

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670265

研究課題名(和文)抗RANKL抗体医薬品デノスマブによる重篤副作用発症機構解析

研究課題名(英文) Mechanistic analysis for anti-RANKL antibody drug associated severe adverse reactions

研究代表者

苅谷 嘉顕 (Kariya, Yoshiaki)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20633168

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：癌の骨転移に伴う疼痛緩和や骨粗鬆症に対し、抗RANKL抗体医薬品デノスマブが近年用いられているが、この薬剤による重篤な低カルシウム血症の惹起の可能性も懸念されている。このような副作用は、開発時に意図していない機構で発症することが多く、その機構解析は難渋する傾向にある。副作用発症機構が解析可能となれば、副作用回避方策の提案に繋がり、安全や薬物治療に貢献することが期待されるため、本研究では、まず副作用メカニズムをシステム薬理学的視点で解析する方法論を構築し、その応用としてデノスマブの副作用メカニズムの解析を試みた。

研究成果の概要(英文)：Denosumab, an anti-RANKL antibody drug, has been clinically used in recent years. However, it has been suspected that Denosumab has a potential to cause severe hypocalcemia. Since drug adverse reactions (ADR) often occur under the mechanisms which are not expected at development, there are difficulties in revealing such mechanisms in many cases. Overcoming these difficulties leads to mechanism based ADR management, resulting in safer drug therapy. Therefore, in this research, we have established a method to obtain the clues for ADR mechanisms based on systems-pharmacological techniques. With this method, we approached the mechanism behind Denosumab inducing hypocalcemia.

研究分野：システム薬理学

キーワード：システム薬理学 毒性予測

1. 研究開始当初の背景

ガン骨転移の疼痛緩和には、破骨細胞活性化抑制作用を有するビスフォスフォネート製剤ゾメタ(ゾレドロン酸)や、ゾメタに対し疼痛緩和優越性を示す破骨細胞活性化分子RANKLに対する阻害抗体ランマーク(デノスマブ)が臨床使用される。両薬剤とも低カルシウム血症の副作用報告があるが、頻度はランマークにおいて高く、また重篤例も同様に高頻度である。2012年9月には、死亡原因とランマーク投与により生じた低カルシウム血症との関連が否定できない例が、本邦において2例(7900例中)報告され、添付文書に警告が加えられた。死亡例では、カルシウム投与の処置が行われたにも関わらず、1日単位での血中カルシウム濃度上昇効果も観察されず、急速な濃度低下が生じていたと考えられ、主作用である破骨細胞活性化抑制の影響のみが原因ではないことが示唆された。この発症機構は一切解明されておらず、かつ、デノスマブが骨粗鬆症へと承認され、使用患者数の大幅増大が予期される。そこで、破骨細胞選択的な薬効を示すゾメタとは異なり、ランマークは、RANKLが発現する組織全般へ影響を与え得る点に着目し、種々の組織におけるRANKLに対しデノスマブが結合した結果の統合として低カルシウム血症が発症するという仮説を着想し、この仮説に基づくメカニズム解析は、副作用回避に重要であると考えられる。

これまでの解析から、当研究室では、RANKLは骨芽細胞において受容体として機能し、下流においてPI3K, Akt, mTORC1のシグナル(RANKL逆シグナル)経路を活性化すること、デノスマブがRANKL逆シグナル経路を活性化すること(Kariya et al. JBMR 2009, Kariya et al. JBMR 2011, Honma et al. ECTS/IBMS 2011)を見出している。骨芽細胞以外のRANKL発現臓器においても種々のRANKL逆シグナルが存在し、下流にて活性化すると想定される。また、血中カルシウム濃度は、骨吸収に伴う骨基質からの遊離の他、小腸における吸収や腎臓からの消失が寄与しており、カルシウム輸送担体であるEpithelial Ca^{2+} Channel (ECaC)、 Na^{+} - Ca^{2+} exchanger (NCX)、plasma membrane Ca^{2+} -ATPase (PMCA)などの関与が報告されている。

