

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24249034

研究課題名(和文) システム的理解に基づく医薬品副作用予測法の構築

研究課題名(英文) Establishment of systems-based prediction method for drug adverse effects.

## 研究代表者

鈴木 洋史 (Suzuki, Hiroshi)

東京大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：80206523

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 33,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では医薬品の副作用を、その発現メカニズムに対するシステム的理解に立脚して予測する手法の構築を目指した。特に心筋細胞毒性に焦点を当て、心筋細胞に発現するアポトーシス関連分子およびその上流シグナル伝達経路に関連する分子を組み込んだ分子間ネットワークモデルを構築した。さらに、細胞生存の特徴を考慮して設定した拘束条件を満たすように、パラメータの可動域を探索する手法を新たに構築して解析を行ったところ、心筋細胞に対する毒性発現を良好に予測出来ることが示され、従来の静的ネットワーク解析よりも、目的に応じた解析が可能なが示された。

研究成果の概要(英文)：We aimed to develop the systems-based prediction method for drug adverse reactions. In the present study, we focused on drug cardiotoxicity and constructed a comprehensive systems-biological model of cardiomyocyte proliferation and apoptosis. We also developed a novel method to determine the allowable parameter ranges for the network behavior to satisfy some constraints, which reflects the features of cell proliferation and apoptosis. Application of this novel analysis method to the comprehensive cardiomyocyte model provided better prediction of cardiotoxicity compared to the conventional method using static network analysis.

研究分野：応用薬理学

キーワード：薬剤反応性 薬理学 シミュレーション

## 1. 研究開始当初の背景

医薬品の候補化合物を見出し、開発を開始してから上市に至るまでの成功確率は1/1000程度と極めて低く、また臨床開発を開始した後の成功確率も1割程度に過ぎない。この効率の悪さの主要な原因として、副作用の発現があげられる。既に2003年の段階における報告事例でも、臨床開発中断の原因の半分以上は、薬理効果と安全性のバランスが期待と異なるためとされており、医薬品副作用の予測精度の低さがボトルネックである現状が明確に示されている (Frank R et al., Nat Rev Drug Discov. 2003)。また上市された後においても、副作用の発現が問題となって市場から撤退された薬物も複数存在し、そのようなケースにおける損失と影響は非常に大きい。

医薬品の副作用は、薬物固有の毒性発現メカニズム (toxicodynamics / TD) と、毒性標的分子の近傍における薬物濃度 (toxicokinetics / TK) により規定される。現在まで、薬物体内動態の記述・予測に関しては、研究代表者らのこれまでの研究も含めて多くの試みが行われてきており、成果が挙げられてきている。一方で、薬物毒性発現の動的記述・予測に関しては、毒性評価系構築の困難さも相俟って研究の絶対数が少ない上に、生理学的実体を反映しない単なる合わせのコンパートメント・モデルを用いて解析された例が多く、応用範囲の狭い研究になっている。さらに、毒性の発現メカニズムというTD特性に基づいた上で、TKを統合して副作用発現を予測する試みはほとんど行われてきていなかった。

研究代表者らはこれまで、がん薬物療法の領域において重要な位置づけを占める薬剤群となっている、チロシンキナーゼ阻害薬 (TKI) に特に焦点を絞り、副作用発現メカニズムの分子論的研究を進めてきた。その結果、創薬段階で意図された標的分子以外のキナーゼ、いわゆるオフターゲット・キナーゼに対する阻害を、臨床用量における組織中薬物濃度を基にして定量的に捉えることで、初めて説明可能になる副作用事例の存在を示すことに成功した。

本研究においては、これまでの研究をさらに発展させ、分子メカニズムの理解に立脚し、生理学的な実体を伴ったTDモデルを構築し、TK記述モデルと連動してin vivoにおける毒性発現を統合的に記述・予測できる応用範囲の広いモデルを構築することが、今後の創薬科学の発展に必須であると考え、研究計画の立案に至った。本研究で対象とする医薬品副作用としては、臨床において一定の頻度で発現し、重症化した際の影響が大きく、かつ前臨床段階での予測も難しいために、創薬過程で最も重要な課題となっている肝毒性および心毒性にフォーカスして検討を進めることとした。

