

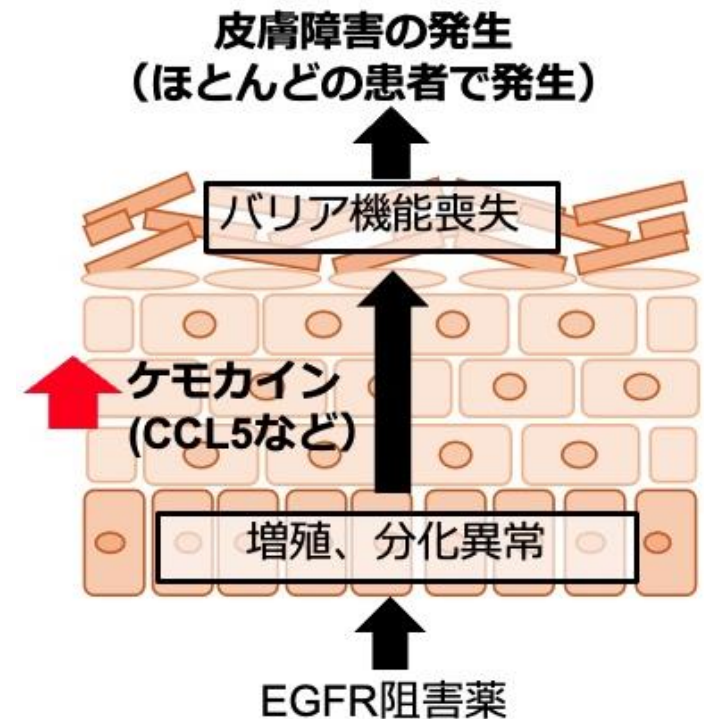
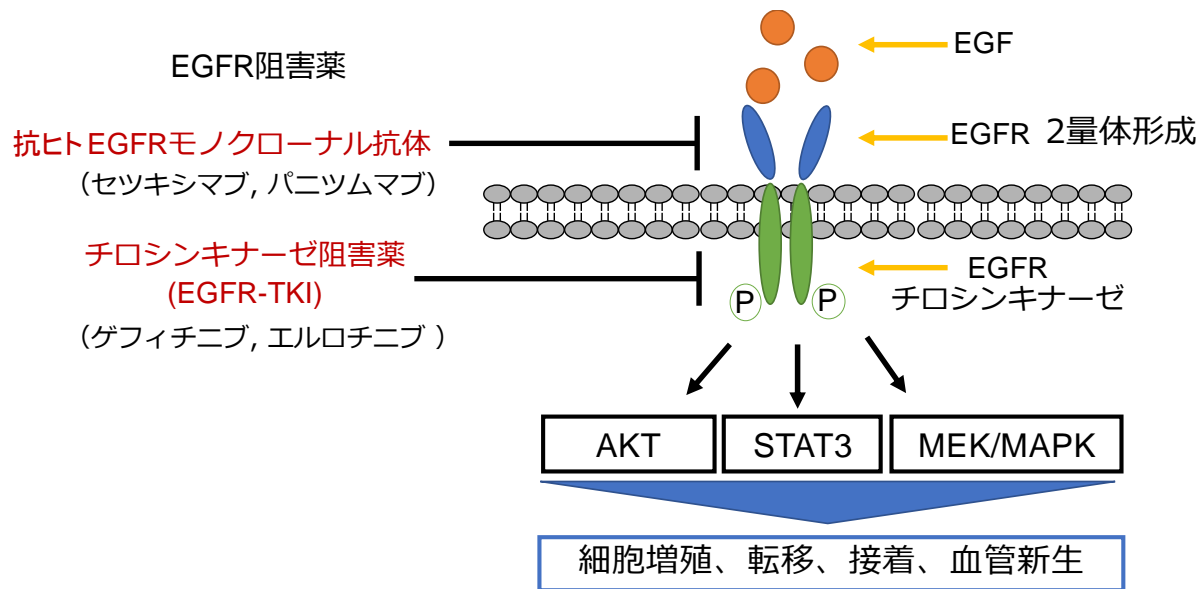
**EGFR阻害剤による
皮膚障害の予防を可能にする
光に安定なビタミンK誘導体の開発**

**福岡大学 薬学部 薬学科
教授 松永 和久**

2023年5月30日

発明の背景と概要①

- EGFR阻害剤は、悪性腫瘍に使用される効果的な分子標的薬であるが、副作用として皮膚障害の発症率が非常に高い。
- EGFR阻害剤による皮膚障害には、炎症性ケモカイン（CCL5）の発現増加が影響している。
[非特許文献]



[非特許文献] Yamaki M, Sugiura K, Muro Y, Shimoyama Y, Tomita Y. Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors induce CCL2 and CCL5 via reduction in IL-1R2 in keratinocytes. *Exp Dermatol.* 2010 Aug;19(8):730-5. doi: 10.1111/j.1600-0625.2010.01108.x. PMID: 20590818.

発明の背景と概要②

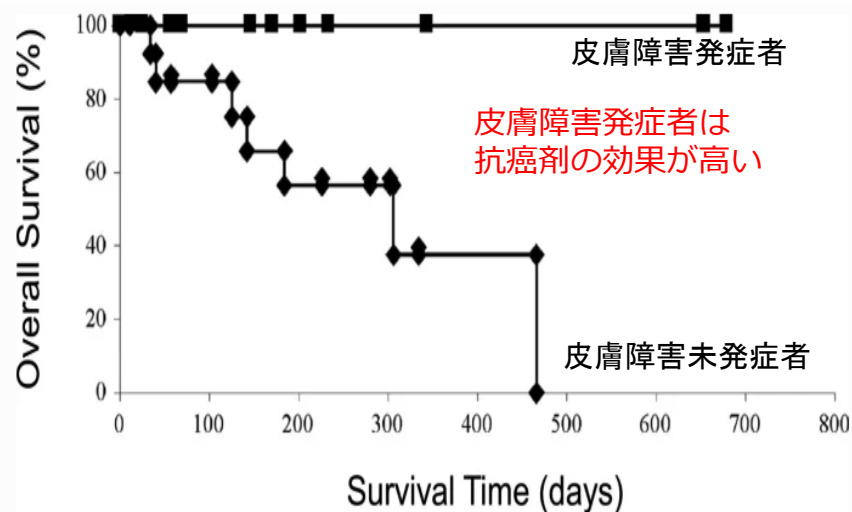
- 皮膚障害は、EGFR阻害剤治療中断の大きな原因であり、患者のQOLやアドヒアランス低下につながる。
- EGFR阻害剤による皮膚障害発症者は、抗癌効果が高いため(下右図)、皮膚障害をコントロールしつつ、抗癌剤治療を継続することが重要である。

EGFR阻害剤によるざ瘡様皮疹



Segaert S, Van Cutsem E. *Ann Oncol*, 2005 16(9):1425-33.

