

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月4日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390041

研究課題名（和文） 生理学的モデルに基づいた分子標的薬による
副作用発現プロファイルの予測研究課題名（英文） Physiological situation based prediction of
the adverse effects associated with molecularly-targeted drugs.

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

研究成果の概要（和文）： チロシンキナーゼ阻害薬(TKI)である erlotinib および sunitinib 投与時に出現する種々の副作用は、off-target キナーゼ、STK10 および PHKG1/2 に対する阻害を考慮することで説明可能であることが明らかとなった。TKI による副作用発現予測には、臨床血中濃度における off-target キナーゼの阻害率を考慮することが極めて重要であると考えられた。

研究成果の概要（英文）： Various adverse effects associated with tyrosine kinase inhibitors, erlotinib or sunitinib, has been elucidated to link to the inhibition of off-target kinases, STK10 or PHKG1/2. Inhibition rate of off-target kinases under clinical concentration is potentially critical to predict the development of adverse effect.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	6,000,000	1,800,000	7,800,000
2010年度	5,200,000	1,560,000	6,760,000
2011年度	3,000,000	900,000	3,900,000
年度			
年度			
総計	14,200,000	4,260,000	18,460,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：癌、薬剤反応性、キナーゼ、分子標的薬、オフ・ターゲット、薬理学、薬物動態

1. 研究開始当初の背景

2001年抗 Her2 モノクローナル抗体 trastuzumab が、転移性乳がんの治療薬として発売されたのを皮切りに、新しい分子標的薬が続々と上市され、がん薬物療法は長足の進歩を遂げている。特に近年、種々のチロシンキナーゼ阻害作用を有する小分子化合物(TKI)が数多く開発され、従来の治療成績を大きく凌駕する成果があげられており、現在も多数の TKI に関して臨床開発が進行中である。一方で、TKI は分子標的治療薬に分類されているため、抗体医薬と同様に標的分子への特異性が極めて高いと誤解されてきた一面があるが、実際には開

発段階で想定された標的(primary target)以外のキナーゼ分子に対しても阻害プロファイルを有する(off-target effect)ことが明らかとなってきており、これが薬効の延長線上で捉えられない副作用発現プロファイルの違いにつながる可能性が指摘されている(Karaman et al. Nat Biotechnol 26;127-32, 2008)。しかしながら、キナーゼの阻害プロファイルから、臨床使用した際の作用・副作用の発現プロファイルを予測するには至っていなかった。

2. 研究の目的

申請者らは、上記背景に基づき、TKI による副作用発現率とキナーゼ阻害プロファイルに関する定量的な関係の解明が重要であると考え、TKI による副作用発現プロファイルと、TKI の体内動態 (Physiologically based-Pharmacokinetics/Toxicokinetics; PB・PK/TK) および薬力学 (Pharmacodynamics/Toxicodynamics; PD/TD)との関係について、文献データをもとに余解析を行った。1つの例として、臨床用量での血漿中非結合型薬物濃度に基づき、非小細胞肺癌治療を対象とした EGFR 阻害剤である gefitinib と erlotinib に関して、各種キナーゼ阻害率の網羅的予測・比較を行った例を以下に示すが、primary target である EGFR の阻害率は両者とも>99%であるものの、erlotinib は gefitinib より off-target を強力に阻害することが示された。例えば、血球系細胞に発現してリンパ球分化に関与するキナーゼ群の中でも、B lymphocyte kinase (BLK)に対する阻害率は erlotinib 52%に対し gefitinib 5%、Lymphocyte cell-specific protein-tyrosine kinase (LCK)に対する阻害率では 45%に対し 10%、Lymphocyte-oriented kinase (LOK)に対する阻害率では 92%に対し 12%と、いずれも erlotinib で高い阻害率を示した。副作用報告されている白血球数異常の出現頻度は、erlotinib で 28%である一方、gefitinib では 2%と 15 倍近い違いがあり、この差異を off-target の阻害率により説明しうること、すなわち TKI の副作用発現プロファイルを PB・PK/TK-PD/TD 理論により説明できる可能性を見出した。そこで、本申請研究では、その標的および off-target となるキナーゼの TKI による阻害率に着目し、ヒトにおける副作用発現機構を解析し、その発現プロファイルを予測するシステムを確立することを目的として計画・立案された。

