Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-12-05

Prostaglandin E_1 reduces the keratinocyte toxicity of sorafenib by maintaining signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) activity and enhancing the cAMP…

Shichiri, Hiroaki

(Degree)
博士（医学）

(Date of Degree)
2017-03-25

(Resource Type)
doctoral thesis

(Report Number)
甲第6974号

(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1006974

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。

（課程博士関係）

学位論文の内容要旨

Prostaglandin E_1 reduces the keratinocyte toxicity of sorafenib by maintaining signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) activity and enhancing the cAMP response element binding protein (CREB) activity

ソラフェニブによる角化細胞への毒性に対するプロスタグランジン E_1 の STAT3 活性維持および CREB 活性亢進を介した軽減効果

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻
薬剤学
（指導教員：平井　みどり教授）

七里　博章

【背景・目的】

近年、ソラフェニブなどのマルチキナーゼ阻害薬（mTKI)が開発されたことを契機に、転移性腎がんおよび肝がんの治療成績は劇的に向上した。しかしながら、mTKI の共通の副作用である手足皮膚反応（HFSR）の発症は、患者の QOL を著しく低下させている。ソラフェニブによる HFSR の発症率は日本人で約 50%と高頻度であり、手足の炎症、潰瘍、角化異常による歩行・作業困難などの機能障害が生じる。HFSR は薬剤の減量や治療の中断につながる重大な副作用である一方、その発症はmTKI の奏効率と関連することが示唆されている。従って、HFSR の効果的な予防法の確立が QOL の向上のみならずソラフェニブの治療成績の向上においても重要かつ緊急課題である。

HFSR の分子生物学的な発症機構として、皮膚組織の恒常性を制御する Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (STAT3) の活性低下が関連することが報告されている。また近年、STAT3 により発現を制御されている myeloid cell leukemia-1 (Mcl-1) が、抗アポトーシス因子としての機能以外に、表皮角化細胞の角化を制御する因子としても機能することが報告され、表皮の恒常性を保つための重要な経路の一つと考えられている。従って、HFSR 発症メカニズムに基づく予防法として、ソラフェニブの存在下においても STAT 3 の活性を維持するような薬剤が候補となる。そこで申請者らは、EP2-β Arrestin1 経路を活性化させる Prostaglandin (PG) E_1 に着目した。PGE_1 はヒト表皮角化細胞の増殖能亢進作用や表皮形成促進作用を示すことから、褥瘡・皮膚潰瘍治療薬として使用されている。そのメカニズムは EP2 受容体刺激作用に基づく転写促進作用であるが、EP2 受容体-β Arrestin の活性化に伴い Src-STAT3 経路の活性化が生じることから、STAT3 の活性を維持する新規 HFSR 予防法となる可能性がある。本研究では、角化細胞におけるソラフェニブ毒性に対する PGE_1 の軽減効果について基礎的検証を行った。

【方法】

単層培養系の実験には、ヒト表皮角化細胞株（HaCaT 細胞）を用いた。HaCaT 細胞におけるソラフェニブおよび PGE_1 処置後のシグナル伝達因子の活性変動は western blot 法により評価した。また、HaCaT 細胞に対するソラフェニブの増殖抑制作用は water soluble tetrazolium salts-8 (WST-8) 法により評価した。また、STAT3 のノックダウン細胞は、HaCaT 細胞に STAT3 siRNA をリポフェクション

法により遺伝子導入することで作製した。さらに、皮膚3次元モデルであるEpiDerm (MatTek Corporation) にソラフェニブおよびPGE_1をそれぞれ真皮層側および角質層側から処置し、病理組織を画像解析することにより皮膚高次組織に及ぼすソラフェニブおよびPGE_1の影響を評価した。

【結果】

HaCaT 細胞にソラフェニブを処置することにより、STAT3 のリン酸化 (P-STAT3) は濃度依存的に低下したが、PGE_1を共存させることでソラフェニブのP-STAT3の低下作用は軽減した。また、ソラフェニブとPGE_1を共存させたHaCaT細胞では、cAMP response element binding protein (CREB) のリン酸化 (P-CREB) が処置後1-2時間で一過性に亢進し、6時間以上処置したHaCaT細胞ではP-CREBの亢進を認めなかった。