肺腺癌患者の皮膚障害の発症による生存期間の違い



Sugiura Y, et al. *Springerplus*, 2013 2(1):22.

従来技術とその問題点

皮膚障害の管理は保湿やステロイド剤を用いた**対症療法**が中心であり、**効果は限定的**である。

ビタミンK類のEGFR阻害剤による皮膚障害軽減に関する先行技術

- ▶ ビタミンK類は、**皮膚のEGFRを活性化**することでEGFR阻害剤の全身作用から皮膚を保護し、EGFR阻害剤による皮膚障害を予防・治療する。[特許文献1]
- ▶ 特許文献1の発明者は、ビタミンK類はA431ヒト扁平上皮癌細胞のEGFRを活性化し、その効果は**ビタミンK₃ (メナジオン)**が最も強く(100μM)、**ビタミンK₁ (フィロキノ)**がその1/10(1000μM)、**ビタミンK₂ (MK-4)**は**活性化作用を示さない**と報告している。さらに同著者は、**ビタミンK₃**がホスファターゼ阻害作用により、EGFR活性体の分解を抑制することでEGFR活性を確保し、皮膚障害を予防・治療すると報告している。しかし、データへの疑義により、この論文は撤回された。[非特許文献1]



上記発明・論文をもとに、欧州で抗EGFR抗体に起因する皮膚障害に対してビタミンK1およびK3の臨床試験が行われた。

- ▶ **ビタミンK₃**を用いたセツキシマブ投与患者における臨床試験では、**効果無し**と判定された。また、**ビタミンK₃**は**毒性が高く**試験が中断された。[非特許文献2]
- ▶ **ビタミンK₁**のセツキシマブ投与患者における臨床試験では、**無効と有効が混在**している。[非特許文献3]
- ▶ 最近の臨床試験(EVITA)は、**ビタミンK₁**が**女性限定で有効性**が示されている。[非特許文献4]

ビタミンK₂ (MK-4)は注目されていない

【特許文献1】 特表2008-536865 抗EGFR療法に二次的な皮疹の予防および処置のためのビタミンK

【非特許文献1】 Perez-Soler R: The Phosphatase Inhibitor Menadione (Vitamin K3) Protects Cells from EGFR Inhibition by Erlotinib and Cetuximab. Clinical Cancer Research 2011; 17(21):6766-6777. (Retracted article)

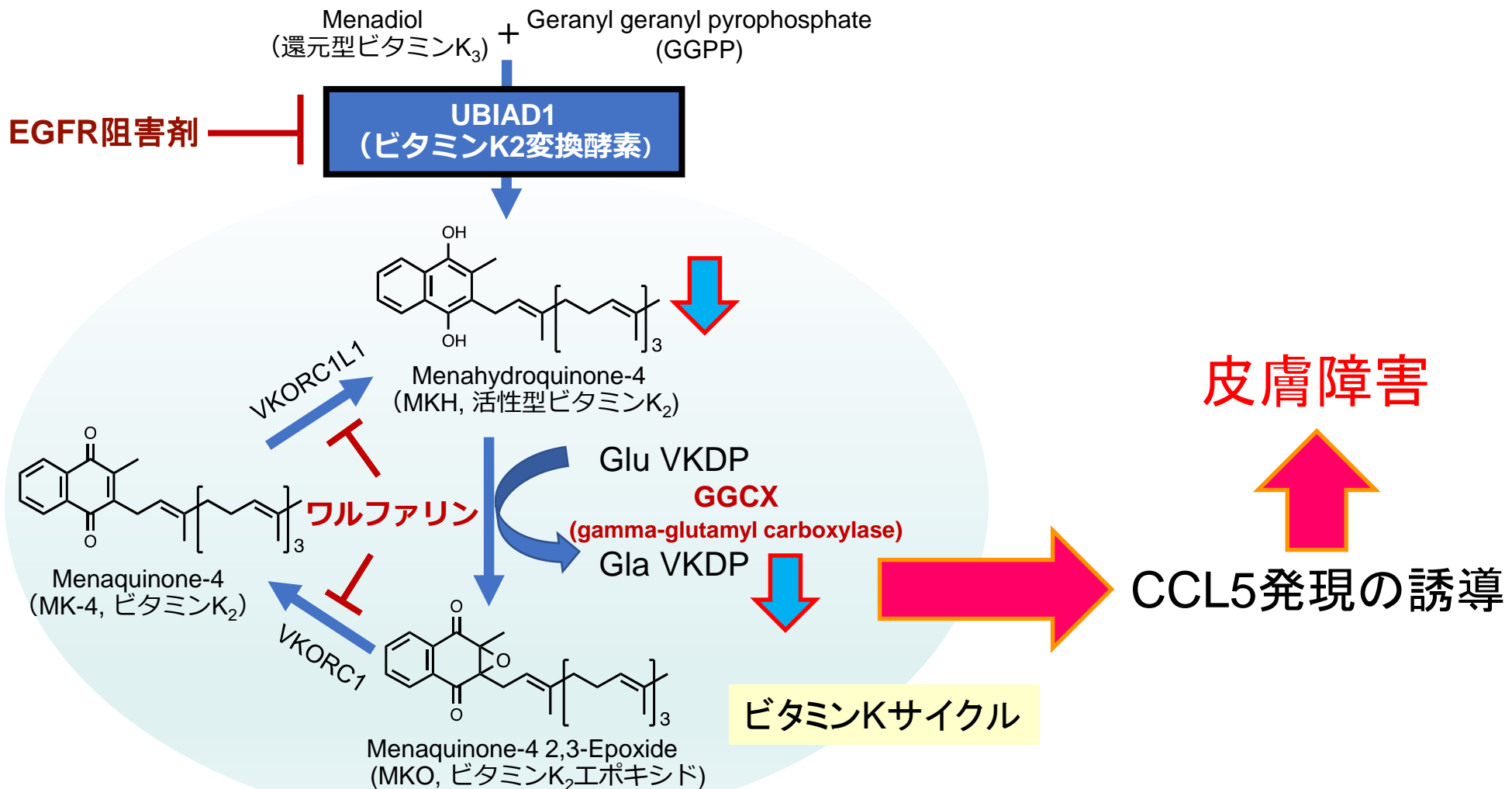
【非特許文献2】 Eriksen JG, et al., Placebo-controlled phase II study of vitamin K3 cream for the treatment of cetuximab-induced rash. Supportive Care in Cancer, 2017; 25:2179-2185.

