

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26461956

研究課題名(和文) 化学療法による皮膚障害に対する高濃度水素水の有用性に関する研究

研究課題名(英文) Efficacy of high density hydrogen water for the treatment of chemotherapy induced skin disease

研究代表者

田口 哲也 (Taguchi, Tetsuya)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：80243260

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：最初にヒト角化皮膚正常細胞株Ha-Cat培養細胞に対してafatinib, lapatinib, 5-fuによる増殖抑制をWST-8 assayで確認した。そして、この増殖抑制が細胞周期停止ではなく、アポトーシスである可能性がFACSによって示唆された。これらはカスパーゼ非依存的なメカニズムによって起こっていることが、pan-caspase inhibitorであるzVADの添加によって確認された。さらに、pan-ROS indicator及びpan-ROS scavengerを用いたassayによりこの細胞死のメカニズムにROSの関与が示唆されたが、特定のものは同定できず他の関与が示唆された。

研究成果の概要(英文)：First of all, inhibitory effect of proliferation by afatinib, lapatinib and 5-FU to Ha-Cat (human keratinocyte) cell line was confirmed by WST-8 assay. And according to the FACS analysis, this proliferation suppression is likely to be due to apoptosis instead of the cell cycle arrest. In addition, caspase independent mechanism was revealed by zVAD added pan-caspase inhibitory assay. Finally, according to the pan-Ros indicator and pan-ROS scavenger assay, this cell death was thought to be due to ROS. But we could not identify the specific type of ROS using specific ROS indicator assay.

研究分野：癌化学療法と副作用対策

キーワード：癌 化学療法 分子標的薬 抗癌剤 皮膚障害 ヒト角化皮膚正常細胞株 アポトーシス ROS

## 1. 研究開始当初の背景

癌治療の進歩はめざましく、特に新規抗癌剤や分子標的薬の開発により癌化学療法の有効性が高まりつつある。しかし、特有な有害事象が発生し患者 QOL は低下、予定外の休薬による治療の延期や投与量の減量により引いては効果を削減させる原因にもなりかねない。これらの有害事象の中でも皮膚障害（手足症候群、ざ瘡様皮疹など）は薬剤によっては頻発し、手足や顔面の皮膚の痛みや障害により日常生活の質が大きく損なわれ、QOL が極度に低下することが知られている。しかし、一方でこれらの皮膚障害と薬剤の有効性には正の相関があることも知られていて、いかに効果を維持したまま皮膚障害だけを予防あるいは治療できるかはこれらの化学療法の成否を左右すると言える。

## 2. 研究の目的

癌化学療法における皮膚障害の発生機序とその抑制方法を基礎的に解明し、予防法や治療法開発への橋渡し研究に繋げることが目的である。

予測される reactive oxygen species (ROS)、特にヒドロキシラジカル( $\cdot\text{OH}$ )を発生させる ROS の関与を証明することでそれによる皮膚障害を高濃度水素水により予防や治療するための臨床試験への橋渡しを目指して研究を行った。

## 3. 研究の方法

ヒト角化皮膚正常細胞株 Ha-Cat 培養細胞にいずれも臨床では皮膚障害の発生頻度の高い EGFR inhibitor の afatinib, EGFR/HER2 inhibitor の lapatinib, 代謝拮抗剤の 5-fu を添加し増殖能測定、細胞周期解析、アポトーシスの解析、ROS の同定解析を行った。

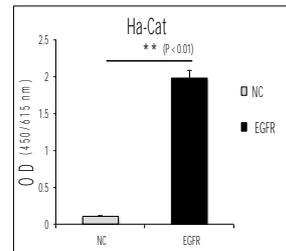
## 4. 研究成果

まず、予備実験としてヒト角化表皮細胞

Ha-Cat に EGFR が発現していることを確認した (図 1)。

図 1: ヒト上皮角化細胞 Ha-Cat 細胞の EGFR 発現について

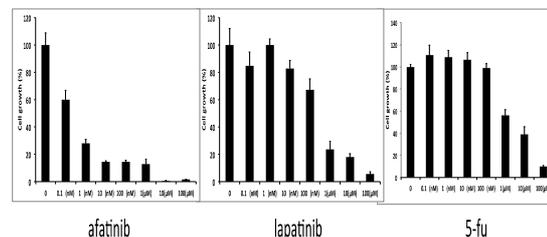
- 目的 Ha-Cat 細胞を用いた分子標的薬及び化学療法薬剤による ROS 誘導の予備実験として、Ha-Cat 細胞に EGFR が発現していることを確認する。
- 方法 EGFR in-cell ELISA kit (Thermo)
- 結果 EGFR の発現が確認された