上述のように、分子生物学の進展により、各分子の機能や近接・共役する分子との機能連携などは、様々な知見が集まりつつある。一方で、これらの知見を統合して、分子機能から、生体としての生理機能変化へと理解する方法論は必ずしも十分に確立されているわけではない。そのため、薬物作用に関しては、特定の作用機序を狙って開発されることが多い主作用とは異なり、往々にして開発初段階では予期しないメカニズムにより発症する副作用に、どのような分子が関与しているかを解析することは、極めて困難である。そのため、臨床現場における副作用対策は、メカニ

ズムに基づく方策ではなく、主として休薬や減量または経験則的に確立された方法論に依存しているため、使用経験の浅い新規治療薬の重篤な副作用は、臨床的マネージメントに難渋することも少なくない。

2. 研究の目的

上記の背景に基づき、本研究においては、薬物が作用する分子と、その分子に関して解明されている機能や、周辺分子との分子連関を考慮するシステム生物学的視点に基づき、薬物副作用のシステム薬理的予測法を構築することを目的の一つと設定した。さらに、構築した方法論に基づき、抗RANKL抗体デノスマブにおいて、高頻度で観察された低カルシウム血症の発症機構を、構築した方法論に基づき解析することを目的として、本研究を遂行した。

3. 研究の方法

上記の目的に基づき、分子連関に基づき、副作用発症メカニズムを予測する方法論を、薬物分子が作用する標的分子に対する網羅的な情報が取得可能なチロシンキナーゼ阻害薬に注目し、重症皮疹が問題となっており背後のメカニズム解明がなされているエルロチニブをモデル化合物として、分子連関ベースでの副作用解析手法の構築を試みた。その後、網羅的な情報が必ずしも十分ではない抗RANKL抗体が細胞に与える分子生物学的知見を細胞実験により一部取得し、上記で確立した手法に基づき、解析した。さらに解析で認められたメカニズムを動物実験により検証することを試みた。以下に、具体的に用いた手法を記す。

3-1) 分子連関情報の収集

Information Hyperlinked over Proteins (iHOP)を用いて、NCBI PubMedに登録されているAbstract文中において、注目するタンパク質と共起するタンパク質を探索することで、機能連関が示唆されるタンパク質群リストを構築した。

3-2) 分子連関ネットワーク解析

共起検索により見出された分子を、ネットワークとして描出・解析するために、Cytoscapeを用いた。

3-3) ヒトRANKL発現マウスの構築

デノスマブは、マウスRANKLに対して結合性を示さないため、ヒトRANKLをコードするBac cloneを遺伝子挿入したトランスジェニックマウスを構築した。

3-4) マウスRANKLに作用する抗体の作成

ファージディスプレイ法を用いて、マウス RANKL に対して結合性を有する抗体フラグメントをスクリーニングし、骨芽細胞において RANKL 下流のシグナル伝達活性化能を有する複数の抗体を取得した。

4. 研究成果

4-1) エルロチニブに関する分子連関ネットワーク構築

Karaman らが 2009 年に報告したキナーゼ阻害剤とキナーゼの解離定数を網羅測定した報告に基づき、EGFR 阻害剤であるエルロチニブに相互作用する分子群を選別した結果、探索主標的分子である EGFR、および、オフターゲット分子として GAK、STK10、SLK、BLK、ABL2 などに相互作用することが示されている。また、当研究室においてこれまでに、臨床的な血中濃度域において薬効発現に関与する分子を絞り込むために、臨床血中濃度における占有率 ($Cu/(Cu+Kd)$; Cu: 臨床血中濃度、Kd: 解離定数) を算出し、かつ、エルロチニブ同様に EGFR 阻害剤であるが、重症皮疹の発症頻度が相対的に低いゲフィチニブの占有率と比較したところ、エルロチニブは STK10 および SLK に対して選択的に阻害していることを明らかにし、報告している (Yamamoto N et al. 2011 Mol Pharmacol)。この報告では、STK10 による免疫反応抑制効果の脱抑制であることを *in vitro* 実験、および、*in vivo* 実験から示している。そこで、このメカニズムを、分子連関のみの情報から予測可能な方法論が構築可能か試みることにした。

まず、既存の分子連関情報を網羅的に探索する目的で、PubMed に登録されている Abstract 中において、STK10 や SLK と同一文中に記載されているタンパク質に対して、物理的あるいは機能的連関がある可能性が高いことを想定し、STK10 および SLK との共起的に出現するタンパク質、さらにそれらのタンパク質と共起的に出現するタンパク質をリストアップした。その結果、100 以上の分子について、それらの相互連関が構築された (図 1)。

