

- 4) Yue, D., Maizels, N., & Weiner, A.M. (1996) *RNA*, 2, 895-908.
- 5) Li, F., Xiong, Y., Wang, J., Cho, H.D., Tomita, K., Weiner, A. M., & Steitz, T.A. (2002) *Cell*, 111, 815-824.
- 6) Tomita, K., Fukai, S., Ishitani, R., Ueda, T., Takeuchi, N., Vassilyev, D.G., & Nureki, O. (2004) *Nature*, 430, 700-704.
- 7) Toh, Y., Takeshita, D., Numata, T., Fukai, S., Nureki, O., & Tomita, K. (2009) *EMBO J.*, 28, 3353-3365.
- 8) Toh, Y., Takeshita, D., Nagaike, T., Numata, T., & Tomita, K. (2011) *Structure*, 19, 232-243.
- 9) Bard, J., Zhelkovsky, A.M., Helmling, S., Earnest, T.N., Moore, C.L., & Bohm, A. (2000) *Science*, 289, 1346-1349.
- 10) Martin, G., Keller, W., & Doublié, S.C. (2000) *EMBO J.*, 19, 4193-4203.
- 11) Betat, H., Rammelt, C., Martin, G., & Mörl, M. (2004) *Mol. Cell*, 15, 389-398.

富田 耕造

((独)産業技術総合研究所バイオメディカル研究部門)

Mechanism of template-independent RNA polymerization
Kozo Tomita (Biomedical Research Institute, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), 1-1-1, Higashi, Tsukuba, Ibaraki 305-8566, Japan)

細胞内シグナル伝達の可視化技術と分子標的治療薬の耐性判定への応用

はじめに

下村脩博士によって、*Aequorea victoria* の発光器官から緑色蛍光タンパク質 GFP (green fluorescent protein) が発見され、1992年にそのcDNAが単離されて以来、生細胞イメージングは生物学研究の必須ツールになっている。シグナル伝達のネットワークにおいては、構成要素であるタンパク質の局在のみならず、他のタンパク質との相互作用、リン酸化をはじめとする翻訳後修飾、構造変化や酵素活性など質的变化がダイナミックに生じている。これらの動的イベントの可視化を可能にする技術の一つが、フェルスターの蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET, Förster/fluorescence resonance energy transfer) である。本稿では、これら蛍光イメージングを用いたイメージングの基礎と、最近我々が開発した FRET バイオセンサーを用いた体外診断薬の臨床検査手法としての適応や有用性について紹介したい。

1. 細胞内シグナル伝達の可視化技術

(1) 緑色蛍光タンパク質 (green fluorescent protein, GFP)

今さら改めて紹介するまでもないが、下村脩博士によってオワンクラゲの発光器官から単離された蛍光タンパク質であり¹⁾、下村博士はその功績により Roger Y. Tsien, Martin Chalfie と共に 2008 年ノーベル化学賞を受賞した。GFP がこれほどまでに普及した契機は、1992年のcDNA単離であり²⁾、以来 GFP と解析したい分子との融合タンパク質をコードする発現ベクターを遺伝子導入するだけで細胞を「染め上げる」ことが可能となった。過剰発現系の実験ではあるが、生理的環境下での生きた細胞の観察が可能であり、ダイナミックなタンパク質動態や環境変化の可視化に汎用されている。現在多くの変異体やクラゲ以外の刺胞動物由来の蛍光タンパク質が開発され、カラーバリエーションが非常に豊富となり、選択可能な波長域も広がった。短波長・長波長側の端的な例として、北海道大学の永井健治博士らによって開発され、15年ぶりに蛍光タンパク質の最短波長記録更新となった群青色蛍光タンパク質 Sirius (励起波長: 355 nm; 蛍光波長: 424 nm)³⁾ から、近赤外の蛍光タンパク質⁴⁾等があげられる。

(2) フェルスターの蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET)

共鳴エネルギー移動現象自体は発光物質等でも生じるが、ここでは蛍光タンパク質を用いた FRET に限定する。FRET はドナー (エネルギー供与体) からアクセプター (エネルギー受容体) へと励起エネルギーが移動する現象である^{5,6)}。GFP を用いた FRET ではシアン色と黄色の蛍光タンパク質のペア (CFP と YFP) が使用される場合が多く、両者が近接した時のみドナーである CFP の励起エネルギーがアクセプターである YFP へと遷移し FRET が観察される (図 1A)。会合状態を調べたい 2 分子をそれぞれ CFP と YFP との融合タンパク質として発現させると、相互作用時のみ FRET を観察する系ができ、これは分子間 FRET (または二分子 FRET) と呼ばれる (図 1B)。この二分子をさらに融合させ、一つの分子で FRET を生じさせる系も構築可能で、分子内 FRET (または一分子 FRET) と呼ぶ (図 1C)。

