

審査の結果の要旨

氏名 山本 奈央子

本研究は、EGFR キナーゼ阻害薬である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明らかにするため、類似の EGFR キナーゼ阻害薬であるゲフィチニブとの比較を行い、エルロチニブとゲフィチニブのオフターゲットキナーゼ阻害プロファイルの差異と皮膚障害重症度の差異の関連性に着目して解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. EGFR を主要標的とするキナーゼ阻害薬であるエルロチニブおよびゲフィチニブに関して、317 種類のヒトキナーゼに対する結合定数をハイスループット法によって測定した報告に基づき、臨床用量における定常状態平均血漿中非結合型薬物濃度を考慮して占有率を算出したところ、両薬物間で占有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。
2. ヒト STK10, SLK に対するエルロチニブおよびゲフィチニブの IC<sub>50</sub> 値を、組み換えタンパク質を用いた *in vitro* 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 IC<sub>50</sub> 値はそれぞれ 160 nM および 1,300 nM、ヒト SLK に対するエルロチニブおよびゲフィチニブの IC<sub>50</sub> 値はそれぞれ 830 nM および 5,200 nM であった。これらの結果に基づき、臨床用量における 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. ヒト白血病 T 細胞由来細胞株 Jurkat E6-1 細胞において、エルロチニブの培地中への添加により、添加濃度依存的にリンパ球活性化刺激に伴う IL-2 分泌量の増大が観察されたが、ゲフィチニブの場合にはほとんど影響が認められなかった。また、エルロチニブおよびゲフィチニブがリンパ球遊走活性に与える影響を、ケモタキシス・アッセイにより解析したところ、エルロチニブおよびゲフィチニブは共にケモカインにより誘引される細胞数を増加させたが、その EC<sub>50</sub> 値はエルロチニブにおいて 470 nM、ゲフィチニブにおいて 1,400 nM と算出され、エルロチニブは臨床用量においてリンパ球遊走性を亢進させる一方で、ゲフィチニブによる影響はほとんどないと考えられた。
4. STK10 および SLK に対する siRNA を用い、各遺伝子発現抑制の影響を解析したところ、STK10 を発現抑制した Jurkat E6-1 細胞において、コントロール処理群と比較してリンパ球活性化刺激に伴う IL-2 mRNA 発現誘導が 2 倍に増大した。一方、SLK 発現抑制群においては変化が認められなかった。さらに、臨床濃度のエルロチニブ添加により、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、リンパ球活性化刺激に伴う IL-2 mRNA 発現誘導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、タンパク質レベルでの IL-2 培地中放出量に関しても、mRNA レベルでの変化と一致した傾向が観察された。これらの結果より、エルロチニブによる IL-2 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。同様の条件下、ケモキシス・アッセイを行ったところ、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。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. マウスを用いた刺激性皮膚炎モデルによる検証の結果、クロトンオイルによる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。さらに、耳介組織切片において、エルロチニブ投与群でのみ炎症部位における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している可能性が示唆された。

以上、本論文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の解析から、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を明らかにした。本研究を通して得られる分子メカニズムの理解および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、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、学位の授与に値するものと考えられる。