日本医療研究開発機構 医薬品等規制調和・評価研究事業 事後評価報告書

公開

I 基本情報

研究開発課題名：（日本語）医薬品等の安全性予測評価に係る分子ネットワークパスウェイ解析に関する研究開発

（英語）Study of molecular network pathway analysis on prediction and risk assessment of pharmaceuticals

研究開発実施期間：令和3年7月1日～令和6年3月31日

研究開発代表者 氏名：（日本語）田邊 思帆里
（英語）Tanabe Shihori

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：
（日本語）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 安全性予測評価部・主任研究官
（英語）National Institute of Health Sciences・Division of Risk Assessment, Center for Biological Safety and Research・Senior Researcher

II 研究開発の概要

研究開発の成果およびその意義等

和文：

新型疾患等や治療耐性疾患の病態メカニズムを解明し、医薬品の作用メカニズム及び副作用/副反応等の有害性を予測して安全性を評価することは国際的な共通課題となっている。医薬品行政において、開発医薬品の有害性を予測し、安全性を評価することは重要である。医薬品等は生体内において臓器・細胞等に作用し、遺伝子発現変動・細胞シグナルパスウェイ変化等の多様なフェノタイプ変化をもたらすことから、開発医薬品の治療ターゲット以外の有害作用パスウェイを効率的に評価し、副作用を予測する評価手法の基盤的な知見を集積することにより、医薬品行政を改善する必要性が増大している。治療耐性がん病態においては、上皮間葉転換やがん幹細胞が、がん転移・がんの悪性化・抗がん剤耐性に関与していることが知られており、その病態解明と治療薬開発が必要となっている。病態メカニズム解明及び医薬品等有害性予測が国際的な共通課題となっていることを踏まえ、有害性発現経路（Adverse Outcome Pathway; AOP）の開発が国際的に進展していることから、本研究においては、病態メカニズム及び有害性発現ネットワークをAIツールによる *in silico* 解析を用いて解明することを目的とした。がん細胞においては、多様な分子シグナルパスウェイが活性化することが知られていることから、本研究においては、抗がん剤により変動する分子に関して、データ

ベース等を用いてそのネットワーク変化を網羅的に解析し、抗がん剤の安全性について検討することを目的とし、抗がん剤の投与により発現変化する分子をまとめ、細胞分子シグナル伝達パスウェイに関する各分子ネットワーク上に変動情報をマッピングし、抗がん剤による生体影響を解析した。

医薬品の副作用や、生体ネットワーク情報の予測に資する分子メカニズム、細胞フェノタイプ変化・相互作用等の知見を明らかとするために分子ネットワークパスウェイ解析を実施し、治療抵抗性疾患医薬品関連の有害性発現経路 AOP (Adverse Outcome Pathway) を作成した。

研究開発項目 1 の医薬品副作用等予測関連パスウェイの構築に関連し、胃がん及び新型コロナウイルス感染症等の疾患関連変動分子ネットワークを、Ingenuity Pathway Analysis (IPA) 等のデータベースツールを用いて網羅的に解析し、有害性発現経路 AOP を作成し、各国の専門家等と共に議論した。IPA データベース上の様々な病態に関する約 9 万件の公開遺伝子発現データを医薬品等処置条件や臓器情報等を用いてフィルタリングすることにより、データベースアッセイ系を構築し、遺伝子発現データを *in silico* 解析した。マイルストーンとして慢性活性酸素種からヒト治療抵抗性胃がんに至る有害性発現経路 AOP 及び新型コロナウイルス感染症 AOP を創成し、OECD データベースに登録した。

研究開発項目 2 の治療抵抗性関連分子のネットワークパスウェイ解析に関連し、治療抵抗性胃がんに関連するフェノタイプである上皮間葉転換 (Epithelial-mesenchymal transition; EMT) 及びがん幹細胞 (Cancer stem cell; CSC) 分子ネットワークパスウェイを解析した。治療抵抗性胃がんのパスウェイはダメージ応答や RNA ウィルス感染にも関与しており、新型コロナウイルス感染症への活性酸素種の関与も考えられることから、酸化ストレス応答関連ネットワークに着目して *in silico* 解析した。

