

## 厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）

### 総括研究報告書

トランスクリプトーム解析を利用した医薬品の副作用発症機構の解明と、それに基づいた副作用予測システム、副作用治療法、及び副作用の少ない新薬の開発戦略の確立

研究代表者 水島 徹 慶應義塾大学薬学部教授

### 研究要旨

平成24年度我々は、イマチニブやメトトレキサートなどの間質性肺炎を起こす他の薬剤に関して同様の解析を行った。その結果、イマチニブが活性酸素から細胞を保護するタンパク質・HO-1の発現を抑制すること、またメトトレキサートがゲフィチニブ同様 HSP70 の発現を抑制することを見出した。また、これらの抑制がこれら医薬品による間質性肺炎の原因であることを示した。

一方我々は、保有する既存薬ライブラリーから HSP70 や HO-1 の発現を抑制するものを検索し、それらがマウスで肺線維化を起こすのかを検討した。その結果、複数の既存薬が HSP70 や HO-1 の発現を抑制すると同時に肺の線維化を起こすことを見出し、その内一部に関しては、薬剤性間質性肺炎を起こしたという臨床報告があった。以上の結果から私は、新薬候補品が HSP70 や HO-1 の発現を抑制するのかを調べることにより、その間質性肺炎副作用を予測することが可能であることを提唱した。実際、複数の製薬企業がこの方法を既に取り入れている。

## A. 研究目的

既存薬による副作用発症機構が理解されていないため、基礎研究段階で新薬候補品の副作用を予測出来ずに（臨床試験で初めて副作用が発見され）、臨床試験が失敗している。そこで本研究で我々は、トランスクリプトーム解析を基に医薬品の副作用発症機構を解明し、新薬候補品の副作用を予測するシステムを確立する。また、副作用の少ない新薬の開発や副作用治療法の確立も目指す。以下に、我々のこれまでの研究成果を述べる。

アスピリンを代表とする NSAID は優れた抗炎症薬として世界中でよく使用されているが、その胃潰瘍副作用（NSAID 潰瘍）が臨床現場で大きな問題になっている（米国では年間 16500 人が亡くなっている）。我々は NSAID が誘導する遺伝子を網羅的に解析し（トランスクリプトーム解析）NSAID が膜傷害性を持つこと、及びこれが NSAID 潰瘍の原因であることを見出した。この成果を受けて製薬企業は、膜傷害性を指標に新薬候補品の胃潰瘍副作用を予測するスクリーニングを開始している。また我々は、膜傷害性の少ない NSAID の合成に世界で初めて成功し、それらが十分な抗炎症作用を示すにも関わらず、ほとんど胃潰瘍を起こさないことを見いだした（現在、製薬企業で開発中）。

また我々は、間質性肺炎副作用が問題になっているレフルノミドに関しても、トランスクリプトーム解析を行った。その結果、レフルノミドが上皮間葉転換（EMT）を起こすこと、及びこれが間質性肺炎副作用の原因であることを明らかにした。一部の製薬企業では、EMT 誘導を指標に新薬候補品の間質性肺炎副作用を予測するスクリーニングを開始している。また我々は、この EMT 誘導を抑制する薬剤の肺内投与が、レフルノミド依存のマウス間質性肺炎を抑制することを見出した（副作用治療法の確立に繋がる成果）。

以上の成果を受けて本研究で我々は、他の薬剤による間質性肺炎副作用（平成 23-24 年度実施）及び薬疹など他の副作用（平成 24-25 年度実施）に関して、トランスクリプトーム解析を用いて副作用発症機構を解明し、新薬候補品の副作用を予測するシステムを確立すると共に、副作用の少ない新薬の開発、及び副作用治療法の確立も目指す。

## B. 研究方法

### （１）ゲフィチニブの間質性肺炎副作用に関する研究

ゲフィチニブ（イレッサ）の間質性肺炎（肺繊維症）副作用による死亡者は多く、社会問題になっている。一方、ある種の肺癌治療にはこの医薬品が必要不可欠であり、その治療法の確立、及び副作用の少ないゲフィチニブ誘導體（改良薬）の開発が急務になっている。

最近我々は、ゲフィチニブによる遺伝子発現変化の網羅的解析から、ゲフィチニブが熱ショックタンパク質（HSP）70（強力な細胞保護作用と抗炎症作用を持つ）の発現を強く抑制することを見出した。また我々はマウスを用いて、ゲフィチニブ依存に肺繊維化を起こす系（薬剤性間質性肺炎の動物モデル）を確立し、このモデルにおいてゲフィチニブ依存に HSP70 の発現が抑制されること、及び HSP70 過剰発現マウス（ゲフィチニブによる HSP70 発現抑制が起こらないマウス）では、ゲフィチニブ依存の肺繊維化も見られないことを見出した。以上の結果は、ゲフィチニブは HSP70 の発現を抑制することにより、間質性肺炎（肺繊維症）を起こすことを示唆している。そこで以下に述べる研究を行う。

