システム薬理学的アプローチによる薬物副作用 メカニズム解析および副作用予測に向けて

荻谷 嘉顕¹⁾, 本間 雅²⁾, 鈴木 洋史¹⁾

要約: 臨床現場における薬物副作用出現は、その症状に伴った臨機応変な対応が求められるのみならず、減量や休薬などにより治療効果を減弱させる場合があり、大きな問題となっている。そのため、治療効果を減弱させないマネジメント法の提案や、開発段階から副作用を回避する薬物を探索する手法構築は極めて重要な課題である。しかしながら、薬物副作用は、主作用と異なり起因分子が明確でないことが多いため、メカニズム解明やその出現予測は一般に困難である。本稿ではまず、副作用解析アプローチを、チロシンキナーゼ阻害薬 erlotinib や sunitinib に対する副作用解析を具体例として紹介している。これらの薬物副作用解析において、生体を分子レベル、細胞レベル、組織レベル、個体レベルと階層性に基づき理解し、ベースと考えられる分子レベルでの薬物親和性に関する網羅的解析により、副作用を誘導する候補分子を同定し、システム生物学的手法により細胞レベルでの応答を理解することで、副作用メカニズムを同定することが可能となった。このアプローチを、より広範な薬物副作用解析に応用するためには、複雑なシステムである細胞内分子ネットワークの“動的”挙動解析に関する技術開発が今後の課題と考えられた。また、副作用予測に関しては、副作用発現に関わる細胞レベルでの網羅的で複雑な分子連関を解析することにより予測可能と期待されるが、このアプローチにおいても複雑システムの解析が重要となることが想定される。“動的”挙動解析は、副作用解析および予測のどちらにおいても強力なツールとなると考えられるが、これまでの解析技術では、シミュレーションモデルにおけるパラメータの信頼性や解析対象モデルの複雑性による解析困難といった課題がある。これらの克服が、副作用解析および副作用予測へのブレイクスルーになると考えられる。

1. はじめに

薬物の効果発現に関して、主作用に関わる分子メカニズムが解明されている場合が多い一方で、開発時に想定されていない分子に作用し出現するケースが多い副作用に関しては、メカニズム解明は一般に容易ではない。そのため、副作用出現時のマネジメントは、対症療法的な薬物の減量や休薬となりがちである。しかし、薬物の減量や休薬による治療効果減弱も考えられるため、副作用が生じるメカニズムに基づいて、減量・休薬に依存しない対処法を見出すことや、そもそも重篤な副作用を回避した薬物開発がより重要となる。そのため、臨床現場で経験する副作用の発現メカニズム解明や、副作用発現可能性を研究開発段階において網羅的にスクリーニングする基盤技術開発が重要になると考えられる。そこで、前者に関して、分子標的薬であるチロシンキナーゼ阻害薬 (TKI) を対象とした解析例を紹介するとともに、後者の開発段階での副作用スクリーニングのための方向性を議論する。

2. TKI - キナーゼ間の親和性に基づく副作用解析

薬物の直接的な作用は薬物が到達する細胞・臓器に限られるため、薬物動態学的特性が薬理効果発現の第一歩となる。各組織・臓器へ分布した薬物は、その構成細胞内にて標的分子に作用し、細胞レベルの応答を惹起する。例えば、抗がん薬である TKI は、標的キナーゼを阻害するという分子レベルの現象が細胞レベルのアポトーシスを惹起し、組織レベルでは、がん細胞死による腫瘍組織の退縮が起こる。このように多くの薬剤の薬理効果は、分子レベルの現象が細胞レベルへの事象に反映され、さらには組織・臓器レベル、個

キーワード: チロシンキナーゼ阻害薬, 副作用, システム薬理学

東京大学 医学部附属病院¹⁾ 薬剤部, ²⁾ 薬理動態学講座 (〒113-8655 東京都文京区本郷 7-3-1)