【非特許文献3】 Tomkov ´a, H., et al., Phytomenadione pre-treatment in EGFR inhibitor-induced folliculitis. J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. 2013;27 (4):514-519.

【非特許文献4】 Gaiser MR., et al., Evaluation of EGFR inhibitor - mediated acneiform skin toxicity within the double - blind randomized EVITA trial: A thorough gender - specific analysis using the WoMo scoreCancer Medicine. 2019;8:4169-4175.

本発明のコンセプト①

- ビタミンKの機能は、活性型ビタミンK(MKH)がGGCXの補因子となりビタミンK依存性タンパク質(VKDP)を活性化(Gla化)することで発揮される。
- ビタミンKサイクルの停止やGGCXのノックダウンは、VKDPのGla化を抑制する。その結果、CCL5発現が誘導され、皮膚障害が起こる。
- EGFR阻害剤は、生体内のMKH合成酵素(UBIAD1)発現を減少し、MKH量を低下させ、CCL5発現を誘導する。

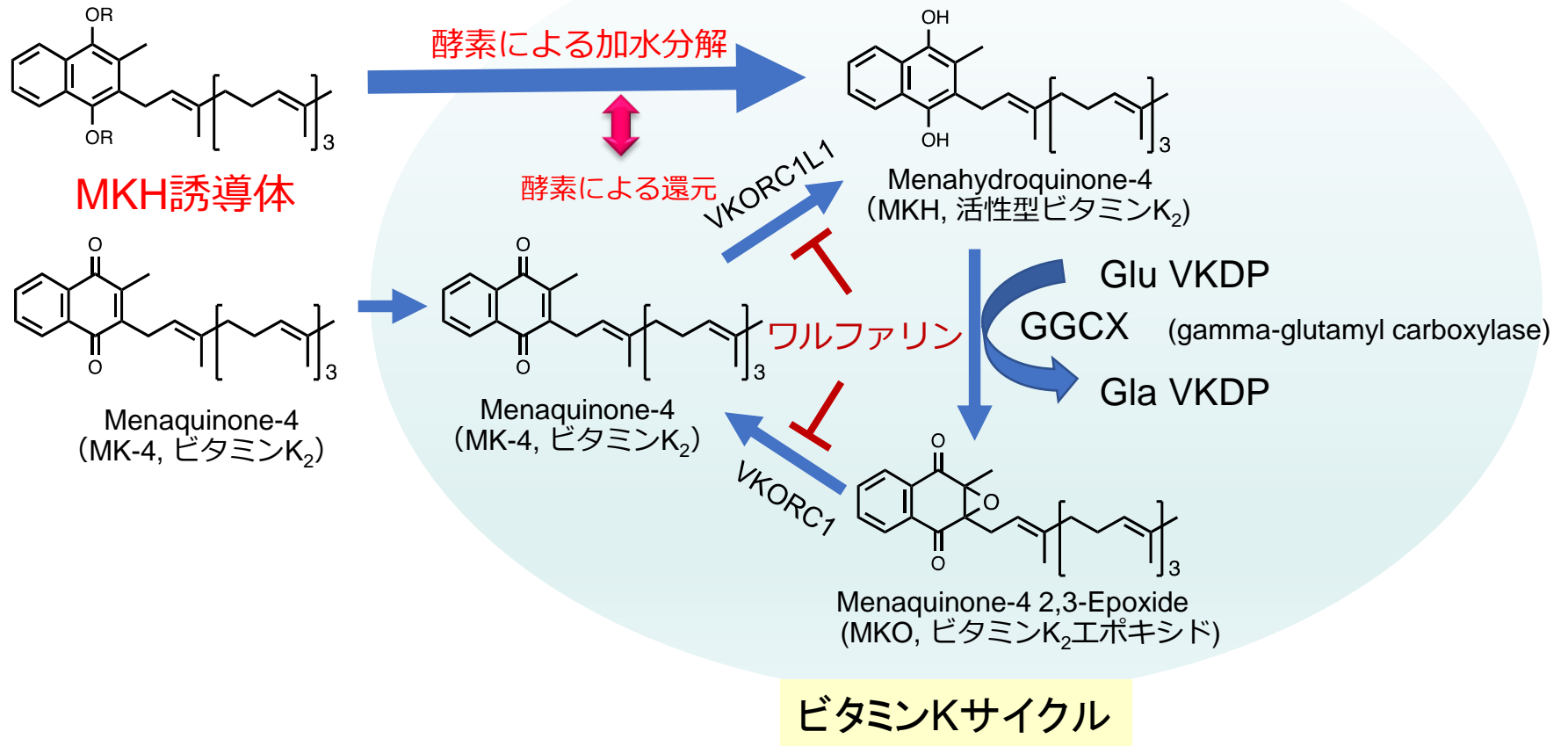


本発明のコンセプト②

MKH誘導体によるCCL5発現抑制効果を評価した。

MKH不足によるGla化VKDPの減少が、CCL5発現を増加し、皮膚障害を起こすことが示唆されるため、MKHを効率的に送達できるMKH誘導体を用いて、EGFR阻害剤による皮膚障害を抑制する。

MKH-DMG R= -COCH₂N(CH₃)₂ · HCl
MKH-SUC R= -COCH₂CH₂COOH

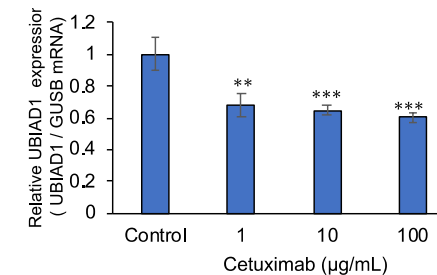
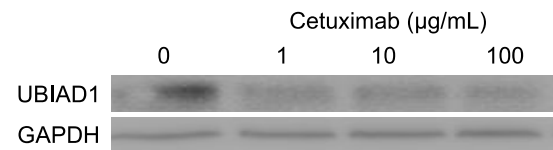
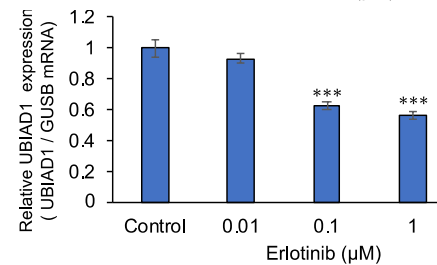
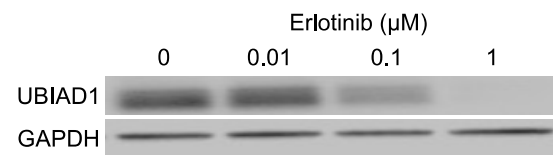
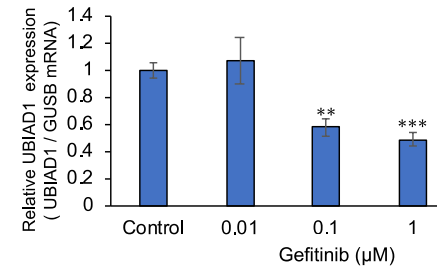
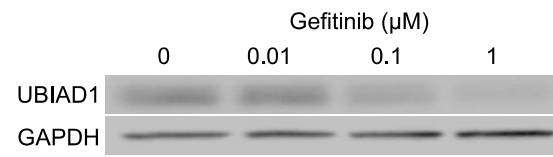