3. 研究の方法

① 実験動物・細胞培養

全ての動物実験は、東京大学大学院医学系研究科動物実験委員会による承認のもと、動物実験計画書に基づき行った。C57/BL6 マウス・ddY マウスは、日本 SLC より購入し、最低 7 日間馴化後、7 週齢にて実験に使用した。

Jurkat E6-1 細胞、MCF-7 細胞、293FT 細胞はそれぞれ American Type Culture Collection、理研細胞バンク、Invitrogen より購入し、定法に従って培養し、実験に用いた。リンパ節細胞は、ddY マウスより単離した。

② 発現ベクターの構築とタンパク質精製

STK10、SLK、PHKG2 の各遺伝子を、それぞれマウス臓器またはヒト由来細胞株より調製した cDNA を鋳型とした RT-PCR 法によりクローニングし、5' 末端に His タグを付与し発現ベクターにサブクローニングした。

各種発現ベクターを 293FT 細胞へ

Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen)を用いて、一過性導入し、48 時間後に細胞回収・可溶化後、His タグに対するアフィニティ・クロマトグラフィによって単離精製し、BCA 法にてタンパク質濃度を測定し、各種検討に用いた。

③ In vitro キナーゼアッセイ

精製組み換えキナーゼタンパク質および基質タンパク質 myelin basic protein (Millipore) を ATP 共存下、バッファー中にインキュベートし、残存する ATP 濃度を Kinase-Glo Plus Luminescent Kinase Assay (Promega) を用いて、推奨プロトコールに従い測定した。各薬物について種々の濃度下、測定し IC₅₀ 値を算出した。

④ 遺伝子発現抑制

BLOCK-iT RNAi Designer (Invitrogen)により、STK10、SLK、PHKG1、PHKG2 に対する siRNA を設計した。Jurkat E6-1 細胞への導入はエレクトロポレーション法によって行った。陰性対照として、ヒト・マウス・ラットの全遺伝子に対して 3 つ以上のミスマッチを有するオリゴ(Sigma-Aldrich)を用いた。また、in vivo での PHKG2 発現抑制は、アデノウイルスによるノックダウン系を用いた。すなわち、BLOCK-iT RNAi Designer により PHKG2 に対する shPHKG2 を設計した後に、Knockout Adenoviral RNAi System 1 (Clontech) に従い、RNAi-Ready pSIREN-Shuttle Vector に shRNA 配列を導入後、Adeno-X ウイルスベクターサブクローニングし、293 細胞にアデノウイルスベクターを導入し PHKG2 に対する shRNA をエンコードするアデノウイルスを構築した。

⑤ T 細胞の活性化評価

T 細胞活性化の指標として、Jurkat E6-1 細胞またはマウスリンパ節細胞を Dynabeads T-ActivatorCD3/CD28 (Veritas)にて刺激した後の、培養メEDIUM中の炎症性サイトカイン IL-2 量を Quantikine® Immunoassay kits (R&D Systems)を用い、推奨プロトコールに従い測定した。また、別の指標としてトランスウェルチャンバーの上層に Jurkat E6-1 細胞を播種、下層に SDF-1 を添加し、下層への細胞遊走を評価した。これらの系を用いて、薬剤による影響、遺伝子発現抑制による影響を評価した。

⑥ 刺激性皮膚炎モデル

Erlotinib (t = 0 h, 18 mg/kg; t = 6, 12, 18 h, 13 mg/kg)および gefitinib (t = 0 h, 25 mg/kg; t = 6, 12, 18 h, 18 mg/kg)を ddY マウスに経口とよした。初回投与 1 時間後に 5 % クロトンオイル 25 ml を耳の両面に塗布し、刺激性皮膚炎を惹起した。塗布後 24 時間にて、耳介の腫脹を測定した。また、塗布後 6 時間後にマウス耳介を摘出し、4 % PFA により固定し、パラフィン法埋切片を作成、ヘマトキシリン-エオジン染色を行い、浸潤リンパ球数を係数下。クロトンオイル塗布前に 0.5 mg/kg の抗 IL-2 モノクローナル抗体 (clone JES6-1A12; R&D sytemes)の静脈内投与を予め行うことで、IL-2 の皮膚炎発症への関与を評価した。また、FTY720 を TKI 投与の 2 日前、1 日

