるゲフィチニブによる皮脂産生およびステロイドホルモン合成促進作用

研究分担者 (虎の門病院) より提供されたヒト皮膚組織より皮脂腺を単離し, その組織から伸展・増殖したヒト脂腺細胞を樹立した(図 7). また, ハムスター脂腺細胞と同様にこのヒト脂腺細胞は insulin 刺激により細胞内に皮脂を蓄積することが判明した(図 8). した

がって、樹立した細胞が皮脂産生能を有する脂腺細胞であることが判明した。

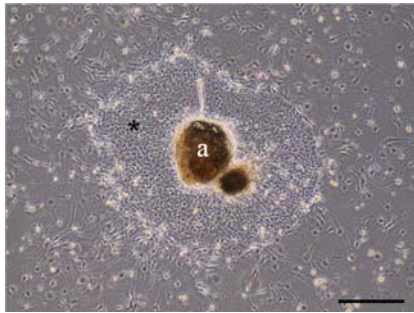


図 7 ヒト皮脂腺(a)より伸展・増殖する脂腺細胞(*)

Bar, 300 μ m.

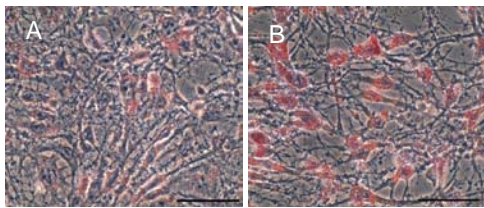


図 8 インスリン刺激によるヒト脂腺細胞の分化誘導の oil red O 染色解析

A: 未処理, B: インスリン処理. Bars, 50 μ m.

ハムスターと同様にヒト脂腺細胞の TG 産生(図 9), 細胞内脂肪滴形成(図 10)もゲフィチニブの濃度依存的に促進した。また, ヒト脂腺細胞は恒常的に CYP11A と 5 α -reductase type-1 および type-3 の遺伝子を発現しており, これら遺伝子発現はゲフィチニブにより促進することが判明した(図 11)。さらに, ゲフィチニブはテストステロンおよび DHT の産生を促進することも明らかとなった(図 12)。これらの結果より, ヒト脂腺細胞においてもゲフィチニブは皮脂産生の増強のみならず, CYP11A および 5 α -reductase の発現増加に起因した 男性ホルモン産生をも促進することが示唆された。

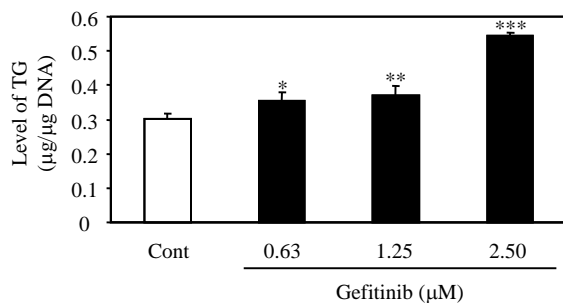


図 9 ヒト脂腺細胞におけるゲフィチニブによる TG 産生促進作用

未処理群, Cont. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

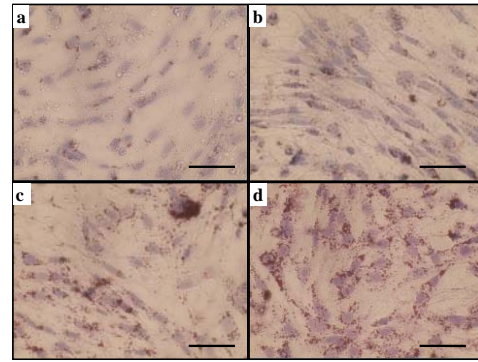


図 10 ヒト脂腺細胞におけるゲフィチニブによる脂肪滴形成促進作用

a, 未処理細胞 ; b-d, ゲフィチニブ処理細胞 (0.63, 1.25, and 2.50 μ M). Bars, 50 μ m.

