

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 5 月 27 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08448

研究課題名(和文) ドラッグリポジショニング創薬の成功率を高める医薬品探索法の開発

研究課題名(英文) Development of drug discovery method to increase the success rate of drug repositioning drug discovery

研究代表者

中嶋 幹郎 (NAKASHIMA, Mikiro)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(薬学系)・教授

研究者番号：00260737

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト肝細胞キメラマウスに医薬品を投与した後のヒト肝臓組織におけるmRNA変動の網羅的解析法(toxicity of liver examination method:T-LEX法)を、ドラッグリポジショニング(DR)のスクリーニング探索に応用することで、成功率の高いDR創薬の新しい候補医薬品探索法を新たに考案した。疾患モデル動物を用いた実験結果をまとめ、ヒトでの安全性・体内動態が十分に証明されている既承認医薬品(Drug X)の新しい薬理効果として肝臓線維化抑制効果を見出し、特許を出願した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々が開発したDR創薬の新しい候補医薬品探索法は、探索段階からヒト肝臓組織に対する作用を指標としているため臨床的予測性が高く、ヒト臨床試験での成功率の高い候補医薬品を抽出することができる点、並びに対象因子や対象疾患を事前に設定せず医薬品投与で生じる網羅的なヒト肝臓組織のmRNA変動を調べるため、一回のスクリーニングで対象医薬品の潜在的効果をもれなく調べ複数の新しい薬効を見つけることもできる点が優れており、DR創薬研究分野での学術的意義は大きい。本研究成果は、将来の重大な懸案事項である医療費/薬剤費の高騰を抑えるために効果的な情報を示しており、社会的意義も大きい。

研究成果の概要(英文)：We applied the comprehensive analysis method of mRNA variation in human liver tissues after administration of a drug to chimera mice with highly humanized liver (toxicity of liver examination method:T-LEX method) to a screening search for drug repositioning (DR). We have developed a new candidate drug discovery method for highly effective DR drug discovery. As a result of experiments using disease model animals, we found liver fibrosis-suppressing effect as a new pharmacological effect of an already-approved drug (Drug X) whose safety and pharmacokinetics in humans have been sufficiently proved, and applied for a patent.

研究分野：医療系薬学

キーワード：ドラッグリポジショニング ヒト肝細胞キメラマウス 肝臓線維化抑制効果 創薬 スクリーニング トキシコゲノミクス T-LEX 法

1. 研究開始当初の背景

医薬品の開発費用は増加の一途をたどっており、我が国では1品目あたり200~300億円にも達する開発費が新薬の薬価を跳ね上げ、その高額な薬剤費が社会問題化している。このため、ヒトでの安全性・体内動態が十分に証明されている既承認医薬品の新しい薬理効果を発見し、その薬を別の疾患治療薬として開発する「ドラッグリポジショニング(DR)」が注目されている。DR創薬の魅力は、医薬品開発の大きな障壁となる動物実験による安全性確認や治療薬のGMP製造のステップが省略され、ヒト臨床試験が第2相試験(患者での安全性と有効性の確認)から始められる点にある。その結果、医薬品開発の時間とコストが大幅に削減されるため、薬価は通常の新薬と比べて圧倒的に安価になる。

DR創薬では、DNAチップやオミクス解析で既承認医薬品の作用を*in vitro*で調べたり、*in silico*で構造活性相関を調べることで、新たな薬理効果をもつ既承認医薬品をスクリーニングする。しかし、このスクリーニングで見つかった候補医薬品がヒト臨床試験でドロップアウトする危険性は依然として高い。このため、スクリーニング段階での“臨床的予測性”の向上、すなわちヒト臨床試験での成功率の高い候補医薬品を探索できる方法を確立するという点が、今後のDR創薬の発展性・将来性を大きく左右する。しかし、従来の探索法は*in vitro*実験や*in silico*をもとにしており“臨床的予測性”が低い。

一方、肝臓は薬物の代謝・解毒を制御する重要な臓器である。したがって、ヒトへ医薬品を投与した時の薬剤性肝障害の発症リスクを予測する情報は極めて重要な安全性情報といえる。研究代表者らはT-LEX(toxicity of liver examination)法(商標登録第5617856号:2013年9月取得)を開発した。本法は、ヒト肝細胞を移植してヒト肝臓が生着したマウス“ヒト肝細胞キメラマウス”と“トキシコゲノミクス”の技術を用いることで、医薬品投与時の肝臓でのmRNA変動を網羅的にマイクロアレイ解析し、そのヒト肝障害リスクの予測を可能とした方法である。研究代表者らは、これまで情報の少なかった後発医薬品の安全性を評価する目的で、多くの市販医薬品について薬剤性肝障害リスクに関連する遺伝子の発現解析を行い、後発医薬品の肝障害リスクが先発医薬品の肝障害リスクと同等であることを明らかにしてきた(同一薬効成分の医薬品適用時におけるヒト肝毒性イベントのリスク予測法に関する研究:基盤研究(C)2011~2013年度、ヒト肝キメラマウスと大規模有害事象情報を用いた薬剤性ヒト肝障害リスク予測法の確立:基盤研究(C)2014~2016年度)。