## 2. 研究の目的

本研究では、医薬品の副作用を、その発現メカニズムに対するシステム的理解に立脚し、創薬過程の試験によって取得可能なデータに基づいて、臨床における副作用発現を予測する手法を構築することを目標とした。

## 3. 研究の方法

スニチニブによる副作用発現過程をモデルとした、数理的アプローチの有用性検証

VEGFR, PDGFR, KITなどをプライマリーターゲットとする、マルチキナーゼ阻害薬であるスニチニブは、心毒性・肝毒性を始めとして、多様な副作用を引き起こすことで知られている。研究代表者らのこれまでの研究から、スニチニブがPHKの活性を阻害することが見出されている。PHKはグリコーゲンの代謝に関わる酵素の活性を調節するキナーゼであるが、グリコーゲン代謝に関連する下流の細胞内物質代謝経路としては、解糖系、ペントースリン酸回路、グルタチオン酸化還元経路などが挙げられ、これらの細胞内代謝経路は、複雑に相互作用しながら恒常性を保っているため、PHKの阻害が細胞内物質代謝に影響を与える可能性は想定されるものの、具体的にどの代謝物濃度を、どの程度変化させるかを、直ちに把握することは困難であり、PHKに対する阻害が毒性発現と関連しているのか、を推測することもやはり困難と言える。このようなケースでは、モデルシミュレーションを用いて、PHK阻害の影響が生じる可能性の高い代謝物質の同定を行うことが有用と考えられた。そこで、グリコーゲン代謝に関連する各種代謝経路を記述する動的シミュレーションモデルを、既存の報告から抽出し、スニチニブによるPHKの阻害が、どのように影響を与え、またスニチニブの影響を回避する手法が有り得るか、検討を行った。

細胞内シグナル伝達経路および分子間相互作用を反映した、心筋細胞におけるシグナル分子間相互作用マップの構築

心筋細胞に対する薬物毒性を評価するにあたり、心筋細胞に発現しているシグナル分子を、Gene Expression Omnibusに登録されているDNA arrayの発現量情報を参照することで選定した。また、本研究においては、キナーゼ阻害が細胞内のシグナル伝達等に与える影響を評価することを目的としているため、心筋細胞に発現しているキナーゼを選定し、それらのキナーゼが関与するシグナル伝達経路や、相互作用により、共役して機能する分子の情報取得を試みた。

この情報集にあたり、各種シグナル伝達経

路に関する knowledge base である Reactome および Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)を参照した。また、十分な情報を得ることが困難な場合は、UniProt データベースなど、個別の遺伝子/タンパク質に対するデータベースを参照し、データベース構築者により、キュレーションされた情報を収集した。

一連の情報収集によって得られた、細胞内のシグナル伝達経路や分子間相互作用に関する情報を統合し、種々のシステムバイオロジー解析を可能な状態にするため、システムバイオロジー分野における標準的なモデル記述様式である Systems Biology Markup Language / SBML に準拠したグラフィカルエディタ Cell Designer を用いた。構築されたマップにおける、反応過程における速度論的法則や各種パラメータに関しても、Cell Designer を用いて記述した。

細胞内分子間相互作用マップを用いた解析手法の検討

網羅的な情報を包含するマップを用いた種々の解析にあたり、分子毎の情報量のばらつきやマップの簡略化による情報量の標準化を試みた。具体的には、ネットワーク全体の制御構造を維持するために必要な分子を、controllability analysis に基づいて抽出し、冗長な分子を捨象することで、標準化を行った。また構築したマップは、一種の分子連関ネットワークであり、ネットワークの特性を把握するためには、ネットワーク構造に基づく静的解析手法が適用可能である。そこで、グラフ理論に基づくネットワーク構造特徴が評価可能な Cytoscape を用いて解析を実施した。

一方、構築されたマップは、各分子の挙動を決定している反応・制御機構を、数式を用いて記述することで、動的シミュレーションモデルとなる。本研究では、特定の条件を満たすために必要となるパラメータ値の条件を、パラメータ空間を探索して決定する、逆解法的アプローチを用いた解析手法を構築し、ネットワークの動的特性の抽出を行った（論文投稿準備中のため、具体的な方法論を詳述することは避けた）。