GFP を用いた FRET バイオセンサーを最初に開発したのは当時 Tsien 研究室にいた宮脇敦史博士であり、カルシウムセンサー Cameleon はあまりに有名でもはや説明は不要であろう⁷⁾。それに引き続き多数の FRET バイオセンサー分子が開発され、様々なシグナル伝達分子のイメージング

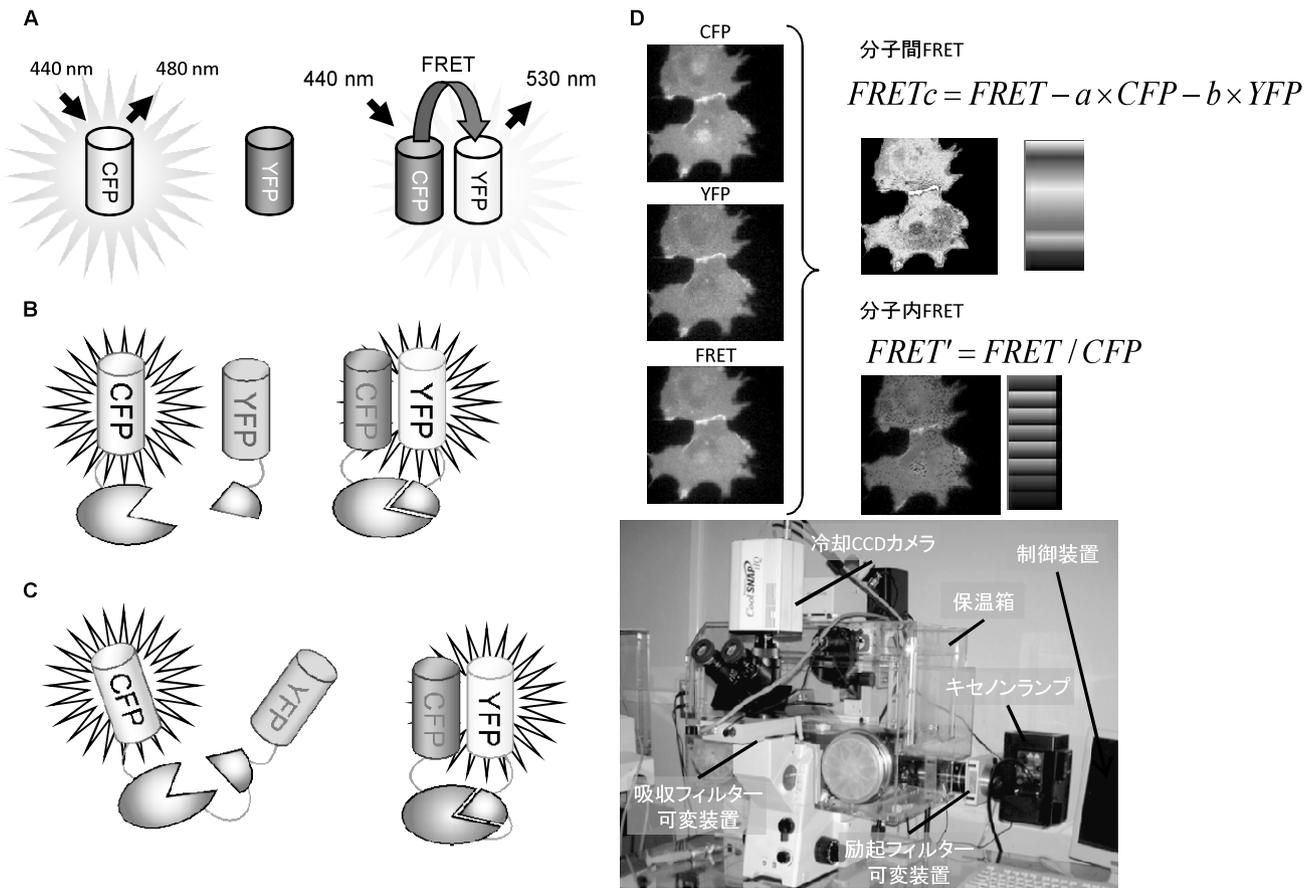


図1 FRETの原理とFRETバイオセンサーの例

A) GFPを用いたFRETの原理. CFPとYFPが離れている時は440 nmの光でCFPを励起するとCFP本来の蛍光である480 nmの光が観察される. CFPとYFPが近接する時にはCFPの励起エネルギーがYFPに遷移することで440 nmの励起光で530 nmの蛍光が観察される. CFP, cyan fluorescent protein; YFP, yellow fluorescent protein; FRET, Förster/fluorescence resonance energy transfer

B) 分子間FRETの模式図

C) 分子内FRETの模式図

D) FRET観察の一例

が行われている. 低分子量Gタンパク質の分子センサー群については京都大学の松田道行博士の研究室が精力的に開発を進めており, それら一連の仕事をまとめた素晴らしいホームページも公開されているので, 一度訪れてみることをお勧めする (<http://www.lif.kyoto-u.ac.jp/labs/fret/>).