2. 研究の目的

本研究は、ヒト肝細胞キメラマウスに医薬品を投与した後のヒト肝臓組織におけるmRNA変動の網羅的解析法であるT-LEX法を、DRのスクリーニング探索に応用することで、成功率の高いDR創薬(肝臓疾患治療薬)の新しい候補医薬品探索法を開発することが目的である。

そのため、ヒト肝細胞キメラマウスにDR創薬を指向した既承認医薬品を投与し、ヒト肝臓組織でのmRNA変動を網羅的にマイクロアレイ解析することで、医薬品投与でヒトmRNAの発現が増加あるいは減少する因子をもとに新たな薬効を推定することに取り組んだ。この方法の長所は、1)探索段階からヒト臓器を使用するため臨床試験で高い成功率が見込める候補医薬品の抽出が可能で、2)注目する因子や疾患を事前に設定せず医薬品投与でのヒトmRNAの変動をバイアスなしに調べて新しい複数の薬効を見つけることが可能な点にある。

そして、このスクリーニング法で見つかった候補医薬品の肝臓疾患治療薬としての新たな薬理効果を、疾患モデル動物を用いた実験で実証し、DR創薬の成功率を高める医薬品探索法の開発に取り組んだ。

3. 研究の方法

(1) 被験医薬品の選択

薬剤性ヒト肝障害の発症リスクが示唆されている20種類以上の既承認医薬品(後発医薬品:東和薬品)を被験製剤に選んだ。

(2) ヒト肝細胞キメラマウス

ヒト肝細胞キメラマウスは、ヒト肝細胞の置換率が70%以上と安定して高いPXBマウス(フェニックスバイオ)を用い、積水メディカルの技術協力の下、医薬品の投与からヒト肝細胞の摘出まで一貫した試験条件で実施した。

(3) ヒト肝細胞キメラマウスを用いたヒト肝遺伝子発現解析による新たな薬理効果をもつ既承認医薬品の探索

被験製剤が錠剤の場合は、粉碎後0.5%メチルセルロース懸濁液としてPXBマウスに1日1回高用量を3日間連続投与した。コントロール群には製剤を含まない0.5%メチルセルロース溶液を投与した。最終投与の24時間後にPXBマウスを断頭放血致死させ、肝臓を採取した。得られた肝臓より100mg程度の小片を採取して、氷冷したRNALater (Applied Biosystem Japan) 中で細断し、4℃で24時間保管した。ヒト肝細胞の肝 Total RNA 試料はRNeasy Kit (キアゲン) を用いて調製した。マイクロアレイの手法により、薬物の代謝・解毒に関連するヒト遺伝子(約30,000個)の発現変動をGeneChip (Human Genome U133 Plus 2.0 Array) を用いて網羅解析した。そこから、医薬品投与群とコントロール群の mRNA の発現量の比 FC (fold-change) を算出し、ヒト mRNA の発現量が増加あるいは減少する因子を検討した。

試験した多数の既承認医薬品のヒト遺伝子変動データを比較検討し、他の医薬品投与群やコントロール群に比べて肝臓内のある特定の遺伝子パスウェイへ大きな変動を及ぼす候補医薬品 (Drug X) を見出し、Drug X 投与で変動したある特定の遺伝子パスウェイが関連する薬理効果を文献調査で明らかとした。