HSP70 に着目した新薬候補品の間質性肺炎副作用予測システムの確立（平成 23 年度実施）

我々が保有する既存薬ライブラリーから HSP70 の発現を抑制するものを検索し、それらがマウスで肺線維化を起こすかを検討した。肺線維化を起こした既存薬（10 数種）に関して、症例報告や副作用データベースを用いて、間質性肺炎副作用の有無を調べた。その結果、複数の既存薬に関して間質性肺炎副作用報告があり、HSP70 発現抑制作用を調べることが間質性肺炎副作用の予測システムとして有用であることを示唆した。今後、製薬企業にこのシステムの導入を促す（目標：少なくとも 3 社）

HSP70 誘導薬による、ゲフィチニブ依存性間質性肺炎治療法の確立（平成 23 年度実施）

上述の結果は、HSP70 誘導薬がゲフィチニブ依存の間質性肺炎治療に有効であることを示唆している。我々は日本で最もよく使われている胃薬・ゲラニルゲラニルアセトン（GGA、商品名セルベックス）が HSP70 を誘導することを報告している（*JBC*, 2007, 2009, 2010 など）。そこで我々が確立した動物モデルを用いて、ゲフィチニブ依存性間質性肺炎治療薬としての GGA の有効性を検討したところ、GGA 投与によりゲフィチニブ依存の肺繊維化、及び HSP70 の発現抑制が見られなくなることを見出した。今後臨床研究へ繋げるための準備を行う。（GGA は既に臨床で使われているので、すぐに臨床研究を行うことが出来る。）（目標：25 年度中の臨床研究開始）

間質性肺炎副作用の少ないゲフィチニブ誘導体の発見（平成 24 年度実施予定）

数多くのゲフィチニブ誘導体を合成しその中から、試験管内で HSP70 発現抑制効果がなく、かつゲフィチニブと同程度の癌細胞増殖抑制効果を有するものを選択する。次に動物実験を行い、ゲフィチニブと同程度の抗癌作用を持ち、かつ肺繊維化を起こさないものを選択する。特許を取得したのち、間質性肺炎副作用の少ないゲフィチニブ改良薬としての開発を製薬企業へ提案する。（目標：25 年度中の特許出願）

**（2）他の薬剤性間質性肺炎に関する研究**（平成 24 年度実施予定）

レフルノミドやゲフィチニブ以外にも、抗癌剤（イマチニブなど）、抗リウマチ薬（メトトレキサートなど）、漢方薬（小紫胡湯など）が間質性肺炎を起こすことが知られているが、その発症機構は分かっていない。そこで、これらの薬剤による遺伝子発現変化の網羅的解析（トキシコゲノミクス・データベース等を利用する）からその副作用発症機構を解明する。

また上述のゲフィチニブの場合と同様の方法で、新薬候補品の副作用を予測するシステムの確立、副作用治療法の確立、副作用の少ない誘導体の発見を目指す。（目標：少なくとも 2 薬剤の副作用機構の解明）

**（3）他の副作用に関する研究**（平成 25 年度実施予定）

抗脂血症薬による横紋筋融解症、抗てんかん薬による薬剤性過敏症（薬疹）、抗生物質によるスティーブンス・ジョンソン症候群、糖尿病薬による肝障害などに関しても、副作用発症機構を解明し、新薬候補品の副作用を予測するシステムを確立すると共に、副作用治療法の開発、及び副作用の少ない誘導体の発見を目指す。（目標：少なくとも 2 薬剤の副作用機構の解明）

## C. 研究結果

我々は、イマチニブやメトトレキサートなどの間質性肺炎を起こす他の薬剤に関して同様の解析を行った。その結果、イマチニブが活性酸素から細胞を保護するタ

ンパク質・HO-1の発現を抑制すること、またメトトレキサートがゲフィチニブ同様HSP70の発現を抑制することを見出した。また、これらの抑制がこれら医薬品による間質性肺炎の原因であることを示した。

一方我々は、保有する既存薬ライブラリーからHSP70やHO-1の発現を抑制するものを検索し、それらがマウスで肺線維化を起こすのかを検討した。その結果、複数の既存薬がHSP70やHO-1の発現を抑制すると同時に肺の線維化を起こすことを見出し、その内一部に関しては、薬剤性間質性肺炎を起こしたという臨床報告があった。以上の結果から私は、新薬候補品がHSP70やHO-1の発現を抑制するのかを調べることにより、その間質性肺炎副作用を予測することが可能であることを提唱した。実際、複数の製薬企業がこの方法を既に取り入れている。

#### D. 考察

結果の欄に記載した。

#### E. 結論

今後は、我々が既に同定しているHO-1を増やす既存薬やテブレノンにより、これらの医薬品による間質性肺炎を抑制できるのかを検討し、臨床研究に繋げたい。またアミオダロンなどの他の間質性肺炎を起こす薬剤に関しても、同様の解析を開始する。さらに、薬疹など他の副作用に関しても、トランスクリプトーム解析を用いて副作用発症機構の解明を目指す。

#### F. 健康危険情報

該当なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Hoshino, T., Namba, T., Takehara, M., Murao, N., Sugimoto, Y., Narumiya, S., Matsushima, T., Suzuki, T. and Mizushima, T. Improvement of cognitive function in Alzheimer's disease model mice by genetic and pharmacological inhibition of the EP4 receptor. *J. Neurochem.* 120, 795-805. (2012)
2. Yamashita, Y., Ikeda, T., Matsuda, M., Maji, D., Hoshino, T. and Mizushima, T. purification and characterization of hsp-inducers from *eupatorium lindleyanum* *Biochem. Pharmacol.* 82, 909-922. (2012)
3. Asano, T., Tanaka, K., Suemasu, S., Ishihara, T., Tahara, K., Suzuki, T., Suzuki, H., Fukudo, S. and Mizushima, T. Effects of  $\beta$ -(1,3-1,6)-D-glucan on irritable bowel syndrome-related colonic hypersensitivity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 420, 444-449. (2012)
4. Tanaka, K., Sato, K., Aoshiba, K., Azuma, A. and Mizushima, T. Superiority of PC-SOD to other anti-COPD drugs for elastase-induced emphysema and alteration in lung mechanics and respiratory function in mice. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 302, L1250-L1261. (2012)
5. Yamakawa, N., Suemasu, S., Okamoto, Y., Tanaka, K., Ishihara, T., Asano, T., Miyata, k., Ohtsuka, M. and Mizushima, T. Synthesis and biological evaluation of derivatives of 2-{2-fluoro-4-[(2-oxocyclopentyl)methyl]phenyl}propanoic acid: Non-steroidal anti-inflammatory drugs with low gastric ulcerogenic activity. *J. Med. Chem.* 55, 5143-5150. (2012)

6. Mizushima, T. Development of NSAIDs with lower gastric side effect. *Frontier of Gastrointestinal Research* 30, 71-78. (2012)
7. Tanaka, K., Azuma, A., Miyazaki, Y., Sato, K. and Mizushima, T. Effects of lecithinized superoxide dismutase and/or pirfenidone against bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *CHEST* 142, 1011-1019. (2012)
8. Tanaka, K. Shirai, A., Ito, Y., Namba, T., Tahara, K., Yamakawa, N. and Mizushima, T. Expression of 150-kDa oxygen-regulated protein (ORP150) stimulates bleomycin-induced pulmonary fibrosis and dysfunction in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 425, 818-824. (2012)
9. Suemasu, S., Yamakawa, N., Ishihara, T., Asano, T. Tahara, K., Tanaka, K. Matsui, M., Okamoto, Y., Otsuka, M., Takeuchi, K., Suzuki, S. and Mizushima, T. Identification of a unique NSAID, fluoro-loxoprofen with gastroprotective activity. *Biochem. Pharmacol.* 84, 1470-1481. (2012)
10. Matsuda, M., Hoshino, T., Yamakawa, N., Tahara, K., Adachi, H., Sobue, G., Maji, D., Ihn, H. and Mizushima, T. Suppression of UV-induced wrinkle formation by induction of HSP70 expression in mice. *J. Invest. Dermatol.* 133, 919-928. (2012)

## 2. 学会発表（招待講演のみ）

- 1 水島徹 既存薬を利用したアルツハイマー病治療薬の開発 日本薬学会シンポジウム招待講演 (2012) (札幌)
- 2 水島徹 NSAID 潰瘍発症機構とその対策 日本消化器病学会招待講演 (2012) (東京)
- 3 Tohru Mizushima PC-SOD, as a drug for IPF. Invited lecture in Asan Medical Center (2012) (Seoul)
- 4 水島徹 ドラッグリプロファイリング研究 武田薬品工業(株)研究所での招待講演 (2012) (藤沢)
- 5 Tohru Mizushima Protective and therapeutic effects of lecithinized superoxide dismutase (PC-SOD) against pulmonary emphysema. American Thoracic Society International Conference (2012) (San Francisco)
- 6 水島徹 ドラッグリプロファイリング研究 南風病院での招待講演 (2012) (鹿児島)
- 7 Tohru Mizushima Development of new type of NSAID with lower gastric side effects. Invited lecture in CJ Pharma (2012) (Tokyo)
- 8 水島徹 ドラッグリプロファイリング研究 わかもと製薬(株)研究所での招待講演 (2012) (大井町)
- 9 水島徹 ドラッグリポジショニングによる創薬アプローチの現状と今後の展望 味の素製薬(株)研究所での招待講演 (2012) (川崎)

- 10 水島徹 消化器治療薬をベースにした新薬開発-その現状と可能性- 日本消化器病学会四国支部会 (2012) (徳島)
- 11 Tohru Mizushima Identification of a unique NSAID, fluoro-loxoprofen with gastroprotective activity. Invited lecture in International Union of Basic and Clinical Pharmacology, GI Satellite Meeting. (2012) (Tokyo)
- 12 水島徹 PC-SOD 吸入製剤の開発 日本 DDS 学会シンポジウム (2012)(札幌)
- 13 水島徹 セルベックスの新しい可能性を求めて 消化器病態生理勉強会での招待講演 (2012) (東京)
- 14 水島徹 ドラッグリプロファイリング研究 医学部薬学部合同サマースクールでの招待講演 (2012) (東京)
- 15 水島徹 ドラッグリプロファイリング研究 バイオメディカル分析科学シンポジウムでの招待講演 (2012) (東京)
- 16 水島徹 プレオマイシン依存の肺線維化、呼吸機能障害に対する PC-SOD、及びピルフェニドンの効果 第15回間質性肺炎細胞分子病態研究会での招待講演 (2012) (東京)
- 17 Tohru Mizushima Protective role for HSP70 against various gastrointestinal diseases and other diseases. Invited lecture in 11<sup>th</sup> International Congress of Hyperthermic Therapy (2012) (Kyoto)
- 18 Tohru Mizushima Development of new type of NSAID with lower gastric side effects. Invited lecture in 7<sup>th</sup> International symposium on cell/tissue injury and Cytoprotection/Organoprotection: Focus on GI Tract (2012) (Honolulu)
- 19 水島徹 ドラッグリポジショニング (DR) の現状と今後の展望 日本バイオインダストリー協会での招待講演 (2012) (東京)
- 20 水島徹 ドラッグリポジショニング (DR) の現状と今後の展望 医薬基盤研究所での招待講演 (2012) (大阪)
- 21 水島徹 ドラッグリポジショニング (DR) 研究 (既存薬を利用した新薬開発) 慶応義塾大学研究推進本部主催シンポジウムでの招待講演 (2012) (東京)
- 22 水島徹 種々の疾患における熱ショックタンパク質 (HSP) の効果と、HSP 誘導薬による治療 第6回 S-Target 学術講演会での招待講演 (2012)(大阪)
- 23 水島徹 2010 年問題 (新薬が産まれない) の解決策 熊本発の創薬研究で

- の招待講演 (2012) (東京)
- 24 水島徹 ドラッグリポジショニング (DR) 慶応義塾大学医学部呼吸器内科での招待講演 (2012) (東京)
- 25 水島徹 薬剤性肺線維症発症機構の解明とその治療法の確立 臨床ストレス応答学会大会招待講演 (2012) (東京)
- 26 水島徹 ドラッグリポジショニング (DR) の現状と今後の展望 第一三共 (株) 研究所での招待講演 (2012) (東京)
- 27 水島徹 ヒートショックプロテインのシワ抑制効果 明日の化粧品科学を創造する FJ セミナー (2012) (東京)
- 28 水島徹 レシチン化 SOD の開発 東京大学大学院新領域研究科での招待講演 (2013) (柏)
- 29 水島徹 ドラッグリポジショニングとは何か、新薬開発にどのような道が開けるのか レギュラトリーサイエンス エキスパート研修会での招待講演 (2013) (東京)
- 30 水島徹 ドラッグリポジショニング-既存薬を利用した新薬開発- 第 55 回鹿児島消化器病研究会での特別講演 (2013) (鹿児島)
- 31 水島徹 PC-SOD 吸入製剤の開発 日本薬学会シンポジウムでの招待講演 (2013) (横浜)
- 32 水島徹 ストレスから体を守るタンパク質・HSP の働きと、その医薬品・化粧品への応用 榊原記念病院定例講演会での特別講演 (2013) (東京)