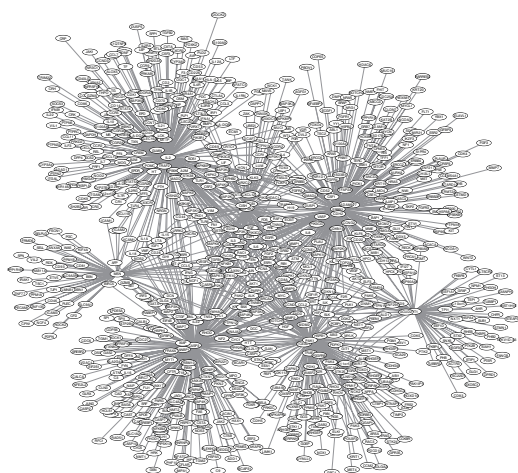


図 1: STK10、SLK に関する分子連関ネットワーク

4-2) ネットワーク解析に基づく副作用メカニズム推定法の構築

ネットワークの各経路 (分子間のつながり) の重要性を評価するために、ネットワークの Betweenness centrality を評価することとした。Betweenness centrality は、各分子がネットワーク全体の制御における重要性を反映すると考えられる。この Betweenness centrality の値に基づき、ネットワーク上の分子サイズに反映させたところ、図 2 のようになった。その結果、IL2、CASP3、ERBB2、PAK1、TPT1 などが重要なキー分子である可能性が見出された。これらの分子が共役する生理機能機能あるいは下流のシグナル伝達経路を過去の報告に基づき精査した結果、エルロチニブによる皮疹に関連しうる分子としては、免疫活性化を担う IL-2 の関与が想定された。そこで、ネットワーク上での STK10 あるいは SLK から、IL-2 までの距離を評価した結果、STK10 と IL-2 の距離がより近接していることが明らかとなった。これらのことから、この分子連関ネットワーク分析 (Betweenness centrality 評価、及び、分子間の距離評価) の結果、エルロチニブによる重症皮疹の原因は、STK10 阻害による IL-2 を介するメカニズムである可能性が示唆された。この知見は、実際に、過去に報告している *in vitro* 実験、および、*in vivo* 実験の結果と合致するものであり、分子連関ネットワーク評価が副作用予測に有用であることが示唆された。また、この方法論を一部応用し、エルロチニブ同様にチロシンキナーゼ阻害剤であるスニチニブに関する副作用発現機構解析にも成功しているほか、チロシンキナーゼ阻害薬による心毒性予測研究にも活用している。

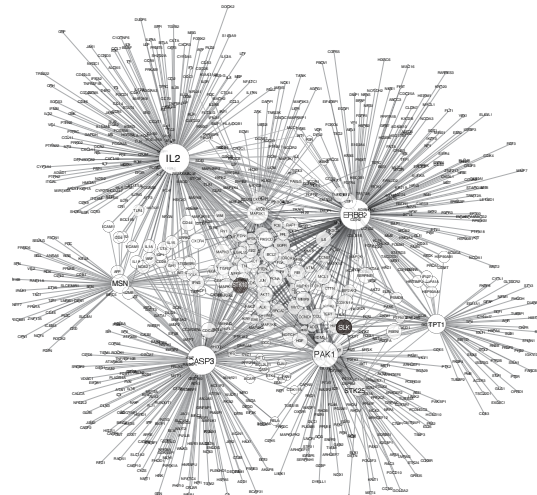


図 2: 分子連関ネットワーク特性解析

○の大きさは、Betweenness Centrality を反映している。

4-3) デノスマブにおける重篤低カルシウム血症メカニズム解析

上述の、分子連関ネットワーク構築法に基づき、抗 RANKL 抗体デノスマブがカルシウム恒常性 (あるいは、カルシウム濃度) への影響

の解析を試みた。デノスマブのターゲット分子である RANKL、当研究室にて RANKL 下流で活性化されることが明らかとしている mTOR、副作用としての表現型としてはカルシウム恒常性以上であることから腎臓におけるカルシウム排泄を担う分子群を共起検索における起点分子として探索し、ネットワーク構築を行い、Betweenness centrality に基づき、各分子のネットワーク制御における重要性を評価した。その結果、図 3 に示すように、SLC8A1、ATP2B1、TRPV5、TRPV6 などが主として、重要な寄与をする可能性が示唆され、中でも RANKL (TNFSF11) とのネットワーク上での距離が近接している TRPV5 が、RANKL 修飾薬剤使用可において何らの影響を受ける可能性が想定された。