前、当日に経口投与し、リンパ球抑制による影響を評価した。

⑥ LC-MS/MS による化合物の定量

種々の化合物濃度測定は、LC-MS/MS 分析は ACQUITY Ultra Performance LC システムに連結した Quattro Premier XE タンデム四重極型質量分析装置(Waters)を用いて行った。ポジティブイオンモード、MRM にて測定した。血漿サンプルはアセトニトリルによる除タンパク質処理の後、乾固・再溶解し測定した。

⑦ 生体マーカー測定

sunitinib 毒性試験において Glycogen、Glucose-6P、NADPH/NADP の測定には、Biovision 社製の測定キットを用いた。NT-proBNP は、NT-proBNP ELISA kit (USCN life science)を用いて測定した。Troponin T の測定は、株式会社 SRL へ委託した。ALT は、SIEMENS 社の Dimension を用いて測定した。GSH/GSSG は、ナカライテスク社の Dithiobis-nitrobenzoic acid(DTNB)による比色法により測定した。血小板数は、三菱化学メディエンスへ委託測定した。FT4 および FT3 は、アボットジャパン社のアーキテクトを用いて測定した。TSH は、ENDCRINE TECHNOLOGIES INC の Rodent TSH ELISA kit を用いて測定した。

⑧ PCR を用いた遺伝子発現量の定量

遺伝子発現量の定量は、SYBR GreenER qPCR SuperMix Universal (Invitrogen)によるリアルタイム PCR 反応を、CHROMO4 (BioRad)にて検出し、添付のソフトウェアにて解析することで行った。各々の遺伝子発現量は、 β -actin をリファレンスに用いて規格化した。

4. 研究成果

①臨床用量において erlotinib は gefitinib に比して STK10、SLK を阻害する

共に EGFR を主阻害標的とする gefitinib、erlotinib に関し、副作用である皮疹発症率は gefitinib 投与群では 63 %に対し、Erlotinib 投与群では 97 %と異なる。この違いが off-target キナーゼ阻害率の差によるか検討するため、まず、Karaman らによるハイスループット測定法により求められたヒトキナーゼに対する K_d 値の報告に基づき、317 種類のヒトキナーゼに対する占有率を算出した。その結果、STK10、SLK のキナーゼ 2 種に対し、erlotinib が高い親和性を有することが明らかとなった。そこで、ヒト及びマウスの STK10、SLK のキナーゼ組み換えタンパク質を作成し、臨床用量における阻害率を測定した。その結果、ヒト STK10 は gefitinib により 4 %、erlotinib により 60 %阻害され、また、ヒト SLK は gefitinib による阻害が観察されない一方、erlotinib により 25 %阻害された(Fig.1)。

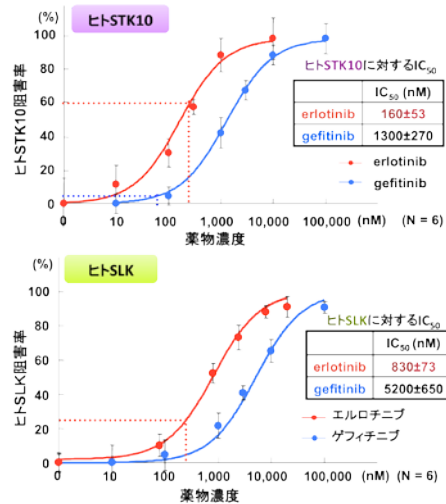


Fig.1. ヒト STK10 および SLK に対する erlotinib および gefitinib 阻害プロファイル

②erlotinib はリンパ球に作用して IL-2 分泌および細胞遊走性を亢進させる

これまでの報告により、STK10 はリンパ球の活性化に対して抑制的に働くことが示唆されていることから、erlotinib による STK10 あるいは SLK 阻害によるリンパ球の活性化亢進の可能性を検討した。そこで、IL-2 分泌能に対する erlotinib および gefitinib の影響を比較するため、Jurkat E6-1 細胞を用いて、リンパ球活性化刺激 48 時間後の培地中の IL-2 濃度を測定したところ、臨床血中濃度付近に対応する濃度域の erlotinib または gefitinib を添加した場合、erlotinib においてのみ IL-2 分泌量の増加が観察された(Fig.2)。