MKHにより、CCL5発現を抑制すれば、皮膚障害を抑制できる

発明の技術内容①-1

EGFR阻害剤で処理したヒトケラチノサイト(HaCaT細胞)において、UBIAD1発現が低下し、ケモカインCCL5発現が誘導されることを明らかにした。

[EGFR阻害剤によるヒト皮膚ケラチノサイトにおけるUBIAD1発現抑制]



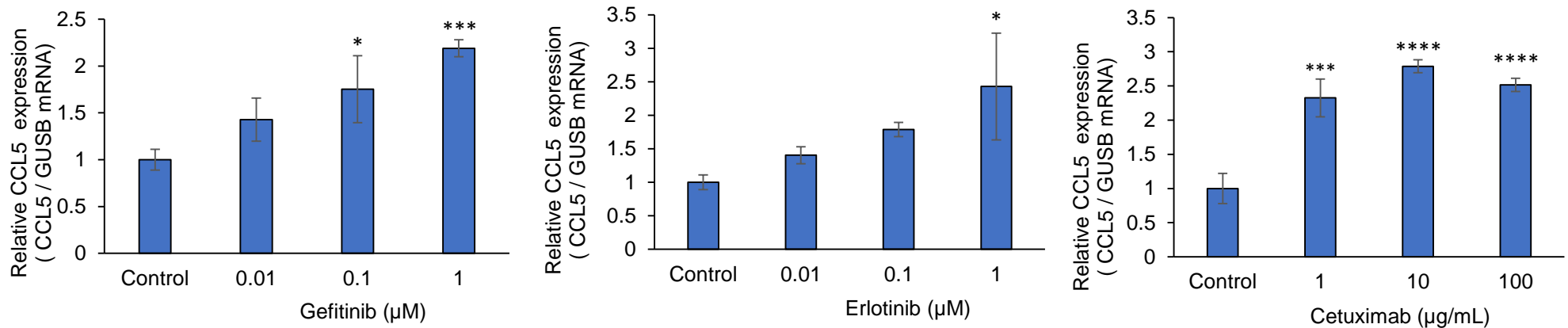
平均値±標準偏差. n=3, vs siControl, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.005, byTukey test.

HaCaT細胞にEGFR阻害剤(Gefitinib, Erlotinib, Cetuximab)を添加し、24時間培養した。24時間後の細胞のUBIAD1タンパク発現及びmRNA発現を評価した。

- EGFR阻害剤(チロシンキナーゼ阻害薬、モノクローナル抗体薬)はHaCaT細胞のUBIAD1のmRNA発現とタンパク発現を濃度依存的に抑制した。
- UBIAD1の発現減少により、MKH生合成量の低下が考えられる。

EGFR阻害剤で処理したヒトケラチノサイト(HaCaT細胞)において、UBIAD1発現が低下し、ケモカインCCL5発現が誘導されることを明らかにした。

[EGFR阻害剤による、ヒト皮膚ケラチノサイトにおけるCCL5の発現誘導]



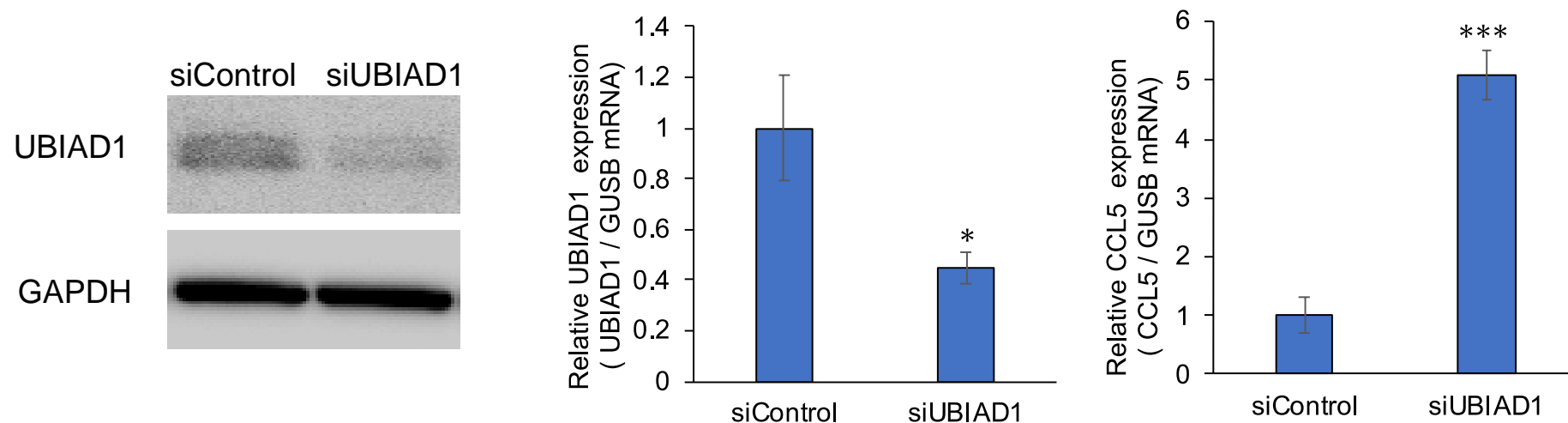
平均値±標準偏差. n=3, Control vs **p<0.05, **p<0.01, ***p<0.005 by Tukey test

ヒト皮膚ケラチノサイト(HaCaT細胞)にEGFR阻害剤(Gefitinib, Erlotinib, Cetuximab)を添加し、24時間培養した。24時間後の細胞を回収し、リアルタイムRT-PCRを用いてCCL5のmRNA発現を評価した。

- EGFR阻害剤(チロシンキナーゼ阻害薬、モノクローナル抗体薬)はHaCaT細胞において、皮膚障害に起因するCCL5 mRNA発現を濃度依存的に増加させた。(既知の報告と同様の結果)

UBIAD1ノックダウンはCCL5発現を誘導した。

[CCL5発現に及ぼすUBIAD1ノックダウンの影響]