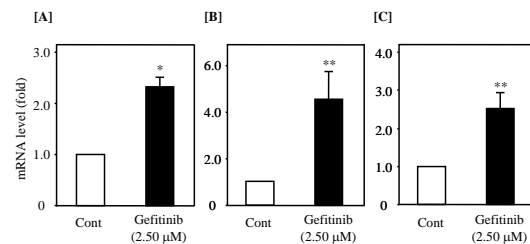


図 11 ヒト脂腺細胞におけるゲフィチニブによるステロイド合成機構の活性化

A: CYP11A, B: 5 α -reductase type-1, C: 5 α -reductase type-3. 未処理群, Cont. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

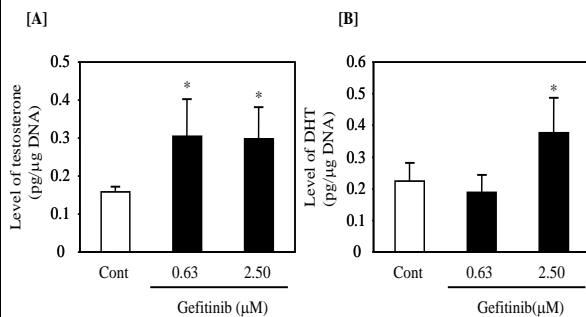


図 12 ヒト脂腺細胞におけるゲフィチニブによる男性ホルモンの産生促進

A: テストステロン, B: DHT. 未処理群, Cont. * $p < 0.05$.

(5) ハムスターおよびヒト皮膚組織における経口投与ゲフィチニブの検出

ゲフィチニブを経口投与したハムスターにおいて, ゲフィチニブがハムスター背部皮膚組織において検出された(図 13)。また, ゲフィチニブ服用患者 (1 例) の痒疹様皮疹内容物 (囊胞) を採取し, その内容物中のゲフィチニブの有無を同様の方法に解析したところ, 皮疹内容物にゲフィチニブが検出された(図 14)。しかしながら, 尋常性痒疹患者由

来の皮疹内容物にはゲフィチニブに相当するピークは検出されなかった。したがって、経口投与したゲフィチニブは皮膚組織に移行し、皮脂腺・毛包系に排出されることが初めて示唆された。