HaCaT 細胞に対するソラフェニブの濃度依存的な増殖抑制作用は、PGE_1の共存により減弱された。特に5 μMのソラフェニブを処置した群では、細胞生存率が対照群の65%であったのに対し、PGE_1を共存させることで細胞生存率は91%と有意に高値を示した。一方、CREB 阻害剤 (CREB-I) を前処置したところ、ソラフェニブの増殖抑制作用に対するPGE_1による減弱効果は消失し、ソラフェニブ単独処置と同程度の増殖抑制作用を示した。また、STAT3をノックダウンしたHaCaT細胞においては、PGE_1はソラフェニブの増殖抑制作用を減弱させず、CREB-Iで前処置した場合でも細胞生存率に変化は認められなかった。

続いて、HaCaT細胞における抗アポトーシス因子の発現変動を解析した。その結果、ソラフェニブとPGE_1を共処置したHaCaT細胞では、P-STAT3、抗アポトーシス因子であるMcl-1およびsurvivinの発現は、ソラフェニブのみを処置した群と比較して増大したが、CREB-Iを前処置することで、PGE_1による抗アポトーシス因子の発現増大作用は消失し、ソラフェニブ単独処置と同程度となった。また、STAT3ノックダウンHaCaT細胞においては、ソラフェニブとPGE_1の共存によるP-STAT3、Mcl-1およびsurvivinの発現増大作用は認められなかった。

さらに、ヒト皮膚3次元モデルの真皮層側にソラフェニブを処置することにより、基底層から顆粒層までの厚みが無処置と比較して30%菲薄化したが、PGE_1を角質層側に処置することにより、菲薄化は認めず無処置と同程度の厚みを示した。皮膚3次元モデルにおけるタンパク質の発現変動についても、HaCaT細胞の検討と同様の結果が得られた。

【考察】

HaCaT 細胞において、PGE_1はソラフェニブによるP-STAT3の減少作用を抑制し、STAT3の活性を維持することが示された。また、EP2-βArrestin1経路の下流に存在するCREBはPGE_1の処置により活性化されるが、ソラフェニブとPGE_1の共存下においても活性化されたことから、EP2-βArrestin1-CREB 経路はソラフェニブ処置による影響を受けない可能性がある。

HaCaT 細胞に対するソラフェニブの増殖抑制作用は、PGE_1を共存させることにより減弱されるが、CREB-Iの前処置はPGE_1の効果を消失させた。このことから、ソラフェニブの増殖抑制作用に対するPGE_1による減弱効果は、CREB の活性化を介する可能性がある。また、ソラフェニブ処置時に認められたP-STAT3の低下は、PGE_1を共存させたHaCaT細胞では認められず、抗アポトーシス因子であるMcl-1の発現量も低下を認めなかったが、CREB-Iを前処置させるとPGE_1の効果が消失した。STAT3ノックダウン細胞を用いた検討においてもPGE_1の効果は認められなかった。従って、PGE_1を処置することでHaCaT細胞のCREB経路は活性化され、ソラフェニブ処置による影響を受けない EP2-βArrestin1-CREB 経路を介してP-STAT3を増大させることが、PGE_1のP-STAT3活性保護作用に寄与すると考えられる。さらに、CREBの活性化のみではソラフェニブのHaCaT細胞に対する増殖抑制作用を減弱させることができず、ソラフェニブの増殖抑制作用に対するPGE_1の減弱効果には、STAT3の持続的な活性化が重要と考えられる。

CREB は転写因子であり、様々なタンパク質の転写を制御していることが知られている。c-jun は CREB により転写制御を受けるタンパク質の一つであり、c-jun/STAT3/ insulin enhancer binding protein-1 複合体を形成することで、リンパ球の増殖を調節することが報告されている。従って、c-jun は CREB と STAT3 の相互作用において媒介因子として機能している可能性がある。しかし、表皮角化細胞における c-jun と STAT3 の関連性は未だ明らかにされていないため、今後更なる詳細な検討が必要である。