初代培養心筋細胞を用いたウェット実験による検証

1~3日齢の C57BL6J マウスより、心臓を摘出し、コラゲナーゼおよびトリプシンにより組織消化し、ゼラチンコーティングした培養ディッシュ上に播種した。2時間後に、浮遊している細胞を回収し、初代培養新規細胞として用いた。

種々のキナーゼに対する shRNA をコードするアデノウイルスベクターを構築し、10,000 MOI での感染により、48時間後に標

的キナーゼが 90%程度ノックダウンできることを確認した。これらの shRNA アデノウイルスを、初代培養心筋細胞に添加し、その後の細胞生存率を、化学発光法を用いて細胞内 ATP 含量を測定することで評価した。

#### 4. 研究成果

スニチニブによる副作用発現過程をモデルとした、数理的アプローチの有用性検証

解糖系およびペントースリン酸回路、グルタチオンの酸化還元経路に関して、数理モデルを用いたシミュレーションを行い、PHK の阻害が与える影響を予測したところ、スニチニブの投与は、細胞内のグルタチオン酸化還元バランスを、大幅に酸化型に偏らせ、細胞に対して強い酸化ストレスを与える可能性が示された。また、ビタミン E などの抗酸化物質を重ねて投与することで、スニチニブによって変化した細胞内グルタチオン酸化還元バランスを、正常なレベルへと戻すことが出来ることも示唆された。これらの予測結果は、マウスを用いた動物実験によって妥当な予測となっていることも検証され、数理モデルを用いたシミュレーションは、TKI が細胞に与える影響を、前臨床で測定可能なキナーゼ阻害プロファイル情報を基に推測する際に、強力な予測ツールになり得ることが確認された。

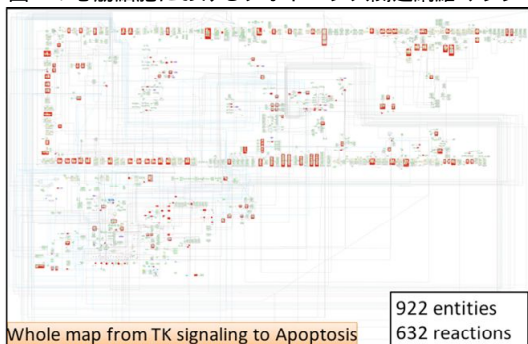
細胞内シグナル伝達経路および分子間相互作用を反映した、心筋細胞におけるシグナル分子間相互作用マップの構築

キナーゼ阻害剤投与により、薬物により程度の違いがあるものの、心筋細胞のアポトーシスに起因する心筋毒性が生じることが報告されている。しかしながら、キナーゼ阻害剤間のキナーゼ阻害プロファイルの比較を行っても、多くの TKI に関して心筋細胞障害の原因となる特定のキナーゼが、明確に見出されるわけではない。これは主に、心筋細胞毒性が、複数のキナーゼ阻害の組み合わせにより出現しているためであると考えられた。そこで、各キナーゼが、心筋細胞の生存性にどの程度寄与しているのかを、数理モデルを用いて予測を試みることにした。心筋細胞に発現している種々のキナーゼ分子、およびアポトーシスに関与する分子群に関して、分子生物学的情報を網羅的に集約したマップを構築した。構築されたマップには、約 100 種類のキナーゼ分子から下流のアポトーシス関連経路に至るまで、合計約 900 種類の分子実体および約 600 種類の反応素過程が含まれている（次頁 図 1）。

しかしながら、ここで構築したマップにおいては、過去の報告から特定の分子周辺の情報量が得られるケースがある一方で、過去の文献から抽出できる情報量が少ない分子の

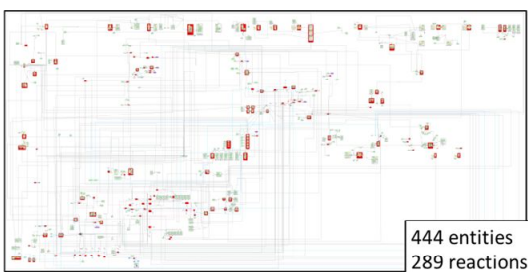
周辺に関しては、比較的マップが疎らになっており、全体として情報量のばらつきが認められた。