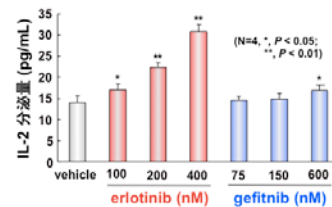


Fig.2. IL-2 分泌量に erlotinib および gefitinib が与える影響

次に、トランスウェルを用いたケモタキシス・アッセイにより、細胞遊走性に与える影響を検討した。その結果、erlotinib、gefitinib いずれにおいても、細胞遊走性が上昇し、その程度は erlotinib がより強かった(Fig.3)。

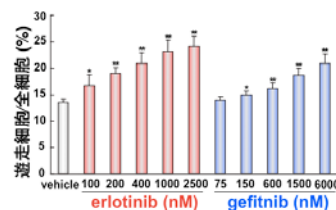


Fig.3. 細胞遊走性に erlotinib または gefitinib が与える影響

③STK10 阻害は erlotinib によるリンパ球活性化亢進の主要な要因である

次に、erlotinib によるリンパ球活性化亢進が、STK10 および SLK の阻害を介するか検証した。siRNA を用いて Jurkat E6-1 細胞に内在性に発現する STK10 または SLK を発現抑制した際の、erlotinib 処理による IL-2 分泌量増加および細胞遊走増加に与える影響を評価した。その結果、erlotinib 処理した際に観察された IL-2 分泌量、細胞遊走性の亢進は、いずれも SLK の発現抑制では同様に観察された一方、STK10 を発現抑制した際に、その亢進効果が観察されず(Fig.4)、erlotinib によるリンパ球活性化は STK10 を介することが明らかとなった。

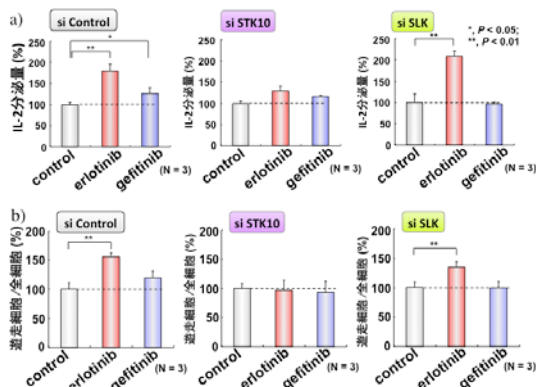


Fig.4. STK10、SLK 発現抑制が erlotinib による IL-2 分泌亢進(a)、および、細胞遊走性亢進(b)に与える影響

④erlotinib によるリンパ球反応性の活性化により皮膚炎症は増悪する

次に、IL-2 分泌および細胞遊走性の亢進が実際に、皮膚炎症を増悪するか、検討した。erlotinib をヒト臨床血中濃度における STK10 の阻害率と同様となるように投与したマウスにおいて、刺激性皮膚炎を惹起させたところ、コントロールマウスと比較し、有意な耳介腫脹の上昇が観察された。また、このとき、耳介においてリンパ球浸潤は erlotinib 投与により有意に上昇した(Fig.5a)。また、erlotinib による耳介主張増大は、抗 IL-2 抗体の前投与により改善することが確認された(Fig.5b)。

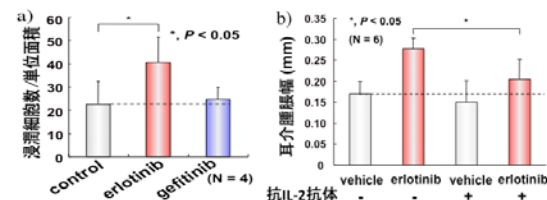


Fig.5. 刺激性皮膚炎惹起マウスにおけるリンパ球浸潤数(a)、および、耳介腫脹(b)

