

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659069

研究課題名(和文)キナーゼ阻害薬による手足症候群発症機序の解析

研究課題名(英文)Mechanistic analysis of hand-foot syndrome associated with kinase inhibitors

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) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：手足症候群は、一部のチロシンキナーゼ阻害薬によって高頻度に誘発される副作用であり、時として治療の中断を余儀なくされるほどの重篤な臨床像を呈する。本研究の開始当初は、FLT3阻害が単独で手足症候群の誘発に関与する可能性を想定していたが、その後臨床開発が進んだ新規薬物の情報も併せて解析した結果、単独分子の阻害のみで説明することは困難であることが判明した。検討を進めた結果、VEGFR阻害が共通要因であり、これにCSF1R阻害を併せ持つ場合は、発症が抑制されることが考えられた。一方、VEGFR阻害・CSF1R阻害に加えてFLT3阻害を有する場合には、CSF1R阻害による発症抑制は打ち消されることが考えられた。

研究成果の概要(英文)：Hand-foot syndrome is an adverse reaction frequently observed in patients administering some tyrosine kinase inhibitors (TKIs), which sometimes becomes too severe to continue the therapy. Although we had originally hypothesized that the syndrome is caused by a single inhibition of FLT3, this hypothesis turned out to be implausible when we considered the information of newly developed TKIs which became available after the start of this research. Analyses based on currently up to date information have suggested that VEGFR inhibition is a common factor for the syndrome and that simultaneous inhibitions of CSF1R and VEGFR suppress the onset. On the other hand, FLT3 inhibition was considered to negate the suppressive effect against the onset which could be achieved by CSF1R inhibition.

研究分野：医療系薬学

科研費の分科・細目：臨床薬学

キーワード：薬剤反応性 薬理学 シグナル伝達 癌 生体分子

## 1. 研究開始当初の背景

近年の癌治療において頻用される、フッ化ピリミジン系プロドラッグであるカペシタビンや、スニチニブ・ソラフェニブなどのチロシンキナーゼ阻害薬の服用に伴って、高頻度な副作用として「手足症候群」の発症が認められ、時として治療の中断を余儀なくされるほどの重篤な臨床像を呈することが明らかとなってきた。厚生労働省も平成 22 年に「重篤副作用疾患別対応マニュアル」を作成して注意喚起を行っているが、現状では休薬を行う以外に有効な対処法が存在せず、症状がひどい場合には治療の中断や治療強度の低下を余儀なくされるケースも多く、癌という原疾患の重篤性を考慮すると、治療の成否に影響をおよぼす可能性も考えられる。このため、手足症候群の発症メカニズム解明と手足症候群を発現しないチロシンキナーゼ阻害薬の新規創薬は、癌治療における喫緊の課題の 1 つである。

チロシンキナーゼ阻害薬の使用に伴う手足症候群は、カペシタビンなどのフッ化ピリミジン系抗がん剤で観察される、びまん性に発現する症状とは異なっており、特に圧力がかかりやすい皮膚部位に限局して生じる紅斑で始まることが多い。また、角化が進行しやすく、強い疼痛を伴うケースが多いことが報告されている。また、カペシタビン投与に伴う症状は、2 サイクル目 (投与後 8 週付近) をピークに発現するのに対し、チロシンキナーゼ阻害薬に伴う症状の発現は投与開始後 3 週程度と比較的に早期に発現が見られるなど、発症メカニズムが異なる可能性が示唆される。申請者は近年、チロシンキナーゼ阻害薬の副作用発現メカニズムに着目した薬理動態学的研究を進めてきた。その結果、オフターゲット・キナーゼ (創薬段階で意図されていなかった標的キナーゼ) に対する阻害作用と、臨床用量における血漿中非結合型薬物濃度プロファイルを考慮することで、初めて説明可能になるチロシンキナーゼ阻害薬副作用事例の存在を示すことに成功している (Yamamoto, N *et al. Mol Pharmacol* 80(3):466-75, 2011)。これらの認識に立脚し、チロシンキナーゼ阻害薬のオフターゲットが手足症候群発症にも関与している可能性を想定し、研究計画が立案された。

## 2. 研究の目的

本申請研究では、発症機序が全く不明な重症薬物副作用である手足症候群にフォーカスし、チロシンキナーゼ阻害薬によるオフターゲット阻害効果が副作用発症に関与している可能性を想定して、以下の仮説を立てた。すなわち、研究開始当初の段階で、臨床で手足症候群を発症することが知られていたチロシンキナーゼ阻害薬 (スニチニブ・ソラフ

