

平成 16 年 5 月

Vol. 46 No. 6

月刊 薬事

The Pharmaceuticals Monthly

別 刷

じほう

医薬品開発における わが国のトキシコゲノミクスの取り組み

菅野 純

KANNO Jun

国立医薬品食品衛生研究所
安全性生物試験研究センター毒性部部长

はじめに

ヒトやマウスなどの全ゲノムが解読されたことを受け、解読されたゲノム情報をもとに、遺伝子機能の解析と、それら遺伝子の発現状況が一挙に把握できるようなマイクロアレイなどの技術の普及が加速している。こうした状況から「全遺伝子発現プロファイリング」を、われわれや実験動物の体内で起こっている分子レベルのできごとを解明する一つの手段として利用することが可能となった。

この際のプロファイリングの特徴は、形質発現を必ずしも必要としないことにある。すなわち、従来のプロファイリングは、ある所見が存在し、それを引き起こした原因と考えられる遺伝子発現を追いかける方法を採用してきた。ここでは、全遺伝子をモニターするため、明瞭な形質発現が見られないような場合でも、プロファイリングに必要な情報が収集できる。

このような、形質発現に依存しないアプローチを毒性学に当てはめると、形質非依存型トキシコゲノミクスといえることができる。将来的な予測毒性学は、この形質非依存型と従来からの形質依存型の両方によって形成される、バランスのよいインフォマティクスにその基礎を置くことになる。

現在、創薬開発促進のためのトキシコゲノミクス・プロジェクトと、化学物質の安全性評価のためのプロジェクトの2つが、発現値絶対量化システムの下で進行中である(表1)。

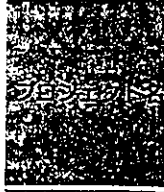


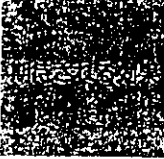



トキシコゲノミクスと安全性評価予測

毒性学では、外来性の因子により生体に引き起こされる種々の形質発現を観察、類型化することに始まり、それに対して原因物質を分類する作業がなされてきた。これらの手法は形質発現に依存しており、もしも処置や遺伝子型に関連した形質発現が認められない場合には、そのメカニズム解析や責任遺伝子の探索などが困難になることが多い。

しかし例えば、恒常性維持機構を対象とする「毒性」を考慮したとき、化合物投与などによる刺激が「毒性所見」を明確に誘発する以前の段階から、何らかの生体機構が防御反応として分子レベルで作動していることは明らかである。このような段階における生体反応をモニターするためには、シグナルそのもの、あるいはシグナルによって引き起こされる蛋白修飾、遺伝子発現調節、蛋白発現などを経時的・用量依存的に観測する必要がある。

現時点で利用可能な技術のうち、定量性、再現

表 1 絶対量化学法を用いた2つのプロジェクト

	<p>「トキシコゲノミクス手法を用いた医薬品安全性評価予測システムの構築とその基盤に関する研究」 (厚生労働科学研究費補助金、萌芽的先端医療技術推進研究事業) 平成14年度～5年計画</p>	<p>「化学物質リスク評価の基盤整備としてのトキシコゲノミクスに関する研究」 (厚生労働科学研究費補助金、化学物質リスク研究事業) 平成15年度～3年計画</p>
	<p>製薬関連企業17社参加「産学官連携」プロジェクト (プロジェクトリーダー: 長尾拓・国立衛研所長)</p>	<p>研究班体制の研究プロジェクト 国立衛研・安全性生物試験研究センター内 (主任研究者: 菅野純)</p>
	<p>創薬過程における安全性の早期予測システムの構築</p>	<p>国が行う既存化学物質の点検を、より迅速、安価かつ正確に実施する毒性予測システムの構築</p>
	<p>医薬品副作用の早期予測 臨床段階での開発中止回避 創薬の経費削減と効率化の促進 製薬企業の活性化と国民の健康増進</p>	<p>日常生活において使用される数万種の化学物質の毒性の迅速、安価かつ網羅的な予測 国民の安全、安心の向上 包括的な毒性評価の体制の整備</p>
	<p>開発中止、あるいは販売中止となった医薬品・医薬品候補物質を中心とした Drug-like な化合物(150物質/5年)</p>	<p>日常生活される数万種に及ぶ化学物質を中心とした各種の物質(約90物質/3年)</p>
	<p>ラット (医薬品の審査に使用されるSD/IGSラット)</p>	<p>マウス (遺伝子改変マウスの活用を見越しC57BL/6マウス)</p>
	<p>肝および腎。ヒトおよびラット肝細胞由来培養細胞</p>	<p>肝および化学物質固有の標的臓器</p>

性およびハイスループット性からは、DNAマイクロアレイを用いたmRNA発現変動モニタリングがこの目的に最適であると考えられる。

われわれはマイクロアレイを使用するにあたり、「細胞1個当たりのmRNA発現量」の概念を導入した発現値絶対量化システム (Percellome)を開発した。この方法を用いることで、遺伝子発現データを対照に対する比率 (例えば, log-ratio) として取り扱う必要がなくなり、個々の遺伝子の発現データを赤血球数や血糖値のように、ゼロを原点にした「値」として扱うことが可能となった。その結果、例えばマイクロアレイ上に用意された全遺伝子のデータを無駄なく活用することが可能となるなどの利点が生じ、データの精度が著しく向上するものと期待される。

この方法は、製薬関連企業17社と国立医薬品食品衛生研究所が共同研究の形でIGSラットを用い

て進行中の、創薬過程における安全性予測システム開発プロジェクト「トキシコゲノミクス手法を用いた医薬品安全性評価予測システムの構築とその基盤に関する研究」(プロジェクトリーダー: 長尾拓・国立衛研所長) の基本プロトコールに採用されている。

医薬品開発のトキシコゲノミクス

網羅的遺伝子発現プロファイリングをもとにしたインフォマティクス技術の構築により、創薬過程における安全性の予測システムを作成することが医薬品開発のトキシコゲノミクスの目的となる。

1) 創薬トキシゲノミクスのデータベース構築

具体的には、少数の小型実験動物あるいは培養細胞系における遺伝子発現の網羅的なプロファイル生成により、検体物質の安全性を従来の毒性試験よりも正確に、かつ詳細に予測するシステムの開発を目指す。これは、企業参加を得て、国立衛研を核とした「産学官連携」の形態を取る大規模プロジェクト（プロジェクトリーダー：長尾）として、この目的の達成のために、「発現解析データ生成部門」、「データベース・インフォマティクス部門」、「データ・システム精度管理部門」、「病理・毒性評価部門」、および「知的財産・総務部門」を設け、平成14年度より始動している。

創薬トキシゲノミクスのデータベース構築の第一段階では、過去の問題例と類似したプロファイルを示す化合物を識別するサービスを提供することになると思われる。途中で開発が中止されたような化学物質を参加17社がプロジェクトに提供することになっており、これらの化合物が示す遺伝子発現プロファイルには、メカニズム解析が完了していない段階においても、フィンガープリントとしてのインフォマティクスの意義があると考えられる。少なくとも、提供された中止化合物を手本としたスクリーニング手段としての役割を果たすものと期待される。

第二段階では、肝毒性や腎毒性といった特徴的毒性反応について、その典型的な毒性パターンとリンクするプロファイルが抽出されてくることが予想される。例えば、小葉中心性壊死と関連するプロファイル、脂肪肝と関連するプロファイルなどが整理されてくると考えられる。この段階で、既知の毒性を効率よく言い当てるような遺伝子群が抽出される可能性がある。これらに基づいて、ある特定の化学物質のプロファイリングから、ある特定の毒性発現パターンが予測されるようになるかもしれない。

ここまでの段階では、お手本とした化合物によく類似した化合物の分類が可能となる。この段階でデータベースの守備範囲を広く確保するためには、それ相当の種類の化合物について発現プロファイルとその毒性発現情報の両方を揃えることが必要になるが、この段階では、詳細な分子毒性的なメカニズム情報は必ずしも必須ではない。

2) 分子毒性的メカニズムのデータベース構築

これに対し、次の段階では遺伝子発現カスケード解析を含む分子毒性的メカニズムのデータベースの構築が考慮される。上記のプロジェクトに1年遅れてスタートした「化学物質リスク評価の基盤整備としてのトキシゲノミクスに関する研究」においては、この点を主眼にしているところである。