FRETを測定する手法はいくつかあり, アクセプターを褪色させる方法, 蛍光寿命を測定する方法, ドナーとアクセプターの蛍光強度比を元にFRET効率を算出する方法, 等があげられる. このうち, 蛍光強度比による算出法は, 厳密な意味での定量的データは得られないものの, 他の手法に比べ比較的簡便かつ高速にイメージングが可能である

ことから我々も愛用している. 具体的には, 顕微鏡にセットした異なるフィルターを介してドナーとアクセプターの蛍光画像を取得し, 得られた画像から背景光を減算した後, FRET効率を画像解析ソフトで算出する (図1D).

2. 慢性骨髄性白血病と分子標的治療薬

本邦の死因第一位は悪性新生物 (すなわち「がん」) であり, がん細胞内では多くの場合, シグナル伝達分子, 特に増殖シグナルに関与するタンパク質に異常 (変異あるいは過剰発現等) が認められる. この異常タンパク質に特異的に作用する分子標的治療薬は, 高効果かつ低副作用を実現する「理想的な薬剤」として期待されており, 慢性骨髄

性白血病 (chronic myeloid leukemia, CML) は典型的な成功例といえる。

CMLは骨髄の造血幹細胞に異常染色体(フィラデルフィア染色体・Ph1)が形成され、白血病の原因タンパク質BCR-ABLが細胞内に出現し発症する血液のがんである⁸⁾。10年ほど前に登場したBCR-ABLに対する分子標的治療薬イマチニブは、5年生存率80%という、がんに対する保存的治療法(手術以外の治療法)の常識を覆すかの治療成績を叩き出し、CMLを不治の病から経口薬でコントロールできる病気へと変化させた。

しかし、イマチニブ服薬でCMLが完治するわけではなく、患者は継続した内服を強いられている。また、イマチニブが無効例、あるいは治療途中から無効に転化する症例も少なからず存在する。近年では第二世代分子標的治療薬であるニロチニブやダサチニブが使用可能となり、患者に使用できる薬剤の選択肢は拡大したものの、これまで使用薬剤の有効性評価は、実際に投薬治療を行い、数ヶ月から1年以上に亘る血液検査や骨髄検査の結果を元に判断するより他なかった。

3. CMLの検査法と課題

CMLの病勢診断や薬剤効果評価のため、これまで様々な手法が実臨床で使用されている。fluorescent *in situ* hybridization (FISH)によるPh1検出とRT-PCR法によるBCR-ABL転写産物量定量の組合せが現在最も汎用されているCML病勢判定基準である。BCR-ABLの変異と薬剤感受性との関連性も精力的に調べられており、代表的変異であれば有効薬剤の選択が可能である。薬剤効果の直接予測には、BCR-ABLチロシンキナーゼ活性測定が必要だが、BCR-ABLの基質CrkLのリン酸化特異的抗体とウエスタンブロッティング、フローサイトメトリー、ELISA法等の組合せが試験的に用いられている。しかしながら、現状使用されている上記検査法は、あくまで現在のCML病態の把握、すなわち薬剤投与後の結果を判定しているにすぎず、将来の薬剤選択に関する客観的判断を下す根拠は得られないのが実情である。我々は、蛍光タンパク質を用いたバイオイメージング技術を導入し、新規BCR-ABL活性測定試薬を開発することで、患者一人一人の白血病細胞に対する薬剤有効性評価法の実用化を目指している。

4. BCR-ABL活性測定試薬 Pickles の開発

(1) 設計および基本性能

CrkLはBCR-ABLの代表的基質で、細胞増殖亢進等

種々のがん化プロセスに関与する。CrkLはBCR-ABLにリン酸化されるチロシン残基(Y207)以外に、Srcホモロジドメイン2と3(SH2およびSH3)を有する(図2A)ため、BCR-ABLによるリン酸化や阻害薬によるBCR-ABL抑制により、リン酸化チロシンとSH2の会合状態に応じた構造変化が生じる(図2A)。この性質を利用してBCR-ABL活性をモニターするバイオセンサーPickles(Phosphorylation indicator of CrkL *en* substrate)を設計した(図2B)。CrkLの両端にYFPとCFPを付加することで、BCR-ABL活性依存的にFRET効率が上昇し、逆に阻害薬によるキナーゼ活性抑制に伴いFRETが減少する(図2B)。