E-mail: kyoshiaki-tky@umin.ac.jp 原稿受領日: 2015 年 11 月 16 日, 依頼原稿

Title: Mechanism analyses and mechanism-based prediction for adverse drug reactions using systems pharmacology

Author: Yoshiaki Kariya, Masashi Honma, Hiroshi Suzuki

図1 薬効発現の多階層的理解

薬物の組織への分布・血中濃度推移、各組織内細胞における薬剤の標的分子への作用、細胞内ネットワーク（シグナル伝達や代謝物連関）への影響、その結果として細胞機能変化、さらに組織・臓器レベルでの応答に繋がるという点で、薬物効果は多階層的に理解可能と考えられる。（文献7より引用）

体レベルへと多階層的に影響を及ぼすと解釈される（図1）。薬物副作用のうち、特に環境要因や遺伝的要因に起因しない中毒様副作用も、同様の階層的理解が可能と考えられるが、副作用発現をトリガーする分子の同定が困難であるため、薬物副作用のメカニズムは不明な場合が多い。実際に、作用標的が分子レベルで明確に設計されたTKIであっても、設計段階で予期しない分子へ作用した結果として副作用が発症するケースが多く存在する。例えば、breakpoint cluster region-Abelson murine leukemia viral oncogene homologue (BCR-Abl) 阻害薬である imatinib は、c-fms, 炭酸脱水素酵素 II, platelet derived growth factor receptor (PDGFR) をオフターゲット阻害することにより、破骨細胞による骨吸収や骨芽細胞による骨形成を直接変動させることも報告されている(1)。そのため、副作用発現メカニズムの探索には、薬物が作用しうる分子を網羅的にスクリーニングし、その結果に基づき副作用誘導に関与する分子を見出すことが必要と考えられる。具体的な解析例として、epidermal growth factor receptor (EGFR) 阻害薬である erlotinib による皮膚障害発症機構の解析を紹介する。

Erlotinib は、同じく EGFR 阻害薬である gefitinib と比較し、顕著に皮膚障害の重症度が高くなっており、EGFR 以外の erlotinib が選択的に作用する分子が、皮疹を増悪している可能性が想定された。そこで、まず網羅的に erlotinib および gefitinib に親和性を持つ分子を探索した。Karaman らは、317 キナーゼについて、その ATP 結合領域との薬物の解離定数を網羅的に測

定する手法を構築し、種々の TKI を対象として行った網羅的測定の結果を報告している(2)。この薬物-キナーゼ間の解離定数および臨床血中濃度を考慮することで、臨床血中濃度下におけるキナーゼ占有率を算出し、臨床条件下において erlotinib により選択的に阻害されると考えられるキナーゼを探索したところ、serine threonine kinase 10 (STK10) が見出された(3)。この分子はT細胞の活性化による interleukin 2 (IL2) 分泌およびT細胞遊走性を抑制することが報告されており(4)、STK10 を阻害した際の影響は、T細胞の過剰な活性化に伴う IL2 分泌亢進およびT細胞遊走性亢進と、生体レベルにおける血中での IL2 量増大に伴う炎症増悪が想定された。そこで、T細胞系細胞株である Jurkat-E1 細胞に erlotinib または gefitinib を暴露し、細胞レベルでの応答を検証したところ、erlotinib 処理において細胞の遊走性および IL2 分泌の亢進が認められた(3)。また、Jurkat-E1 細胞において STK10 の発現を抑制した際にも同様の傾向が観察されるとともに、STK10 発現抑制時に erlotinib 阻害による上乗せ効果が減弱したことから、erlotinib 処理による STK10 阻害に起因した IL2 分泌量増大および遊走性亢進が示唆された(3)（図2）。続いて、erlotinib または gefitinib を混餌投与し、臨床血中濃度と同程度の血中濃度を維持させたマウスの耳介に、クロトンオイルを塗布し皮膚炎症を惹起したところ、gefitinib 投与群に比べ erlotinib 投与群では有意に耳介肥厚が亢進しており、皮膚炎症増悪が認められた(3)。さらに、IL2 に対する中和抗体を事前に投与することにより耳介の肥厚が抑

図2 ErlotinibによるSTK10を介したIL2分泌増大

A: 各種濃度のerlotinibまたはgefitinibをJurkat細胞に添加し培養した際のIL2分泌量。臨床血中濃度(矢頭)において、erlotinibはIL2分泌を増大させている。B: STK10をsiRNAにて発現抑制した際のIL2分泌量に与える影響。STK10抑制により、erlotinibの効果が減弱している。(文献3より改変引用)

制されたことから、皮膚炎症増悪にIL2分泌量増大が生体レベルでも関与していることが示唆された(3)(図2)。このように、分子レベルの受容体-薬物間の親和性情報から、細胞レベル・個体レベルのerlotinibによる薬物副作用メカニズムが明らかにすると同時に、IL2中和という副作用マネージメントの可能性を見出すことに成功した。

3. システム生物学的アプローチによる副作用解析

Erlotinibによる副作用解析では、阻害された分子の機能から細胞機能に与える影響を比較的容易に推定でき、細胞レベル応答から個体レベル応答も比較的容易に推定可能であった。しかしながら、副作用を誘導する候補分子の機能と、その個体レベルでの副作用発現応答の関係性が必ずしも容易に推定可能であるとは限らない。すなわち、候補分子の機能と観察される副作用発現との間に乖離があるケースが存在する。この場合、候補分子がもたらす影響を広範囲に俯瞰的に捉え、その中から副作用への関与が想定される分子を探索するといったシステム生物学的視点を取り入れたアプローチが、有効な手段の一つになると期待される。筆者らは、vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR) 1~3, PDGFR α/β , KIT, RET, FLT3など複数キナーゼを薬理標的としたマルチキナーゼ阻害薬であり、血小板減少や肝機能障害、心拍出率低下、甲状腺機能低下など臨床上問題となる副作用が極めて多

く報告されているsunitinibに関して、薬物副作用のメカニズム解析を試みた。Sunitinibと同様のキナーゼ群を薬理標的とするが、副作用発現頻度が相対的に低いsorafenibを比較対照として、臨床血中濃度におけるキナーゼ占有率を比較したところ、sunitinibにより選択的に阻害される候補分子としてphosphorylase kinaseの触媒サブユニットであるphosphorylase kinase gamma (PHKG) 1/2が同定された(5)。PHKGは、グリコーゲンからglucose-1-phosphateへの代謝を担うphosphorylaseを活性化させる役割を担う。しかしながら、このキナーゼの機能情報のみでは、副作用表現型との連関が不明確であり、発症機構を推定することは困難である。そこで、PHKGが関与する物質代謝および周囲における分子レベルでのイベントを、大きな分子連関マップ(代謝物連関マップ)として構築することで細胞レベルでの応答を推定する基盤情報を準備し(図3)、副作用発現に寄与しうる分子を探索したところ、PHKG阻害はグリコーゲン代謝、解糖系、ペントースリン酸回路、グルタチオン代謝を介して還元型グルタチオン量を低下させる可能性が想定された。細胞内の酸化還元状態の変化は、酸化ストレス惹起による様々な細胞障害、さらには臓器障害の原因になる可能性が考えられた。一方で、広範囲に拡大したマップから見出した多数の経路により隔てられている反応が、生理的に影響を及ぼすかは不明確である。そのため、実際にwet実験による検証の前に、尤もらしい仮説であるかを評価するステップは、網羅的情報からメカニ

図3 PHKG 関連代謝物経路とその動的シミュレーション
本文参照。(文献5より改変引用)