本研究では、ヒト皮膚3次元モデルを用いて HFSR の病理像を再現した。真皮層側にソラフェニブを処置することで、顆粒層の菲薄化や角質層の肥厚など、HFSR の特徴的な病理像を認め、*in vitro* での HFSR の病態モデルとなることを確認した。

さらに、ソラフェニブを真皮層側に、PGE_1を角質層側に処置することで、顆粒層の菲薄化は認めず、未処置と同様の組織像を示した。薬液処置後のヒト皮膚3次元モデルを用いたタンパク質発現解析においても、ソラフェニブ処置により低下したP-STAT3、survivinおよびMcl-1の発現が、PGE_1の共処置により発現が維持されており、HaCaT細胞による単層培養系の検討と同様の結果が得られた。ヒト皮膚3次元モデルは、皮膚研究における動物実験代替法としてもよく知られており、本研究結果は、表皮角化細胞の単層培養による検討のみならず、高次構造を有する生理的モデルにおいても支持された。

【結論】

PGE_1はCREBを介したSTAT3のリン酸化機構によって、表皮角化細胞に対するソラフェニブの増殖抑制作用を減弱させることが明らかとなった。さらに、ヒト皮膚3次元モデルを用いた検討においても、PGE_1がソラフェニブによる病理変化を軽減することが示されたことから、PGE_1がHFSRの新規予防薬となる可能性が示唆された。

神戸大学大学院医学(系)研究科（博士課程）

論文審査の結果の要旨

受付番号	甲 第2703号	氏　名	七里　博章
論文題目 Title of Dissertation	ソラフェニブによる角化細胞への毒性に対するプロスタグランジン E_1 の STAT3 活性維持および CREB 活性亢進を介した軽減効果 Prostaglandin E_1 reduces the keratinocyte toxicity of sorafenib by maintaining signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) activity and enhancing the cAMP response element binding protein (CREB) activity		
審査委員 Examiner	主　査 Chief Examiner 古屋敷智之 副　査 Vice-examiner 伊藤雅雄 副　査 Vice-examiner 中村俊一		

（要旨は１，０００字～２，０００字程度）

【目的】

近年、ソラフェニブなどのマルチキナーゼ阻害薬（mTKI）が開発されたことを契機に、転移性腎がんおよび肝がんの治療成績は劇的に向上している。しかしながら、mTKI に共通する副作用である手足皮膚反応 (HFSR) の発症は、患者の QOL を著しく低下させている。ソラフェニブによる HFSR の発症率は日本人で約 50%と高頻度であり、手足の炎症、潰瘍、角化異常による歩行・作業困難などの機能障害がもたらされる。HFSR は薬剤の減量や治療の中断につながる重大な副作用である一方、その発症は mTKI の奏効率と関連することが示唆されている。従って、HFSR に対する特異的な予防法の開発が患者 QOL の改善とソラフェニブの治療成績の向上において重要かつ緊急課題といえる。

HFSR の分子生物学的な発症機構として、皮膚組織の恒常性を制御する Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (STAT3) の活性低下が関連することが報告されている。従って、HFSR の発症メカニズムに基づく予防法として、ソラフェニブの存在下においても STAT3 の活性を維持する薬剤の投与が候補となる。申請者は、ソラフェニブの阻害経路とは異なる EP2-βArrestin1 経路を介して STAT3 を活性化させる可能性のある Prostaglandin (PG) E_1 に着目し、角化細胞におけるソラフェニブ毒性に対する PGE_1 の軽減効果について基礎的検討を行った。

【方法】

単層培養系の実験には、ヒト表皮角化細胞株（HaCaT 細胞）を用い、ソラフェニブおよび PGE_1 処置後のシグナル伝達因子の活性変動は western blot 法により評価した。また、HaCaT 細胞に対するソラフェニブの増殖抑制作用は water soluble tetrazolium salts-8 (WST-8) 法により評価した。STAT3 のノックダウン細胞は、HaCaT 細胞に STAT3 siRNA をリポフェクション法により遺伝子導入することで作製した。さらに、皮膚 3 次元モデルである EpiDerm (MatTek Corporation) にソラフェニブおよび PGE_1 をそれぞれ真皮層側および角質層側から処置し、病理組織を画像解析することにより皮膚高次組織に及ぼすソラフェニブおよび PGE_1 の影響を評価している。

