

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790156

研究課題名(和文) 分子標的治療薬による皮膚障害の副作用バイオマーカーの探索

研究課題名(英文) Search for biomarkers of adverse events as skin reaction by molecular target drugs

研究代表者

山本 和宏 (YAMAMOTO, KAZUHIRO)

神戸大学・医学部附属病院・薬剤師

研究者番号：30610349

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：STAT3の活性化変動は分子標的治療薬によるヒト表皮角化細胞(HaCaT)の増殖抑制作用およびアポトーシス効果を増強させた。また、恒常的活性化体であるSTAT3Cを遺伝子導入した細胞において分子標的治療薬による細胞増殖抑制作用を減弱した。さらに、薬剤をHaCaT細胞に短時間曝露するとSTAT3の活性を低下させるが長時間曝露では亢進させることや、STAT3C導入細胞においてアポトーシス抑制因子であるbcl-2やsurvivinの発現が亢進することを考慮すると、分子標的治療薬による角化細胞への障害性においてアポトーシス抑制因子の発現変動に起因するSTAT3の活性変動が重要な因子となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to examine whether the toxicity of molecular target drugs for human keratinocytes was associated with inhibiting signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3). We studied whether STAT3 activity affects molecular target drugs-induced cell growth inhibition in HaCaT cells by WST-8 assay. Stat3 enhanced the cell-growth inhibitory and apoptotic effects of molecular target drugs. HaCaT cells transfected with constitutively-active STAT3 (STAT3C) were resistant to the molecular target drugs-induced cell growth inhibition. STAT3 activity decreased after short-term treatment with sorafenib and sunitinib in a dose-dependent manner and recovered after long-term treatment with molecular target drugs at low doses. Moreover, HaCaT cells transfected with STAT3C showed high expression of apoptosis suppressors, e.g. bcl-2 and survivin. Thus, STAT3 activation mediating apoptosis suppressors may be a key factor in molecular target drugs-induced keratinocyte cytotoxicity.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：分子標的治療薬 皮膚障害 手足症候群 STAT3

1. 研究開始当初の背景

近年、癌化学療法は分子標的治療薬の登場により飛躍的に進歩したが、一方で、重大な副作用も認められている。中でも皮膚障害は、多くの患者に発症し、治療の中断や QOL を低下させる要因となっている。しかし、発症に関する詳細なメカニズムは未だ解明されておらず、今後も数多くの分子標的治療薬が登場することが予想されるため、機構の解明が急務とされている。

皮膚の恒常性を維持するタンパク質として Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (STAT3) が知られている。STAT3 は成長因子やサイトカインからの刺激を受け、自身が転写因子となって、増殖やアポトーシスに関連する因子の発現制御を行うことが知られている。また、腎癌においてはその発現量が分子標的治療薬の奏効率と逆相関することが報告されており、治療効果と発現が相関する皮膚障害との関連性は検討する意義が高い。

そこで本研究では、分子標的治療薬による皮膚障害発症メカニズムの分子生物学的解明と副作用のバイオマーカーを特定することを目的とし、皮膚組織に及ぼす分子標的治療薬の影響について検討する。

2. 研究の目的

本研究では、分子標的治療薬の標的分子の下流に位置する STAT3 に着目し、表皮角化細胞への毒性における STAT3 の関連性について解明することを目的とする。

3. 研究の方法

ヒト表皮角化細胞モデルとして HaCaT 細胞を使用し、また、選択的 STAT3 阻害剤として staticc を使用した。分子標的治療薬としてソラフェニブ、スニチニブ、エベロリムスを選択して下記検討を実施した。

(1) 細胞増殖抑制作用の評価

staticc の前処置による各分子標的治療薬の HaCaT 細胞における細胞増殖抑制作用の変化を WST-8 法によって評価した。

(2) アポトーシス解析

staticc の前処置による各分子標的治療薬の HaCaT 細胞におけるアポトーシス作用の変化を Annexin-V/Propidium iodide (PI) を用いたイメージングサイトメトリー法により評価した。イメージングサイトメーターとして IN Cell Analyzer 2000 (GE Healthcare) を用いた。