ェニブ・リニファニブ) に共通する標的分子であり、手足症候群の発症を引き起こさない他のチロシンキナーゼ阻害薬では阻害が認められない **FMS-like tyrosine kinase 3 (FLT3)** が、手足の皮膚ケラチノサイトにおけるメカニカルストレス応答に関与しており、この分子の阻害が手足症候群発症に繋がる、という仮説である。この仮説に基づき、ケラチノサイト培養系およびマウスモデルを用いて検証することを目標とした。また創薬段階でのハイスループット FLT3 阻害活性スクリーニングに応用可能な方法論を構築する。

## 3. 研究の方法

### ① FLT3 キナーゼドメイン組み換えタンパク質の取得と活性評価

研究開始当時までに行われているマルチキナーゼ阻害薬を対象にした臨床試験の副作用情報を整理した結果、日本で既に承認されているスニチニブおよびソラフェニブと、臨床試験が進行中であるリニファニブなどにおいて、高頻度の手足症候群発症が報告されている一方で、ダサチニブによる手足症候群の発症は報告されていない。この点に着目し、各薬物の臨床用量における血漿中非結合型薬物濃度プロファイルと、300 種類以上のヒト・キナーゼに対する結合定数の報告値 (Karaman, MW *et al. Nat Biotechnol* 2008) を基にキナーゼ阻害率を網羅的に算出し、比較解析を行った。その結果、手足症候群の発症を引き起こす 3 種類の薬物に関して、その臨床用量において共通して阻害が生じると考えられたのは、colony stimulating factor 1 receptor (CSF1R), platelet-derived growth factor receptor, beta polypeptide (PDGFRB), v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog (KIT) および FLT3 の 4 分子であった。これらの候補分子のうち、臨床用量の dasatinib による阻害を受けないのは FLT3 のみであった。この結果に基づき、FLT3 の阻害が手足症候群発症に関与している可能性を想定し、オフターゲット阻害情報が存在しない新規薬物に関しても FLT3 阻害作用を評価できるようにするため、FLT3 のキナーゼドメインの組み換えタンパク質を、哺乳類細胞発現系を用いて取得し、キナーゼ活性に対する阻害効果を評価できる実験系の構築を行った。

### ② チロシンキナーゼ阻害薬によるケラチノサイト細胞毒性の検討

研究開始後も新規のチロシンキナーゼ阻害薬の臨床開発が進み、新たに手足症候群を発症する薬物として、アキシチニブおよびセディラニブが報告された。そこでこれらの薬物に関しても上述と同様に、臨床濃度におけ

るオフターゲット阻害特性を推定したところ、これらの薬物に関しては臨床用量ではFLT3をほとんど阻害しないことが明らかとなった。この結果、チロシンキナーゼ阻害薬による手足症候群の発症過程は、少なくともFLT3の寄与のみでは説明できないことが明らかとなった。そこで、これらの新規チロシンキナーゼ阻害薬も含めて、ケラチノサイトに対する直接的な細胞障害性を有しているか否かを、ケラチノサイト様細胞株であるHaCaT細胞を用いて評価することとした。

### ③ チロシンキナーゼ阻害薬が、ケラチノサイトのメカノストレス応答性に与える影響の評価

チロシンキナーゼ阻害薬による手足症候群は、圧力のかかる部位に好発することが知られている。そのため、表皮ケラチノサイトがメカノストレスに応答する過程に、チロシンキナーゼ阻害薬による影響が発生する可能性も考えられた。そこでFlexcell Tensionシステムを用いてHaCaT細胞の培養系に対して機械的進展刺激を与える系の構築を行った。柔軟な培養底面にHaCaT細胞を播種し、培養底面の進展と緩和を繰り返すことでメカノストレスを与え、その後RNAを抽出して遺伝子発現に与える影響を評価した。またこの際、培養メディアウム中に各種のチロシンキナーゼ阻害薬を添加し、メカノストレス応答に与える影響を評価した。