これを創薬トキシゲノミクスに当てはめると、以下のようなことが考えられる。

医薬品の開発過程との関連においては、網羅的トランスクリプトームによる薬効ゲノミクス解析と毒性ゲノミクス解析とがコインの裏表の関係になることが予想される。すなわち、ファーマコゲノミクスにおいて薬効に関わる遺伝子発現情報が網羅的に得られれば、その生命体内で同時に誘発される毒性発現事象の情報をすでに多少なりとも含んでいるはずであるからである。実験プロトコルが毒性解析に最適ではない場合もあり得るが、コインの裏表を積極的に一括して検討しようとすれば、両面に適した実験プロトコルを採用することも可能であろう。薬効と毒性の解析が共通のゲノミクスデータベースインフォマティクスの表裏の関係となったあかつきには、テーラーメイド医療の推進にも、この解析アプローチが有効となることが考えられる。

例えば、「特定のSNPsをもった人にあわせた薬効をもつ医薬品の開発」、より消極的には「毒性

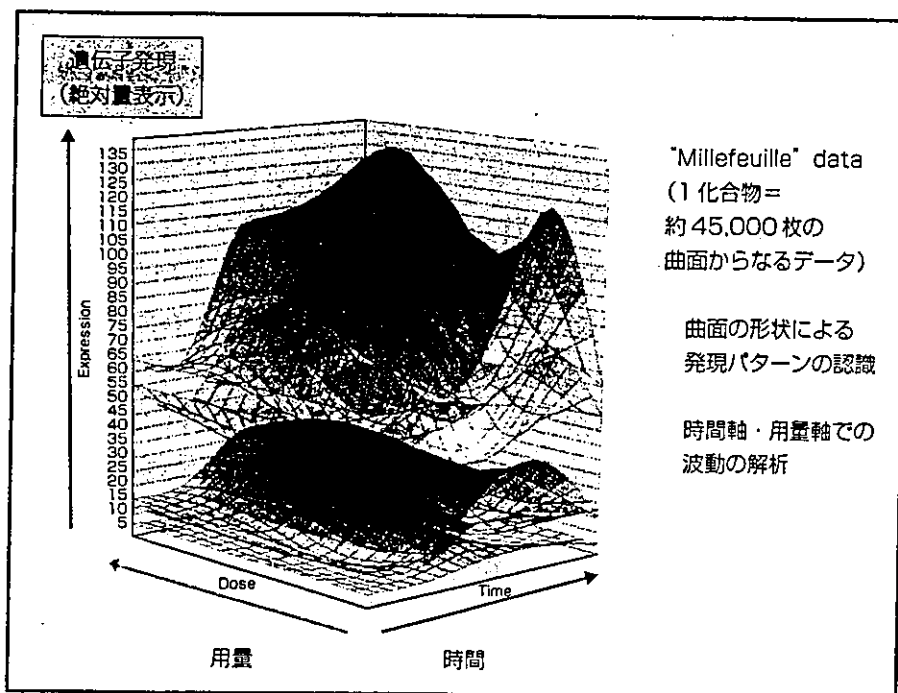


図1 PercellomeによるMillefeuille data

が強く出るタイプのSNPsをもった人への投与を差し控える,あるいは「薬の効かないSNPsをもった人にはその薬を無駄に投与しない」といったことがその命題であろう。前者に対しては,薬効に関わる遺伝子カスケードが正確に把握されることにより,開発当初の薬効標的分子だけでなく,その周辺の新たな標的部位が開拓され,創薬標的の設定自由度を増すことで多様なSNPsへの対応の可能性が指摘されている。後者に対しては,毒性発現カスケードとSNPsの関係を明らかにすることができれば,それを回避する方策,あるいは薬が効かない理由が明らかになる可能性が考えられる。

形質非依存型トキシコゲノミクスにおけるデータ解析法

創薬開発促進のためのトキシコゲノミクスプロジェクトでは,前述のように,特に開発中止となった化合物を含む薬剤関連の化学物質を中心と

してラットを用いた実験を進めており(現在まで約40化合物),すでに蓄積されている膨大なラット毒性情報との対比に重点を置いた解析を日立製作所とともに推し進めている。

一方,化学物質の安全性評価のためのトキシコゲノミクスプロジェクトにおいては,一般的な化学物質が対象であるために毒性データが必ずしも豊富でないこともあり,生体反応の分子メカニズム解析(カスケード解析)に重点を置き,さらに遺伝子欠失動物の活用を見込んで,マウスを用いた実験を重ねている。こちらでは遺伝子発現プロファイルを体系化するために形質発現情報に頼らず,完全な「教師無しクラスタリング」を実施する。Percellomeによる絶対量化データをMillefeuille dataの形に表現する方法(図1)を基礎に,生物学者が視覚的に確認できる変数を利用する方法をNTTコムウェアと共同開発し,Teradata(日本NCR)による解析・データベース上に搭載した。このクラスタリング手法は,クラスター数およびクラスター径を指定せず,通常45,000プ

ローブセット (MOE430v2) を小さいものから順に数百クラスターに分類する。

今後、この方法と適切な遺伝子欠失マウスによるデータを活用し、客観的な遺伝子カスケード構築を進め、そのうえで既知の情報との比較を行い、必要に応じて確認のための小実験を追加して実施し、最終的に信頼性の高い遺伝子カスケードデータベースの構築と、これに基づいた効率的で正確な毒性評価・予測技術の開発をめざしている。

まとめ

毒性発現と投与した化学物質の関連性の上に成り立つ毒性学に、効率化と正確性向上のために分子毒性学的なメカニズム解析の導入を図るにあたり、

遺伝子発現変動を網羅的に捕らえて毒性に関わる遺伝子発現カスケードの全容を解明する必要性が増してきていると考えられる。これに応えるために、われわれは形質非依存型トキシコゲノミクスの概念の導入と、それに必要な技術であるマイクロアレイから細胞1個当たりのmRNA絶対量情報を生成するPercellomeシステムを開発した。

分子毒性学として遺伝子発現カスケード解析が進んだ段階では、医薬品の開発過程における薬効ゲノミクス解析と毒性ゲノミクス解析とがコインの裏表の関係になることが予想される。そして、毒性予測の向上による開発中止事例の回避がもたらす経済的・時間的損失の軽減のみならず、創薬標的の自由度の増加によるテーラーメイド医療の推進などの面からも医療の向上に貢献するようになると期待される。

日刊薬業

高齢化、技術革新、国際化といった流れは医薬品産業に大きな変革をもたらそうとしています。「日刊薬業」は、その動きを簡潔・迅速にお伝えいたします。

大きな変動が予想される医療・薬価制度改革、加速する医薬品メーカー・卸業界の再編成、国際的規模での開発競争激化、新薬承認迅速化など、医薬品産業を取り巻く環境は、さらに激変の度を増しています。日刊薬業は電子メール速報版「日刊薬業メールサービス」とともに、これらの動向を迅速に提供しています。また、情報の総合的な理解を助けるため、定期的に解説の頁を加えております。医薬品産業の現在と未来を見通すためには欠くことのできない情報紙です。

- ◇行 政=厚生労働省をはじめ医療・保健・福祉関連全省庁、地方庁取材も充実。
- ◇国 会
- ◇医療施設=病院・診療所、老人保健施設、在宅。
- ◇薬局・薬店
- ◇産業・流通=医薬品産業・流通をはじめ医療関連産業・流通の全域。
- ◇団 体=医療、保険、産業の各種団体。
- ◇海外情報=欧米・アジアを中心に高い速報性

発行：月～金曜日
判形：B5判 縦組み
購読料：1年83,160円、6か月46,410円
(税込み価格/送料当社負担)