(3) シグナル伝達因子の活性化・発現変動

HaCaT 細胞における各分子標的治療薬曝露後のシグナル伝達因子の活性化および発現

変動を western blot 法により評価した。

(4) STAT3 核移行解析

各分子標的治療薬曝露における HaCaT 細胞の STAT3 の核移行率の変化を蛍光免疫染色によるイメージングサイトメトリー法により評価した。核染色は PI にて行い、STAT3 は FITC-conjugate 抗 STAT3 抗体を用いて染色を行った。

(5) 変異型 STAT3 遺伝子導入による影響

HaCaT 細胞に恒常的活性化 STAT3 (STAT3C) の発現ベクターをリポフェクション法により遺伝子導入し、各分子標的治療薬の細胞増殖抑制作用、タンパク質発現の変動に及ぼす影響を評価した。

4. 研究成果

(1) 細胞増殖抑制作用の評価

staticc の前処置により、HaCaT 細胞における各分子標的治療薬の細胞増殖抑制作用は顕著に増大した (Fig 1)。本結果よりソラフェニブ、スニチニブ、エベロリムスにおける細胞増殖抑制作用において、STAT3 の活性化が生存に関わる重要な因子であることを示唆した。また、本現象は STAT3 の活性化を欠損したヒト腎癌細胞、肝癌細胞、肺癌上皮細胞などでは認められないことも明らかにし、STAT3 阻害の影響は皮膚組織特異的である可能性が示された。

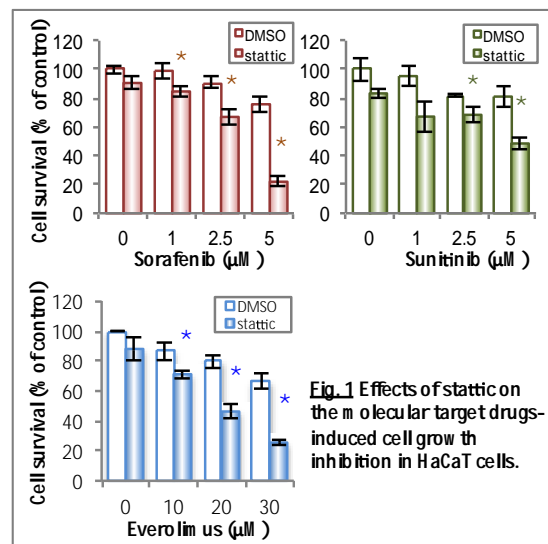


Fig. 1 HaCaT cells were incubated in medium containing each molecular target drugs at the indicated concentrations for 48 h after pretreatment with 10 μM staticc or DMSO (a solvent of staticc) for 20 min. Cell viability was determined by WST-8 colorimetric assay. *p < 0.01 Student's t test compared with control (DMSO).

(2) アポトーシス解析

static の前処置により HaCaT 細胞における各分子標的治療薬のアポトーシス効果は顕著に増大した (Fig. 2)。本結果より Fig. 1 より得られた増殖抑制作用の増強は主にアポトーシスを亢進することに起因することを示した。

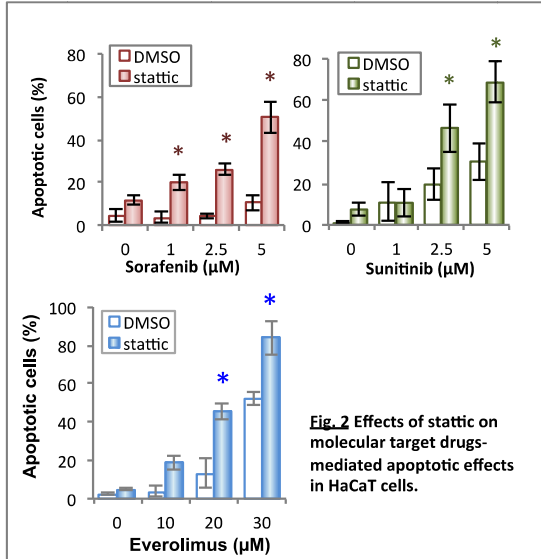


Fig. 2 HaCaT cells were incubated in medium containing everolimus at the indicated concentrations for 48 h after pretreatment with 10 μM static or DMSO for 20 min. Subsequently, apoptotic cells were detected using FITC-labeled Annexin V/PI staining on an IN Cell Analyzer 2000 for Imaging cytometric analysis.