平均値±標準偏差. n=3, vs siControl, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, by Student's t-test

siUBIAD1処理24時間後のHaCaT細胞におけるUBIAD1のタンパク及びmRNA発現と、CCL5 mRNA発現について評価した。

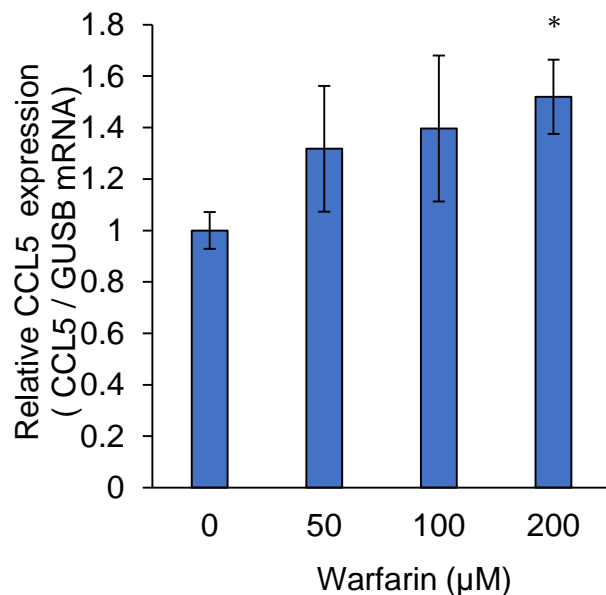
➤ UBIAD1のノックダウンは、CCL5のmRNA発現と関連している。

発明の技術内容②-1

ビタミンKサイクルの停止とGGCXノックダウンは、CCL5発現を誘導した。

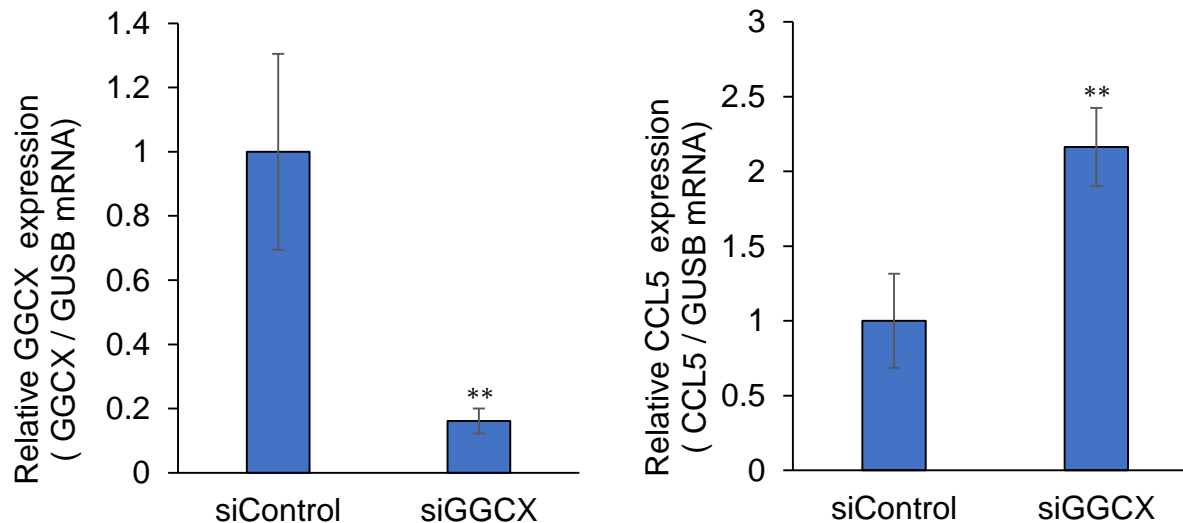
[ワルファリンおよびsiGGCXによるCCL5発現への影響]

ワルファリンによる
ビタミンKサイクルの停止



平均値±標準偏差. n=3, vs Control, *p<0.05 by Dunnett's test

siGGCXによる
VKDPのGla化抑制



平均値±標準偏差. n=3, vs siControl, **p<0.01 by Student's t-test

HaCaT細胞にワルファリン (左図)、siGGCX(右図)を処理し、24時間培養した。リアルタイムRT-PCRを用いて、CCL5 mRNA発現を評価した。

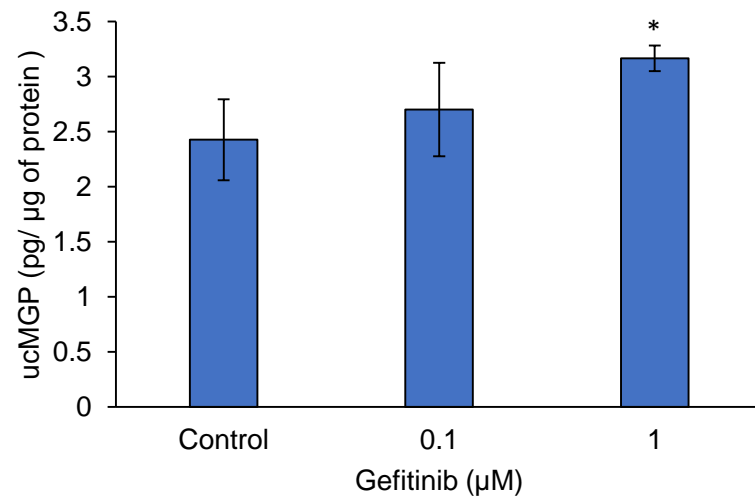
➤ ワルファリンやsiGGCX処理によりCCL5 mRNA発現が増加した。(新技術)