⑤臨床用量において sunitinib は sorafenib に比して PHKG1、PHKG2 を占有する

続いて、共にマルチキナーゼ阻害剤であり、腎細胞癌等に用いられる sunitinib、sorafenib に注

目した。sunitinib は、sunitinib と比較し、心毒性、血小板欠乏、甲状腺機能低下、肝障害の頻度が顕著に高い。そこで、erlotinib の場合と同様に off-target キナーゼによる阻害で説明可能か検討した。まず、Karaman らによるハイスループット測定法により求められたヒトキナーゼに対する K_d 値の報告に基づき、317 種類のヒトキナーゼに対する占有率を算出したところ、候補 off-target キナーゼとして PHKG1/2 が考えられた(Fig.6)。

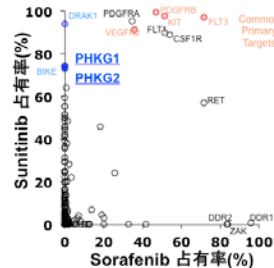


Fig.6. 臨床血中濃度における sunitinib および sorafenib のキナーゼ占有率

⑥sunitinib 投与により肝障害が発症し、グリコーゲンが蓄積する

まず、sunitinib による肝障害に関して検討を行った。sunitinib または sorafenib を 1 週間混餌投与し、肝障害マーカーである血中 ALT、ALP レベルを測定した。その結果、sunitinib 投与群において、有意に ALT、ALP レベルの上昇が観察され、肝毒性発現が確認された(Fig.7a)。PHKG1/2 は、グリコーゲンからグルコース 1 リン酸への変換反応を触媒するため、この肝毒性が PHKG1/2 阻害による場合、グリコーゲンの蓄積が想定された。そこで、肝臓中グリコーゲン量を測定したところ、sunitinib 投与により有意に上昇していた(Fig.7b)。

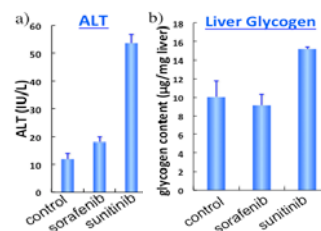


Fig.7. sunitinib、sorafenib 投与マウスにおける血中 ALT レベル(a)、肝臓中グリコーゲン量(b)

⑦sunitinib 投与により肝臓内に酸化ストレスが生じている

グリコーゲン蓄積が観察されたことから、解糖系・ペントースリン酸回路を介して、グルコース 6 リン酸量、NADPH/NADP⁺の変動が想定された。この点を検証するため、sunitinib 投与マウスの肝臓中の各物質量を測定した結果、グルコース 6 リン酸の減少、NADPH/NADP⁺の減少が確認された(Fig.8a,b)。また、NADPH/NADP⁺の変動は、グルタチオン酸化還元状態に影響を与える可能性が想定されたため、その点を検証した。その結果、sunitinib 投与により、有意に肝臓内

グルタチオンの還元型/酸化型の比(GSH/GSSG)が減少しており(Fig.8c)、肝臓内において酸化ストレスが生じていることが示唆された。

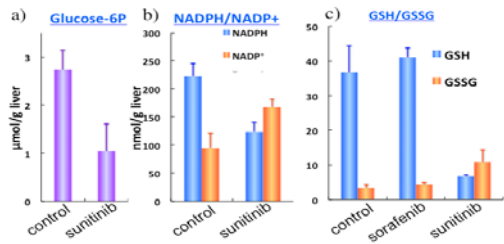


Fig.8. sunitinib 投与時の肝臓内グルコース 6 リン酸、NADPH/NADP⁺、GSH/GSSG

⑧肝臓内 PHKG2 抑制は、酸化ストレスを惹起する

次に、肝臓における PHKG1/2 抑制が酸化ストレスを惹起するかを検討した。肝臓においては、PHKG2 が発現しているため、PHKG2 を発現抑制する shRNA をコードするアデノウイルスを構築し、マウスに投与することで、in vivo ノックダウンを行った。その結果、肝臓内 PHKG2 発現抑制に伴い、グリコーゲンの蓄積、GSH/GSSG の低下が観察された(Fig.9)。