(3) シグナル伝達因子の活性化・発現変動

各分子標的治療薬を HaCaT 細胞に処置すると、曝露濃度依存的な STAT3 のリン酸化の減少を認めた (Fig. 3)。また、この減少は時間依存的に逆転し、低濃度長時間曝露により STAT3 リン酸化においては亢進を示した。以上の結果より、分子標的治療薬による表皮角化細胞に対する毒性において、STAT3 は間接的に阻害されるが、代償的シグナル経路として活性化が回復し、細胞の生存に大きく寄与することが示唆された。

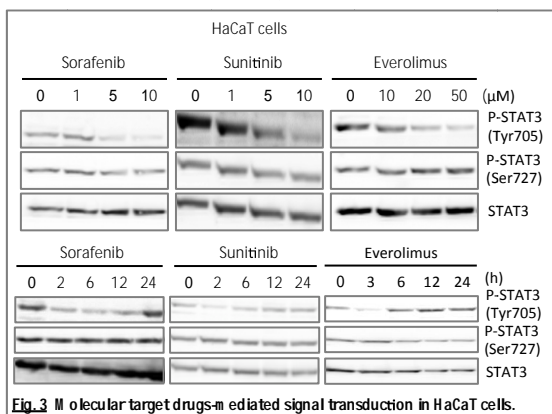


Fig. 3 Molecular target drugs-mediated signal transduction in HaCaT cells.

Fig 3 Alteration in signal transduction of STAT3. HaCaT cells were incubated in medium containing everolimus at the indicated concentrations for 2 h. Total cell lysates were separated by SDS-PAGE and electrotransferred to PVDF membranes. Various proteins and phosphorylation levels were evaluated by immunoblotting assay with specific antibodies.

(4) STAT3 核移行解析

STAT3 は上流からのシグナルを受けると自身が転写因子として核内に移行し、増殖、アポトーシスなどに関わる種々の遺伝子を転写することが報告されている。HaCaT 細胞にソラフェニブおよびスニチニブを処置すると、STAT3 は細胞質分画における存在比が大きくなり、核移行率の減少を示した (Fig. 4)。これらはリン酸化が減少した結果を支持するものである。

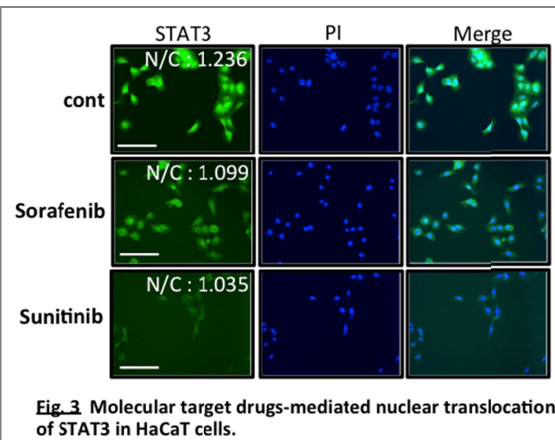


Fig. 3 Molecular target drugs-mediated nuclear translocation of STAT3 in HaCaT cells.

Fig 3 Immunostaining images. HaCaT cells incubated with medium with indicated drugs for 2 h were fixed and incubated with an anti-Stat3 antibody, followed by incubation with FITC-conjugated anti-rabbit IgG (green) and visualization on an IN Cell Analyzer 2000. STAT3 nuclear entry was determined by measuring the nucleus/cytoplasm intensity ratio of green fluorescence (n = 3).

