

審査の結果の要旨

氏名 雨宮 貴洋

本研究はマルチキナーゼ阻害薬であるスニチニブにおいて、高頻度に認められる血小板減少、甲状腺機能低下に加え、肝機能障害、心機能障害の発現に関与する分子メカニズムを明らかにするために、スニチニブの臨床濃度におけるオフターゲットキナーゼ阻害に基づいて解析を試みたものであり、以下の結果を得ている。

1. 報告値を基に、スニチニブ及びソラフェニブに関して 317 種類のヒトキナーゼに対する占有率を網羅的に算出・比較した結果、両薬物間で占有率が大きく異なるオフターゲットキナーゼとして、phosphorylase kinase (PHK) gamma 1 (PHKG1)及び phosphorylase kinase gamma 2 (PHKG2)が見出された。
2. 臨床用量のスニチニブによって PHKG1/2 が阻害されることを確認するため、ヒト PHKG1、PHKG2 及びそれらのマウスオルソログに関し、キナーゼ領域の組み換えタンパク質を取得し、それらを用いてスニチニブ及びその活性代謝物あるいはソラフェニブによる阻害効果を実測した。その結果、臨床用量においてスニチニブは PHKG1/2 を強力に阻害し、マウスオルソログでも同様であることが確認された。一方、ソラフェニブによる阻害効果は微弱であった。
3. 臨床と同等の薬物血中濃度を示すマウスモデルにおいて、スニチニブ投与群では、肝臓内グリコーゲン量が増大し、血清肝機能マーカーである ALT 値が有意に上昇した。さらにグルコース-6-リン酸濃度の低下、NADPH/NADP⁺比の低下、GSH/GSSG 比の低下が認められた。また、酸化ストレスマーカーであり脂質過酸化物量を示す TBARS 値は、スニチニブ投与群の肝臓内において有意に上昇していた。次に肝臓内 PHKG2 を発現抑制したマウスモデルを構築し評価を行ったところ、グリコーゲン量の増大及びグルコース-6-リン酸量の減少が認められ、この際同時に NADPH/NADP⁺比、GSH/GSSG 比も有意に低下していた。さらにこのマウスモデルに対し、スニチニブの混餌投与を行っても上乘せ効果は観察されなかった。
4. GSH 合成酵素を阻害し、酸化ストレスを惹起する buthionine sulfoximine (BSO)を腹腔内投与したマウスに、スニチニブを 1 日間経口投与した後の血清 ALT 値を測定した。BSO 非処理下ではスニチニブの短期間投与による ALT 値変動は観察されない一方で、BSO の前処理をした際には ALT 値の有意な上昇が観察された。また、初代肝細胞培養を用い、スニチニブの細胞毒性を評価した結果、BSO 非処理群では 136 nM であったスニチニブの EC₅₀は、BSO 処理群では 19 nM へ減少し、酸化ストレスが肝細胞のスニチニブに対する毒性感受性を増強することが示唆された。続いて、抗酸化薬物の併用による効果を検討した。ビタミン E 製剤である α -トコフェロールニコチネート(α -T.N.)とスニチニブを 2 週間併用投与した結果、肝臓内 NADPH/NADP⁺比、GSH/GSSG 比、ALT 値はいずれも、スニチニブ非投与群と同程度まで回復することが明らかとなった。

5. 各薬物を混餌投与したマウスの心臓においても、内因性代謝物質の変動は肝臓と同様であった。心臓における ATP 産生は、解糖系及び脂肪酸 β 酸化経路により供給されるが、ソラフェニブ投与により惹起される高血圧条件下では、酸化ストレスを発生する脂肪酸 β 酸化経路が抑制され、解糖系が亢進していることが関連遺伝子 mRNA の定量により示唆された。一方、スニチニブ投与においても高血圧状態となるが、脂肪酸 β 酸化経路の抑制は認められなかった。この際心臓内 ATP 量は、スニチニブ、ソラフェニブいずれの投与群においても非処理群と同程度であった。これらのことは、スニチニブ投与条件下では、解糖系関連遺伝子が上昇するにも関わらず、上流グリコーゲン代謝の破綻により解糖系を介した ATP 供給が不十分であり、脂肪酸 β 酸化経路に依存して心臓内 ATP 量を維持していると考えられた。また、スニチニブ投与マウスでは、心筋障害を反映する Troponin T 値及び心拍出量低下を反映する NT-proBNP 値が有意に増大し、 α -T.N.併用によりコントロールレベルまで回復することも明らかとなった。
6. 各薬物を混餌投与したマウスより回収した血小板においても、内因性代謝物質の変動は肝臓と同様であった。スニチニブを投与したマウス由来の血小板においては有意に annexin V 結合性が増大した。また、スニチニブ投与群由来の血小板は、マクロファージに対する被貪食能が亢進していることも確認された。血小板の生体内での半減期を評価するため、血小板ラベル化剤を投与し、経時的にラベル化血小板数を測定した結果、スニチニブを投与した群では循環血中半減期の低下が示唆された。さらに α -T.N.併用によるレスキュー効果も観察された。
7. 各薬物を混餌投与したマウスより摘出した甲状腺においても、内因性代謝物質の変動は肝臓と同様であった。また、血清 Free T4 (FT4)・Free T3 (FT3)値は、どの群においても大幅な変動は観察されなかったが、血清 TSH 値はスニチニブ投与群で顕著に増大した。 α -T.N.の併用により、この TSH 値上昇は非投与群と同程度まで低下した。さらに、TSH 分泌を直接的に抑制するオクトレオチドを投与し、スニチニブ投与群において血清 TSH 値の上昇をコントロールレベルまで抑制した場合、血清 FT3・FT4 値及び、甲状腺内 T3・T4 値はスニチニブ投与群にて有意に低下した。
8. スニチニブによる治療を行う腎細胞がん患者を対象とし、酸化ストレス及びグリコーゲン蓄積に関する検証を行った。その結果、5例の患者すべてにおいて、スニチニブ投与中に血清 TBARS の増加、血中グリコーゲン量の増大が観察された。さらに重度の血小板減少に先行して、グリコーゲン蓄積と酸化ストレス生成が観察された。

以上、本論文では、スニチニブは PHKG1/2 の阻害を介して糖代謝ホメオスタシスを破綻させ、酸化ストレスを誘導し、最終的に多臓器毒性を発現することが示唆された。また、酸化ストレスを制御した際には、これらの臓器毒性はいずれも大きく軽減された。これらの知見はスニチニブによる副作用発現を回避する治療法を確立する上で、重要な基盤情報であると考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。