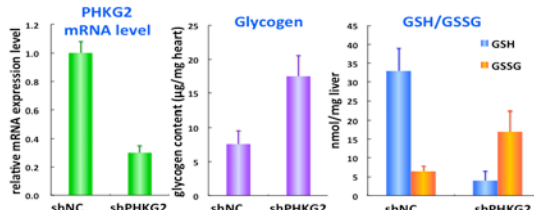


Fig.9. 肝臓における PHKG2 発現抑制下のグリコーゲン量および GSH/GSSG

⑨抗酸化剤の同時投与により、sunitinib 誘発性の肝毒性は抑制される

抗酸化剤の同時投与により、肝臓内酸化ストレスを抑制することで肝障害を抑制できるか検討するため、抗酸化剤 N アセチルシステイン(NAC)およびビタミン E (Vit.E)を sunitinib と同時投与した際の、肝障害マーカーを測定した。その結果、NAC および、Vit.E はともに、sunitinib により低下した肝臓内 GSH/GSSG を上昇させ、同時に肝障害マーカーである ALT の上昇を抑制し、ほぼ control レベルまで回復していた(Fig.10)。

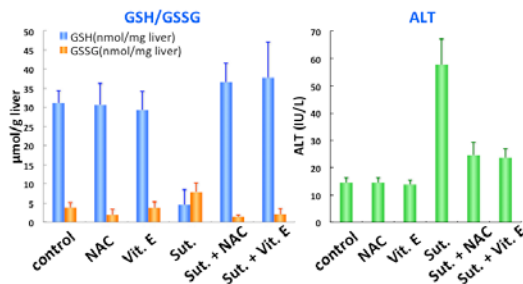


Fig.10. 抗酸化剤同時投与による肝臓への影響 (Sut.=sunitinib)

⑩sunitinib による心毒性は、酸化ストレスによって惹起される

続いて、が肝毒性同様の機構により発症するか検討した。sunitinib を 10 日間混餌投与したマウスを用いて、心臓内 GSH/GSSG および心毒性マーカーである Troponin T および NT Pro-BNP を測定した。その結果、sunitinib 投与により心臓内においても、GSH/GSSG が減少しており、心毒性マーカーの上昇が認められた。また、抗酸化剤 N アセチルシステイン(NAC)およびビタミン E (Vit.E)を sunitinib と同時投与した際には、GSH/GSSG および心筋マーカーともに control レベルまで回復した(Fig.11)。また、グリコーゲンの心臓内蓄積、グルコース 6 リン酸の低下も観察されており、肝臓同様の機構により心毒性が生じると考えられた。

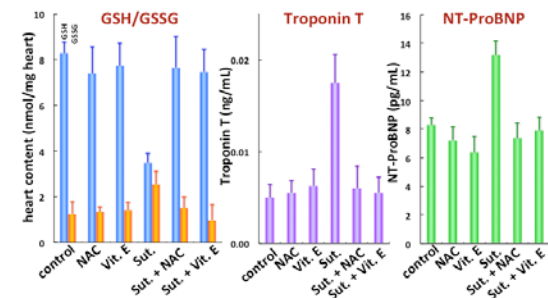


Fig.11. sunitinib による心毒性、および、抗酸化剤同時投与の効果

⑪sunitinib による血小板減少は、酸化ストレスによって惹起される

続いて、sunitinib の副作用である血小板減少が同様の機構によるか検討した。sunitinib を 14 日間混餌投与したマウスを用いて、血小板内 GSH/GSSG および血小板数を測定した。その結果、sunitinib 投与により血小板においても、GSH/GSSG が減少しており、血小板数の減少が認められた。また、抗酸化剤ビタミン E (Vit.E)を sunitinib と同時投与した際には、GSH/GSSG および血小板数ともに control レベルまで回復した(Fig.12)。また、グリコーゲンの血小板内蓄積、グルコース 6 リン酸の低下も観察された。さらに、血小板の細胞膜外層に露出するフォスファチジルセリン(PS)の増大も観察されたため、sunitinib による酸化ストレスにより PS の細胞膜外層への転移、それに伴って起こるマクロファージによる貪食亢進が血小板減少の原因と想定された。