(5) 変異型 STAT3 遺伝子導入による影響

STAT3C プラスミドを遺伝子導入した HaCaT 細胞においては空ベクターの遺伝子導入細胞と比較して、各分子標的治療薬による細胞増殖抑制作用が顕著に減弱した (Fig. 5)。また、遺伝子導入した細胞においては survivin や bcl-2 などのアポトーシス抑制因子の発現亢進を認めた (Fig. 6)。これらのアポトーシス抑制因子は皮膚の恒常性に寄与することが報告されており、さらにその発現は、STAT3 による制御を受けていることが知られているため、分子標的治療薬による表皮角

化細胞への毒性は、STAT3 の活性化変動を介したアポトーシス抑制因子の発現変動によりアポトーシスが亢進することが機序として考えられる。

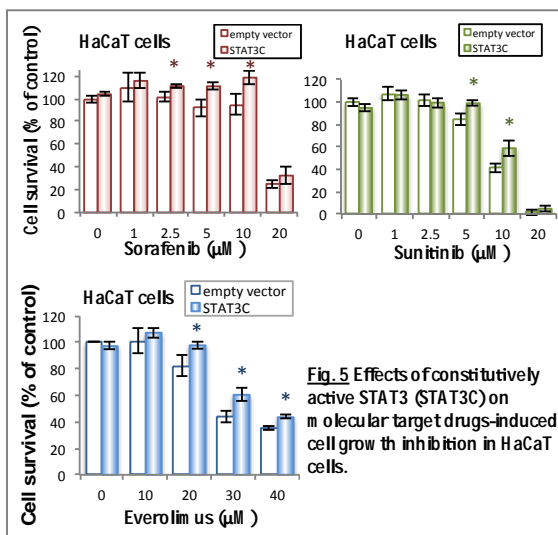


Fig. 5 Effects of STAT3C transfection on molecular target drugs-induced cell growth inhibition. HaCaT cells transiently transfected with STAT3C or empty vector were incubated in medium containing each molecular target drugs at the indicated concentrations for 48 h after preincubation for 24 h. Cell viability was determined by WST-8 colorimetric assay. *p < 0.01 Student's t test compared with control (DMSO).

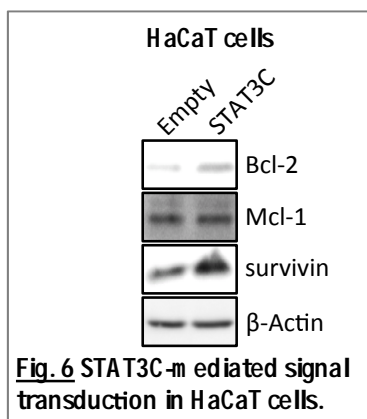


Fig. 6 Alteration in signal transduction of apoptosis suppressors. HaCaT cells transiently transfected with STAT3C or empty vector. Total cell lysates were separated by SDS-PAGE and electrotransferred to PVDF membranes. Various proteins and phosphorylation levels were evaluated by immunoblotting assay with specific antibodies.

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 2 件)

1. **Yamamoto K**, Uda A, Mukai A, Yamashita K, Kume M, Makimoto H, Bito T, Nishigori C, Hirano T, Hirai M. Everolimus-induced human keratinocytes toxicity is mediated by STAT3 inhibition.. J Exp Clin Cancer Res. 32:83, 2013 (査読有)
2. 四宮一昭, 池方康一郎, 小山敏広, **山本和宏**, 平野剛, 北村佳久, 平井みどり, 干堂年昭: 患者のジェネリック医薬品変更希望に影響を及ぼす患者背景・重要因子の探索 -ジェネリック医薬品の適切な使用促進のために-, 日本薬剤師会雑誌, 65:23-25, 2013 (査読有)

[学会発表] (計 14 件)