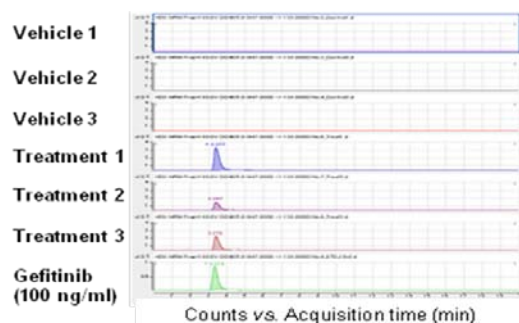


図 13 ゲフィチニブ投与(Treatment 1-3)ハムスター皮膚組織における薬剤の同定

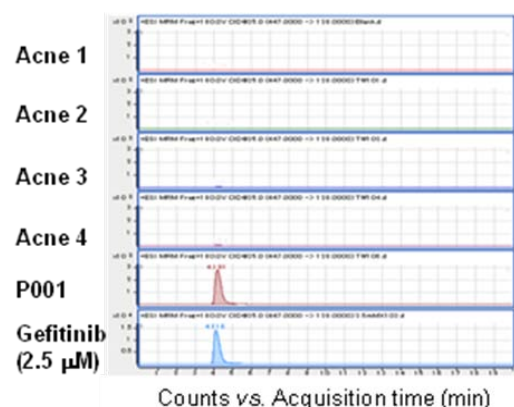


図 14 ゲフィチニブ服用患者(P001)由来皮疹内容物中における薬剤の同定

以上を総括すると、ゲフィチニブによる痤瘡様皮疹の発症機構として、ゲフィチニブが皮脂腺に作用し、EGFR 下流の STAT シグナル阻害に起因した男性ホルモンの生合成促進に連動して皮脂産生および細胞内脂肪滴形成を増強することが強く示唆される(図 15)。痤瘡様皮疹の発症は良好な治療予後と関連することが報告されているものの、顔面や胸部などに高発現する皮疹は、患者の QOL を低下させることも事実である。本研究成果は、ゲフィチニブによる痤瘡様皮疹の発症機構解明のみならず、その治療を受ける患者の QOL 改善または副作用防止に向けた新たな治療指針の策定にも貢献するものと期待される。今後は、同様な皮膚障害が顕著に現れる抗体医薬品による副作用機構解明に本研究成果を応用することで、患者のストレス軽減に繋がる次世代抗体薬によるガン治療法の開発が期待される。

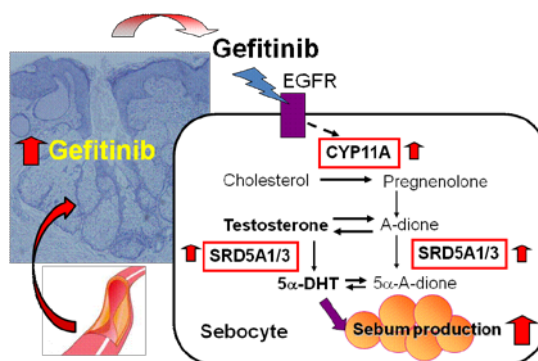


図 15 ゲフィチニブによる痤瘡様皮疹の発症機構

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

- ① Sato, T., Akimoto, N., Kitamura, K., Kurihara, H., Hayashi, N., and Ito, A. Adapalene suppresses sebum accumulation via the inhibition of triacylglycerol biosynthesis and perilipin expression in differentiated hamster sebocytes *in vitro*. *J. Dermatol. Sci.* 70: 204-210 (2013) (査読有) Doi: 10.1016/j.jdermsci.2013.02.003
- ② Sato, T., 他 3 名. Suppression of sebum production and accumulation by β-cryptoxanthin due to the inhibition of the expression of diacylglycerol acyltransferase-1 and perilipin in hamster sebocytes. *J. Cosmet. Dermatol. Sci. Appl.* 3: 99-106 (2013) (査読有) Doi: 10.4236/jcdsa.2013.31014
- ③ Kurihara H, Sato T., 他 2 名. Differentiated hamster sebocytes exhibit apoptosis-resistant phenotype by the augmentation of intracellular calcium level *in vitro*. *Exp Dermatol.* 22: 57-59 (2013) (査読有) Doi: 10.1111/exd.12026
- ④ Sato, T., 他 4 名. Novel anti-acne actions of nadifloxacin and clindamycin that inhibit the production of sebum, prostaglandin E₂, and promatrix metalloproteinase-2 in hamster sebocytes. *J. Dermatol.* 39: 774-780 (2012) (査読有) Doi: 10.1111/j.1346-8138.2012.01525.x
- ⑤ Akazawa, Y., Sayo, T., Sugiyama, Y., Sato, T., 他 3 名. Adiponectin resides in mouse skin and upregulates hyaluronan synthesis in dermal fibroblasts. *Connective Tissue Res.* 52: 322-328 (2011) (査読有) Doi: 10.3109/03008207.2010.528566
- ⑥ Sato, T., 他 5 名. Augmentation of gene expression and production of promatrix metalloproteinase 2 by *Propionibacterium acnes*-derived factors in hamster sebocytes

and dermal fibroblasts: A possible mechanism for acne scarring. *Biol. Pharm. Bull.* 34: 295-299 (2011) (査読有) Doi: <http://dx.doi.org/10.1248/bpb.34.295>

[学会発表] (計 24 件)

- ① 佐藤 隆, 林 伸和 (5 番目) (他 9 名), ゲフィチニブによる痤瘡様皮疹の発症機構: 毛包内へ移行したゲフィチニブによる皮脂異常産生, 第 111 回日本皮膚科学会総会・学術大会, 20120601, 京都
- ② 堤 亜弥, 佐藤 隆 (他 4 名), 皮脂腺における熱ショックによる神経内分泌ネットワーク(HPA axis)の活性化と皮脂産生促進作用, 第 68 回西東京内分泌代謝研究会, 20120611, 東京
- ③ Sato, T. (他 3 名), Novel anti-acne action of adapalene that inhibits the biosynthesis of triacylglycerol and lipid-drop formation in hamster sebocytes *in vitro*, The 42nd Annual Meeting of the European Society for Dermatological Research, 20120919, Venice, Italy
- ④ Ito, A., Akimoto, N., and Sato, T., Triptolide, a diterpenoid triepoxide, prevents ultraviolet B-induced sebum production and hyperkeratinization in hamster skin *in vivo* and *in vitro*, The 42nd Annual Meeting of the European Society for Dermatological Research, 20120919, Venice, Italy
- ⑤ Sato, T. (他 6 名), Novel anti-acne action of β -cryptoxanthin that inhibits sebum production and lipid-droplet formation in hamster sebocyte, 日本研究皮膚科学会第 37 回年次学術大会・総会, 20121207, 沖縄
- ⑥ 佐藤 隆, 培養皮脂腺細胞を駆使した皮脂腺機能の分子機構解明と創薬研究, 第 1 回日本痤瘡研究会学術大会, 20130224, 東京
- ⑦ Sato, T. (他 6 名), Molecular mechanisms of acne-like rash development by gefitinib that augments sebocyte steroidogenesis resulting in the enhancement of sebum production, 22nd World Congress of Dermatology, 20110524, Seoul, Korea
- ⑧ Sato, T. (他 4 名), Inhibition of sebum, prostaglandin E₂, and promatrix metalloproteinase-2 production by antimicrobial agents in hamster sebocytes, 41st Annual Meeting of the European Society for Dermatological Research, 20110907, Barcelona, Spain
- ⑨ Sato, T. (他 4 名), Anti-lipogenetic and -inflammatory actions of antimicrobial agents in peptidoglycan-stimulated hamster sebocytes, The 36th Annual Meeting of the

Japanese Society for Investigative Dermatology, 20111209, Kyoto

- ⑩ 阿部夏希, 佐藤 隆 (他 4 名), 紫外線による皮脂産生・分泌促進機構: 皮脂腺局所における神経内分泌ネットワーク(HPA axis)の関与, 日本薬学会第 132 年会, 20120328, 札幌
- ⑪ 吉田健太, 佐藤 隆 (他 6 名), ゲフィチニブによる副作用・痤瘡様皮疹の発症機構とそれに対する痤瘡治療薬の有用性評価, 第 54 回日本薬学会関東支部大会, 20101002, 八王子
- ⑫ Sato, T. (他 7 名), Molecular mechanisms of gefitinib-induced rash formation: Gefitinib augments lipogenesis and steroidogenesis in sebaceous gland cells, 第 35 回日本研究皮膚科学会, 20101202, 和歌山

[図書] (計 1 件)

- ① 佐藤 隆, 中山書店, 培養皮脂腺細胞から得られた最新の知見: 皮膚科臨床アセット 8 変貌する痤瘡マネジメント (古江増隆, 林 伸和編), 2012, 292-297

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 隆 (SATO TAKASHI)
東京薬科大学・薬学部・准教授
研究者番号: 9 0 2 6 6 8 9 1

(2) 研究分担者

林 伸和 (HAYASHI NOBUKAZU)
(財) 冲中記念成人病研究所・その他部
局等・研究員
研究者番号: 9 0 2 7 2 5 7 5
太田 伸 (OHTA SHIN)
東京薬科大学・薬学部・教授
研究者番号: 3 0 2 3 3 1 2 5