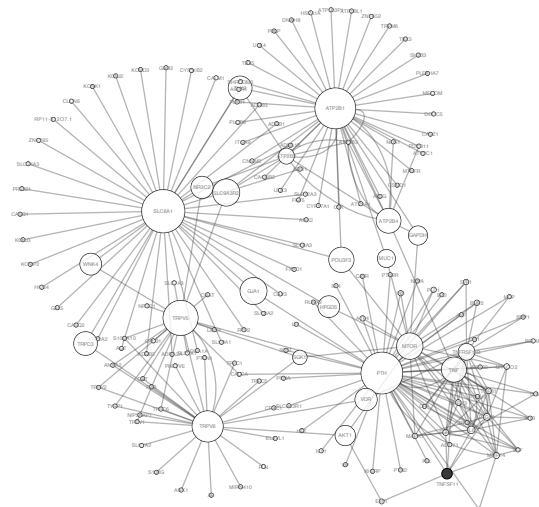


図 3: RANKL 及びカルシウム腎排泄関連分子に関する分子連関ネットワーク解析
○の大きさは、Betweenness Centrality を反映している。なお、ネットワーク全体は、更に複雑なため、上記の図は一部抜粋したものを示す。

4-4) 動物実験による検証の試み

以上の解析から得られた可能性を検証するため、デノスマブを投与した際の生態応答性を動物モデルにおいて評価することを試みた。デノスマブは、ヒト RANKL に対して高親和性を有するものの、マウス RANKL に対しては結合性を示さない。そこで、ヒト RANKL をトランスジェンしたマウスの樹立を試みた。しかしながら、構築されたトランスジェニックマウス群において、ヒト RANKL の高発現がしている個体が取得できなかった。そこで、異なるアプローチとしてマウス RANKL に結合し、デノスマブ同様の骨破壊抑制効果を有する抗体を取得し、その作用を検証することを試みることとした。ファージディスプレイ法によるスクリーニングにより、様々な抗 RANKL 抗体を取得に成功している。ヒト RANKL 発現トランスジェニックマウスの樹立が困難であったため、当初の計画から一部変更して研究を遂行しているが、代案である種々の抗マウス RANKL 抗体取得は順調に進行しており、現在、

構築した抗体をマウスに投与し、抗 RANKL 抗体が生体レベルで与える影響、および、上記解析において見出された分子群への影響の解析を順次進めている。

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 1 件)

① 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 Systems Biology and Applications* 1, Article number: 15005 (2015)、査読有

[学会発表] (計 4 件)

① 荻谷嘉頭、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、2015 年 3 月 19 日、名古屋

② Yoshiaki Kariya, Masashi Honma, Keita Tokuda, Hiroshi Suzuki、Prediction of cardiac cell apoptosis using systems pharmacological methodologies、新学術領域「多階層生体機能学」終了記念シンポジウム、2015 年 3 月 4 日～6 日、大阪

③ Yoshiaki Kariya、Prediction of TKI Associated Cardiotoxicity Based on Network Analysis of Intracellular Signaling Pathways、Workshop on Pharmacological Mechanism Based Drug Safety Prediction、2015 年 8 月 6 日、FDA, Silver Spring, MD, USA、招待講演

④ Yoshiaki Kariya、Prediction of cardiotoxicity triggered by kinase inhibition、第 89 回 日本薬理学会、2016 年 3 月 9 日～11 日、横浜

[図書] (計 1 件)

① Hiroshi Suzuki, Yoshiaki Kariya, Masashi Honma, Systems Pharmacology and Pharmacodynamics Chapter 16, Systems Pharmacology of Kinase Inhibitor-Associated Toxicities、Springer、2016 年発行確定

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

苅谷 嘉顕 (KARIYA, Yoshiaki)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：20633168

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし