

論文の内容の要旨

論文題目 **EGFR** チロシンキナーゼ阻害薬による副作用発現機構の解析

氏名 山本 奈央子

【序文】

近年本邦では、手術不能再発非小細胞肺癌に対して epidermal growth factor receptor (EGFR) チロシンキナーゼ阻害剤であるゲフィチニブおよびエルロチニブが用いられ、良好な治療成績を上げている。薬剤開発当初は、このような特定の分子に対して選択性を示すように設計された分子標的治療薬に関しては、副作用が少ないことが期待されていたが、実際の臨床においては、従来の抗がん剤治療とはスペクトルの異なる副作用が高頻度に認められる例が明らかとなっており、臨床上の課題ともなっている。皮疹、掻痒、皮膚乾燥、ざ瘡等の皮膚障害は EGFR キナーゼ阻害薬服用患者において最も高頻度に認められる副作用の 1 つであり、その発症頻度および重症度は EGFR キナーゼ阻害薬間で大きく異なることが知られている。特にエルロチニブによる皮膚障害は頻度、重症度ともに高く、患者の quality of life (QOL) に大きな影響を与える。

これまでに EGFR キナーゼ阻害薬による皮膚障害に関し、その病態生理的メカニズムとして、EGFR 阻害を起点とした、皮脂腺および毛嚢上皮の傷害および表皮の増殖・分化異常とそれに伴う炎症反応からなる一連の反応が提唱されている。一方、これまでに報告されている EGFR に対する解離定数から、各薬物の臨床用量における EGFR チロシンキナーゼに対する占有率を算出したところ、エルロチニブおよびゲフィチニブにおいてそれぞれ 100%および 99%と差が無いことから、エルロチニブによる重症の皮膚障害には EGFR 阻害以外の他の何らかの因子が寄与していると推察された。これまでに、エルロチニブおよびゲフィチニブが EGFR だけでなく複数のオフターゲットキナーゼにも結合することが明らかとなっているが、皮膚障害の増悪との関連性に関しては明らかにはなっていない。そこで本研究では、エルロチニブ服用に伴う皮膚障害重症化の分子メカニズムを理解することを目的として、皮膚障害重症化とオフターゲットキナーゼ阻害の関連性に着目し、解析を行った。

【方法および結果】

1. 臨床用量のエルロチニブおよびゲフィチニブによるオフターゲットキナーゼへの占有率の比較

ハイスループット測定法によって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、臨床用量で連投されて定常状態に達した際の両薬物の平均血漿中非結合型濃度を考慮して、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、両薬物間で阻害率の異なるオフターゲットキナーゼとして、serine/threonine kinase 10 (STK10) および ste20-like kinase (SLK) の 2 種類が見出された。STK10 に対する占有率はエルロチニブで 92%、ゲフィチニブで 12%、また SLK に対する占有率はエルロチニブで 89%、ゲフィチニブで 7% と算出された。STK10 および SLK はともに Ste20 ファミリーに属するセリン/スレオニンキナーゼであり、STK10 は主にリンパ球に発現し、IL-2 の発現や細胞の遊走性といったリンパ球性の反応を負に制御することが知られている。一方、SLK は生体内にユビキタスに発現しているが、リンパ球における機能に関しては未知の分子である。STK10 あるいは SLK の阻害によるリンパ球の活性化は皮膚障害を含む炎症反応を増悪させ、エルロチニブ服用に伴う重症の皮膚障害に関与する可能性が想定されることから、本研究では STK10 および SLK に焦点を当て、検討を行った。

2. エルロチニブおよびゲフィチニブの STK10 および SLK に対する IC₅₀ 値の測定

STK10 および SLK のキナーゼ活性が臨床用量のエルロチニブにより実際に阻害されるか確認するため、ヒト STK10、SLK およびそれらのマウス・オルソログに対するエルロチニブおよびゲフィチニブの IC₅₀ 値を組み換えタンパク質を用いた *in vitro* のアッセイにより測定した。ヒト STK10 に対するエルロチニブおよびゲフィチニブの IC₅₀ 値はそれぞれ 160 nM および 1300 nM であった。ヒト SLK に対するエルロチニブおよびゲフィチニブの IC₅₀ 値はそれぞれ 830 nM および 5200 nM であった。これらの結果に基づき、臨床用量での STK10 に対する阻害率を算出したところ、エルロチニブでは約 60% である一方、ゲフィチニブではわずか 4% であることが推定された。また、SLK に対する阻害率は STK10 と比べてやや低く、エルロチニブではおよそ 25% であるのに対し、ゲフィチニブではほとんど阻害は認められないことが示された。

3. エルロチニブ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

リンパ球の IL-2 分泌能に対するエルロチニブおよびゲフィチニブの影響を比較するため、ヒト白血病 T 細胞由来細胞株である Jurkat E6-1 細胞をモデルとして用い、リンパ球活性化刺激により培地中に放出される IL-2 濃度を ELISA 法により測定した。エルロチニブを培地中に添加した場合、添加濃度依存的に IL-2 分泌量の増大が観察されたが、ゲフィチニブの場合はほとんど影響が認められなかった。これらの結果によりエルロチニブが臨床用量においてリンパ球からの IL-2 分泌を亢進させることが示唆された。

エルロチニブおよびゲフィチニブのリンパ球遊走に対する影響はトランスウェルを用いたケモタキシス・アッセイにより解析した。ケモカインによって誘引される細胞数に対してエルロチニブおよびゲフィチニブ暴露が与える影響を評価したところ、エルロチニブおよびゲフィチニブは共に誘引される細胞数を増加させたが、リンパ球遊走に対する EC₅₀ 値はエルロチニブにおいて 470 nM、ゲフィチニブにおいて 1400 nM と算出され、その程度はエルロチニブがゲフィチニブより強かった。これらの結果によりエルロチニブが臨床用量においてリンパ球遊走性を亢進させることが示唆された。

4. STK10 の阻害はエルロチニブによるリンパ球活性化亢進の主要な要因である

エルロチニブによるリンパ球の活性化が STK10 および SLK の阻害を介して生じているのか否かを検証するために、RNAi による STK10 および SLK の遺伝子発現抑制の影響を解析した。STK10 を発現抑制した Jurkat E6-1 細胞においてはコントロール処理群と比較して、IL-2 mRNA 発現誘導が 2 倍に増大した一方で、SLK 発現抑制群においては変化は認められなかった。さらに、臨床濃度のエルロチニブを添加したところ、SLK を遺伝子発現抑制した Jurkat E6-1 細胞およびコントロール細胞においては、IL-2 mRNA 発現量の有意な増大が観察された一方で、STK10 の遺伝子発現抑制条件下では顕著な差異は認められなかった。また、IL-2 のタンパク質レベルでの培地中放出量に関しても mRNA レベルでの発現量変化と一致した傾向が観察された。これらの結果により、エルロチニブによる IL-2 の分泌誘導の増大は、エルロチニブによる STK10 の阻害を介して生じる、転写レベルにおける発現誘導の増大に起因するものと考えられた。同様に Jurkat E6-1 細胞に対して siRNA 導入し、ケモカインによる細胞遊走アッセイを行った。STK10 の遺伝子発現抑制条件下においては、コントロールおよび SLK 遺伝子発現抑制条件下と比較してケモカインにより誘引される細胞数の増大が観察された。培地中に臨床濃度のエルロチニブを添加したところ、SLK を遺伝子発現抑制した Jurkat E6-1 細胞およびコントロール細胞においてはケモカインによる遊走細胞数の増大が観察された一方で、STK10 の遺伝子発現抑制条件下では変化は認められなかった。これらの結果より、エルロチニブによるリンパ球遊走性の亢進に関しても STK10 の阻害を介して生じていると考えられた。

5. エルロチニブ投与によるリンパ球性反応の活性化は刺激性皮膚炎を増悪させる

一連の *in vitro* 実験の結果から、エルロチニブによる STK10 の阻害を介したリンパ球活性の増大が皮膚障害の増悪に寄与している可能性が想定されたため、マウスを用いた刺激性皮膚炎モデルによる検証を行った。刺激性皮膚炎の評価は、クロトンオイルを耳介に塗布し、24 時間後の耳介の腫脹を計測して行った。クロトンオイルの塗布と共にエルロチニブ

あるいはゲフィチニブを、マウスにおける STK10 の阻害率が臨床用量におけるヒト STK10 阻害率とほぼ同等となるように経口投与し、影響を評価した。耳介の腫脹はコントロールと比較し、エルロチニブ投与により顕著に増大した一方で、ゲフィチニブ投与による変動は観察されなかった。またこの際、エルロチニブは Jurkat E6-1 細胞と同様、マウスより単離したリンパ節細胞に関しても IL-2 産生およびリンパ球遊走性亢進等のリンパ球活性の増大を引き起こすことが示された。さらに、組織切片染色を用いて耳介へのリンパ球浸潤の度合いを計測したところ、炎症部位においてエルロチニブ投与群においてのみ浸潤リンパ球数の増加が認められた。抗 IL-2 中和抗体あるいは T リンパ球の活性を選択的に抑制する免疫抑制剤である FTY720 の影響を同様の刺激性皮膚炎モデルを用いて検討したところ、抗 IL-2 中和抗体あるいは FTY720 の投与によって、エルロチニブによる耳介腫脹の増大作用は減弱することが確認された。これらの結果から、エルロチニブ投与によるリンパ球活性化の亢進により皮膚炎症が増悪する可能性が示唆された。

【まとめと考察】

本研究では皮膚障害重症化とオフターゲットキナーゼ阻害の関連性に着目し、*In vitro* の解析から、①エルロチニブが臨床用量において STK10 の阻害を介し、リンパ球の IL-2 分泌や遊走性などリンパ球活性を亢進させること、また、刺激性皮膚炎モデルマウスを用いた *in vivo* 解析により、②エルロチニブ投与条件下では、炎症部位局所においてリンパ球活性化と炎症反応が増強されることを示した。これらの結果からエルロチニブによるオフターゲットキナーゼ STK10 の阻害がリンパ球の活性増大を介して、皮膚障害の増悪に関与していることが示唆された。

本研究から、臨床用量における薬物の定常状態血漿中非結合型濃度を考慮したオフターゲットキナーゼ阻害プロファイルの網羅的解析手法は、個々のキナーゼタンパク質の生理機能に関する情報を加味することで、薬理作用および副作用を推定する上で有用な手法となることが示唆された。さらに、本研究を通して得られる分子メカニズムの理解は、臨床における副作用マネジメントの方法論を模索する上でも、また今後より安全な新規キナーゼ阻害薬の創薬を考える上でも、重要な基盤情報を与えるものと考えられた。