実際の臨床応用に資するセンサー分子の開発には様々な改良を要したが、ここでは詳細は省く⁹⁾。最終完成版version 2.31(Pickles 2.31)は、BCR-ABLによるリン酸化に伴いFRET効率が80~100%程度上昇し、既存の手法(ウエスタンブロッティング法)に比べてより低濃度から抑制効果を検出することができ、結果としてより広範な濃度域で抑制効果の評価可能であった(図2C)。また、CML細胞を用いた経時的薬剤反応性の観察では薬剤投与3-6時間後にはBCR-ABL活性の完全抑制が見られ(図2D)、12時間以内に薬効評価が可能であることが明らかになった。

(2) 薬剤耐性細胞検出能力

FRETを応用したPicklesによる薬剤反応性判定における最も特筆すべき優位性は、評価を一つ一つの細胞に対して行えることである。Picklesは薬剤感受性細胞群の中から1%以下の薬剤耐性細胞を同定することが可能だが、顕微鏡を用いた手作業での観察に依存する現行システムでは、検出率1%は事実上最高感度である。今後コンピュータ制御による自動画像取得が実現して解析細胞数を増やすことができれば、さらに少ない耐性細胞を同定可能であると期待される。

(3) G250Eパラドックス

既に述べたように、代表的なBCR-ABLの変異については有効な薬剤がある程度特定できるようになりつつある。しかし、250番目のグリシンがグルタミン酸に変異したG250Eという変異に関しては、第二世代薬剤のうちニロチニブの有効性が報告により異なっている^{10,11)}。そこで我々はPicklesを用いてこの原因を究明することにした。実際にG250E変異BCR-ABLを細胞導入して解析を行うと、細胞間の薬剤感受性のばらつきが大きく、結果として標準偏差が増大した。そこで、BCR-ABLの発現量を調整