図1．心筋細胞におけるアポトーシス関連網羅マップ



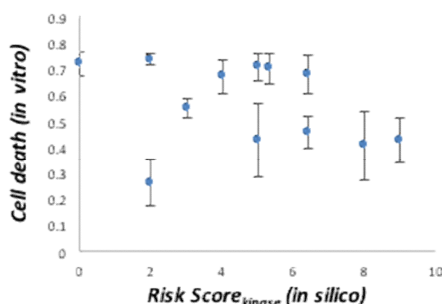
そのため、このマップを用いてネットワークの形状解析を進めた場合、ネットワーク形状だけではなく、「情報量」によりバイアスがかかった解析となることが予測された。そこで、controllability analysis に基づく情報量の標準化を行ったところ、約 450 個の分子実態および 300 程度の素過程により、ネットワーク構造が記述されることが明らかとなった（図2）。

図2．情報量を標準化したアポトーシス関連網羅マップ



この標準化したマップを用いて、ネットワーク構造の静的解析を行った。指標としては、ネットワーク上の各分子が、ネットワーク全体の制御にどの程度影響を与えるかの指標になると考えられる Betweenness centrality を用いた。各キナーゼに対する Betweenness centrality 値が、各キナーゼの重要性、あるいは、心筋細胞アポトーシスに対する危険度に対応する可能性を想定した。この点を検証するため、初代培養心筋細胞に対し、各キナーゼに対する shRNA をコードするアデノウイルスを感染させ、各キナーゼを発現抑制した際の細胞生存率を測定して比較を行ったが、Betweenness centrality との良好な相関は認められなかった（図3）。

図3．静的解析によるリスク予測と心筋細胞生存率

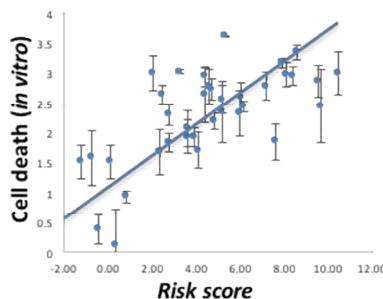


良好な相関が見出されない原因として、Betweenness centrality がネットワーク全体への影響を評価する指標であり、必ずしもアポトーシスのみへの影響評価となっていないこと、また動的挙動（速度論的挙動）の影響が反映されていないことが想定された。

この点を克服するため、動的特性の解析に基づく予測を試みることにした。通常、動的挙動解析では、文献値やフィッティングによって決定したパラメータ値を用い、シミュレーションを行って各キナーゼを阻害した状況を再現し、その際のアポトーシスの程度を評価する方法論が想定される。しかしながら本モデルでは、300 程度ある素過程に対し、すべての速度論パラメータを決定することは極めて困難である。そこで、A. キナーゼに対する阻害がかかっていない基底状態では、細胞はアポトーシスを生じることなく生存を続ける、また、B. 各キナーゼの発現量変動などに対しても、ある程度安定に細胞が生存可能であり、アポトーシスの誘導は生じない、という2つの条件を仮定し、これを満足するようにネットワークが挙動するためには、各速度論パラメータはどのような値の範囲に収まる必要があるか、という観点でパラメータ空間の探索を行った。

その結果、上記の条件を満足するためには、パラメータ毎に許容される変動幅が異なることが見出された。この許容される変動幅が広い場合は、細胞生存に対して与える影響が相対的に小さく、逆に変動幅が狭い場合には、パラメータ値が範囲を逸脱した場合に、細胞生存を維持できなくなる事を示唆しており、アポトーシス誘導に対して感受性の高い反応に関与していると推測される。そこで、感受性が高い反応に関与する分子がハイリスクと判定されるようスコアリングを設定し、各キナーゼのリスクと、in vitro でのキナーゼロックダウン下における細胞生存率と対比したところ、比較的良好な相関関係が認められた（図4）。

図4．動的解析によるリスク予測と心筋細胞生存率



## 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3件)

Yoshiaki Kariya, Masashi Honma,

Hiroshi Suzuki Systems-based understanding of pharmacological responses with combinations of multidisciplinary methodologies Biopharm Drug Dispos. 2013 Dec, 34(9):489-507. doi: 10.1002/bdd.1865. Review.