研究開発項目 3 の分子ネットワーク AI 予測モデル解析に関連し、人工知能を用いた画像識別モデリングによるがんサブタイプの判別を試み、人工知能にネットワーク図を学習させることによりサブタイプ判別をモデリングした。抗がん剤耐性がんサブタイプ判別を安全性評価に用いる方策を考えた。

上皮間葉転換関連分子に関する間葉系幹細胞及びびまん型胃がん細胞における遺伝子発現を解析し、上皮間葉転換分子ネットワークを明らかにした。がんの転移、悪性化や抗がん剤耐性においてはがん幹細胞や上皮間葉転換が関与していることが知られている。がん治療において抗がん剤の安全性を検討することは非常に重要であり、特に抗がん剤耐性や転移能を獲得したがん細胞をターゲットとした抗がん剤の開発及び安全性の検討が必要である。本研究においては、医薬品の安全性について細胞分子シグナルパスウェイネットワーク解析及び人工知能 AI を用いて検討する点が極めて独創的であり、がん関連ネットワークパスウェイにおける抗がん剤ターゲットが明らかとなり、安全な医薬品開発につながることを期待される。本研究では、医薬品副作用や抗がん剤耐性に関するネットワークパスウェイの活性化を予測する手法について人工知能 AI を用いて開発した。分子ネットワーク解析は Ingenuity Pathway Analysis (IPA) を用いて実施し、医薬品副作用や抗がん剤耐性に関するネットワーク図及び活性化情報を収集した。活性化情報と関連させた分子ネットワーク図について AI を用いた機械学習により学習させ、活性化予測モデルを構築した。活性化予測モデルを検証し、AI 予測モデルの精度を向上させた。

本研究では OECD における有害性発現経路 AOP のコーチング及び科学的レビューに関連したガイドライン案を作成し、AOP 開発時に必要な要件等をまとめた。ガイドラインの適用が想定される場面は AOP コーチングや科学的レビューの際であり、その透明性を担保しながら OECD における出版へ導くことが重要である。また、個別 AOP 開発事例として、AOP212 の科学的レビューを経た OECD における公開により、AOP 開発から完成までに至る道筋が示されている。多数の AOP が完成して相互ネットワークを形成することにより、医薬品等の予期せぬ有害反応へ至る経路が明らかとなり、医薬品開発の迅速化が期待される。AOP は、種特異的な情報のみならず普遍的なメカニズムを対象としていることから、環境変化及び環境要因に伴う種々の環境疾患における発症メカニズムが解明され、医薬品の作用ターゲットが同定される可能性が考えられる。現在、*in*

*vitro*や*in silico*のアプローチをベースとした新規アプローチ手法 (New Approach Methodologies; NAMs) のリスクアセスメントにおける活用が世界的に進められており、AOP の枠組みは知識データベースの向上及び化学物質安全性評価に係る行政的応用の観点から重要な位置付けを占めている。本研究により、AOP を用いた医薬品の有効性・安全性の予測という新たな視点を取り入れ、様々な疾患の新たな治療ターゲットや医薬品の有害性発現経路を特定することにより、医薬品やワクチン等の化学物質の有効性・安全性を評価する手法が開発されることが期待される。

上皮間葉転換は、がん幹細胞様の特徴と薬剤耐性の獲得に重要な役割を果たしているが、シグナル伝達経路の正確なメカニズムは完全には解明されていない。腸型及びびまん型胃がんに着目し、公開 RNAseq 遺伝子発現データを解析することにより、胃がんのサブタイプごとの分子パスウェイ制御を解明した。cBioPortal Cancer Genomics の腸型及びびまん型胃がんデータにおいて有意差のあった 2815ID について、Ingenuity Pathway Analysis (IPA) を用いてネットワークパスウェイ解析を実施した。その結果、腸型及びびまん型胃がんにおける MSL3P1、CKS1B、DDX27、GET4、CSE1L、TOMM34、YTHDF1、RAE1、PARD6B、MRGBP の遺伝子発現変化が観察された。MYC、NTRK1、UBE2M との合計 463 リレーションシップが、ネットワークパスウェイ解析によって生成されたバイオマーカーネットワークにおいて同定された。