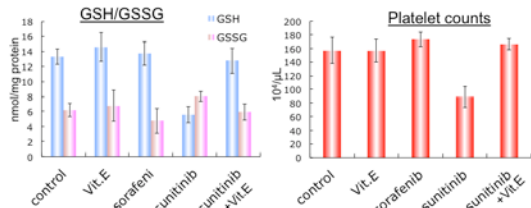


Fig.12 sunitinib による血小板減少、および、抗酸化剤同時投与の効果

⑫sunitinib による甲状腺機能低下は、酸化ストレスによって惹起される

続いて、sunitinib の副作用である甲状腺機能低下かが同様の機構によるか検討した。sunitinib を 14 日間混餌投与したマウスを用いて、甲状腺内 GSH/GSSG および血中遊離サイロキシン(FT4)、血中遊離トリヨードサイロニン(FT3)を測定した。その結果、sunitinib 投与により甲状腺においても、GSH/GSSG が減少しており、FT4 の減少が認められた。FT3 に関しては、有意な変化は観察されなかった。また、抗酸化剤ビタミン E (Vit.E) を sunitinib と同時投与した際には、GSH/GSSG および FT4 とともに control レベルまで回復した(Fig.13)。また、甲状腺におけるグルコーゲン蓄積、グルコース 6 リン酸の低下も観察された。

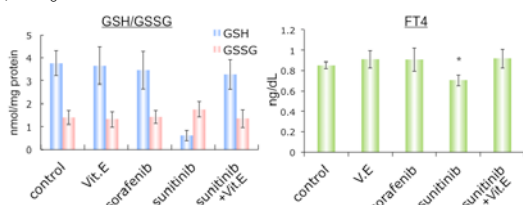


Fig.13. sunitinib による甲状腺機能への影響、および、抗酸化剤同時投与の効果

⑬結論

本研究では、皮膚障害と off-target キナーゼ阻害の関連性に着目した解析から、elrotinib が臨床用量において STK10 を阻害して、リンパ球の IL-2 分泌や遊走性などリンパ球活性化を亢進させ、生体における炎症反応の増強に関与することを見出した。また、sunitinib による種々の毒性と off-target キナーゼ阻害の関連性に着目した解析から、臨床用量において sunitinib は PHKG1/2 を阻害し、グルコーゲン分解が抑制された結果、解糖系・ペントースリン酸回路を介した酸化ストレス惹起に伴って、肝毒性、心毒性、血小板減少、甲状腺機能低下という多岐にわたる副作用が共通に生じることを見出し、抗酸化剤の投与によりこれらの副作用を回復させることが可能であることが示唆された。

これらの結果から、臨床血中濃度において off-target キナーゼの阻害率を考慮することが、副作用を予測する上で、極めて重要であると考えられた。また、主標的キナーゼへの阻害率を保ちつつ、off-target キナーゼの阻害率を低下させる投与量設計は、副作用回避において有用である可能性が想定され、今後の TKI 使用法を改善しうる臨床に大きく貢献しうる成果が得られた。

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、査読有り)

Naoko Yamamoto, Masashi Honma and

Hiroshi Suzuki, Off-target serine/threonine kinase 10 inhibition by elrotinib enhances lymphocytic activity leading to severe skin disorders. *Molecular Pharmacology*, 2011, 80, pp466-475

[学会発表] (計 4 件、すべて査読有り)

①本間雅, 山本奈央子, 雨宮貴洋, 鈴木洋史, キナーゼ阻害薬による副作用とオフ・ターゲット阻害プロファイル. 第 3 回日本ファーマコメトリクス研究会, 2010 年 9 月, 東京

②山本 奈央子, 本間 雅, 鈴木 洋史, チロシンキナーゼ阻害薬の副作用発現における、オフターゲット阻害の重要性. 日本薬学会第130年会, 2010 年 3 月, 岡山

③本間 雅, 山本 奈央子, 雨宮貴洋, 鈴木洋史, キナーゼ阻害薬による副作用発現メカニズムの解析. 第3回 次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム, 2009 年 12 月, 福岡

④山本 奈央子, 本間 雅, 鈴木 洋史, EGFR キナーゼ阻害薬による皮膚毒性発現メカニズムの解析. 日本薬物動態学会 第24回年会, 2009 年 11 月, 京都

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

樋坂 章博 (HISAKA AKIHIRO)
東京大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号: 80420206

本間 雅 (HONMA MASASHI)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 60401072

三浦 将吾 (MIURA SHOUGO)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 90529182

宮川 清 (MIYAGAWA KIYOSHI)
東京大学・医学系研究科・教授
研究者番号: 40200133