Jiho 株式会社 じほう 無料試読・購読のお申込みは<http://www.jiho.co.jp>へ。

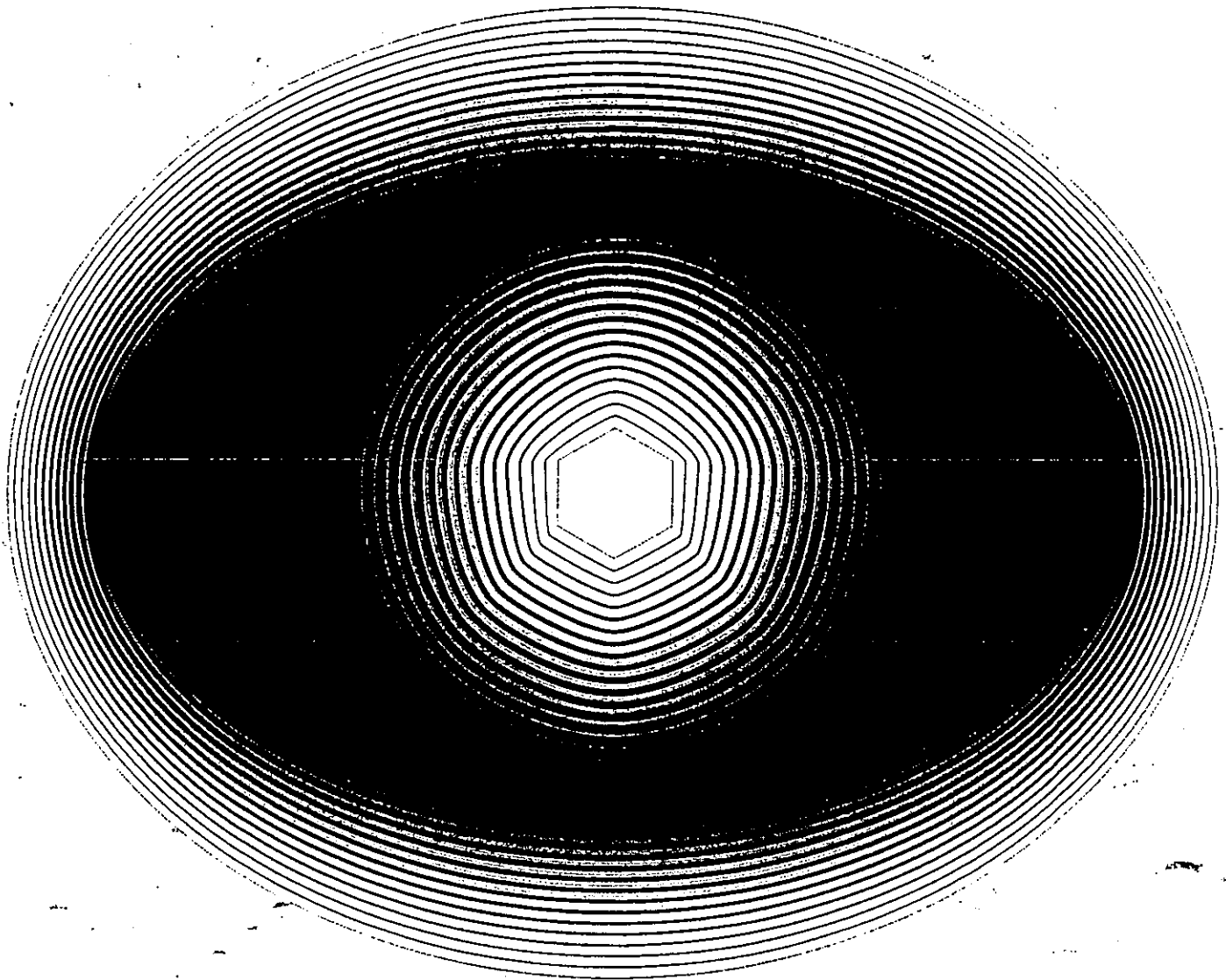
化学と教育

Copyright 2004 by the Chemical Society of Japan

Vol.52/No.5/2004

日本化学会

化学物質とリスク評価



Chemistry & Education

ヘッドライン

科学技術とリスク評価 / 中西準子
 化学物質の環境中濃度とリスクを計算する / 東野晴行
 化学物質の毒性 / 菅野 純
 身の周りの化学物質のリスクを知ろう / 浦野絃平

講座

タンパク質—その姿を見た立て役者たち (1)
 / 太木進野・甲斐荘正恒

全国高校化学グランプリ2003 (3) / 尾中 篤



化学物質の毒性

KANNO Jun

菅野 純

国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 毒性部

毒性は、化学物質と生体の種々の構成分子との相互作用の結果として発現する。酵素阻害の様な直接的な相互作用の他、生体の機能を調節しているシグナルの攪乱などの間接的な機序によっても引き起こされる。それらが、同時に複数箇所で行われるのが普通であり、その複雑な全容の解明には現在の毒性学はまだ到達していない。そこで、化学物質が引き起こす生体反応を現象として、ヒトの身代わりとしての実験動物を用いて観測し、その毒性の評価を実施している。ここでは、それに纏わる四方山話として生物側からの私見を述べる。

胃や腸などの消化管は、無数の腺管の集まりからできている(図1)。これらの一つに遺伝子異常が起きて、異常な増殖(周囲との協調を欠くようになる)を始めると、それが腫瘍の始まりである。周囲を圧排するだけで浸潤や転移を起こさない腫瘍を良性腫瘍(消化管の場合腺腫)と呼び、そうではなくて、放置すれば浸潤・転移により死を招くものを悪性腫瘍(腺癌)と呼ぶ慣わしがある。さて、ひとつの腺管から段々と病変が進行してゆく過程を想像してみると、ごく初期の段階では、たとえそれが腺癌であっても浸

潤や転移を起こす前の状態が存在すると考えられる。すなわち、粘膜層内に留まった段階の粘膜内癌という病変が定義されるのである(図2)。病変を構成する腺管が明らかに悪性の腺癌の所見を示していたとしても、粘膜内に留まっていれば、転移を起こしている確率は事実上ゼロであることが知られている。よって、その様な病変は単純に切除する(良性腫瘍を摘出するが如く、あるいは、リンパ節廓清や拡大切除をしないという意味である)ことで完治してしまう。欧米では、粘膜内癌を癌と呼ばずに、異型病巣と呼んで医療保険上も癌保険がおりない。日本でも大腸のポリープ癌などは、これに倣って癌保険はおりなくなっている(ただし、欧米でも、印鑑細胞癌だけは粘膜層内に留まっても癌と呼ぶ(図3)。この癌は、腺管を作らない単細胞から成る癌であり、粘膜層内に留まっても転移することがあるとの理由による)。さて、異型病巣は良性か? 放置すれば必ず浸潤と転移を引き起こし患者は死ぬ。故に、悪性である。顕微鏡で局所だけを見た場合、異型病巣も浸潤癌も区別がつかない。他方、良性の腺腫(ポリープ)

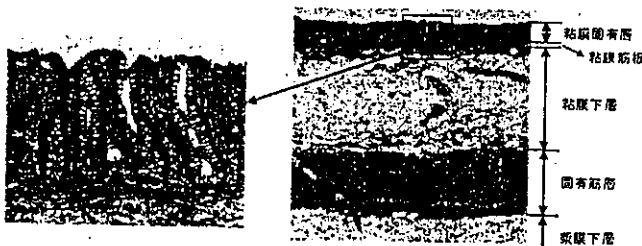


図1 ヒト大腸の構造。粘膜固有層の厚さが約2 mm、固有筋層(腸の蠕動を起こす)は約5 mmである。粘膜は拡大図で見ると枝分かれしない一本の腺管が並んだものである。



図2 粘膜層内に留まった段階の粘膜内癌。▲の部分の腺管は不規則に分岐し、それを構成する細胞の形態も異常である。
*は粘膜筋板であり、本病変は粘膜内にあることがわかる。



図3 ヒトの胃の印鑑細胞癌。中央部分に見られる淡紅色の細胞群は一つ一つがばらばらに増殖する癌細胞である。右はその拡大。*は全て癌細胞である。



図4 ヒト大腸のポリープで、良性の腺腫である。

は、直径が1センチを超え、大きくなる場合もあるが、粘膜下に浸潤することは無く、転移もしない(図4)。ただし、大きな腺腫では、その一部が癌化して、その成分が浸潤・転移を来す場合が知られている。

ひとつの腺管に異常が発生した最初の段階から悪性の場合と、最初は良性であっても病変が成長するにつれて次第に悪性化が進んでいく場合の二通りがあるようである。翻って、良性・悪性の境目はどこに設定するのがよいであろうか。癌の「真の判定」というものは存在するのであろうか。この問題は現実的には「何のために、あるいは誰のために」判定するかに依存する。例えば、患者のためには、「局所を単純切除すれば完治する病変は良性である(放置しておけば癌で死ぬ場合でも)」という基準が良いと考える立場がある。保険会社は、「良性腫瘍と同じ取り扱いで完治する病変は、何であろうと癌ではない」という判定を好むであろう(保険料が、その分安く据え置かれるのであれば利用者にとってもよい事かもしれない)。科学的には「真実を正直に記載する」のが良いとする立場がある。特に、癌の特性解明を目指す研究者の立場からは、これが必須であると考えてであろう。ここで言いたいのは、診断の基準はその目的によって変わり得るということである。

インスリンは、膵臓のランゲルハンス島(図5)で合成され、血液中に放出されるホルモンである。血液中のブドウ糖を細胞内に取り入れる機能を促進的に調節している。これが、何らかの原因で欠乏した場合、高血糖となり、糖尿が出る。体中の細胞にはブドウ糖が取り込まれないため、細胞はエネルギー不足となり、特に脳細胞は機能を停止し(糖尿病性昏睡)、さらに死に始めることがある(脳死となる)。自前でインスリンを作れなくなってしまった患者(1型糖尿病、インスリン依存型糖尿病(IDDM))には、治療薬としてインスリンの投与が必要である。投与量が足りなければ、高血糖、昏睡となる。インシュリンが多すぎれば、今度は血糖値が異常に低下して脳に必要なブドウ糖が行き渡らないために昏睡となり、量によっては死亡する。毒性学の開祖とも言われる16世紀のパラケルスス(Paracelsus)という錬金術師、医者(あるいは何でも屋?)の言葉、「すべての物質が有害である。有害でない物質は



図5 ラット膵臓のランゲルハンス島：中央の色の淡い細胞の集団がランゲルハンス島(*)である。周囲の色の濃い細胞は膵液を作る細胞(腺房)である。

なく、用量によって毒であるか薬であるかが決まる」は有名である。インスリンも量が超せば毒である。砒素は、昔から暗殺に用いられてきた。現在においては、極く少量がある種の白血病の治療に効果的であるといわれる。フグ毒の成分であるテトロドトキシンは毒矢にも使われる運動神経麻痺物質で、多量では呼吸が止まり、死に至る。「てっちり鍋」で摂取する程度の微量では「体が温まる」、すなわち抹消の血管拡張作用が前面に現れる。インシュリンの話は同じ作用が度を越せば有害である場合を示すが、後二者は低濃度では異なった内容の作用を現す場合を示している。すなわち、バラケルススの言葉は、「適量なら薬で、量が多ければ有害で、微量なら無害だ」という量の関係だけを行っているとは限らない。少なくとも、現代においては「量によって現れる作用の内容もがらりと変わり得る」と読んだほうが正しい。

薬の開発の過程では、「臨床試験」なる「人体実験」が可能である。もちろん、人に使っても薬効もたらす利益よりも副作用たる毒性が十分に小さいであろうことを、各種の動物実験によって確かめてから、厳重な管理体制の元で、且つ本人の了解を得た上で「人体実験」に入るわけである。この場合の毒性には、用量作用関係の概念が乏しい。すなわち、実際に薬として投与するときの薬用量において、どのような毒性(副作用)が現れるかが、最大の焦点なのである。この貴重な人体実験でわざわざ死に至るような大量投与を行うことは無い。また、薬効が期待できないような微量の投与も当然行わないわけである。

これに対して、いわゆる化学物質、たとえば、家庭用品、工業製品、食品添加物、などに関しては、人体実験が倫理的にも現実的にも出来ないと考えるのが通常である。ポランティアを募ることが出来れば、それは可能かもしれない。しかし、発癌性が疑われたり、蓄積性が高いもの(ダイオキシンやPCBのようなもの)などは、いくらボランティアが名乗り出てくれても投与させてもらう気にはならないものである。なお、薬でも人体実験が事実上出来ない対象がある。それは、胎児と子供である。人体実験が事実上

出来ない場合は、現在のところ、人間の身代わりとしてモデル動物を用いることになる。ラット、マウス、ウサギなどが化学物質の毒性試験に、これらに加えてイヌやサルが主に医薬品関係の毒性試験に用いられる。発生毒性、催奇形性、生殖毒性など、様々な試験があるが、一般的なげっ歯類をモデルにした毒性試験は、

1. 対照群 (検体を投与するための溶媒を投与する)
2. 低用量処置群
3. 中用量処置群
4. 高用量処置群

を設ける場合が多い。すなわち、薬の場合と異なり、幅広い用量範囲における毒性の用量作用関係を求める実験が行われる。一群の動物匹数は10、20あるいは50近くを用いることもある。また、投与方法 (投与経路) には経口、混餌、皮下、静脈内、吸入などがある。投与期間は、単回投与から、28日間反復投与、90日、1年、2年など、目的に応じて選択される。母体に投与し経胎盤的に胎児に暴露する場合もある。観察する項目は体の外表所見 (奇型の有無など)、体重、臓器重量、血清生化学、血算、病理組織検査など、多岐にわたる。

さて、毒性の判定は通常、対照群の測定値に対して処置群の値が有意に増加 (あるいは減少) したか否かによって行われる。毒性の場合は p 値が0.05未満をもって有意差有りとする事が多い。すなわち、20回に1回偶然に起こる事象よりも稀な事が起こった場合、投与が何かを引き起こしたと考えるわけである。生物統計の専門家、吉村功・東京理科大学教授のお話では、勝負事 (例えば囲碁や将棋) で1回、2回、3回、そして4回連続して負けても、「まだまだ、次は勝つぞ」と思うかもしれない。これが、2の4乗分の1、すなわち、偶然に確率16分の1の事象が起きた段階。しかし、5回連続で負けたら、さすがに自分の方が弱いと観念するのが一般的な感覚であろう。それが、2の5乗分の1、即ち32分の1。 p 値 = 0.05 = 20分の1という値は、そういう感覚のものであるとことである。毒性試験では、様々な項目について検討するわけであるが、その中で一番低用量で有意差が認められた用量を最小作用量 (LOEL) あるいは最小毒性量 (LOAEL) とすると、その下の用量が無作用量 (NOEL)、あるいは無毒性量 (NOAEL) の候補となるわけである。通常、この値を、種差や個体差の不確実性を勘案する「不確実係数あるいは安全係数 (uncertainty factor あるいは safety factor)」 (通常100) で除して規制に用いる基準値を設定することが多い。

ここで、ちょっと話を交えて頂く。ある人が、熱っぽく、だるく、頭が痛いので病院に行ったとする、すると外来で…

医者 「どうなさいました？」

患者 「熱っぽく、だるく、頭が痛いので、風邪かなと思

いまして」

医者 「では、正常な人を10人と、そう、それから、あなたと同じ症状の人を9人連れてきて下さい」

患者 「??」疑問に思いながらも、ちょうどインフルエンザが流行っていて、外来には9人ぐらいそれらしき人が順番待ちしていたので、そこから9人と、健康そうな看護婦さん10人を病院中からかき集めてきて、

患者 「先生、揃いました」

医者 「どれどれ、では、体温は…」。「風邪疑い10名の体温は 38.2 ± 1.1 度、健康と思われる10名の体温は 36.5 ± 0.4 度。 t 検定で良いですかね、この場合、……、 $n = 10$ 、 p 値が…」

医者 「結果が出ました、統計学的に、あなたは健康ではないようですね。」

患者 「????」

実際には、こんな事は行われていない。「正常でない」ことを言い当てる事と「診断」することは全く異なっていることは明白である。では、医者は $n = 1$ の患者さんに対してどのような手順で診断しているのか。「正常」との対比ではなく、多数の「病気、病状」の知識との対比をしていくわけである。つまり、患者からの「特徴抽出」と、医者の頭の中の「データベース」との比較を行っているわけである。名医と藪医者の差は、特徴抽出能力とデータベースの差にあると考えられる。例えば、新しい病気の発見の論文は、たった数症例で書かれることが多いが、これも (新しい病気のデータベースがない筈であるにもかかわらず) 今までの病気のデータベースとの比較によって可能となる訳である。