発明の技術内容②-2

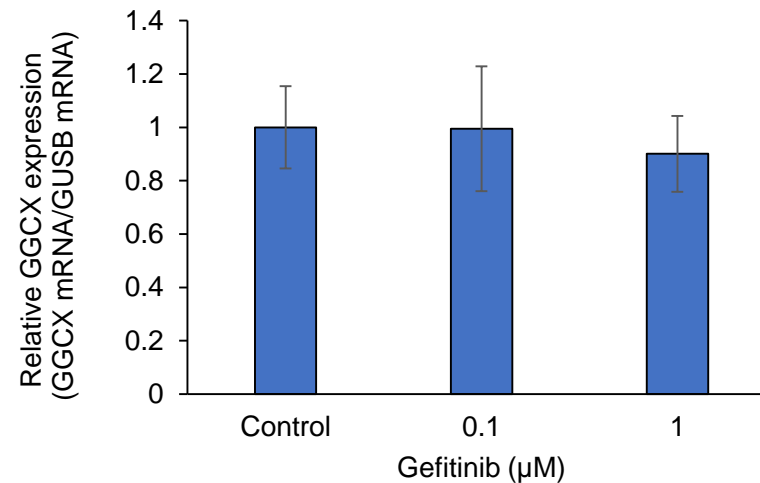
ヒト皮膚ケラチノサイトにおけるGGCX発現に及ぼすEGFR阻害剤の影響

EGFR阻害剤によるCCL5発現誘導は、MKHにより抑制できることが示唆される。

MKHの生合成低下による供給が低下しVKDPのGla化が抑制された



EGFR阻害剤はGGCX発現に影響しない



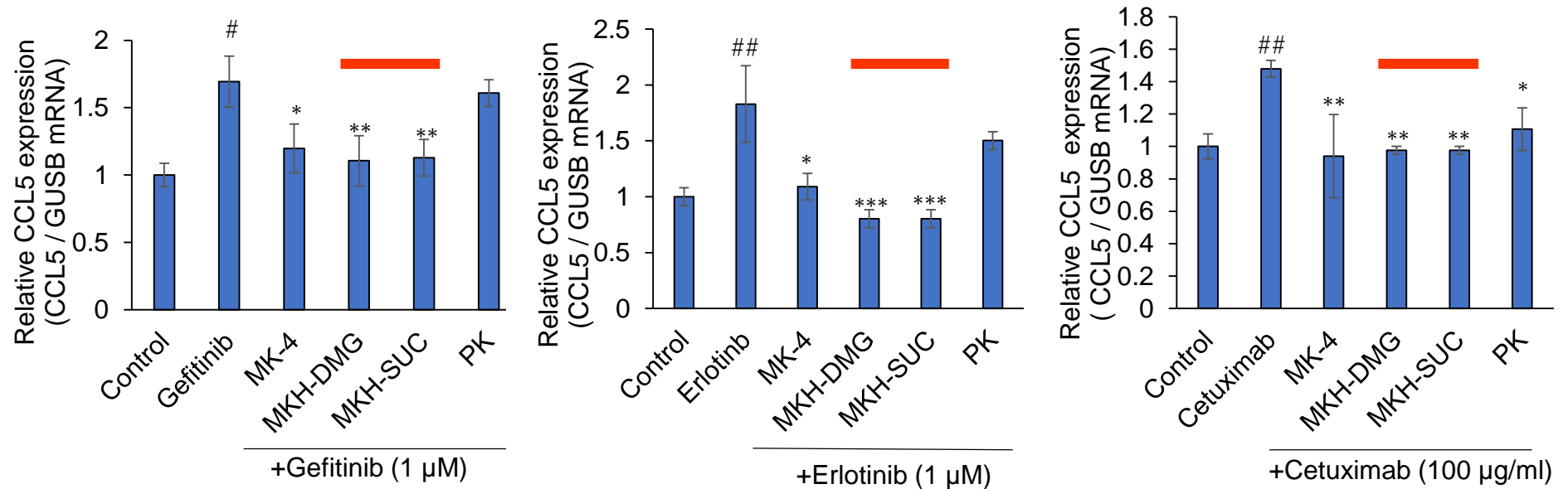
HaCaT細胞にGefitinibを添加し、24時間培養した。24時間後の細胞を回収しuc MGP発現量(ELISA)とGGCX mRNA発現(リアルタイムRT-PCR法)を評価した。vs Control, *p<0.05by Tukey test

➤ EGFR阻害剤は、GGCXのmRNA発現に影響しない。(新技術)

発明の技術内容②-3

MKH誘導体が、EGFR阻害剤により誘導されるケモカインCCL5の発現を抑制することを明らかにした。

[MK-4およびMKH誘導体によるCCL5発現抑制効果]



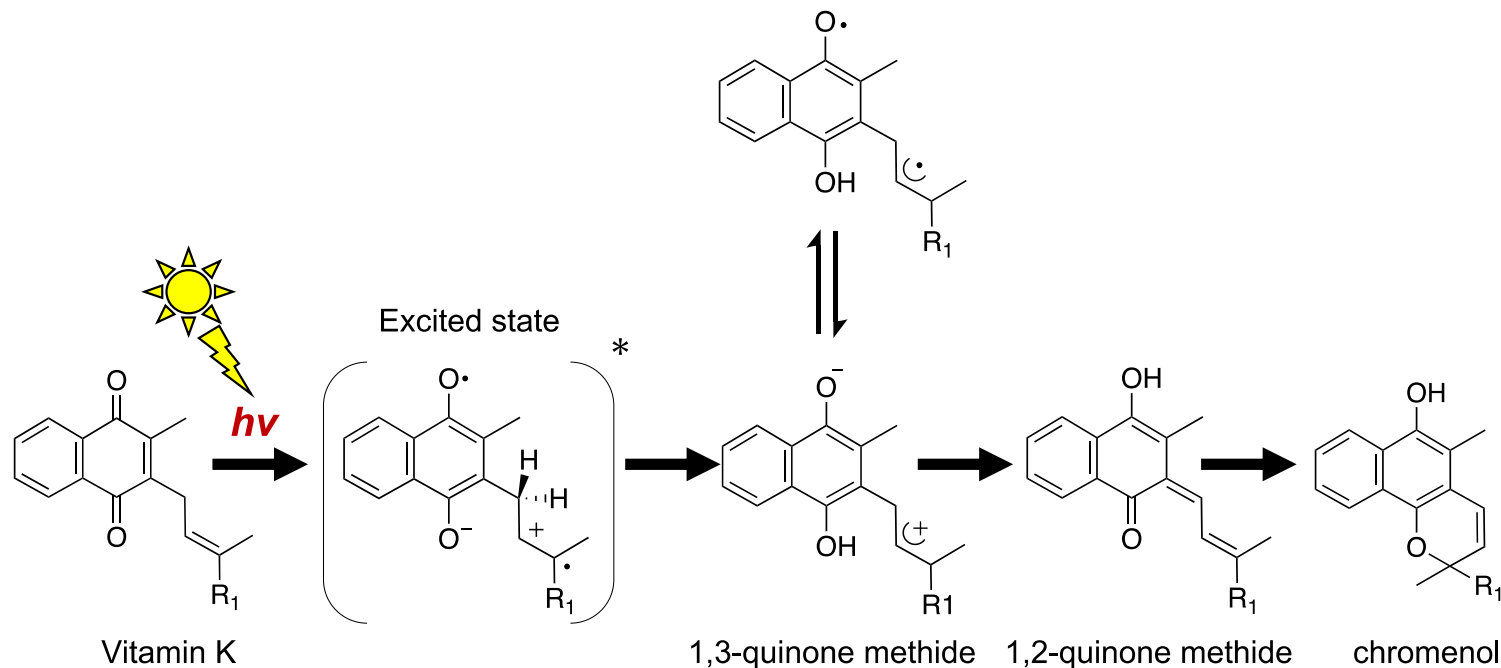
平均値±標準偏差. n=3, vs Control #p<0.05, ##p<0.01 by Tukey test
vs Gefitinib, Erlotinib or Cetuximab *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.005 by Tukey test