### ④ 手足症候群を惹起するチロシンキナーゼ阻害薬に関する、標的阻害プロファイルの解析

上述した様に、新規に臨床開発が進んだチロシンキナーゼ阻害薬に関して手足症候群発症頻度の情報が得られた結果、手足症候群の発症はFLT3に対する阻害効果だけでは説明できないことが明らかとなった。そこで、複数のキナーゼ分子に対する阻害効果が、複合的に手足症候群の発症に関与する可能性を想定し、手足症候群を引き起こすチロシンキナーゼ阻害薬で共通して阻害される標的分子の探索を行った。臨床用量における血中非結合型薬物濃度と、キナーゼに対するIC50値あるいはKd値の情報に基づき、臨床用量における阻害率を算出し、手足症候群の発症を誘導する薬物と発症が報告されていない薬物の間で、標的阻害プロファイルの比較を行うことで関連するキナーゼ分子の抽出を試みた。

### ⑤ イミキモドによる皮膚炎誘導マウスモデルを用いた評価

チロシンキナーゼ阻害薬による手足症候群を発症した手足の皮膚の特徴として、表皮層の肥厚が挙げられる。有棘層の厚みが顕著

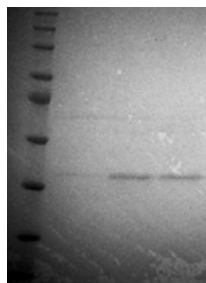
に増加し、逆に顆粒層が消失する。また、角質層で通常生じている脱核が不十分であり、角質層の新陳代謝にも影響が生じているため、ケラチノサイトの分化異常が生じていると考えられた。このような皮膚症状の特徴が良く類似している疾患として、乾癬が挙げられる。乾癬の発症過程においては、皮膚組織に局在する炎症性樹状細胞からIL-23の分泌が行われ、IL-23によって刺激を受けて活性化したTh17細胞よりIL-22の分泌が行われる。高レベルのIL-22に暴露されたケラチノサイトではSTAT3経路の過剰活性化が生じ、これがケラチノサイトの異常増殖と分化異常に繋がる、という一連の分子メカニズムが関与することが報告されている。チロシンキナーゼ阻害薬による手足症候群との症状の類似性を考慮すると、手足症候群の発症過程においても類似の炎症機構が関与している可能性があると考えられた。

また④の解析から、手足症候群の発症を引き起こすチロシンキナーゼ阻害薬に共通する性質としてVEGFRの阻害が考えられた。VEGFは皮膚組織においては主として繊維芽細胞より分泌されており、炎症性樹状細胞の活性を負に制御しているとする報告がある。これらの背景を基に考えると、チロシンキナーゼ阻害薬による手足症候群の発症には、VEGFRの阻害作用によって炎症性樹状細胞の活性化が長く維持されることによって、IL-23の過剰放出が生じて乾癬様の皮膚病変が生じている可能性も想定される。

そこで、炎症性樹状細胞を活性化させる薬物であるイミキモドを、マウス耳介に塗布することで、耳介に乾癬様の炎症を惹起するマウスモデルを用い、各種チロシンキナーゼ阻害薬を混餌投与することで生じる影響を評価した。

## 4. 研究成果

### ① FLT3 キナーゼドメイン組み換えタンパク質の取得と活性評価

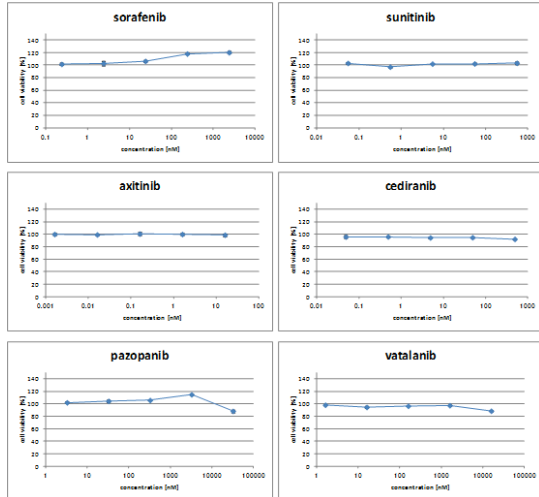


精製した FLT3  
キナーゼドメイン

pcDNA3.3 ベクターを用い、FLT3のキナーゼドメインの組み換えタンパク質の発現ベクターを構築した。得られたベクターをHeLa細胞に導入し、その後細胞を可溶化して高発現したFLT3キナーゼドメインを回収・精製を行った。得られた組み換えタンパク質を用い、キナーゼ活性をATPの消費を指標として高精度に検出するアッセイ系の構築に成功した。

