

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860104

研究課題名(和文) 分子標的治療薬による皮膚障害発症メカニズムに基づく新規予防・治療法の探索

研究課題名(英文) Searching for treatment and prevention method of molecular targeted drugs-induced dermatological side effects based on the pathological mechanism

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) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：分子標的治療薬による皮膚障害の発症機構としてSTAT3の活性変動に着目し、発症メカニズムに基づいた皮膚障害予防・治療法をin vitroで探索することを目的とした研究を実施した。HaCaT細胞においてソラフェニブによるSTAT3のリン酸化低下に抵抗する化合物のスクリーニングにより、P-VC-MgおよびPGE1を選定した。両化合物はSTAT3を介したアポトーシスの誘導に抵抗し、皮膚3次元モデルにおいても両化合物の皮膚障害に対する有用性が認められたため、これらの化合物が分子標的治療薬による皮膚障害の治療薬または予防薬として適応可能であることを示唆した。

研究成果の概要(英文)：We aimed to search for treatment and prevention method of molecular targeted drugs-induced dermatological side effects based on the pathological mechanism to focus the activity of STAT3. By screening assay searching chemicals resisted to decrease of phosphorylated STAT3 by sorafenib in HaCaT cells, P-VC-Mg and PGE1 were selected. Both chemicals showed resistance to sorafenib-induced apoptosis, and the efficacy of both chemicals to dermatological side effects was demonstrated by the experiment with 3D skin model. These chemicals may be able to apply as treatment and prevention method of molecular targeted drugs-induced dermatological side effects.

研究分野：臨床薬学

キーワード：STAT3 HaCaT

1. 研究開始当初の背景

分子標的治療薬による皮膚障害は患者の60%以上に発症し、治療の中断やQOLを低下させる要因となるため治療上最大の課題となっている。しかし、発症メカニズムが十分に研究されていないため、経験則に基づく対症療法が一般的な対処法となっており、有効な予防・治療法が確立されていない。既に我々は、Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT) 3 が分子標的治療薬による皮膚障害に大きく関与していることを明らかにしているが、メカニズムに基づく有効な治療法は未だ確立できていない。

2. 研究の目的

本研究では、分子標的治療薬による皮膚障害の発症機構として STAT3 の活性変動に着目し、発症メカニズムに基づいた皮膚障害予防・治療法を *in vitro* で探索することを目的とする。

3. 研究の方法

1. STAT3 活性化スクリーニング

抗酸化物質、ヒアルロン酸、各種ビタミンなどから、HaCaT 細胞において分子標的治療薬による STAT3 の活性化抑制に対して抵抗性を示す化合物をスクリーニングする。イメージング用マイクロプレートに播種した細胞に分子標的治療薬 (ソラフェニブ) と各種化合物を処置し、ソラフェニブ単独処置と比較して STAT3 のリン酸化 (Y705) レベルを高く維持する化合物を探索する。STAT3 リン酸化レベルおよび核内移行率は蛍光免疫染色によるイメージングサイトメトリー法で母集団解析により評価する。

2. 生存試験

HaCaT 細胞におけるソラフェニブの増殖抑制作用に対する選定化合物の抵抗性の効果を WST-8 法により評価し、選定化合物の有用性を *in vitro* で評価する。また、STAT3 の寄与を確認するため、siRNA により STAT3 をノックダウンさせた (siSTAT3) HaCaT 細胞、あるいは STAT3 の優性不活性体を遺伝子導入した HaCaT 細胞を用いて、同様の増殖抑制作用を評価した。

3. アポトーシス解析・シグナル解析

ソラフェニブのアポトーシス効果に対する選定化合物の影響について、Annexin V および Propidium iodide 染色によるイメージングサイトメトリー法により評価する。また、STAT3 の活性化に関連する因子やアポトーシス関連因子について western blot 法により解析し、詳細な有効性メカニズムについて解明する。

4. *in vitro* 皮膚 3 次元モデルを用いた有用性の検証

*in vitro* 皮膚刺激性試験 (SIT 法) は経済協力開発機構 (OECD) が承認した試験試料の刺激性を評価するための動物実験代替法である。本法を応用し、皮膚モデルに対する選定化合物の局所投与の有用性を検証する。検討にはヒト正常表皮角化細胞から構成された皮膚 3 次元モデル EPI-200 (Mat Tek 社製) を用いる。真皮側 (Basal side) からソラフェニブを処置することで皮膚障害モデルとし、その細胞障害性に対して表皮側 (Epidermal side) からの化合物処置により抵抗性を示すかについて MTT アッセイを評価パラメーターとして検討する。また、組織 HE 染色により形態の変化を評価する。