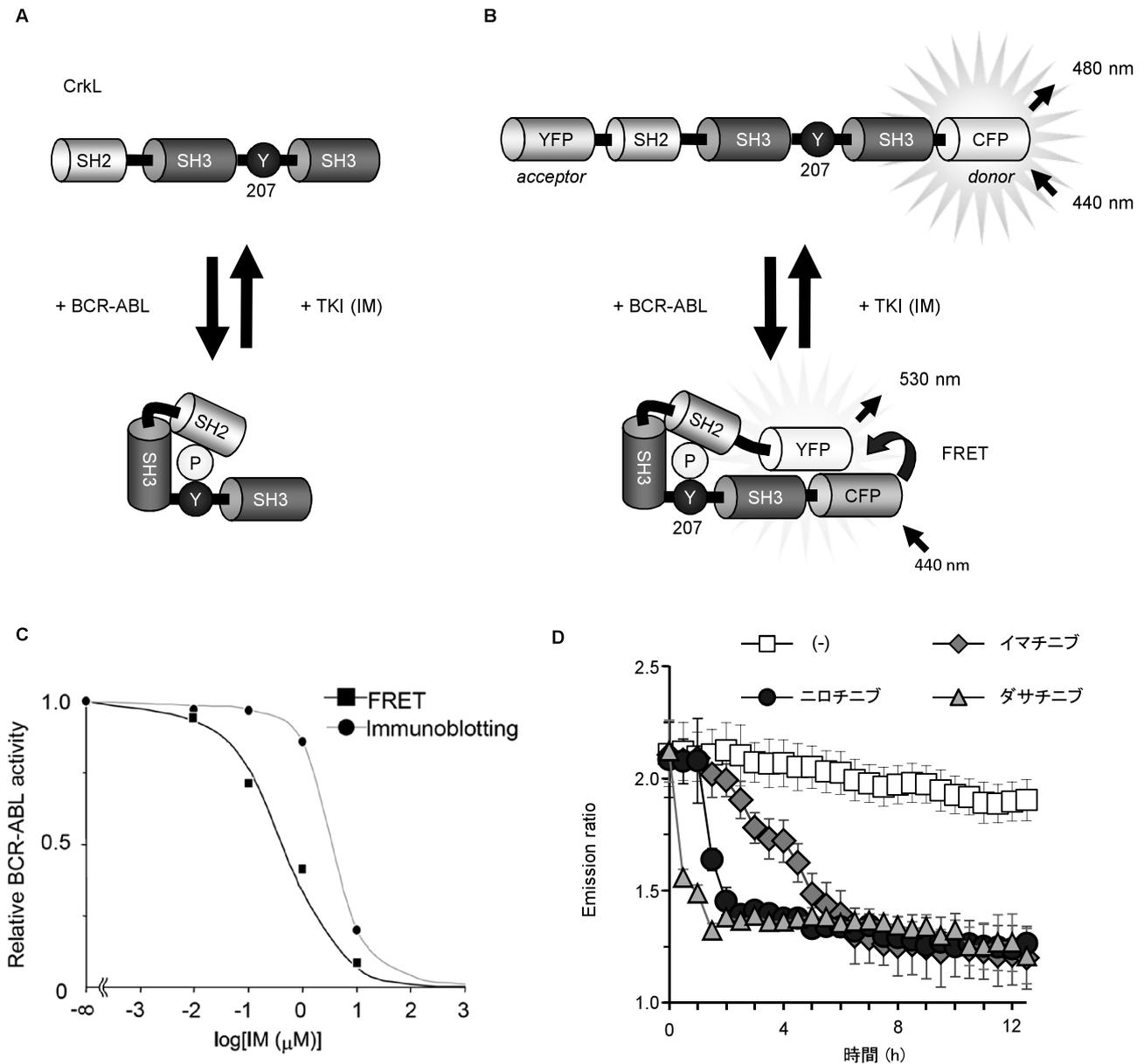


図2 BCR-ABL 活性測定試薬 Pickles

A) CrkL の構造. N 末から順に, SH2 ドメイン, SH3 ドメイン, BCR-ABL によりリン酸化されるチロシン (Y), SH3 ドメインからなる. BCR-ABL により 207 番目のチロシンがリン酸化されると, SH2 ドメインがリン酸化チロシンに結合することで折り畳まれた構造に変化する. 逆にイマチニブによって BCR-ABL 活性が抑制されると開いた構造に復帰する. SH, src homology; TKI, tyrosine-kinase inhibitor (チロシンキナーゼ阻害薬); IM, imatinib mesylate (メシル酸イマチニブ)

B) Pickles の構造

CrkL の両端に YFP と CFP を付加することで, BCR-ABL による CrkL 上のチロシンリン酸化に伴い FRET が生じる分子を設計した.

C) Pickles とイムノブロットの感受性比較

293F 細胞に BCR-ABL と Pickles を発現させ, 様々な濃度のイマチニブ処理による BCR-ABL の活性抑制効果を Pickles (FRET) とイムノブロットで比較した. Pickles の方がより低濃度から抑制効果を検出し, かつ検出域が広範囲であることが解る. BCR-ABL の活性はイマチニブ未処理のサンプルに対する比活性で表している.

D) 各薬剤による時間依存的な BCR-ABL 活性抑制効果

ヒト慢性骨髄性白血病由来 K562 細胞に Pickles を発現させ, タイムラプス顕微鏡で FRET 効率を経時的に観察した. 時間 0 で各薬剤処理を開始した.

し再度実験を行ったところ、G250E変異とニロチニブの組合せ時のみ、BCR-ABLの発現量に依存して薬剤反応性が低下することが明らかになった。したがって、薬剤感受性が認められると結論づけた報告の症例ではG250E変異を持つ患者腫瘍細胞のBCR-ABL発現量は少なく、逆に抵抗性であるとした報告の症例においては発現量が高かったと示唆される。BCR-ABLの発現量と薬剤感受性との相関は以前から指摘されていたが¹²⁾、G250Eの場合はその傾向が特に顕著なようである。もう少し言及すると、細胞集団全体の平均的なBCR-ABLの発現量よりも、むしろBCR-ABLの発現量の多い細胞がどれほど存在しているかが問題なのであろう。個々の細胞におけるBCR-ABL発現量と薬剤応答性の関連性は本法が初めて証明し得たことであり、今後さらなる検討が必要である。しかし、いずれにせよこの変異が検出された場合は、BCR-ABL発現量に注意する必要がある、結果により使用可能な薬剤オプションが変わることを明記したい。

5. 分子標的治療薬反応性試験

現在我々のプロジェクトは、各研究施設における倫理委員会の承認を得て、文書にて同意の得られた患者から採取されたCML細胞を用い、Picklesにより薬剤評価を行う段階にある。実施開始後2年間で20以上の症例について延べ50解析以上が実施済みである。今後の注意深い経過観察が必要な症例も多いが、初期に解析を実施し治療開始後の経過観察が十分なされている症例では、我々が治療に先立って実施した検査が、薬剤反応性の予測や薬剤耐性細胞の検出に有用だったことが証明されている（治療効果の低下がCML細胞自体の反応性に起因しないもの、例えば副作用での休薬等は除く）。実際の解析は、患者さんから採血あるいは骨髄穿刺により末梢血や骨髄細胞を採取するところから始まるが、これらの手技はCMLの定期的な診断・検査に含まれるもので、本検査のために取り立てて患者への侵襲が増えることはない。いずれのサンプルにおいても、密度勾配遠心法で腫瘍細胞を含む単核球分画を分離精製した後、これらの細胞に電気穿孔法を用いてPicklesをコードする発現ベクターを導入する。24時間後にPicklesの発現による蛍光を確認の上薬剤処理を開始し、顕微鏡で撮影した画像から個々の細胞におけるFRET効率を算出する（図3A）。