### ② チロシンキナーゼ阻害薬によるケラチノサイト細胞毒性の検討

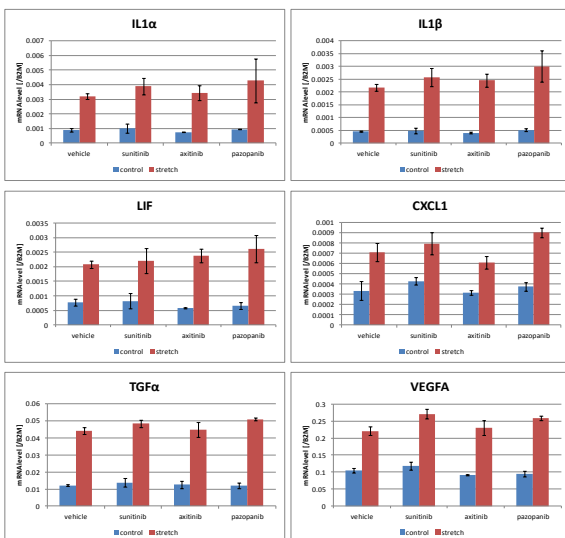
チロシンキナーゼ阻害薬によって、表皮ケラチノサイトに対して細胞死が誘導される可能性を、HaCaT細胞培養系を用いて検証した。その結果、手足症候群の誘発が報告されているいずれの薬物（ソラフェニブ・スニチニブ・アキシチニブ・セディラニブ）に関しても、臨床用量付近においては、ケラチノサイトへの細胞障害性は認められなかった。



HaCaT細胞に対する細胞障害性の評価

### ③ チロシンキナーゼ阻害薬が、ケラチノサイトのメカノストレス応答性に与える影響の評価

手足症候群を引き起こすチロシンキナーゼ阻害薬は、表皮ケラチノサイトに対して直接的な細胞障害作用を及ぼさないことが明らかとなったため、次いで、ケラチノサイトのメカノストレス応答に対して、各種チロシンキナーゼ阻害薬が影響を与えるか否かを検証した。その結果、スニチニブ・アキシチニブに関しては、メカノストレス応答への影響は認められず、手足症候群を引き起こさないパゾパニブによる処理を行った場合と同様であった。



メカノストレス応答性に与える影響の評価

### ④ 手足症候群を惹起するチロシンキナーゼ阻害薬に関する、標的阻害プロファイルの解析

手足症候群の発症に関与する可能性のあるキナーゼを抽出するため、新規開発されたチロシンキナーゼ阻害剤も含めた、キナーゼ阻害プロファイルの解析を行った。その結果、手足症候群を誘発する報告のあるチロシンキナーゼ阻害薬全てに共通する標的キナーゼはVEGFRのみであった。また、手足症候群を誘発する報告の無いチロシンキナーゼ阻害薬の中でVEGFRを標的とする薬物としては、パゾパニブおよびバタラニブが挙げられるが、これらの薬物ではVEGFRに加えてCSF1Rが共通の標的分子となっている。一方で、スニチニブ・ソラフェニブ・リニファニブの3種類の薬物は、いずれも手足症候群の発症が報告されているが、これらの化合物もVEGFRおよびCSF1Rを阻害する。そこで、前者の薬物群と後者の薬物群の阻害プロファイルの差を検討した結果、FLT3が後者で共通した標的分子であった。

### ⑤ イミキモドによる皮膚炎誘導マウスモデルを用いた評価

④の解析から、VEGFRの阻害が手足症候群の発症の基底に関与し、CSF1Rの阻害は手足症候群の発症を抑制する方向に寄与し、これに加えてFLT3の阻害があるとCSF1R阻害による抑制が無効になると考えれば説明が可能である。VEGFRは炎症性樹状細胞の活性化の抑制に寄与することが知られており、FLT3は抑制性樹状細胞の維持に寄与することが知られている。CSF1Rは単球系の細胞の分化に関与していると考えられるため、CSF1Rの阻害は炎症性樹状細胞の数を負に制御すると考えられる。これらの背景を基に考えると、手足症候群は乾癬と類似の発症機構を経由する可能性が想定できる。

実際、スニチニブを混餌投与したマウスの耳介に対してイミキモドを塗布して、乾癬様の炎症を惹起したモデルでは、耳介の腫脹はイミキモド単独群に比較して有意に延長した。今後、この動物モデルが他のチロシンキナーゼ阻害薬による手足症候群発症を良く反映するモデルになり得るかの検証を進め、手足症候群発症の分子機構を明らかにしたいと考えている。

### 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 0件)

〔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 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

## 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

該当なし

### (3)連携研究者

本間 雅 (HONMA, Masashi)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60401072