毒性試験の話に戻る。20匹からなる実験群の血糖値を測定したところに1匹だけ飛び離れた値を示すものがあったとする。用いた動物は近交系 (臓器移植がお互いに可能なくらい遺伝子が均一な実験動物) であるし、飼育条件も何もかも差別なく施してきたにも関わらず、である。こういう場合、統計学的には、「はずれ値 (outlier)」として、その測定値をその後の計算から除外することが往々にして行われる。では、その一匹を「診断」したらどうであろうか。全く原因不明で血糖値だけがおかしいのであれば、本当に測定エラーであった可能性が高い。しかし、その動物だけ腫瘍が発生していた、あるいは炎症病変があった、ということが見つければ、これは「はずれ値」ではない可能性が高い。毒性試験の判定の際には、すなわち、2通りの見方が常に行われる。

1. 同じ処置を受けた群単位の動向として、統計判断に基づく有意差検定を行う、
 2. 処置 (投与した化合物とその量) によって個々の動物に何が起きているかを「診断」する、
- の2とおりである。1. に係る検査項目は「所定 (routine)

の項目」を基本として、2.で問題となった (ad hoc) 項目を追加することで強化される。

ある特定の化学物質が悪い影響を及ぼしているかもしれないと、報告されたとしよう。その内容は、「毒性試験をしたところ、統計学的有意差が付いた測定項目がいくつかある」というものであった。追試験を行ったところ、今度は傾向はあるものの有意差が無い。はっきりした科学的裏づけが得られない。それでも、安全を見越して、法的に規制することも考えられる。しかし、 p 値 < 0.05 で有意差検定をすることは20項目に1項目は、偶然に有意差有りという判定がなされる可能性を示している。多数の検査項目からなる長期毒性試験においては、偶然に何項目かに有意差が付く事象が起こる確率が決して低くない。もしも、このような「有意差」だけを根拠に一旦規制を開始してしまった場合、それを解除する試験結果を得る方策は、同じ類の毒性試験からは、事実上無いことになる (偶然はじめたとしたら、偶然やめるしかないわけである)。

これに対して、一群20匹の実験で、処置群の中のたったの1匹にだけ異常な病変があったとする。統計学的には有意差は無いと計算されるであろう。しかし、この1例を「診断」してみると、処置によって引き起こされた変化であることが強く示唆される場合があり得る。この場合、本当に確からしいことを診断学的に示すことが出来れば、統計学的に有意でなくても緊急性に鑑みて規制することは正しいと判断される場合があり得る。この場合、継続的に「下した診断が正しかったか否か」を検討し続けることで、「誤診」であった場合には、規制を中止することが出来る。また、第2例目以降が続々と出現すれば、「診断」は正しかったことになる。ここでの注意点は「診断学は純粋科学では無い」事である。診断基準は日々更新されるものであり、診断については「診断医」あるいは「診断者」がその責任を負うのである。

まとめ：

化学物質の毒性は、生体内に進入した化学物質が引き起

こす生命体の複雑な反応を診て、どのような有害作用が起こるかを見届けることにより判断することになる。体内では化学物質が生体による修飾を受けて、その修飾体がさらに生体反応を複雑にすることもしばしばある。生体反応は、人為的に制御不能な変動性を持っているので、例えば動物数を無限に増やしてみても、ひとつの値に収束するものでは決してない (ときとして、変動の幅を正確に教えてくれるようにはなるが)。まずは、動物において上述の二通りの見方をした上で、ヒトへの外挿が検討される。実験動物個体として、そして集団として何が起こりうるのかを考察し、それを基にヒトの個体として、亜集団として、そして集団として何が起こりうるのかを考察することが、ヒトに対する毒性を判断するには重要であると考えられる。

以上、化学の講義ではあまり遭遇されないであろう、生物学的側面からの裏話を一研究者としてご紹介した。より正確な毒性決定手順等は成書に譲る。(人体病理標本は、佐々木研究所附属杏雲堂病院のご厚意による。)

参考文献

- 1) 中村恭一, 大腸癌の構造, 医学書院, pp 92 ~ 106 (1989).
- 2) 渡辺英伸, 小腸・虫垂・大腸, 田中勉蔵 監修, 暁城寺宗知 編, 医学書院.
- 3) 中村恭一, 胃癌の構造, 医学書院.
- 4) 林 雄造, 安全と安心, 生活と環境 6月号, 13, 1999 (財) 日本環境衛生センター.
- 5) 林, 松本, 医薬品の毒性評価とその作用メカニズム, 日薬理誌, 113, 19 ~ 30 (1999).
- 6) 吉村 功 編著, 毒性・薬効データの統計解析, サイエントリスト社 (1987).

かんの・じゅん

筆者紹介 [経歴] 1985年東京医科歯科大学大学院医学研究科博士課程修了。[専門] 病理学, 分子毒性学。[趣味] テニス, スキー, ギター, 紙ヒコーキ。[連絡先] 158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1 (勤務先)。



©「現代医療」Vol. 36 No. 7 2004. 別刷

基礎

がん分子標的と創薬スクリーニング

矢守隆夫

癌研究会癌化学療法センター 分子薬理部 (部長)

株式会社 現代医療社

がん分子標的と創薬スクリーニング

矢守 隆夫

癌研究会癌化学療法センター 分子薬理部 (部長)

はじめに

この20年で達成された分子生物学の急速な進歩は、がんの発生・増殖・進展の機序解明に革新的役割を果たした。そして、ヒトゲノム構造解読の完了は、がんの分子基盤解明にいっそう拍車をかけている。このような流れの中で、新規抗がん剤開発の方向は、がん細胞に発現した特定分子機能を標的とする分子標的治療薬に向けられている。

本稿では、がん分子標的治療薬開発の現状とゲノム創薬の流れを概観し、筆者らが抗がん物質評価に用いている cancer cell informatics の創薬における位置づけについて述べてみたい。

がん分子標的

図1にがん治療の分子標的と考えられるおもなものを示す。がん遺伝子産物、増殖因子とその受容体、シグナル伝達分子、ホルモン受容体、細胞周期関連蛋白質、テロメラーゼ関連分子、アポトーシス関連分子、血管新生関連分子、抗がん剤耐性・感受性因子、転写因子、浸潤転移関連分子などがある。これらには、がん細胞に

特異的に発現するもの、正常細胞にもあるが量的にがん細胞に多く発現するもの、あるいは局所でがんの間質をなす宿主側組織で高発現するものなどが含まれる。いずれにせよ、分子標的治療薬は、がんのいわばアキレス腱となる特徴的分子を選択的に狙おうとするものである。従来の抗がん剤の多くは、DNA合成や蛋白質合成など基本的機能を障害し、ためのがん細胞のみならず正常細胞にも広範に毒性が及び、当然の帰結として強い副作用を惹起する。それに対し、分子標的治療薬はがん選択性に基づく、高い有効性と副作用の軽減を狙うものである。

分子標的治療薬の開発

分子標的治療薬の開発は、従来薬のそれとまったく逆の流れで行われる(図2)。すなわち、その開発は、「はじめに標的ありき」で始まり、細胞レベル、次に個体レベルという順で有効性を証明していくことになる。以下にまず、近年から最近にかけ実際に新薬として相次いで承認されたおもな分子標的治療薬を紹介する。