そして、ヒト角化皮膚正常細胞株 Ha-Cat 培養細胞に対して afatinib, lapatinib, 5-fu による増殖抑制を WST-8 assay で確認した (図 2)。

図 2: Afatinib, lapatinib, 5-fu による Ha-Cat 細胞の増殖抑制効果

- 目的 Ha-Cat 細胞に対する afatinib, lapatinib, 5-fu の増殖抑制効果を確認するとともに、濃度条件を検討する。
- 方法 WST-8 assay (CCK-8 試薬, dojindo) (薬剤処理時間 72 時間)
- 結果 三剤ともに増殖抑制が確認され、それぞれの Cmax (各薬剤のインビューフォーム参照を元に以後の実験での処理濃度を決定した)。

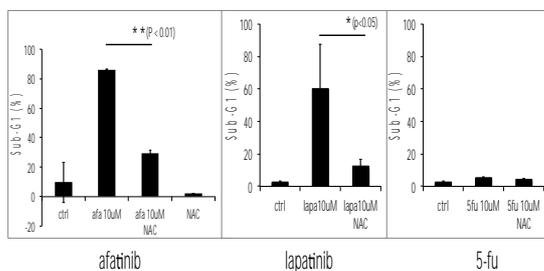


次に三剤処理時における細胞周期解析を行ったところ、afatinib, lapatinib 各処理群において sub-G1 population の増加が起こり、5-fu 処理ではおこらないことが確認され、増殖抑制は細胞周期停止ではなく、アポトーシ

スである可能性が FACS を用いた細胞周期解析によって示唆された(図3)。

### 図3: 三剤による増殖抑制における細胞周期解析及びROSの関与

- 目的 Ha-Cat細胞に対するafatinib, lapatinib, 5-fuの増殖抑制効果がアポトーシスによるものかどうかを確認するとともに、ROSの関与について検証する。
- 方法 PI染色した細胞をフローサイトメーターで計測して細胞周期を解析し、アポトーシスをSub-G1 populationとして定量化する。同時にN-アセチルシステイン(NAC)の添加によるadd-back実験を行う。(薬剤懸濁時間72時間)
- 結果 afatinib (10 μM), lapatinib (10 μM)の添加でSub-G1の増加及びNACの添加によるリバースが確認され、アポトーシスとROSの関与が示唆された。5-fu (10 μM)についてはSub-G1の増加が確認されなかった。

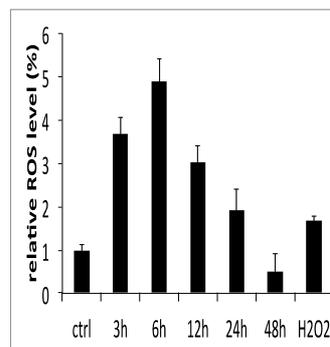


また afatinib, lapatinib 各処理群において、pan-ROS scavenger である N-アセチルシステイン (NAC) の添加によって Sub-G1 population が減少したことから ROS 依存性のアポトーシスが起きている可能性が示唆された。また afatinib について、pan-caspase inhibitor zVAD の添加によるレスキューは確認されなかった (data not shown) ことから、カスパーゼ非依存的なアポトーシスであることが裏付けられた。

さらに afatinib に関して pan-ROS indicator (CM-H2DCFDA) による染色細胞のフローサイトメトリーにより、ROS の蓄積を確認し、この細胞死のメカニズムに ROS の関与が示唆された (図4)。

### 図4: afatinibによるROSの蓄積

- 目的 Ha-Cat細胞に対するafatinibの投与によるROSの蓄積を評価する。
- 方法 ROS indicator (CM-H2DCFDA Thermo)で染色した細胞をフローサイトメーターで計測しROSの蓄積を評価する
- 結果 afatinib (10 μM) の添加によるROSの蓄積が確認された。(現在時間条件検討中)



最後に現在、数種の特異的 ROS indicator (HPF, APF, Hy-DROP, Hy-SOX etc)を用いて、ROS 種の同定を試みているが特定するには至っていない。

これまでの結果、当初予想していたような高濃度水素水と反応するヒドロキシラジカル( $\cdot\text{OH}$ )が発生する ROS が未だに同定されていないため、in vitro の高濃度水素水による皮膚細胞障害の抑制実験には至っていない。

### 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 1 件)

田口哲也、阪口晃一 化学療法による手足症候群の支持療法 京府医雑誌 124(7), 467-474, 2015. (査読無)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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 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

田口哲也 (TAGUCHI, Tetsuya)  
京都府立医科大学・医学研究科・教授  
研究者番号：80243260

##### (2) 研究分担者

阪口晃一 (SAKAGUCHI, Koichi)  
京都府立医科大学・医学研究科・講師  
研究者番号：00405284

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

##### (4) 研究協力者

( )