ズム探索する際には極めて有益である。そこで、sunitinib 投与条件下においてグルタチオン酸化還元状態の変動が生じ得るか、in silico シミュレーションにて検討した。PHKG からグルタチオンに至る代謝経路の全てを包含したシミュレーションモデルは、既存のデータベースや論文報告には存在しない。一方で、マップ中的一部分のみのシミュレーションモデルは複数報告されており、これらのモデルの組み合わせにより PHKG 阻害がグルタチオン代謝に与える影響の評価を試みた。その結果、PHKG 阻害は、グリコーゲン代謝経路におけるグリコーゲンの蓄積 (図 3A)、解糖系における glucose-6-phosphate (図 3D) の減少を介して、ペントースリン酸回路への fructose-6-phosphate 供給低下、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸化還元型/酸化型比 (NADPH/NADP⁺ 比) を減少させ (図 3E)、結果としてグルタチオン代謝経路における還元型/酸化型グルタチオン比 (GSH/GSSG 比) の低下 (図 3F) を惹起することが半定量的に予測された。そこで、in vivo における検証として、ヒトにおける臨床血中濃度と同程度となるよう sunitinib を混餌投与したマウスより、心臓、肝臓、血小板、甲状腺の副作用発現部位を回収し、各代謝物量を測定した。一例と

して肝臓の測定結果を図 4 に示すが、シミュレーションで予測された通り、glucose-6-phosphate の減少(5)、NADPH/NADP⁺ 比の減少(5)、GSH/GSSG 比の減少が確認され (図 4A, B)、酸化ストレスのマーカーである過酸化脂質 thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) の血漿中濃度も上昇しており (5)、酸化ストレス暴露状態にあることが確認された。このとき肝機能マーカーである血清 ALT 値、血清 AST 値が上昇しており、肝機能障害発現が確認された (図 4C)。また、PHKG2 に対する shRNA をコードするアデノウィルスを暴露することで肝臓内の PHKG2 を発現抑制したマウスでは、肝機能マーカーの増悪が確認されるとともに、各種代謝物量は sunitinib 投与時と同様の推移であることが確認され、PHKG 阻害による酸化ストレス惹起および肝障害発症が確認された (図 4A) (5)。さらに、sunitinib 投与マウスや PHKG を発現抑制させたマウスにおける各種臓器機能の悪化は、抗酸化薬の同時投与により軽減が認められたことから (図 4B, C)、sunitinib 投与による PHKG 阻害に起因する酸化ストレス増大が生じ、肝機能障害が発症していることが示された。また、心機能障害、血小板減少、甲状腺機能低下に関しても、抗酸化薬の同時投与により回避できる

図4 マウス肝における PHKG 阻害および sunitinib 投与によるグルタチオンへの影響

A : Sunitinib 投与群における GSH/GSSG 比減少に対する sunitinib の上乗せ効果は観察されない。 B : α -tocopherol nicotinate (α -T.N.) により, GSH/GSSG 比は回復する。 C : α -T.N. 投与により, sunitinib 投与による肝障害マーカー ALT の上昇が軽減される。(文献5より改変引用)

ことも確認され, 抗酸化薬併用が副作用回避に有効である可能性が示唆された(5)。続いて, この抗酸化薬併用が, sunitinib による抗腫瘍効果に影響を与えるか検討した。Lewis lung carcinoma をマウスに移植し構築した担がんマウスに, sunitinib および抗酸化薬である α -tocopherol nicotinate の同時併用は, sunitinib 単剤投与の場合と比較しても腫瘍退縮効果に対する影響は認められなかったため(5), 抗酸化薬の同時併用が治療効果を損なわずに sunitinib による副作用を回避しうる臨床的にも応用可能なマネジメント法となる可能性が示唆された。このように, 薬物のオフターゲットまでを含めた分子レベルでの網羅的スクリーニング, 副作用発現に関わる細胞機能と直接関連する分子とのリンケージ検出, 細胞レベルでの応答予測, in silico シミュレーションによる妥当性の検討という一連のシステム生物学的アプローチが, 効率的な副作用機構解明に有効であった。

4. 副作用解析におけるシミュレーションの活用のための課題

多くの薬物副作用メカニズムを解析する場合, 上記 sunitinib 解析例と同様のストラテジが適応可能と考えられる。しかしながら, 分子間相互作用に関する過去の報告や関連経路に関するモデルが無いために, in silico 予測過程が往々に困難となることが想定される。この場合, in silico による検証を回避し, 妥当性の担保が不十分な多くの仮説に関して個々に wet 実験による検証を行うか, 独自にシミュレーションモデルを構築する必要がある。効率的な副作用解析のためには, シミュレーションモデル構築法も重要になることが想定されるため, ここでは細胞内ネットワークのモデル構築における問題点に触れる。

一般に細胞内の分子反応をモデル化する際, 個々の反応は常微分方程式により記述することが多い。例えば, 分子 A と分子 B が結合し, 複合体 A:B を形成する速度は, 速度定数 k , および反応系内分子濃度 $[A]$, $[B]$

を用いて, $d[A:B]/dt = k[A][B]$ と記述される。新規モデル構築に当たっては, 全ての速度定数および各分子の発現量(初期値)を決定する必要がある。通常, これらの値は実験的に実測するか, 実測可能な関連事象を定量的に測定し, その結果を再現するパラメータ値をフィッティングすることにより探索し決定する。しかしながら, これらの手法で決定困難なパラメータは, モデル構築者の経験的な調節により, 様々な観察事象が矛盾なく再現できるように決定されることもある。このような恣意的に調節されたパラメータの信頼性は必ずしも十分ではない。すなわち, シミュレーションにより得られた計算結果が, パラメータ調節の際に考慮された状況から大きく異なる場合に, その結果が信頼できるかどうか不明確となる。しかしながら, wet 実験等で気軽に再現できないような様々な状況を, 計算機上で再現して可能性を検討できることが, 副作用解析等においてシミュレーションモデルを活用することの大きな利点と考えられるため, 様々な状況を反映させてシミュレーションを行った際の結果の信頼性担保やモデルの適応限界が明確であることは重要である。そのため, 構築されたシミュレーションモデルの適応可能範囲が明確となるパラメータ決定法の確立が, 今後の大きな課題の一つと考えられる。近年, 吉田らは Cluster Newton 法を用いたパラメータ決定という, 従来と異なるアプローチで薬物動態モデルの構築に成功している(6)。Cluster Newton 法は, 不確定な全てのパラメータに関して, 特定の満足すべき条件を予め設定し, その条件を再現できるパラメータセットを網羅的に複数探索する方法である。取り得るすべてのパラメータ探索を目指した方法論であり, 吉田らは得られたパラメータ群の特性を解析することでモデルの特性評価および未知パラメータの推定に成功している。システム生物学的モデルパラメータ決定法として, このような技術が活用されれば, 副作用メカニズム解析のみならず, 多方面でのシミュレーション解析の信頼性向上に貢献すると考えられる。