1. Trastuzumab (Herceptin®)

Trastuzumab は、HER2の細胞外ドメインに結合するヒト型モノクローナル抗体で、承認

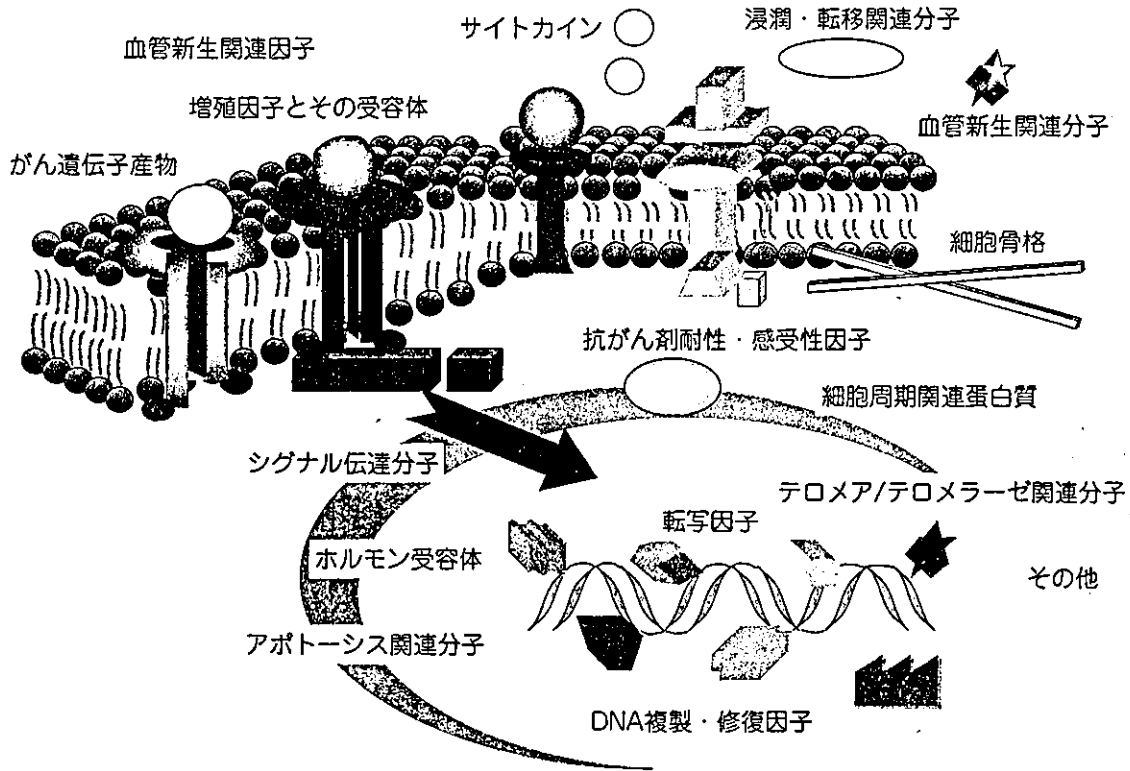


図 1. がん治療の分子標的

された分子標的治療薬の第一号である。HER2 (ErbB2)は、乳がん、卵巣がん、肺がん、胃がんなどの腺がんで過剰発現が知られ、ことに乳がんでは予後因子の一つとして重要である^{1,2)}。

Trastuzumabは、HER2 へのリガンドの結合を阻害してがん増殖を阻害する。HER2 陽性の転移性乳がんの標準的治療として、他剤との併用療法で用いられている。

2. Imatinib (Gleevec®)

Imatinib は、慢性骨髄性白血病(CML)の治療に画期的成果をもたらした。すなわち、CMLの慢性期症例の90%に、さらにこれまで手の施しようのなかった急性転化期の症例でも約30%に完全寛解をもたらし、しかも副作用がわずかであった³⁾。CMLでは、染色体相互転座により *bcr/abl* キメラ遺伝子が生じ、その産物 BCR/ABL 蛋白質の持つ強力なチロシンキナーゼ活性が悪性化の要因とされる。Imatinib

は、BCR/ABL チロシンキナーゼのATP結合部位に特異的な競合阻害薬である。さらに、imatinibは、PDGF受容体およびKITのチロシンキナーゼ活性を阻害する。KITは、消化管間質腫瘍(gastrointestinal stroma tumor: GIST)、セミノーマほか多くのがん種に発現している。最近 imatinib は、これまで外科切除以外に治療法がないとされたGISTに対し高い奏効率を示し⁴⁾、GIST に対しても承認された。

3. Gefitinib (Iressa®)

EGF受容体(EGFR)は、多くのがんでの過剰発現が知られている。Gefitinibは、EGFRのATP結合部位に競合的に結合しEGFRチロシンキナーゼ活性を阻害する。現在、肺がんの分子標的薬として非常に注目されている。ただし、副作用として間質性肺炎がみられ、その原因解明が待たれる。また、有効性に関してEGFRチロシンキナーゼの阻害だけでは説明

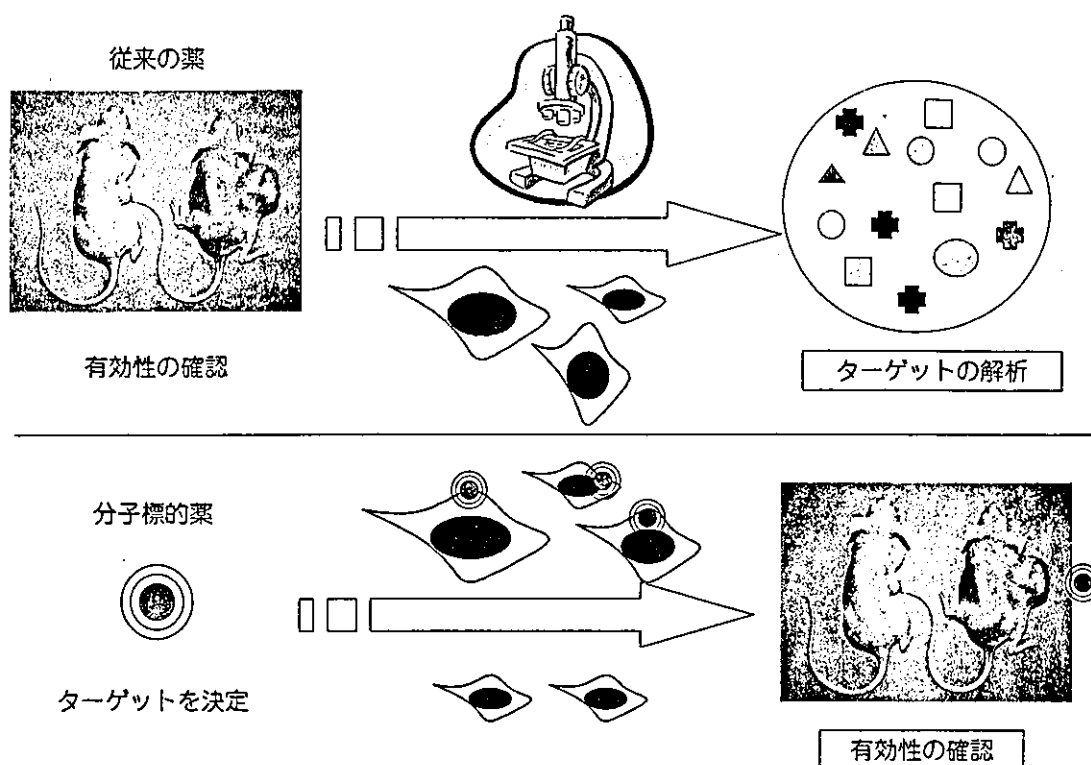


図 2. 分子標的治療薬開発と従来の抗がん剤開発の違い

分子標的治療薬の開発は、従来薬のそれとまったく逆の流れで行われる。すなわち、その開発は、「はじめに標的ありき」で始まり、細胞レベル、次に個体レベルという順で有効性を証明していく。

できない点があり、血管新生阻害作用など⁵⁾、別の局面での作用の解析も進められている。

4. Bortezomib (Velcade®)

Bortezomib は、プロテアソームの阻害薬としては初の分子標的治療薬として 2003 年 5 月に FDA によって、多発性骨髄腫に対して承認された。プロテアソームは、真核細胞内での蛋白質分解の主要な経路を司る酵素複合体である。細胞周期やアポトーシスに対しても、関連蛋白質の分解を通じてそれらの制御に関係していると考えられている⁶⁾。

5. Vivacizumab (Avastin®)

血管新生阻害薬は待望久しかったが、vivacizumab がついにその第一号とし 2004 年 2 月に FDA によって承認された。転移性大腸がんに対する 5Fu との併用治療が認められた。

