

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461666

研究課題名(和文) EGFR阻害剤による皮脂腺細胞の変化と治療薬探索モデルの構築に関する研究

研究課題名(英文) the pathogenic mechanisms of EGFR inhibitor-induced rash and establishment of system for constructing medical treatment

研究代表者

宇原 久 (UHARA, Hisashi)

信州大学・学術研究院医学系・准教授

研究者番号：40201355

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：我々はヒト培養皮脂腺細胞SEB-1を使って、EGFR阻害剤によるざ瘡様皮疹がおこる病理学的機序を検討した。EGFR阻害により引き起こされるTNF α の産生には皮脂腺細胞の分化が関連していた。そしてこの過程にはPPAR γ -COX-2経路とNF κ B経路が関与していることが明らかとなった。したがってこれらの分子を阻害することでEGFR阻害によるざ瘡様皮疹の炎症症状を軽減させる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We investigated the pathogenic mechanisms of EGFR inhibitor-induced papulopustular rash development, using cultured human sebocytes, SEB-1. Blockade of EGFR led to TNF α induction, which was associated with sebaceous differentiation. EGFR inhibitor-induced TNF α expression involves with PPAR γ , COX-2 and NF κ B; thus, inhibition of these molecules may attenuate inflammation of papulopustular rash.

研究分野：皮膚科学

キーワード：EGFR阻害剤 ざ瘡様皮疹 皮脂腺細胞 SEB-1 PPAR γ NF κ B COX-2

1. 研究開始当初の背景

EGFR 阻害剤による皮膚障害は治療継続を困難にする場合がある。代表的なざ瘡様皮疹 (papulopustular rash: PPR) に対して副腎皮質ホルモン剤やざ瘡薬などで対応しているが、これらの治療効果に関する基礎的なエビデンスはほとんどない。これまでの PPR に関する基礎的な研究では、EGFR を阻害すると炎症性ケモカインやサイトカインが誘導される、脂腺周囲の炎症細胞浸潤や脂腺の肥大、などが報告されていた。以上より EGFR 阻害により脂腺細胞では炎症と分化が引き起こされると考えられていたが、その詳しい機序はわかっていない。代表的なヒト培養脂腺細胞株は世界に3つしか存在しない。我々はその内の一つである SEB-1 をペンシルバニア州立大学の Thiboutot 博士より分与を受け、脂腺の解析を進めてきた。SEB-1 に EGFR 阻害薬のひとつであるエルロチニブを加えたところ TNF α 、IL-5 や IL-12A などいくつかのサイトカインが上昇した。ヒト表皮細胞 HaCaT やヒト線維芽細胞 WI38 と比較して、SEB-1 においては特に TNF α の産生が上昇していた。脂腺細胞に特異性が高いことから、TNF α をはじめとするいくつかのサイトカインの産生異常が PPR の発症に関連性が高いのではないかと考えた。さらに SEB-1 にエルロチニブやゲフィチニブを加えると、細胞内に大型の油滴が増えることを見出した。このことは脂腺細胞のサイトカイン産生は細胞分化と関連性があることを示唆している。以上より EGFR 阻害薬により脂腺細胞の状態が変化し、さらに TNF α などのサイ

トカインが誘導されることが皮膚障害の機序ではないかと考えた。SEB-1 を用いてこの現象の詳細を解明することが EGFR 阻害による皮膚障害に対する治療法の開発につながるのではないかと考え、本研究課題の着想に至った。

2. 研究の目的

ヒト培養脂腺細胞 SEB-1 を用いて以下の点を解析する。
EGFR 阻害剤によって (1) 誘導されるサイトカインは何か。(2) 脂腺細胞はどのような形態変化をするのか。(3) どのシグナル伝達経路が活性化してサイトカイン産生と脂腺細胞の変化を起こすのか。これらを明らかにし、候補となる分子のアゴニストやアンタゴニストを用いてシグナル活性が抑制されるかを確認する。さらに新規の治療法に結び付けることを目指す。

3. 研究の方法

SEB-1 に EGFR 阻害剤 (エルロチニブ、ゲフィチニブ) を投与し、生じる変化をサイトカイン、脂腺分化、シグナル活性の3点の解析を行う。

(1) EGFR 阻害剤による遺伝子発現変化の網羅的解析

PCR アレイを使ってエルロチニブにより発現が上昇する分子のスクリーニングをする。

(2) EGFR 阻害剤によって脂腺細胞で活性変化が生じるシグナル伝達系の同定
炎症関連であるリン酸化蛋白特異的抗体を用いたウエスタンブロット法や luciferase assay を用い、各シグナル系の

活性変化を把握する。活性化が認められた経路についてさらに詳しい解析を行う。

(3) EGFR 阻害剤によるざ瘡様皮疹での cytokine 産生や脂腺分化の解析

エルロチニブやゲフィチニブを投与に伴い生じたざ瘡様皮疹に発現している分子を解析するため、免疫染色 (TNF α 、NF κ B、EMA: epithelial membrane antigen など) を行う。

(4) アゴニスト、アンタゴニストによる SEB-1 でのサイトカイン産生の変化の解析

EGFR 阻害剤によって変化したシグナル活性をアゴニスト、アンタゴニストを投与して是正を図る。これによりざ瘡様皮疹発症に関わるサイトカインが正常化するかを確認する。(PPAR γ 、NF κ B、COX-2 など)