慢性期のCMLでは各分化段階にある細胞が混在しており、必ずしもすべての細胞でBCR-ABLの活性が高いわけではない。この現象はFRET効率の分布にも反映される。

そこでBCR-ABL活性が高い細胞を同定するための閾値(D-FRET)を設定した。この値はBCR-ABLを発現していない細胞が示すFRET効率の平均値と標準偏差から数学的に決定したものである。BCR-ABL活性の低い細胞がD-FRETを越える確率は、0.003未満であるため、この値より高いFRET効率を示す細胞のBCR-ABL活性は有意に高い。

我々はこのようなプロセスと判断基準のもと判定作業を行っている。末梢血および骨髄細胞共にD-FRETより上方に位置した細胞が薬剤処理により消失すれば「薬剤感受性」、逆に両者共に細胞が残存すれば「薬剤耐性」と判定される（図3B）。さらに注意深くFRET効率の分布パターンと臨床経過を比較検討したところ、初発時の解析により治療後の薬剤への反応性がある程度予想できることが明らかになってきた。例えば、末梢血は薬剤感受性を示すにも関わらず、骨髄では薬剤耐性細胞が残存する症例では、治療開始当初は順調に腫瘍細胞が減少したものの、12ヶ月後でも細胞遺伝学的寛解あるいは分子遺伝学的効果が得られず、suboptimal responseとなり、治療薬の投与量や種類の変更を余儀なくされた。おそらく最初に骨髄で検出された薬剤耐性細胞が経過中に再燃したためではないかと考えられる。

6. 今後の展望と課題

本システムはセンサー分子を遺伝子の状態で腫瘍細胞に導入し、腫瘍細胞自身のタンパク質合成能力を利用して腫瘍細胞内に発現させる手法をとっている。このため診断の成否が遺伝子導入効率に左右されるのが問題点である。実際、同じような細胞集団であっても患者によってPicklesの導入効率は異なり、いかに安定した導入効率を得られるかが課題である。我々もこの点については鋭意検討を進めているが、画期的な遺伝子導入法の開発が待たれるところである。

もう一つの課題は、本技術の臨床現場への普及である。解析についてはMetaMorphという画像解析ソフトの自動化機能を採用することである程度オートメーション化されたが、画像取得過程の大部分はまだまだ手作業での顕微鏡撮像に依存しており、修練を積んだ研究員が必要である。本技術を臨床応用するためには、例えば電動顕微鏡を用いて自動的に画像取得を行うなど、誰にでも簡単に解析可能な体制の確立が求められる。あるいは検査拠点を形成してサンプルを一手に引き受けて判定するという方法にも期待が持てる。遺伝子導入には新鮮なサンプルの方が良好な結果