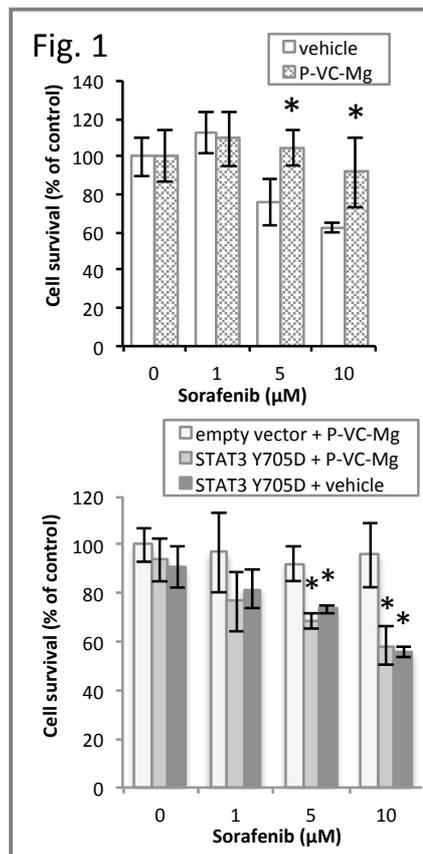
4. 研究成果

1. STAT3 活性化スクリーニング

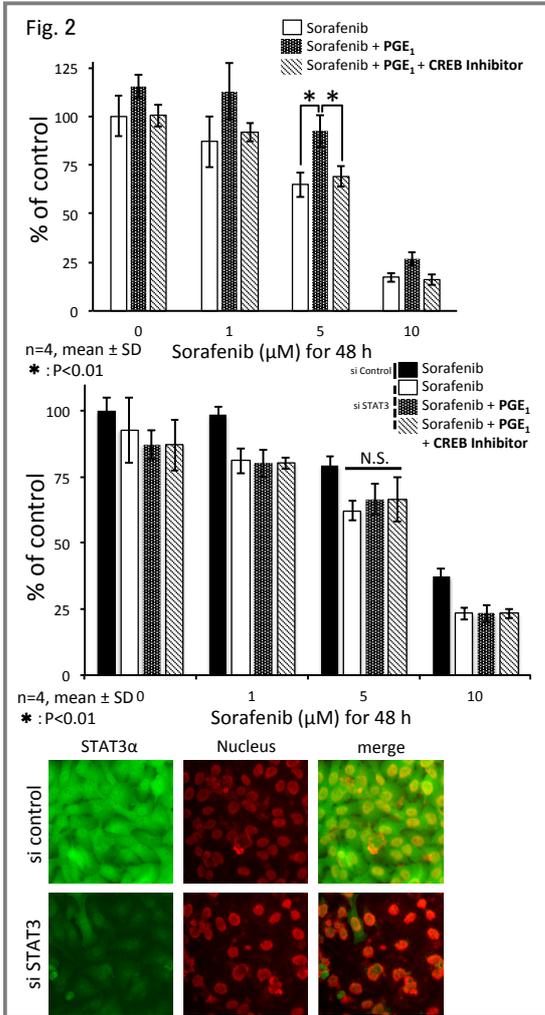
STAT3 の活性化スクリーニングにより、ビタミン C 誘導体やプロスタグランジン E1 (PGE1) などが分子標的治療薬による STAT3 の活性阻害を抑制した。以降、ビタミン C 誘導体 (P-VC-Mg) および PGE1 について、詳細な検討を実施した。

2. 生存試験

P-VC-Mg 共存下において、HaCaT 細胞に対するソラフェニブの増殖抑制作用は顕著に減弱することが示された (Fig. 1)。また、優性不活性体の導入細胞においては P-VC-Mg の軽減効果を認めなかった。また、PGE1 の共存下においてもソラフェニブの増殖抑制作用は顕著に減弱することが示された (Fig. 2)。



さらに、siRNA により STAT3 をノックダウンした HaCaT 細胞においては、ソラフェニブによる増殖抑制作用に対する PGE1 の軽減作用を示さなかったことから、P-VC-Mg および PGE1 は STAT3 の活性変動を抑制することにより、増殖抑制作用の軽減効果を発現している可能性を示した。