(4) 疾患モデル動物を用いた候補医薬品 (Drug X) の新規薬理効果の検討

候補医薬品 (Drug X) 投与における新規薬理効果を疾患モデル動物を用いた各種実験で検証した。各種実験方法については研究成果に記述する。

4. 研究成果

(1) 新たな薬理効果をもつ既承認医薬品の探索

試験した既承認医薬品のヒト肝細胞における遺伝子変動データを比較検討した結果、候補医薬品 (Drug X) 投与群では肝臓内の transforming growth factor beta 1 (TGFB1) 遺伝子の発現量が検出限界以下を示し、connective tissue growth factor (CTGF) 遺伝子の発現量がコントロール群の1/7に有意に減少していた。また heat shock protein 47 (HSP47) 遺伝子、alpha smooth muscle actin (ASMA) 遺伝子、collagen, type1, alpha1 (COL1A1) 遺伝子が、それぞれコントロール群の1/2に有意に減少していた。文献調査の結果、Drug X 投与群で大幅に低下した CTGF 遺伝子は肝臓線維化の促進因子であること、TGFB1 遺伝子はその上流因子であること、Drug X 投与群で変動する遺伝子の多くは肝臓の線維化に関連する因子であることが判明した。Drug X 投与群では、肝臓内の線維化促進因子の遺伝子パスウェイを強力に抑えるデータが示されたことから、Drug X には肝臓の線維化を抑制する作用があることが示唆された。

(2) 疾患モデル動物を用いた候補医薬品 (Drug X) の新規薬理効果の検討

Drug X の新たな薬理効果として肝臓線維化抑制作用が示唆されたため、肝臓線維化のモデル動物を作製し、in vivo における肝臓線維化抑制効果を検討した。肝臓線維化モデル動物としては、ラットを麻酔下で開腹し胆道を結紮して作製した胆道結紮モデルラットと四塩化炭素を経口投与して作製した四塩化炭素誘発モデルラットを用いた。肝臓の線維化部分の確認はシリウスレッド染色により定性的に行った。また Drug X と同一薬効を有する別の既承認医薬品 (対照薬) についても、比較のため同様な検討を行った。

胆道結紮モデルラットへ Drug X 又は対照薬を投与し、ヒト肝細胞キメラマウスのデータで変動が確認された因子のうち、肝臓の線維化に働く CTGF、HSP47、ASMA、COL1A1、TGFB1 の ELISA 測定を行い、タンパク質レベルでの検討を行った。その結果、Drug X 投与時にはコントロールや対照薬投与時に比べて、COL1A1 のタンパク質発現量が 1/6 を示し、大きく低下した。また TGFB1 と ASMA の発現も抑制された。ELISA キットを用いたタンパク質量の測定でも、mRNA 量のデータと同様な結果が得られたことから、Drug X の新しい肝臓線維化治療薬としての可能性が示さ

れた。一方、四塩化炭素誘発モデルラットでも同様な検討を行い、Drug Xの肝臓線維化治療薬としての有用性が示されたが、胆道結紮モデルラットにおける結果を上回るデータを得ることはできなかった。

これらの検討結果をまとめ、ヒトでの安全性・体内動態が十分に証明されている既承認医薬品 (Drug X)の新しい薬理効果として肝臓線維化抑制効果を見出し、特許出願を行った(榎本初音、立木秀尚、中嶋幹郎、大山 要、曾木洋志、宮元敬天、稲嶺達夫、寺井崇二、上村顕也、酒井規裕：線維化誘導遺伝子の発現抑制剤およびその用途、特願 2018-205632)。

(3) 研究成果の学術的意義や社会的意義

我々が開発した DR 創薬の新しい候補医薬品探索法は、探索段階からヒト肝臓組織に対する作用を指標としているため、“臨床的予測性”が高く、ヒト臨床試験での成功率の高い候補医薬品を抽出することができる点、並びに対象因子や対象疾患を事前に設定せず医薬品投与で生じる網羅的なヒト肝臓組織の mRNA 変動を調べるため、1度のスクリーニングで対象医薬品の潜在的効果をもれなく調べ複数の新しい薬効を見つけることもできる点が優れており、DR 創薬研究分野での学術的な意義は大きい。さらに本研究成果は、将来の重大な懸案事項である医療費/薬剤費の高騰を抑えるために効果的であるため、社会的な意義も大きいと考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 中嶋幹郎、大山 要	4. 巻 53
2. 論文標題 後発医薬品の信頼性向上の取組として開発された T-LEX 法	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 ファルマシア	6. 最初と最後の頁 787-789
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 特許権	発明者 榎本初音、立木秀尚、中嶋幹郎、大山要、寺井崇二ら	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2018-205632	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	大山 要 (OHYAMA Kaname) (50437860)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(薬学系)・准教授 (17301)	
研究協力者	島田 卓 (SHIMADA Takashi)		
研究協力者	長塚 伸一郎 (NAGATSUKA Shin-ichiro)		

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 協力者	立木 秀尚 (TACHIKI Hidehisa)		
連携 研究者	佐々木 均 (SASAKI Hitoshi) (00170689)	長崎大学・病院・教授 (17301)	