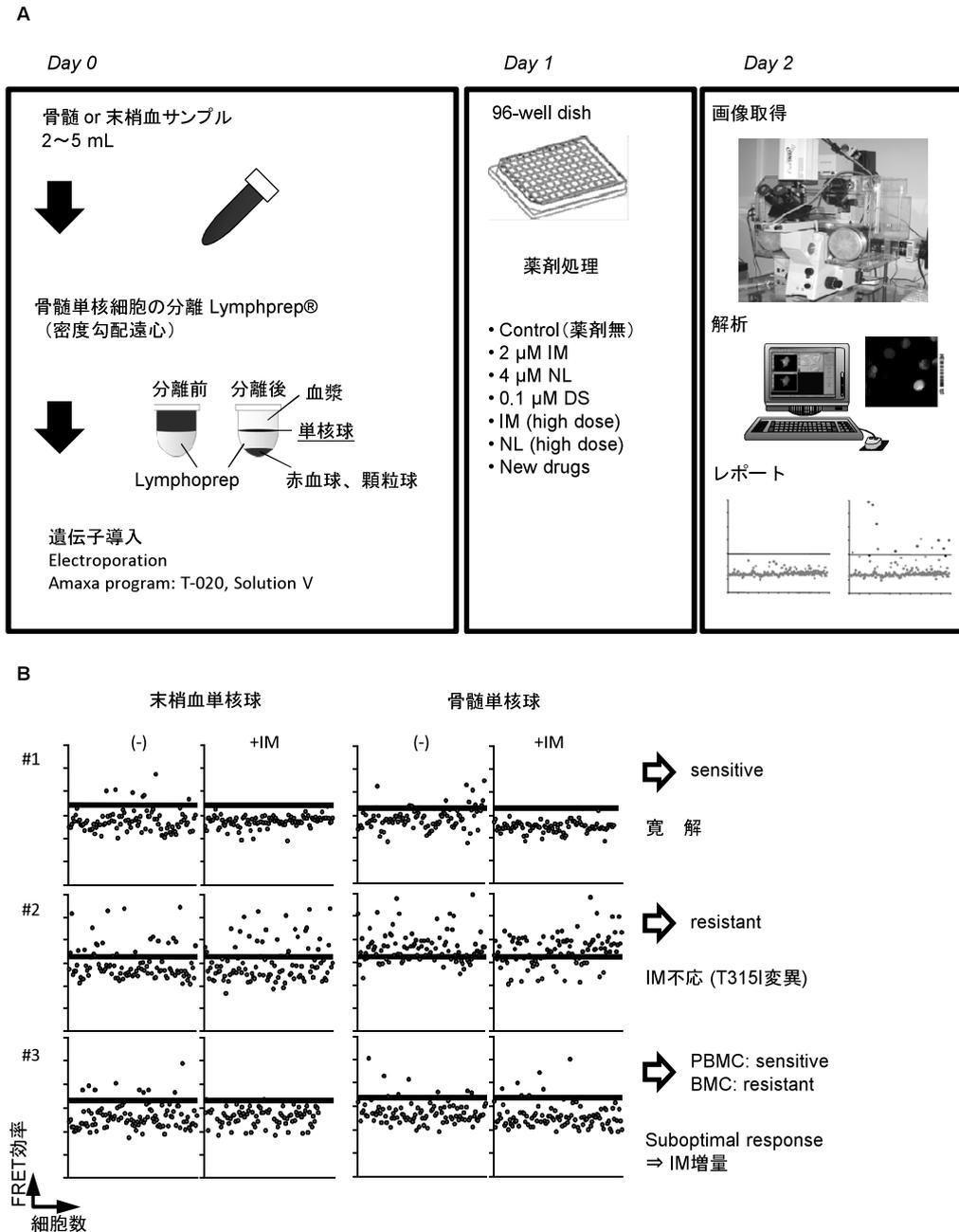


図3 FRETを用いた薬剤感受性試験

A) 検査の流れ

B) 患者細胞を用いた薬剤感受性試験の実例。感受性試験の典型3例を示す。各グラフの横軸は観察した細胞を観察順に展開したものの、縦軸はFRET効率を示す。太い水平線はD-FRET。症例1では末梢血・骨髓ともにイマチニブ処理(IM)によりBCR-ABL活性が抑制されるため薬剤感受性と判定された。患者はイマチニブに非常に良く反応し、12ヶ月で分子遺伝学的完全寛解が得られた。症例2は両サンプルとも薬剤抵抗性であり、その後の検査で多剤耐性変異であるT315が検出された。症例3は末梢血と骨髓細胞が異なる薬剤反応性を示し、末梢血は感受性、骨髓細胞は抵抗性であった。当該患者はイマチニブ治療により3ヶ月で血液学的完全寛解、細胞遺伝学的にも順調な経過をとっていたが、12ヶ月後に分子遺伝学的完全寛解が得られずsuboptimal responseとなった。その後イマチニブの増量、ニロチニブへのスイッチが試みられているが、治療後30ヶ月を経た現在も分子遺伝学的完全寛解は得られていない。

が得られるため、サンプルの保存・移送の問題も克服する必要がある。これらの課題をクリアし、できるだけ早い時点で診断技術として確立されることを目指している。

おわりに

蛍光タンパク質はこれまで生物学研究に文字通り多くの光を照らしてきた。とりわけ蛍光タンパク質を用いたFRETは、生きた細胞内で起こる現象を色の変化として捉えられる画期的なイメージング技術で、世界的にも頻用されている。しかしこれまで、これらの技術が利用されるのは純粋な基礎研究分野に限られていた。今回の我々の研究は、GFPに臨床現場での活躍の場を与える最初の一步と位置づけられ、Clinical Cancer Research誌の論説においても、本成果はテーラーメイド医療に向けた「pioneer study (先駆的研究)」として紹介されている¹³⁾。しかし、実際に医療現場に普及してこそ真に評価されるものであり、その点に鋭意努力する所存である。本技術の利点としては治療効果の向上のみならず、最大治療効果が得られる時間を短縮できることがあげられる。また、分子標的治療薬は大変高価であるため、本技術の臨床現場への普及は経済的かつ効率的な医療の実践にも繋がると思われる。さらに本手法には生きた細胞を解析するという他の検査には類を見ない特徴があり、単なる臨床的効果だけでなく薬剤耐性機構解明への発展も期待できる。