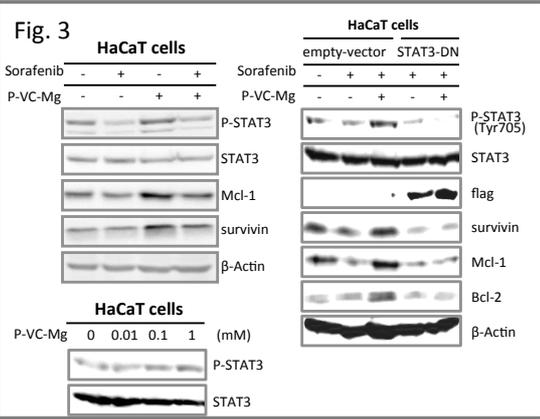


### 3. アポトーシス解析

HaCaT 細胞にソラフェニブを処置することにより誘導されるアポトーシスは P-VC-Mg や PGE1 を共存させることにより顕著に減少した。

### 4. シグナル解析

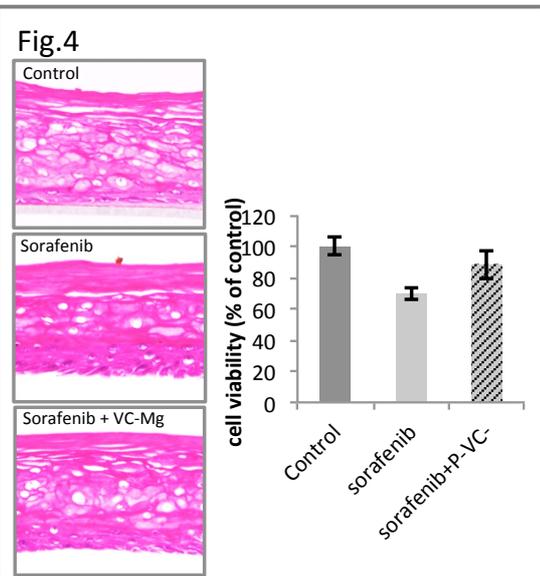
HaCaT 細胞にソラフェニブを処置した際のシグナル伝達因子の活性・発現変動を解析した (Fig. 3)。ソラフェニブの処置により生じたリン酸化 STAT3、survivin、Mcl-1 の発現低下は、P-VC-Mg を共存させることにより回復した。また、STAT3 の優性不活性体を導入した細胞では P-VC-Mg を処置した群においても survivin や Mcl-1 の回復は認めず、STAT3 依存的に抗アポトーシス因子を制御することで、HaCaT 細胞への増殖抑制作用を軽減したことが明らかとなった。この結果は PGE1 でも認められており、STAT3 を介した抗アポトーシス因子の発現制御に抵抗することに



より、P-VC-Mg および PGE1 は効果を示したと考えられる。

### 5. 皮膚 3 次元モデルによる影響

皮膚 3 次元モデルにソラフェニブを処置することにより、角質層の幅が増大し、顆粒層・有棘層の幅が縮小した (Fig.4)。しかしながら、P-VC-Mg を上皮側に処置すると、形態は薬液未処置のものと同様の形態を示し、ソラフェニブの作用を減弱させた。皮膚 3 次元モデルの生存率の評価ではソラフェニブ処置により顕著に低下し、P-VC-Mg を上皮側に処置することにより、生存率の低下が抑制された。本現象は PGE1 の処置においても認められている。



以上より、HaCaT 細胞においてソラフェニブによる STAT3 のリン酸化低下に抵抗する化合物のスクリーニングにより、P-VC-Mg および PGE1 を選定した。両化合物は STAT3 を介したアポトーシスの誘導に抵抗することにより、ソラフェニブの皮膚毒性に抵抗する可能性が考えられる。また、皮膚 3 次元モデルにおいても P-VC-Mg および PGE1 の皮膚障害に対する有用性が認められたため、これらの化合物が分子標的治療薬による皮膚障害の治療薬または予防薬として適応可能であることを示唆した。

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 5 件)

1. Mizumoto A, Yamamoto K, Nakayama Y, Takara K, Nakagawa T, Hirano T, Hirai M. Induction of epithelial-mesenchymal transition via activation of epidermal growth factor receptor constitutes to sunitinib resistance in human renal cell carcinoma cell lines. *J Pharmacol Exp Ther.* **355**:152-8, 2015. (査読あり)
2. Yamamoto K, Shichiri H, Uda A, Yamashita K, Nishioka T, Kume M, Makimoto H, Nakagawa T, Hirano T, Hirai M. Apoptotic Effects of the Extracts of Cordyceps militaris via Erk Phosphorylation in a Renal Cell Carcinoma Cell Line. *Phytother Res.* **29**:707-13, 2015. (査読あり)
3. Yamamoto K, Mizumoto A, Nishimura K, Uda A, Mukai A, Yamashita K, Kume M, Makimoto H, Bito T, Nishigori C, Nakagawa T, Hirano T, Hirai M. Association of Toxicity of Sorafenib and Sunitinib for Human Keratinocytes with Inhibition of Signal Transduction and Activator of Transcription 3 (STAT3). *PLoS One*, **9**:e102110, 2014. (査読あり)