【結果】

HaCaT 細胞にソラフェニブを処置することにより、STAT3 のリン酸化 (P-STAT3) は濃度依存的に低下したが、PGE_1 を共存させることでソラフェニブの P-STAT3 の低下作用は軽減した。また、ソラフェニブと PGE_1 を共存させた HaCaT 細胞では、cAMP response element binding protein (CREB) のリン酸化 (P-CREB) が処置後 1～2 時間で一過性に亢進したが、6 時間以上処置した HaCaT 細胞では P-CREB の亢進を認めなかった。ソラフェニブの存在下においても P-CREB の発現亢進が認められたことから、EP2-βArrestin1-CREB 経路のシグナル伝達は、ソラフェニブ処置による影響を受けない可能性を示した。　HaCaT 細胞に対するソラフェニブの濃度依存的な増殖抑制作用は、PGE_1 の共存により減弱された。特に 5 μM のソラフェニブを処置した群では、細胞生存率が対照群の 65%であったのに対し、PGE_1 を共存させることで細胞生存率は 91%と有意に高値を示した。一方、CREB 阻害薬を前処置したところ、ソラフェニブの増殖抑制作用に対する PGE_1 による減弱効果は消失し、ソラフェニブ単独処置と同程度の増殖抑制作用を

示した。また、STAT3 をノックダウンした HaCaT 細胞においては、PGE_1 はソラフェニブの増殖抑制作用を減弱させず、CREB 阻害薬で前処置した場合でも細胞生存率に変化は認められなかった。以上の結果より、HaCaT 細胞において、PGE_1 はソラフェニブによる P-STAT3 の阻害作用を軽減し、STAT3 の活性を維持することでソラフェニブの増殖抑制作用を減弱させることが示された。

続いて、HaCaT 細胞における抗アポトーシス因子の発現変動を解析した。ソラフェニブと PGE_1 を共処置した HaCaT 細胞では、P-STAT3、抗アポトーシス因子である myeloid cell leukemia-1 (Mcl-1) および survivin の発現は、ソラフェニブのみを処置した群と比較して増大したが、CREB 阻害薬を前処置することで、PGE_1 による抗アポトーシス因子の発現増大作用は消失し、ソラフェニブ単独処置と同程度となった。また、STAT3 ノックダウン HaCaT 細胞においては、ソラフェニブと PGE_1 の共存による P-STAT3、Mcl-1 および survivin の発現増大作用は認められなかった。以上より、HaCaT 細胞において、ソラフェニブの増殖抑制作用に対する PGE_1 による減弱には、抗アポトーシス因子である Mcl-1 および survivin の発現増大が大きく寄与していることを示した。

さらに、ヒト皮膚 3 次元モデルの真皮層側にソラフェニブを処置することにより、基底層から顆粒層までの厚みが無処置と比較して 30%菲薄化したが、PGE_1 を角質層側に処置することにより、菲薄化は認めず無処置と同程度の厚みを示した。皮膚 3 次元モデルにおけるタンパク質の発現変動についても、HaCaT 細胞の検討と同様の結果が得られた。以上より、表皮角化細胞に対するソラフェニブの増殖抑制は、HaCaT 細胞の単層培養による検討のみならず、高次構造を有する生理的モデルにおいても支持されることを明らかにした。

【結論】

PGE_1 は CREB 活性化を介した STAT3 活性維持によって、表皮角化細胞に対するソラフェニブの増殖抑制作用を減弱させる。

以上、本研究は、PGE_1 がソラフェニブによる皮膚毒性を軽減させる可能性を見出し、また、その機構として、CREB 活性化を介した STAT3 活性維持の関与を明らかにしたものである。本研究成果は、ソラフェニブによる HFSR に対する新たな予防法の開発に繋がる発展性の高いものであり、ソラフェニブの角化細胞への毒性における CREB および STAT3 の役割を解明する上でも重要な貢献をしたものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。