HaCaT細胞にMK-4、MKH-DMG、MKH-SUC、PK(各3μM)を添加後24時間培養し、培地をEGFR阻害剤(Gefitinib 1μM、Erlotinib 1μM、Cetuximab 100μg/ml)添加培地に置換し、24時間培養した。リアルタイムRT-PCRを用いて、CCL5 mRNA発現を評価した。

- MK-4, MKH誘導体はEGFR阻害剤により増加したCCL5 mRNA発現を抑制した。(新技術)
- PK(ビタミンK₁)のCCL5発現抑制効果はMK-4, MKH誘導体に比較して低い。(新技術)

発明の技術内容③-1

- 従来技術は光に不安定であり、光毒性の懸念もあるため、皮膚外用剤に適さない。



- **光に非常に不安定→光分解**
- **光分解に伴いラジカルを生成→光毒性**

European Commission Health & Consumersにより
ビタミンKの化粧品への使用が制限

発明の技術内容③-2

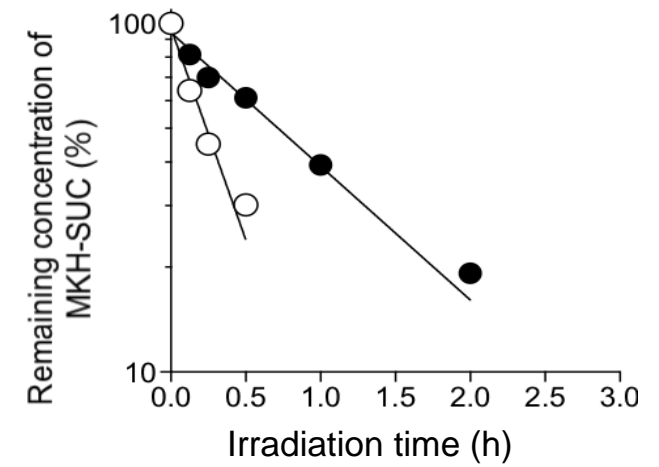
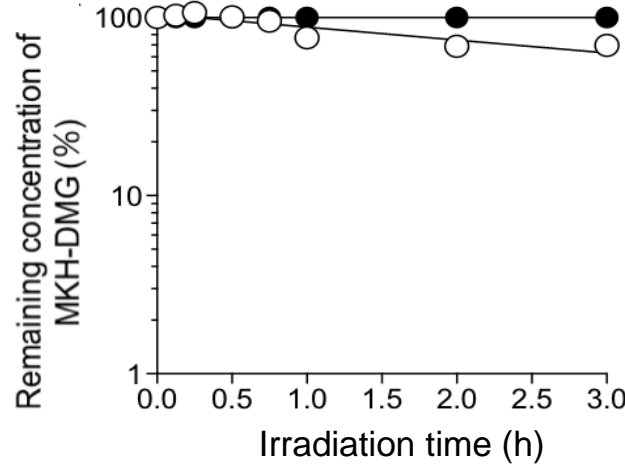
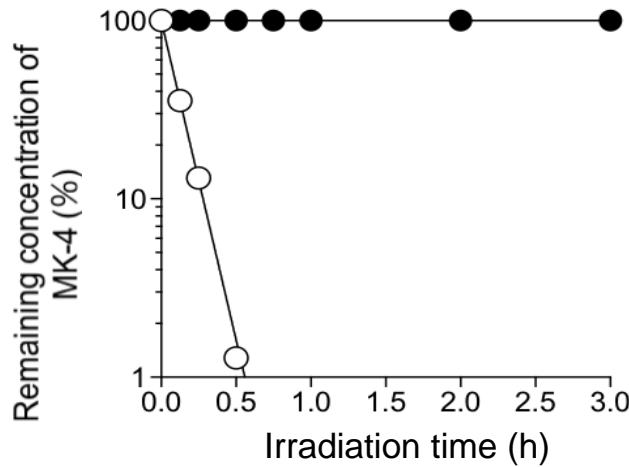
ケラチノサイト (HaCaT細胞) の試験結果から、皮膚適用の可能性が示された。

【UVA照射による活性酸素種の生成と細胞死】

MK-4

MKH-DMG

MKH-SUC



Goto S et al., *Int J Mol Sci*, 2019, v.20(10)

約3倍

約50倍

○照射 : $t_{1/2} = 0.084$ h
●非照射 : $t_{1/2} = \text{too long}$

○照射 : $t_{1/2} = 4.2$ h
●非照射 : $t_{1/2} = \text{too long}$

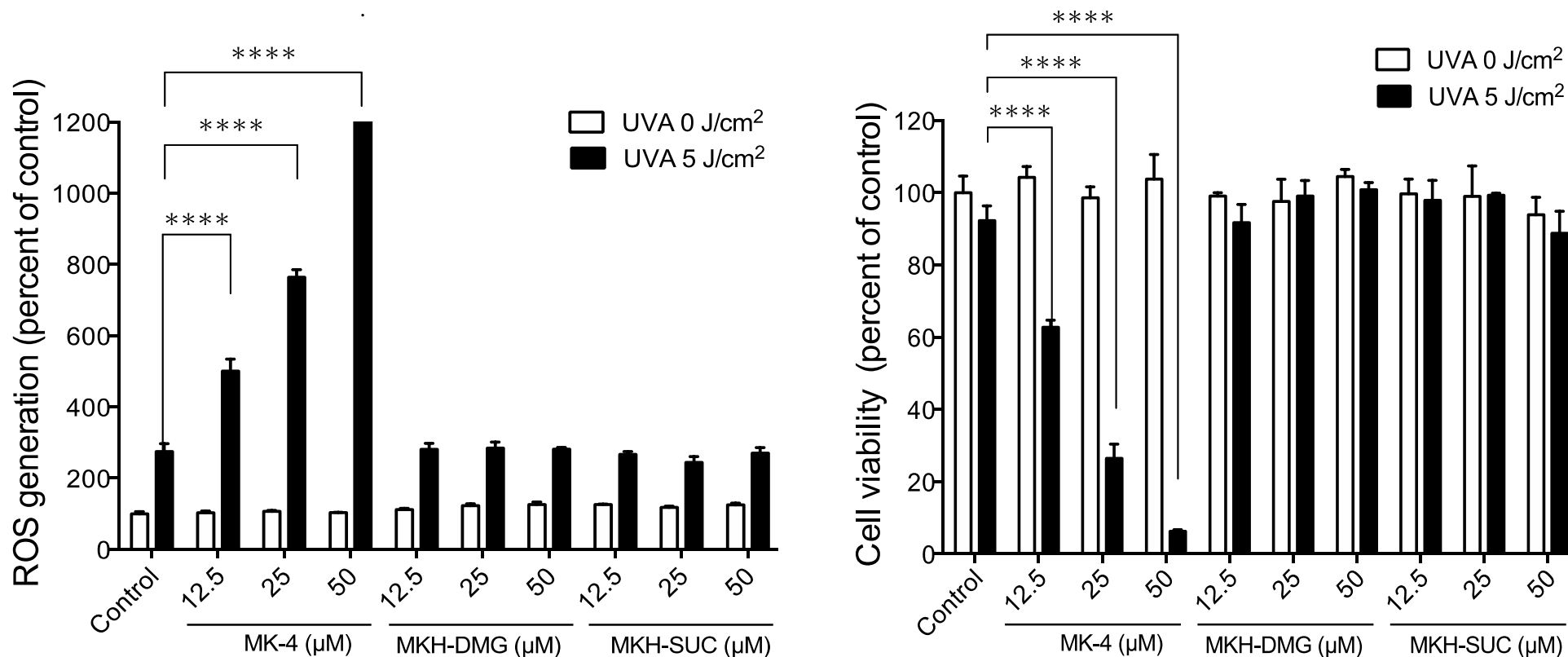
○照射 : $t_{1/2} = 0.25$ h
●非照射 : $t_{1/2} = 0.79$ h