細胞周期制御や DNA 損傷応答等の分子ネットワーク制御は、がんにおいて重要な役割を果たしている。がんの特徴を明らかにするために、びまん型及び腸型胃がんにおける遺伝子発現及びそのネットワーク制御をプロファイリングした。Ingenuity Pathway Analysis (IPA) によるネットワーク解析の結果、細胞周期調節に関連するカノニカルパスウェイの活性化状態が変化していることが示された。G₁/S チェックポイント調節パスウェイはびまん型胃がんにおいて腸型胃がんより活性化され、染色体複製の細胞周期制御、サイクリン及び細胞周期制御のカノニカルパスウェイは、腸型胃がんにおいてびまん型胃がんより活性化されていた。腸型胃がんにおいては、DNA 損傷応答における BRCA1 の役割に関するカノニカルパスウェイがびまん型胃がんより活性化されていた。mir-10、mir-17 等の microRNA が、G₁/S 細胞周期チェックポイント調節パスウェイに関与していることが確認された。びまん型及び腸型胃がんにおける細胞周期調節に関連するパスウェイ活性化状態の変化により、上皮間葉転換における細胞周期調節の重要性が示された。

上皮間葉転換の活性化は、抗がん剤耐性やがん悪性化に関与し、がん幹細胞と共通の特徴を有していることから、人工知能 (AI) モデリングを用いて、遺伝子発現データにおけるがん上皮間葉転換関連パスウェイの活性化状態を同定した。まず、分子パスウェイに遺伝子発現データを重ね合わせた画像を Ingenuity Pathway Analysis (IPA) で生成した。次に、上皮間葉転換制御パスウェイの活性化パスウェイ 50 画像と不活性化パスウェイ 50 画像のデータセットを、DataRobot 自動機械学習プラットフォームによってモデル化した。最も精度の高いモデルは、Elastic-Net Classifier であった。このモデルを、さらに活性化パスウェイ 10 画像と不活性化パスウェイ 10 画像を用いて検証した。本アプローチにより、上皮間葉転換制御パスウェイが活性化又は不活性化されたがんの表現型が特定され、それによって治療法が適用される可能性のある条件が特定された。がん表現型とがん幹細胞標的は多種多様であることから、本アプローチは細胞表現型遷移のモデル化とシミュレーション及び分子誘発性応答の予測に有効であると考えられる。

プラチナ製剤等の抗がん剤に対する耐性メカニズムは完全には明らかにされていないことから、薬剤耐性メカニズムを明らかにするために、シスプラチン、カルボプラチン、オキサリプラチン、三酸化ヒ素等の抗がん剤の分子ネットワークを解析した。びまん型胃がんは、上皮間葉転換様の特徴を有し、腸型胃がんよりも悪性度が高いことから、びまん型及び腸型胃がんの遺伝子発現と分子ネットワークを解析した。カルボプラチンの解析により、びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫の原因ネットワークが明らかとなった。シスプラチン治療肺腺がんの分子ネットワークの上流調節因子には、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤である抗がん剤トリコスタチン A が含まれていた。シスプラチンの上流レギュレーター解析により、FAS、BTG2、SESN1 及び

DKN1A の増加、腫瘍微小環境パスウェイの関与が明らかになった。分子ネットワークとマイクロ RNA

(microRNA) の相互作用が予測されていることから、薬剤耐性がんの新規創薬標的の同定に寄与する可能性が考えられる。プラチナ製剤オキサリプラチンの解析により、虚血性心筋症では SPINK1 膵がんパスウェイが不活性化されることが明らかとなった。抗がん剤耐性がん治療における抗がん剤の分子ネットワークと腫瘍微小環境の重要性が示された。