4. 研究成果

(1) EGFR 阻害により炎症性サイトカインが誘導される

SEB-1 にエルロチニブを添加すると様々なサイトカインやケモカインが誘導された(図1)。有意に産生が上昇した分子について HaCaT と WI38 と比較したところ、TNF α 産生が最も顕著だったため TNF α につきさらに解析を進めた。エルロチニブ、ゲフィチニブ共に用量・時間依存性に TNF α 産生が増加した。EGFR 阻害により、脂腺細胞から TNF α 産生が誘導されることがわかった。

(2) EGFR 阻害により脂腺分化が誘導される

エルロチニブ添加により、SEB-1 から脂腺分化を示す分子 (Adipophilin, FAS:

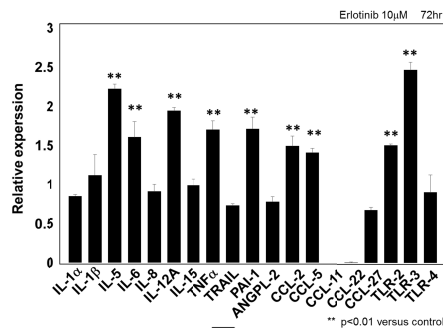


図1

fatty acid synthase, MC5R: melanocortin 5 receptor, が有意に上昇した。エルロチニブやゲフィチニブを加えた SEB-1 は大型の油滴を多数含有し、これらはオイルレッド染色陽性だった。また、EGFR 阻害剤を投与により生じた患者のざ瘡様皮疹の病理組織では脂腺の最外層にも油滴を含有する細胞が多数認められ、脂腺分化の異常が示唆された。尚、TNF α や NF κ B 染色では、正常脂腺と有意な差は認められなかった。

(3) EGFR 阻害により PPAR γ を介して TNF α 産生が誘導される

エルロチニブにより SEB-1 の PPAR 活性が上昇した(図2)。PPAR γ アゴニストにより TNF α 産生が上昇した。

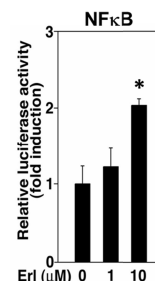


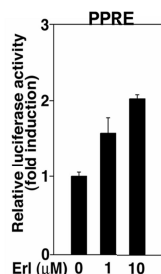
図2

同時に大型の油滴を含有し、Adipophilin 発現が著明に増加した。以上より PPAR γ 経路が活性化すると、脂腺分化と TNF α 産生が誘導されることがわかった。また、エルロチニブにより COX-2 発現が上昇し、PPAR γ アンタゴニストにより抑制されたことから PPAR γ の下流に COX-2 が位置することが示唆された。エルロチニブ上昇した TNF α 発現は、PPAR γ アンタゴニストまたは COX-2 阻害剤により共に抑制された。

(4) EGFR 阻害により NFκB を介して TNFα 産生が誘導される

エルロチニブにより SEB-1 の NFκB 活性が上昇した (図3)。

NFκB アゴニストにより TNFα 産生が上昇した。同時に大型の油滴を含有し、Adipophilin と MC5R の発現が有意に増加した。以上



より NFκB 経路が活性化すると、脂腺分化と TNFα 産生が誘導されることがわかった。また、エルロチニブにより COX-2 発現は誘導されなかった。

エルロチニブ上昇した TNFα 発現は、NFκB アンタゴニストにより抑制された。

(5) EGFR 阻害により PPARγ と NFκB 活性化はそれぞれ独立している

エルロチニブにより PPAR と NFκB の活性は上昇するが、NFκB アンタゴニスト、PPARγ アンタゴニストをそれぞれ加えてもそれらの活性に変化はなかった。

以上の結果から、EGFR 阻害剤により脂腺細胞は分化が誘導され、分化した細胞から TNFα をはじめとする炎症性サイトカインが産生されることがわかった。そしてこの過程で PPARγ - COX-2 経路と NFκB 経路がそれぞれ活性化しており、これらの経路を阻害することが PPR の炎症症状を軽減させる可能性があることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Atsuko Ashida, Eisaku Ogawa, Hisashi Uhara, Tomonobu Koizumi, Ryuhei

Okuyama. Inhibition of epidermal growth factor receptor induces tumor necrosis factor- α via activation of peroxisome proliferator-activated receptor- γ and nuclear factor- κ B in sebocytes: A possible pathogenesis of papulopustular rash. J Dermatol Sci 2016, in press, 査読あり

〔学会発表〕(計2件)

Atsuko Ashida, Eisaku Ogawa, Ryuhei Uchiyama, Hisashi Uhara, Ryuhei Okuyama. Epidermal growth factor receptor inhibitor induces tumor necrosis factor- α via activation of the PPAR and NF- κ B from sebocytes. 第40回日本研究皮膚科学会学術大会総会 岡山 12月11-13日, 2015

芦田敦子、木庭幸子、高沢裕子、内山龍平、宇原久、小川英作、奥山隆平. Analysis of EGFR inhibitor-induced inflammation in human sebocytes. 第28回表皮細胞研究会 鹿児島 12月6日, 2014

〔図書〕(計1件)

御子柴飛鳥、芦田敦子、奥山隆平. 最新臨床 大腸癌学 抗EGFR抗体薬により皮膚障害とその予防・対策, 日本臨床 73(増刊4): 612-616, 2015

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宇原 久 (UHARA, Hisashi)
信州大学・学術研究院医学系・
准教授

研究者番号: 40201355

(2) 研究分担者

芦田敦子 (ASHIDA, Atsuko)

信州大学・学術研究院医学系・

助教

研究者番号 : 00596786

奥山隆平 (OKUYAMA, Ryuhei)

信州大学・学術研究院医学系・

教授

研究者番号 : 80292332