MK-4、MKH-DMG、MKH-SUC のエタノール溶液に太陽光 (12000lx) を照射し、経時的な濃度変化をLC-MS/MSで測定した。

➤ MK-4は太陽光照射により容易に分解したが、MKH誘導体は高い光安定性を示した。

ケラチノサイト (HaCaT細胞) の試験結果から、皮膚適用の可能性が示された。

【UVA照射による活性酸素種の生成と細胞死】



Data represent mean \pm SD ($n = 3$). **** $p < 0.001$ by Dunnett's test.

Goto S et al., *Int J Mol Sci*, 2019, v.20(10)

HaCaT細胞にMK-4、MKH-DMG、MKH-SUCを添加後、UVA照射または非照射を行い、照射直後の細胞内ROS量をDCFH-DA試薬を用いて、照射24時間後の細胞生存率をCTG試薬を用いて測定した。

- UVA照射により、MK-4は細胞内ROS量が増加したが、MKH誘導体は増加しなかった。
- UVA照射により、MK-4は細胞生存率が低下したが、MKH誘導体は低下しなかった。

新技術の特徴・従来技術との比較

新技術の特徴

- ①EGFR阻害剤で処理されたヒト皮膚由来のケラチノサイトにおいて、**ケモカインCCL5発現**が誘導されると同時に**UBIAD1(活性型ビタミンK₂生合成酵素)**の発現が低下することを明らかにした。さらにUBIAD1のノックダウンは、CCL5発現を誘導することを明らかにした。
- ②ビタミンKサイクルの阻害またはGGCXのノックダウンによりCCL5発現が誘導されることを明らかにした。
- ③本発明は、**MKH誘導體**が、EGFR阻害剤により誘導される**ケモカインCCL5の発現を抑制**することを明らかにした。
- ④従来のキノン型ビタミンKの光安定性および光毒性を改善できており、皮膚への使用も可能である。

従来技術

- 従来技術はビタミンK₃とK₁に着目しており、**活性型ビタミンK₂**に言及していない。
- 従来技術はEGFR活性化を機序としており、**ケモカイン抑制**に言及していない。
- 従来技術は光に不安定であり、光毒性の懸念もあるため、**皮膚外用剤に適さない**。

想定される用途

EGFR阻害剤は非常に有効な抗がん剤であるが、皮膚障害の出現頻度が極めて高く、患者QOLおよび治療アドヒアランスの低下が大きな問題である。またマルチキナーゼ阻害剤も皮膚障害を起こす抗がん剤である。これら皮膚障害の治療は対症療法が中心で効果は限定的であり、皮膚障害発症を抑制する薬剤のニーズは高い。

- ① CCL5を標的としたEGFR阻害剤の皮膚障害抑制剤は市販されておらず、既存薬では、皮膚障害抑制効果が不十分な場合の代替薬として使用が期待できる。
- ② CCL5を標的とする医薬品はまだないが、CCL5が関与する疾患（がん転移など）の治療薬としての展開も期待できる。
- ③ 既存のビタミンKは、光安定性および光毒性の懸念もあるが、MKH誘導体はこれらを改善しており、ビタミンKを皮膚外用剤として使用することも可能である。

実用化に向けた課題

① EGFR阻害剤による皮膚障害モデル動物を作製し、MKHまたは誘導体のCCL5発現抑制効果及び皮膚障害に対する効果の判定を行う。また皮膚適用時の光毒性についても検討する。

→EGFR阻害剤による皮膚障害モデルの作製とMK-4による効果評価中

- ② MKHは新規化合物であるため、所定のGLP安全性試験が必要である。
- ③ MKH誘導体の製剤開発のため、経皮投与製剤のノウハウを持つ製薬企業と協力して、製剤を開発する。(1年)
- ④ 動物モデルで有効性の確認、作用機序の解明を行う。(1年)
- ⑤ 臨床試験(治験)を行う。(2年)

MKH-DMGおよび類縁化合物のモデル動物での薬理効果の評価により選択した候補化合物の安全性試験、製剤開発を経て、2～4年後には臨床試験開始を目指している。

本技術に関する知的財産権

- 発明の名称：ケモカインCCL5発現抑制剤
- 出願番号：特願2022-37369
- 出願人：学校法人福岡大学
- 発明者：高田 二郎、松永 和久、加留部 善晴、
松尾 宏一、古賀 允久、瀬戸口 修一、
後藤 将太郎

産学連携の経歴

- 2002年-2004年 JST研究成果活用プラザ福岡FS調査に係る試験研究 (共同研究者)
- 2005年 JSTシーズ育成試験に採択
- 2006年 JSTシーズ発掘試験に採択
- 2007年 久留米リサーチパーク発展型都市エリア産学官連携促進事業可能性試験に採択
- 2012年-2013年 JST A-STEP シーズ顕在化タイプ(共同研究者)

お問い合わせ先

福岡大学 研究推進部 産学官連携センター

T E L 092-871-6631

F A X 092-866-2308

e-mail sanchi@adm.fukuoka-u.ac.jp