Vivacizumab は、血管新生に重要な VEGF に結合しその作用を中和する抗体として期待される。

6. そのほかの開発中の分子標的治療薬

表 1 に現在臨床開発中の種々の分子標的治療薬の一部をまとめた。Erb B ファミリーのチロシンキナーゼを標的とするものが最も競合している。セリン/スレオニンキナーゼ阻害薬のうち、mTOR や CDK 阻害薬にも興味もたれる。キナーゼ阻害薬は、今のところ ATP 結合部位への競合阻害をするものしか開発されていない。今後、基質蛋白質を特異的に阻害するようなものが出れば、新しい制御につながるかも知れない⁷⁾。RAS 経路関連では、MEK, RAF キナーゼの阻害薬の有効性がどこまで達成されるか、また、HDAC では、アイソザイム特異性と

表 1. 臨床開発中および承認された分子標的治療薬

薬剤名	ターゲット	開発	臨床開発段階	備考
チロシンキナーゼ関連				
imatinib (Gleevec [®])	Bcr/Abl, c-KIT, PDGFR	Novartis	承認	
trastuzumab (Herceptin [®])	ErbB2	Genentech/Roche	承認	Antibody
gefitinib (Iressa [®])	EGFR	AstraZeneca	承認	
erlotinib (Tarceva [®] , OSI-774)	EGFR	OSI/Genebtech	Phase III	
IMC-C225	EGFR	ImClone	Phase III	
lapatinib (GW2016)	EGFR, ErbB2	GlaxoSmithKline	Phase I	
PKI 166	EGFR, ErbB2, ErbB3, ErbB4	Novartis	Phase I	
EKB-569	EGFR, ErbB2, ErbB4	Wyeth-Ayerst	Phase II	
CI-1033 (PD183805)	ErbB1-4	Pfizer	Phase II	
vivacizumab (Avastin [®])	VEGF	Genentech	承認	Antibody
SU5416	VEGFR	Sugen/ Pharmacia	Phase I	
ZD6474	VEGFR	AstraZeneca	Phase II	
PKC412	VEGFR, c-KIT, PDGFR, FLT3	Novartis	Phase II	
セリン/スレオニンキナーゼ				
sirolimus, rapamycin (Rapamune [®])	mTOR*	Wyeth-Ayerst	承認	
CCI-779	mTOR	Wyeth-Ayerst	Phase II	
UCN-01	PKC, Chk 1	協和発酵	Phase I	
LY 900003/ISIS 3521 (Affinitak [®])	PKC- α	ISIS Pharmaceuticals	Phase III	Antisense
R-roscovitine (CYC202)	CDK2	Cyclacel	Phase II	
alvocidib (flavopiridol, HMR1275)	CDKs	NCI/Aventis	Phase II	
RAS 経路関連				
tipifarnib (Zarnestra [®] , R115777)	farnesyltransferase	Johnson & Johnson	Phase III	
lonafarnib (SCH66336)	farnesyltransferase	Schering-Plough	Phase III	
L-778,123	farnesyltransferase	Merck	Phase II	
CI-1040 (PD184352)	MEK	Pfizer	Phase II	
BAY43-9006	RAF kinase	Bayer	Phase III	
	HDAC**			
SAHA	HDAC	Aton Pharma	Phase II	
FR901228 (depsipeptide)	HDAC	藤沢薬品	Phase II	
MS-275	HDAC	Schering	Phase I	
その他				
17-AAG	HSP-90	NCI	Phase I	
bortezomib (Velcade [®])	proteasome	Millennium	承認	
rituximab (Rituxan [®])	CD20	Genentech	承認	Antibody
oblimersen (Genasense [®] , G3139)	BCL2	Genta	Phase III	Antisense

* : mammalian target of rapamycin

** : histon deacetylase

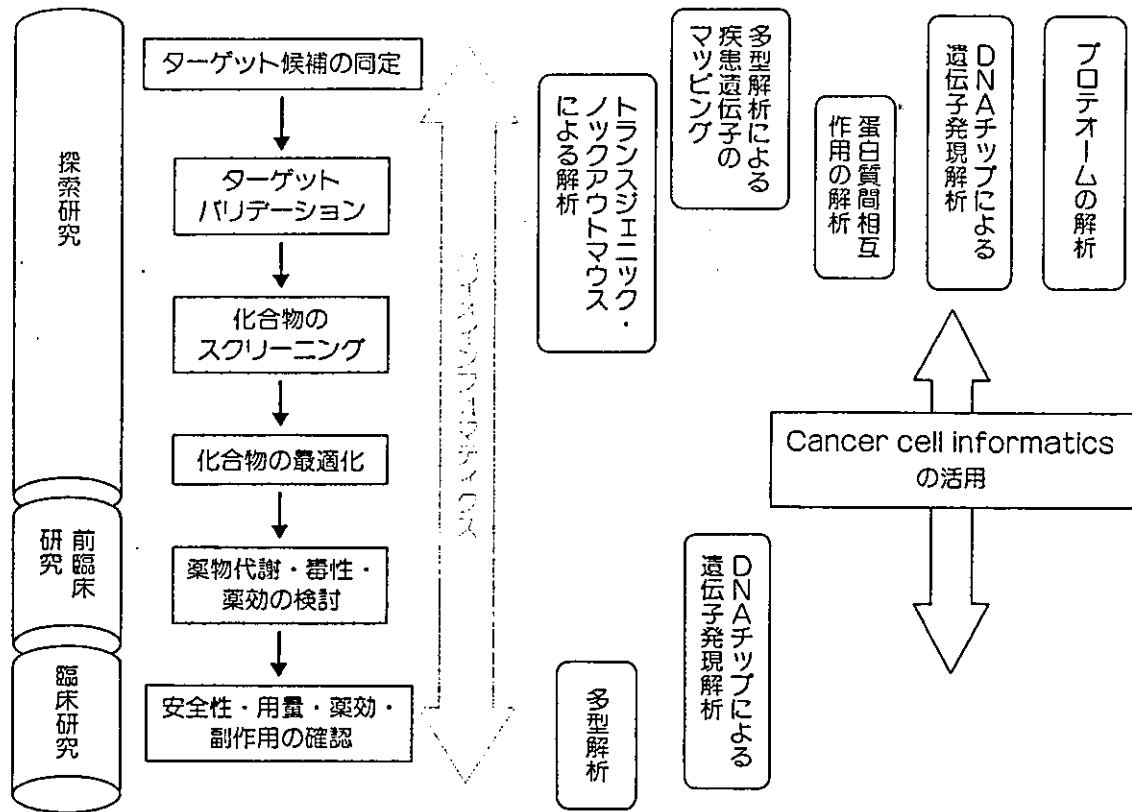


図 3. ゲノム創薬の流れと方法

の関連はどう展開するか、などがポイントと考えられる。ここでは、取り上げなかったが、低酸素状態での転写制御に重要な HIF-1 もこれから標分子的として有望と考えられる⁸⁾。

ゲノム創薬と cancer cell informatics

1. ゲノム創薬の流れ

図 3 に、ゲノム創薬の一般的流れと方法を示した。いうまでもなくいかに有効なターゲットを見いだすかが重要である。多型解析による疾患関連遺伝子の解析からは、疾患の原因追求を通して治療に直結するターゲットが同定される可能性がある。また、発現解析、プロテオーム解析を健常人とがん患者とで比較することでバイオマーカーを見だし、その中からトランスジェニックマウス・ノックアウトマウス、あるいは蛋白質相互作用を利用することによって、

重要なパスウェイを同定し、ターゲット候補の絞り込みとそのバリデーションを進める。ターゲット候補が決まれば、アッセイ系を構築しハイスループットのスクリーニングによってリード化合物を見いだす。リード化合物から化合物の最適化を行い、前臨床薬効・安全性研究から、臨床研究へとトランスレーショナルリサーチを進める。このプロセスでは、開発中の分子標的治療薬の有効性と毒性とを生体資料からいかに評価するかの方法論の確立が必要である。発現解析などを通じてサロゲートマーカーなどを見いだすことなども考えられる。さらに、開発した分子標的治療薬が想定した標的以外への作用を改めて見直すことも重要である。