- 1) Morise, H., Shimomura, O., Johnson, F.H., & Winant, J. (1974) *Biochemistry*, 13, 2656-2662.
- 2) Prasher, D.C., Eckenrode, V.K., Ward, W.W., Prendergast, F. G., & Cormier, M.J. (1992) *Gene*, 111, 229-233.
- 3) Tomosugi, W., Matsuda, T., Tani, T., Nemoto, T., Kotera, I., Saito, K., Horikawa, K., & Nagai, T. (2009) *Nat. Methods*, 6, 351-353.
- 4) Shcherbo, D., Shemiakina, I.I., Ryabova, A.V., Luker, K.E., Schmidt, B.T., Souslova, E.A., Gorodnicheva, T.V., Strukova, L., Shidlovskiy, K.M., Britanova, O.V., Zaraisky, A.G., Lukyanov, K.A., Loschenov, V.B., Luker, G.D., & Chudakov, D.M. (2010) *Nat. Methods*, 7, 827-829.
- 5) Miyawaki, A. (2003) *Dev. Cell*, 4, 295-305.
- 6) Miyawaki, A. (2011) *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 12, 656-668.
- 7) Truong, K., Sawano, A., Mizuno, H., Hama, H., Tong, K.I., Mal, T.K., Miyawaki, A., Ikura, M. (2001) *Nat. Struct. Biol.*, 8, 1069-1073.
- 8) Kurzrock, R., Gutterman, J.U., & Talpaz, M. (1998) *N. Engl. J. Med.*, 319, 990-998.
- 9) Mizutani, T., Kondo, T., Darmanin, S., Tsuda, M., Tanaka, S., Tobiume, M., Asaka, M., & Ohba, Y. (2010) *Clin. Cancer Res.*, 16, 3964-3975.
- 10) O'Hare, T., Walters, D.K., Stoffregen, E.P., Jia, T., Manley, P.

W., Mestan, J., Cowan-Jacob, S.W., Lee, F.Y., Heinrich, M.C., Deininger, M.W., & Druker, B.J. (2005) *Cancer Res.*, 65, 4500-4505.

- 11) Redaelli, S., Piazza, R., Rostagno, R., Magistrini, V., Perini, P., Marega, M., Gambacorti-Passerini, C., & Boschelli, F. (2009) *J. Clin. Oncol.*, 27, 469-471.
- 12) Gorre, M.E., Mohammed, M., Ellwood, K., Hsu, N., Paquette, R., Rao, P.N., & Sawyers, C.L. (2001) *Science*, 293, 876-880.
- 13) Lu, S. & Wang, Y. (2010) *Clin. Cancer Res.*, 16, 3822-3824.

大場 雄介, 津田 真寿美
(北海道大学大学院医学研究科)

Visualization of intracellular signaling and its application to assessment of response to molecular target drugs
Yusuke Ohba and Masumi Tsuda (Laboratory of Pathophysiology and Signal Transduction, Hokkaido University Graduate School of Medicine, N15W7, Kita-ku, Sapporo 060-8638, Japan)

非ステロイド系抗炎症薬の新しい薬理効果とその分子機構

1. はじめに

ケミカルバイオロジーとは、有機化合物を用いて生命科学研究を行うことであり、近年世界的に注目されている分野である。本稿のキーワードであるドラッグリプロファイリング研究 (Drug re-profiling research, DR 研究) とは、現在臨床で使われている医薬品 (既存薬) を用いたケミカルバイオロジー研究と位置づけることが出来る。

既存薬の中には、その作用機構がよく分かっていないものが多い。特に古くから使われてきた薬 (いわゆる“いい”薬) にこのケースが多い。これは病気に効くことが伝承されてきた天然物などからその医薬品が開発されたため、「なぜ効くか？」という研究がなされて来なかったためである。またそのような医薬品が開発された頃は、現在のように分析手法が確立されておらず、分子レベルでの作用機構の検討が難しかったのも原因である。さらに新薬の開発に比べ、副作用研究があまり注目されてこなかったこともあり、副作用に関しては、その発症機構が解明されていないものがほとんどである (後述する非ステロイド系抗炎症薬 (NSAID) による胃潰瘍など)。一方疫学調査により、既存薬の新しい薬理作用 (後述する NSAID の抗が