1. **山本和宏**, 水本篤志, 西村幸治, 宇田篤史, 中川勉, 久米学, 榎本博雄, 尾藤利憲, 錦織千佳子, 平野剛, 平井みどり: ソラフェニブ・スニチニブによるアポトーシス制御機構を介した皮膚障害発症メカニズムの解明, 日本薬学会 134 年会, 2014 年 3 月 30 日, 熊本
2. 七里博章, **山本和宏**, 宇田篤史, 中川勉, 平野剛, 平井みどり: 冬虫夏草エキスにおけるアポトーシス誘導作用の評価, 日本薬学会 134 年会, 2014 年 3 月 30 日, 熊本
3. 小澤拓, **山本和宏**, 久保萌子, 賀来健太, 水本篤志, 宇田篤史, 濱口常男, 中川勉, 尾藤利憲, 錦織千佳子, 平野剛, 平井みどり: ソラフェニブによる皮膚障害のビタミン C 誘導体を用いた予防・治療法のメカニズム解析, 日本薬学会 134 年会, 2014 年 3 月 30 日, 熊本
4. 渡邊愛未, **山本和宏**, 宇田篤史, 中川勉, 平野剛, 平井みどり: mTOR 阻害薬によるサイトカイン分泌制御を介した口内炎発症機構の解明, 日本薬学会 134 年会, 2014 年 3 月 30 日, 熊本
5. 老川諒, **山本和宏**, 宇田篤史, 中川勉, 平野剛, 平井みどり: エベロリムスによる STAT3 活性化変動を介した間質性肺疾患発症機構の探索, 日本薬学会 134 年会, 2014 年 3 月 30 日, 熊本 *優秀発表賞受賞
6. 宇田篤史, 大澤史宜, **山本和宏**, 中川勉, 久米学, 榎本博雄, 平野剛, 平井みどり: 服用後におけるゾピクロン錠(アモバン®錠)とエスゾピクロン錠(ルネスタ®錠)の苦味評価, 日本薬学会 134 年会, 2014 年 3 月 30 日, 熊本
7. 水本篤志, **山本和宏**, 宇田篤史, 高良恒史, 中山優子, 中川勉, 平野剛, 平井みどり: MAPK-STAT3 解析によるマルチキナーゼ阻害薬治療アルゴリズムの確立, 日本薬学会 134 年会, 2014 年 3 月 29 日,

熊本

8. **山本和宏**, 田中健太, 宇田篤史, 久米学, 榎本博雄, 平野剛, 平井みどり: タクロリムス併用腎移植維持期におけるエベロリムス初期投与量の検討, 第 23 回日本医療薬学会年会, 2013 年 9 月 22 日, 仙台
9. **山本和宏**, 西村幸治, 宇田篤史, 向井啓, 久米学, 榎本博雄, 平野剛, 尾藤利恵, 錦織千佳子, 平井みどり: 分子標的治療薬による皮膚障害に対する各種ビタミンを用いた治療への応用, 日本薬学会 第 133 年会, 2013 年 3 月 30 日, 横浜
10. 西村幸治, **山本和宏**, 宇田篤史, 向井啓, 久米学, 榎本博雄, 平野剛, 尾藤利恵, 錦織千佳子, 平井みどり: sunitinib による皮膚障害バイオマーカーの検討, 日本薬学会 第 133 年会, 2013 年 3 月 30 日, 横浜
11. 宇田篤史, 原口珠実, 吉田 都, 向井 啓, **山本和宏**, 久米学, 榎本博雄, 平野剛, 内田享弘, 平井みどり: ソピクロン錠(アモバン錠®)とエスゾピクロン錠(ルネスタ錠®)の苦味評価, 第 22 回 日本医療薬学会年会, 2012 年 10 月 28 日, 神戸
12. 富田猛, **山本和宏**, 久米学, 榎本博雄, 平野剛, 平井みどり: モルヒネ導入患者における腎機能を考慮した副作用発現頻度の検討, 第 6 回日本緩和医療薬学会年会, 2012 年 10 月 2 日, 神戸
13. 宮川典子, 富田猛, **山本和宏**, 宇田篤史, 向井啓, 山下和彦, 久米学, 榎本博雄, 平野剛, 平井みどり: CLIA 法および ACMIA 法におけるシクロスポリン A 血中濃度測定法の比較, 第 29 回日本 TDM 学会学術大会, 2012 年 6 月 16 日, 神戸
14. 若松雄太, 山下和彦, **山本和宏**, 向井啓, 瀬戸崇光, 宇田篤史, 平野剛, 濱口常男, 岩川精吾, 太田光熙, 棚橋孝雄, 平井みどり: Dimension® Xpand を用いた血清リチウム濃度の院内測定 第 29 回日本 TDM 学会学術大会, 2012 年 6 月 17 日, 神戸

〔図書〕(計 1 件)

1. **山本和宏**, 平野剛, 平井みどり: 薬学教育 6 年制とこれからの展望 次世代薬剤師を目指して, 医薬ジャーナル 2012 年 9 月号, 医薬ジャーナル社, 63-66

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 和宏 (YAMAMOTO KAZUHIRO)
神戸大学・医学部附属病院薬剤部・薬剤師
研究者番号: 30610349