2. Cancer cell informatics の活用

Cancer cell informatics とは、抗がん剤の分子薬理研究の足場として筆者らが開発した研究

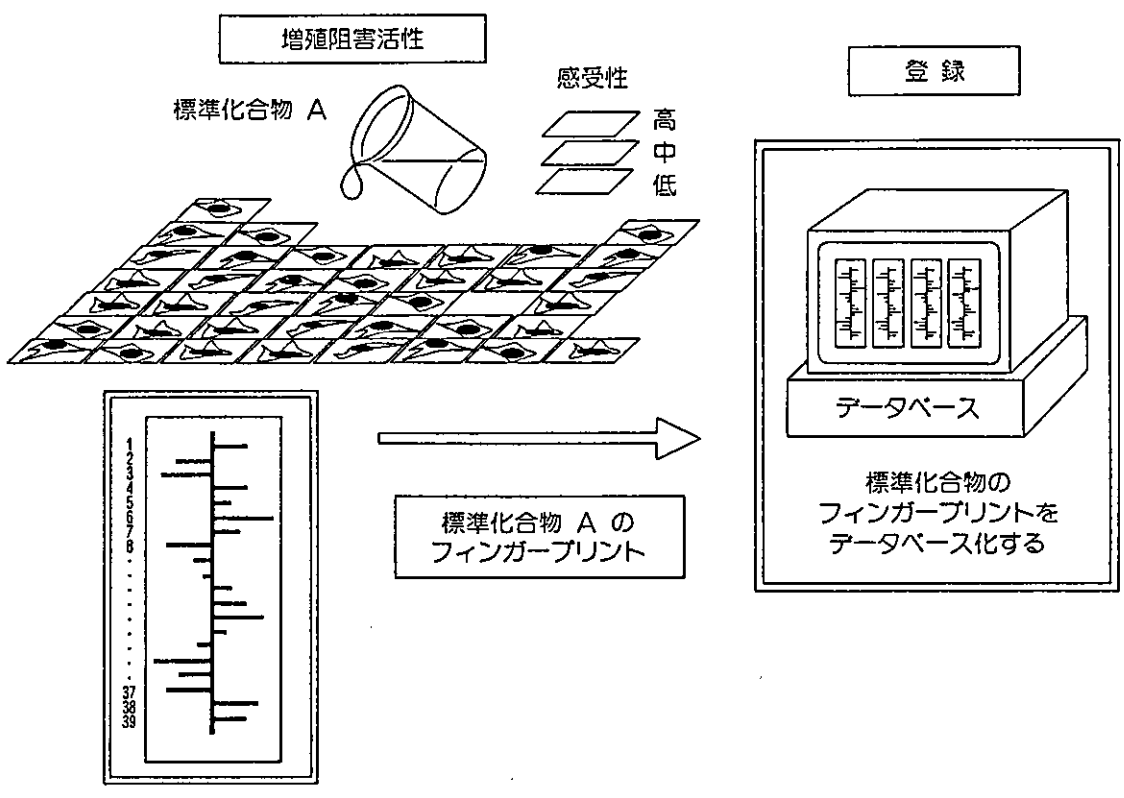


図 4. Cancer cell informatics におけるフィンガープリントデータベースの構築

がん細胞パネルの各がん細胞株は一つの薬剤に対しおのおの異なる感受性を持つ。その結果、一つの薬剤について各がん細胞株の薬剤感受性をパネル全体でみると、その薬剤固有のパターン(フィンガープリント)が得られる。標準化合物のフィンガープリントをデータベース化することにより標準化合物の作用メカニズムがフィンガープリントの形でデータベース化できる。

プラットフォームである。がん細胞株数十系を一組とし(がん細胞パネル)、さまざまな抗がん剤に対するその感受性をデータベース化し、データマイニングを導入することによって、化合物の薬理評価に役立つ辞書的機能を持つユニークなシステムが構築できる(図4~6)。紙面の都合で詳しくは述べないが、ウェットな実験(感受性試験)とドライな研究手法(データベース構築とデータマイニング)とを連携させたこのシステムは、がん化学療法研究手法としてこれまでにない特徴を持っている。たとえば、抗がん剤研究や抗がん剤探索に応用する場合、化合物の作用メカニズムを予測できるという特徴をもつ。新規作用メカニズムをもつ抗がん剤を探索

したい、開発中の抗がん剤と既存の抗がん剤との差別化ができるかどうかを知りたい、あるいは、開発した分子標的治療薬が想定した標的以外への作用を持つかを知りたい時、ことに威力を発揮する。したがって、図3のゲノム創薬のパイプラインの中で cancer cell informatics は、探索から前臨床までを広くサポートするシステムとして役立つものと考えられる。Cancer cell informatics により、筆者らは新規抗がん物質 MS-247 や thiazinotrienomycin B を見いだすとともに^{9,10)}、製薬企業の抗がん剤開発の支援も進めている。さらに、がん細胞パネルにおける遺伝子発現をデータベース化し、上述の抗がん剤感受性データと比較解析することにより、抗

表 2. Cancer cell informatics の有用性

Cancer cell informatics の有用性は
リード探索・最適化に有用である
1. 新規作用機作を持つリードの探索
2. 弱い活性のリードをもとに、より高い活性の物質をデータベースの中から探索
3. 分子標的薬剤を見直す—他の標的への作用はないのか?
4. 抗がん剤以外の化合物の分類(他の医薬品, 毒物など)
5. 遺伝子機能を化合物と対応づける(化学遺伝学に貢献)

がん剤の分子標的予測, 抗がん剤感受性に影響する遺伝子候補, あるいは診断・治療のバイオマーカー候補の探索も可能である¹¹⁻¹³⁾。この系は, オーダーメイド診断・治療への基盤情報を提供するツールとしてポストゲノム研究分野での活用, さらに将来は化学遺伝学分野での活用も期待される(図 6, 表 2)。

おわりに

がんの分子生物学に立脚して生まれた分子標的治療のコンセプトは, 最近相次ぐ分子標的治療薬の承認により現実のものとなり, がん化学療法は, 新たな展開を迎えた。これらに続く分子標的治療薬の開発競争は激化の様相を示している。問題点としては, 分子標的治療薬にも従来の抗がん剤と同様に耐性発現がみられているのでその克服が必要となろう。また, 標的が発現しているのみでは有効性につながらない場合もあるので, 個々のがんの遺伝子発現プロファイルにおける当該分子標的の位置づけを見極め, 標的への打撃がそのがん細胞に与えるダメージを正確に予測できるような感受性診断法の開発も望まれる。今後, 有望な標的に対し多様な分子標的治療薬の開発が行われていくものと予想され, それらの併用による真の意味でのオーダーメイド治療の実現を期待したい。

文 献

- Slamon DJ *et al* : Human breast cancer : Correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 235 : 177, 1987.
- Slamon DJ *et al* : Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 244 : 707, 1989.
- Druker BJ *et al* : Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 344 : 1031, 2001.
- Demetri GD *et al* : Efficacy and safety of imatinib mesylate in advanced gastrointestinal stromal tumors. *N Engl J Med* 347 : 472, 2002.
- Tortora G *et al* : Oral administration of a novel taxane, an antisense oligonucleotide targeting protein kinase A, and the epidermal growth factor receptor inhibitor Iressa causes cooperative antitumor and antiangiogenic activity. *Clin Cancer Res* 7 : 4156, 2001.
- Adams J : The proteasome : a suitable antineoplastic target. *Nat Rev Cancer* 4 : 349, 2004.
- Cohen P : Protein kinases--the major drug targets of the twenty-first century? *Nat Rev Drug Discov* 1 : 309, 2002.
- Semenza GL : Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 3 : 721, 2003.
- Yamori T *et al* : Potent antitumor activity of MS-247, a novel DNA minor groove binder, evaluated by an *in vitro* and *in vivo* human cancer cell line panel. *Cancer Res* 59 : 4042, 1999.
- Yamori T : Panel of human cancer cell lines provides valuable database for drug discovery and bioinformatics. *Cancer Chemother Pharmacol* 52 (Suppl 1) : 74, 2003.
- Dan S *et al* : An integrated database of chemosensitivity to 55 anticancer drugs and gene expression profiles of 39 human cancer cell lines. *Cancer Res* 62 : 1139, 2002.
- Shiwa M *et al* : Rapid discovery and identification of a tissue-specific tumor biomarker from 39 human cancer cell lines using the SELDI ProteinChip platform. *Biochem Biophys Res Commun* 309 : 18, 2003.
- 矢守隆夫 : がん細胞パネルによる化合物評価とその分子標的スクリーニングにおける役割. *癌と化学療法* 31 : 485, 2004.