5. 複雑系システムの挙動解析による副作用発現予測に向けた課題

本稿では、副作用発症メカニズムの解析アプローチや技術の提案・紹介をしてきた。しかしながら、研究開発段階での化合物スクリーニング過程や、ヒト臨床試験への移行前に候補化合物の副作用予測を分子レベルでのメカニズムに基づき行う方法論は発展途上であり、既存の予測法の多くは、種々の因子との相関に基づく予測法となっている(7)。分子メカニズムに基づく副作用予測への一つのアプローチとして、特定の副作用発現に関与する分子メカニズムを網羅的に包含したモデルを構築することが想定される。例えば、肝細胞障害による毒性であれば、肝細胞の細胞死に関わる網羅的な分子連関ネットワークモデルを構築し、薬物による影響を入力として与えた際の肝細胞死の程度を予測することが想定される。このアプローチでは、網羅的かつ複雑なネットワークの解析が不可避であるが、複雑系シミュレーション解析という点では上記の副作用解析と同様であり、同様の技術基盤が適応可能と考えられる。これまでに、種々のパスウェイ解析を実行可能な形式で複雑な分子連関を記述することが可能なソフトウェア Cell Designer(8)や、網羅的パスウェイデータとオミクスデータの対比解析が可能な Ingenuity Pathway Analysis ソフトウェア(9)など、基盤面での整備は着実に進展している。これらのツールを用いた既存の複雑ネットワークのシステム生物学的解析では、主にネットワークの形状から抽出される情報に基づく“静的”解析が主として行われ、一定の解析実績が報告されている(7)。しかしながら、ネットワーク構造のみの“静的”解析では、各分子の時間変化に関する“動的”情報が十分に得られず、生体応答を適切に予測できないことも想定される。これらの点の克服には、複雑系の動的挙動をシミュレーションすることは不可避であると考えられるが、網羅的で複雑なモデルは、決定すべきパラメータ数も膨大なために、動的シミュレーションは困難であることが予想される。そのため、複雑性低減のためのアプローチが必要である。望月らは、複雑な分子連関マップは、その部分ネットワークを一部の分子によって代表させることにより簡略化し得ること、および、それらの代表分子はネットワーク構造のみから決定しうることを報告している(10)。さらに、ネットワーク構造の制御様式から決まる定常状態が満足すべき条件、例えば活性型／不活性型が存在する複数の分子がある場合、定常状態において全ての分子が活性型あるいは不活性型の一方に

偏ることは、生物学的に極めて想定されにくいなどの状況を考慮することで、定常状態において取り得る活性化状態の組み合わせは、ネットワークの制御構造から限定されることも提唱している。このようなネットワークの理論解析アプローチによる網羅的な分子連関ネットワークの複雑性低減は、定性的なネットワーク挙動の理解を容易にするとともに、動的シミュレーションにおいて決定すべきパラメータ数の減少も期待できる。これらの複雑系解析理論を含め、今後種々の複雑系解析手法の構築が、ネットワークの動的挙動、さらには、分子メカニズムを考慮した薬物毒性予測に繋がることが期待される。

6. おわりに

副作用メカニズムは、主作用と異なり起因分子が明確でないことが多いため、その解明が困難となりがちであるが、生体システムの階層性を考慮した網羅的・システム生物学的アプローチにより、効率的にメカニズム解明が可能となることを具体的な解析例を通じて紹介した。また、特定の副作用を分子レベルで俯瞰的かつ網羅的に捉え、その副作用発症に関わるシステム挙動を解析することによる副作用リスク予測ストラテジを提案した。副作用メカニズム解析および副作用発症予測は、どちらもシステム生物学的な挙動解析が有効であると考えられる。現在までに構築されている理論・基盤技術や分子生物学情報量をもって、少なくとも erlotinib や sunitinib の副作用メカニズム解析が可能であることを示した。今後、さらなる理論的技術革新により、システム生物学的解析、特に複雑システムの動的特性解析(シミュレーション)に関する種々の課題が克服されれば、分子メカニズムを考慮した副作用マネジメントや副作用を回避した安全な薬物開発が可能になると考えられる。

謝辞：本研究は、科研費新学術領域研究「統合的多階層生体機能学領域の確立とその応用」(平成22年度～平成26年度)やその他の科研費の支援にて遂行した。

著者の利益相反：開示すべき利益相反はない。

文 献

- 1) Vandyke K, et al. Blood. 2010;115:766-774.
- 2) Karaman MW, et al. Nat Biotechnol. 2008;26:127-132.
- 3) Yamamoto N, et al. Mol Pharmacol. 2011;80:466-475.
- 4) Tao L, et al. Biochem J. 2002;363:175-182.
- 5) Amemiya T, et al. npj Syst Biol Appl. 2015;1:15005.
- 6) Yoshida K, et al. BMC Syst Biol. 2013;7:S3.
- 7) Kariya Y, et al. Biopharm Drug Dispos. 2013;34:489-507.
- 8) Funahashi A, et al. Proc IEEE. 2008;96:1254-1265.
- 9) <http://www.ingenuity.com>
- 10) Mochizuki A, et al. J Theor Biol. 2010;266:323-335.