[学会発表] (計 44 件)

シンポジウム (計 5 件)

1. 山本和宏 : 病棟薬剤業務への応用と連携を目指した副作用ゲノムマーカーの探索研究 -泌尿器科における実践事例-, 第 25 回日本医療薬学会年会, 2015 年 11 月 22 日, パシフィコ横浜 (神奈川県)
2. 山本和宏, 平野剛, 平井みどり : 分子標的治療薬による皮膚障害の発症メカニズムの解明と副作用バイオマーカーの探索, 第 23 回クリニカルファーマシーシンポジウム・医療薬学フォーラム 2015, 2015 年 7 月 5 日, 名古屋国際会議場 (愛知県)
3. 山本和宏 : 分子標的治療薬による副作用バイオマーカーの確立, メディカルジャパン 2015 大阪, 2015 年 2 月 6 日, インテックス大阪 (大阪府)
4. 山本和宏 : 新たな薬剤師業務を切り開くゲノム薬理学の実践, 日本ゲノム薬理学会第 1 回総会・学術講演会, 2014 年 4 月 12 日, 神戸大学 (兵庫県)

国際学会 (計 1 件)

1. Hiroaki Shichiri, Kazuhiro Yamamoto, Tsutomu Nakagawa, Takeshi Hirano, Midori Hirai : Apoptotic effects of the extracts of

Cordyceps militaris via ERK phosphorylation in a renal cell carcinoma cell line. The 3rd International Symposium of Training Plan for Oncology Professionals, February 7, 2015, Sheraton Miyako Hotel (Osaka)

一般発表 (計 38 件)

1. 山本和宏, 五百蔵武士, 金谷和哉, 四宮一昭, 河本紫帆, 須野学, 平田佐智, 西岡達也, 久米学, 榎本博雄, 中川勉, 三宅秀明, 藤澤正人, 平井みどり : 腎細胞癌患者におけるマルチキナーゼ阻害薬の治療効果と PK-PD に関わる SNP の関連性, 日本薬学会第 136 年会, 2016 年 3 月 27 日, パシフィコ横浜 (神奈川県)
2. 渡邊愛未, 山本和宏, 平田佐智, 原田健一, 藤澤正人, 中川勉, 平井みどり : スニチニブによる口内炎発症メカニズムのゲノム薬理的解析, 日本薬学会第 136 年会, 2016 年 3 月 28 日, パシフィコ横浜 (神奈川県)
3. 清水菜央, 山本和宏, 黒木成弥, 中川勉, 濱口常男, 平井みどり : エルロチニブによる間質性肺疾患発症メカニズムの解明, 日本薬学会第 136 年会, 2016 年 3 月 27 日, パシフィコ横浜 (神奈川県)
4. 向江有里, 山本和宏, 住江春香, 河本紫帆, 渡邊愛未, 平田佐智, 宇田篤史, 中川勉, 三宅秀明, 藤澤正人, 小山敏広, 四宮一昭, 平井みどり : 腎細胞癌患者への mTOR 阻害薬投与により生じる薬剤性肺障害と STAT3 遺伝子多型との関連性, 日本薬学会第 136 年会, 2016 年 3 月 27 日, パシフィコ横浜 (神奈川県)
5. 渡邊愛未, 山本和宏, 四宮一昭, 平田佐智, 石村武志, 横山直己, 三宅秀明, 藤澤正人, 中川勉, 平野剛, 平井みどり : エベロリムスによる口内炎発症と MDR1 遺伝子多型との関連性, 第 25 回日本医療薬学会年会, 2015 年 11 月 21 日, パシフィコ横浜 (神奈川県)
6. 山本和宏, 老川諒, 中川勉, 西岡達也, 榎本博雄, 久米学, 三宅秀明, 藤澤正人, 平野剛, 平井みどり : mTOR 阻害薬による肺線維症の長期曝露モデルを用いた基礎的検討とゲノム薬理的解析, 日本薬学会 135 年会, 2015 年 3 月 26 日, 神戸コンベンションセンター (兵庫県)
7. 河本紫帆, 山本和宏, 平田佐智, 三宅秀明, 藤澤正人, 田村麻衣, 小山敏広, 四宮一昭, 中川勉, 平野剛, 平井みどり : 腎細胞癌における分子標的薬の治療効果と STAT3 遺伝子多型との関連性, 日本薬学会第 135 年会, 2015 年 3 月 26 日, 神戸コンベンションセンター (兵庫県)
8. 土倉麻弥, 山本和宏, 中川勉, 尾藤利憲, 錦織千佳子, 濱口常男, 平野剛, 平井みどり : ソラフェニブによる皮膚障害に対する PGE1 を用いた治療への応用, 日本