Takahiro Amemiya, Masashi Honma, Yoshiaki Kariya, Samik Ghosh, Hiroaki Kitano, Yoshihisa Kurachi, Ken-ichi Fujita, Yasutsuna Sasaki, Yukio Homma, Darrel R Abernethy, Haruki Kume, Hiroshi Suzuki Elucidation of the molecular mechanisms underlying adverse reactions associated with a kinase inhibitor using systems toxicology. npj Syst. Biol. Appl. 2015 Sep, 1:1-10. doi: 10.1038/npjbsa.2015.5

Yoshiaki Kariya, Masashi Honma, Hiroshi Suzuki Mechanism analyses and mechanism-based prediction for adverse drug reactions using systems pharmacology Nihon Yakurigaku Zasshi. 2016 Feb, 147(2):89-94. doi: 10.1254/fpj.147.89.

〔学会発表〕(計 10 件)

本間雅 キナーゼ阻害薬による副作用発現機構の解析 日本薬物動態学会第 27 回年会、タワーホール船堀(東京都・江戸川区) 2012 年 11 月 20 ~ 22 日

Hiroshi Suzuki Challenges to clarify the mechanism of heart toxicity of sunitinib based on systems-biological approach. Systems Pharmacology for the Prediction of Tyrosine Kinase (TKI workshop), Silver Spring, USA, 2013 年 02 月 28 日 ~ 03 月 01 日

本間雅 Systems-based understanding of TKI cardiotoxicity 日本薬物動態学会第 28 回年会、タワーホール船堀(東京都・江戸川区) 2013 年 10 月 09 ~ 11 日

Hiroshi Suzuki Pk-pd analysis of mechanism of toxicity of molecular target drugs: towards optimal treatment of cancer 5th FIP Pharmaceutical Sciences World Congress, Melbourne, Australia, 2014 年 04 月 13 ~ 16 日

本間雅 医薬品適正使用から医薬品創成へ:分子標的薬を例として 医療薬学フォーラム 2014/第 22 回クリニカルファーマシーシンポジウム、ビッグサイト TFT ホール(東京都・江東区) 2014 年 6 月 28 ~ 29 日

Hiroshi Suzuki Utilization of Systems Biology in Analyzing and Predicting the Toxicity of Molecular Target Drugs 19th North American ISSX Meeting / 29th JSSX Meeting, San Francisco, USA, 2014 年 10 月 19 ~ 23 日

Hiroshi Suzuki Systems Pharmacology Approach to Tyrosine Kinase Inhibitor Toxicity ASCPT2015 pre-conference, New Orleans, USA, 2015 年 03 月 03 日

苅谷嘉顕、本間雅、鈴木洋史 細胞内シグナルネットワークを考慮したシステム薬理学的心毒性予測 第 88 回日本薬理学会年会、名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市) 2015 年 03 月 18 ~ 20 日

Yoshiaki Kariya, Masashi Honma, Hiroshi Suzuki Prediction of tki associated cardiotoxicity based on network analyses of intracellular signaling pathways. Workshop on Pharmacological Mechanism-Based Drug Safety Prediction, Silver Spring, USA, 2015 年 08 月 06 日

本間雅 薬物副作用に関するトランスレーショナル研究サイクル 日本薬物動態学会第 30 年会、タワーホール船堀(東京都・江戸川区) 2015 年 11 月 12 ~ 14 日

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

鈴木 洋史 (SUZUKI, Hiroshi)  
東京大学・医学部附属病院・教授  
研究者番号: 80206523

### (2)研究分担者

本間 雅 (HONMA, Masashi)  
東京大学・医学部附属病院・特任准教授  
研究者番号: 60401072