英文：

Elucidating the pathological mechanisms of new diseases and treatment-resistant diseases, predicting the mechanism of action of pharmaceuticals and adverse effects and other harmful effects, and evaluating their safety have become a common international issue. It is important for pharmaceutical regulation to predict the harmfulness of developed drugs and evaluate their safety. Since pharmaceuticals act on organs and cells *in vivo* and cause various phenotypic changes such as gene expression fluctuations and cell signaling pathway changes, there is a growing need to improve pharmaceutical regulation by efficiently identifying adverse effect pathways as off-target effects of therapeutics and accumulating basic knowledge of evaluation methods for predicting side effects. In the pathogenesis of treatment-resistant cancers, epithelial-mesenchymal transition (EMT) and cancer stem cells (CSCs) are known to be involved in cancer metastasis, malignancy of cancer, and resistance to anticancer drugs, and it is necessary to elucidate their pathophysiology and develop therapeutic drugs. In light of the fact that the elucidation of pathological mechanisms and the prediction of the harmfulness of pharmaceuticals, etc., have become common international issues, and the development of Adverse Outcome Pathway (AOP) is highlighted in global framework, we aimed to elucidate the pathological mechanism and AOP network using *in silico* analysis using AI tools in this study. Since it is known that various molecular signaling pathways are activated in cancer cells, this study aims to comprehensively analyze the molecular network changes that fluctuate with anticancer drugs using databases, etc., and to examine the safety of anticancer drugs. We mapped the gene expression alteration on each molecular network of cellular molecular signaling pathways and analyzed the biological effects of anticancer drugs. The molecular network and gene expression of EMT-related molecules were examined. It is known that CSCs and EMT are involved in cancer metastasis, malignancy, and anticancer drug resistance. It is very important to study the safety of anticancer drugs in cancer treatment, and it is necessary to develop and study the safety of anticancer drugs targeting cancer cells that have acquired anticancer drug resistance and metastatic potential. In this study, it is extremely original to examine the safety of drugs using cellular and molecular signaling pathway network analysis and artificial intelligence (AI), and it is expected that the anticancer drug targets in the cancer-related network pathway will be clarified, leading to safe drug development. We developed a method to predict the activation of network pathways related to drug side effects and anticancer drug resistance using AI in the study. Molecular network analysis was performed using Ingenuity Pathway Analysis (IPA) to collect network diagrams and activation information on drug side effects and anticancer drug resistance. We learned about molecular network diagrams associated with activation information by machine learning using AI and constructed an activation prediction model. The activation prediction model was verified, and

the accuracy of the AI prediction model was improved. In this study, we prepared guidance related to coaching and scientific review of AOPs in the OECD and summarized the requirements for AOP development. The guidance is applied during AOP coaching and scientific review, and it is important to ensure transparency and lead to publication in the OECD. In addition, as an example of individual AOP development, the path from AOP development to completion is shown by the publication of AOP212 in the OECD Series on AOPs (<https://doi.org/10.1787/b9c4bdb2-en>) after scientific review. By completing a large number of AOPs and forming networks, it is expected that the pathways leading to unexpected adverse reactions of pharmaceuticals will be clarified, and drug development will be accelerated. Since AOP covers not only species-specific information but also universal mechanisms, it is conceivable that the pathogenic mechanisms of various environmental diseases associated with environmental changes and environmental factors will be elucidated, and that targets for the action of pharmaceuticals will be identified. Currently, new approach methodologies (NAMs) *in vitro* and *in silico* are being used worldwide, and the AOP framework occupies an important position from the viewpoint of improving knowledge databases and administrative applications related to chemical safety assessment. This study will lead to further develop methods for evaluating the efficacy and safety of chemical substances such as pharmaceuticals and vaccines by incorporating a new perspective of predicting the efficacy and safety of drugs using AOPs, and by identifying new therapeutic targets for various diseases and AOPs of therapeutics.