- 薬学会第 135 年会, 2015 年 3 月 26 日, 神戸コンベンションセンター (兵庫県)
9. 久土智也, 山本和宏, 中川勉, 尾藤利憲, 錦織千佳子, 濱口常男, 平野剛, 平井みどり: エルロチニブによる痤瘡様皮疹モデルの確立と分子機構の解明, 日本薬学会第 135 年会, 2015 年 3 月 26 日, 神戸コンベンションセンター (兵庫県)
  10. 宮庄章嘉, 山本和宏, 尾藤利憲, 錦織千佳子, 中川勉, 平野剛, 平井みどり: 分子標的治療薬の皮膚障害に及ぼす物理的刺激の影響, 日本薬学会第 135 年会, 2015 年 3 月 26 日, 神戸コンベンションセンター (兵庫県)
  11. 渡邊愛未, 山本和宏, 中川勉, 平野剛, 平井みどり: ヒト頬粘膜細胞を用いたエベロリムス長期曝露と未曝露細胞の薬剤反応性の相違, 日本薬学会第 135 年会, 2015 年 3 月 26 日, 神戸コンベンションセンター (兵庫県)
  12. 山本和宏, 五百蔵武士, 四宮一昭, 河本紫帆, 須野学, 平田佐智, 中川勉, 平野剛, 原田健一, 三宅秀明, 藤澤正人, 平井みどり: 分子標的治療薬による副作用における STAT3 遺伝子多型の関連性, 第 1 回日本ゲノム薬理学会学術集会, 2015 年 2 月 14 日, 神戸大学 (兵庫県)
  13. 老川諒, 山本和宏, 中川勉, 平野剛, 平井みどり: mTOR 阻害における TGF- $\beta$  1 非依存的な肺上皮細胞の線維化亢進への STAT3 の関与, 第 37 回日本分子生物学会年会, 2014 年 11 月 26 日, パシフィコ横浜 (神奈川県)
  14. 渡邊愛未, 山本和宏, 中川勉, 平野剛, 平井みどり: mTOR 阻害薬による細胞内 ROS 産生非依存的 IL-6 分泌を介した口内炎発症機構, 第 64 回日本薬学会近畿支部総会・大会, 2014 年 10 月 11 日, 京都薬科大学 (京都)
  15. 賀来健太, 山本和宏, 尾藤利憲, 錦織千佳子, 中川勉, 平野剛, 平井みどり: ビタミン C 誘導体による STAT3 の活性化を介した分子標的薬の皮膚毒性軽減効果, 第 64 回日本薬学会近畿支部総会・大会, 2014 年 10 月 11 日, 京都薬科大学 (京都)
  16. 山本和宏, 平田佐智, 山口徹郎, 須野学, 三宅秀明, 藤澤正人, 尾藤利憲, 錦織千佳子, 西岡達也, 榎本博雄, 久米学, 中川勉, 平野剛, 平井みどり: STAT3 遺伝子多型と分子標的治療薬の皮膚障害発症頻度・重症度との関連性, 第 24 回日本医療薬学会年会, 2014 年 9 月 27 日, 名古屋国際会議場 (愛知県) \* 優秀演題賞受賞

[図書] (計 1 件)

山本和宏, 渡邊愛未: 口から始める健康と美容, 「第 2 章 口内炎の要因と口腔ケアについて」, 星雲社, 2016 (分担執筆)

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

1. 名称: 薬剤性間質性肺炎の易発症性判定用マーカーを用いた薬剤性間質性肺炎の易発症性を判定する方法およびキット  
発明者: 山本和宏, 平井みどり  
種類: 特許  
番号: 特願 2015-147366  
出願年月日: 2015 年 7 月 27 日  
国内外の別: 国内
2. 名称: 疎水性物質包接剤およびそれを用いた疎水性物質の可溶化方法  
発明者: 谷口泰造, 宮本和英, 炬口真理子, 角山圭一, 福田勝, 鈴木利雄, 甲元一也, 山本和宏, 渡邊愛未  
種類: 特許  
番号: 特願 2014-251325  
出願年月日: 2014 年 12 月 11 日  
国内外の別: 国内

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