

令和 2 年 11 月 24 日

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 平成 30 年度

受付番号 201860135

氏 名 西賀 雅隆

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地（派遣先国名）用務地：スタンフォード大学（国名：米国）

2. 研究課題名（和文）※研究課題名は申請時のものと変わらないように記載すること。

ヒト iPS 細胞を用いた化学療法誘発性心毒性の機序解明

3. 派遣期間：平成 30 年 10 月 1 日 ～ 令和 2 年 9 月 30 日

4. 受入機関名及び部局名

受入機関名：Stanford University

部局名：Stanford Cardiovascular Institute

5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 書式任意 (A4 判相当 3 ページ以上、英語で記入も可)

(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)

(注)「6. 研究発表」以降については様式 10－別紙 1～4 に記入の上、併せて提出すること。

【研究の進捗状況のまとめ】

近年、抗がん剤治療の進歩によって、がん自体の生命予後が改善したが、それに伴い、抗がん剤治療中および治療後のがん以外のケアが重要になっている。特に、心臓への毒性を有する抗がん剤は多く、がん患者ではがん治療中および治療後に心不全を発症することがしばしば起こる。したがって、抗がん剤による心毒性の予防と治療が重要である。近年、がん治療による心毒性、がん患者の循環器病、循環器病患者のがん等を対象とする研究は、急速に需要が高まっており、Cardio-oncology として注目されるようになってきている(図1)。

がん治療による心毒性は予測・予防が困難である

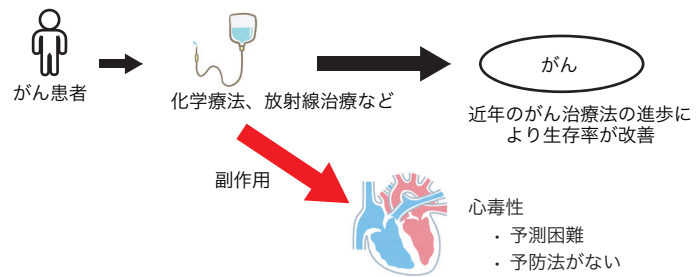


図1. がん治療による心毒性

近年のがん治療法の進歩により、がん患者の生存予後は改善したものの、治療に伴う副作用ががん治療後に問題になることが増加してきている。特に化学療法による心毒性は頻度の高い合併症である。

本計画では、抗がん剤による心臓への毒性、特にドキソルビンによる心毒性に焦点をあてる。抗がん剤は、がん細胞の増殖を抑え、細胞死させることを目的として使用されるが、一方で、我々の体内の正常細胞にも影響を与える。一般的に、抗がん剤は、がん細胞への影響と正常細胞への影響の差を利用して、がんを治療するため、正常細胞への影響はがん細胞への影響よりも少ない。しかし、正常細胞への影響の程度は患者一人一人によって異なる。それぞれの患者の薬剤感受性は、もともとのがんや合併症に加えて、いわゆる「体質」によるところが大きく、遺伝的背景の影響が考えられている。したがって、患者個人の遺伝的背景を反映した手法にて、がん治療の前にリスクを評価すること、および、がん治療による心毒性を抑えることが今後の課題である。

患者由来 iPS 細胞は、それぞれの患者の遺伝情報を反映できるため、がん治療による心毒性の機序解明や新たな薬剤探索に有用である可能性が高い。派遣先の Stanford University Joseph Wu lab では、循環器疾患の患者由来 iPS 細胞を 1000 症例以上作製し、Stanford CVI Biobank にストックしている。このストックされた iPS 細胞を心筋細胞、内皮細胞、平滑筋細胞などへ分化させ、もとの疾患を *in vitro* で再現し、疾患メカニズムの解明やドラッグスクリーニングに応用している(図2)。

私は派遣先の Stanford University Joseph Wu lab にてドキソルビン心毒性の機序解明を目的とし

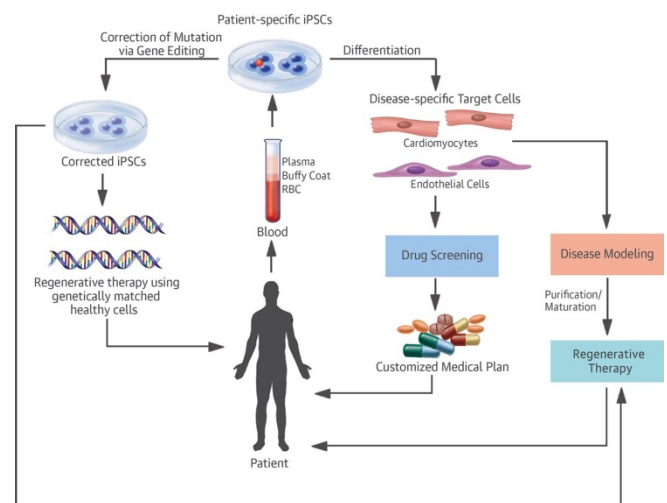


図2. 患者由来 iPS 細胞を用いた疾患研究

iPS 細胞はドナー患者の遺伝情報を *in vitro* で再現できる。Sayed N, Liu C, Wu JC. J Am Coll Cardiol. 2016 May 10; 67(18): 2161–2176.

A

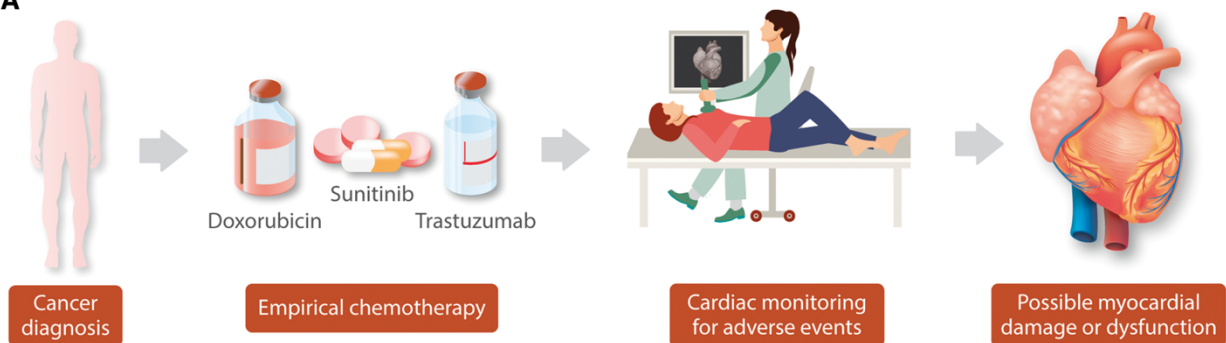


図3A. 現在の抗がん剤による心毒性の検査

抗がん剤による心毒性は、現在のところ、薬剤使用後に早期発見のための検査がなされている。薬剤使用前に予測することは困難である。Sayed N, Ameen M, Wu JC. Cardiovasc Res. 2019 Apr 15;115(5):949-959

B

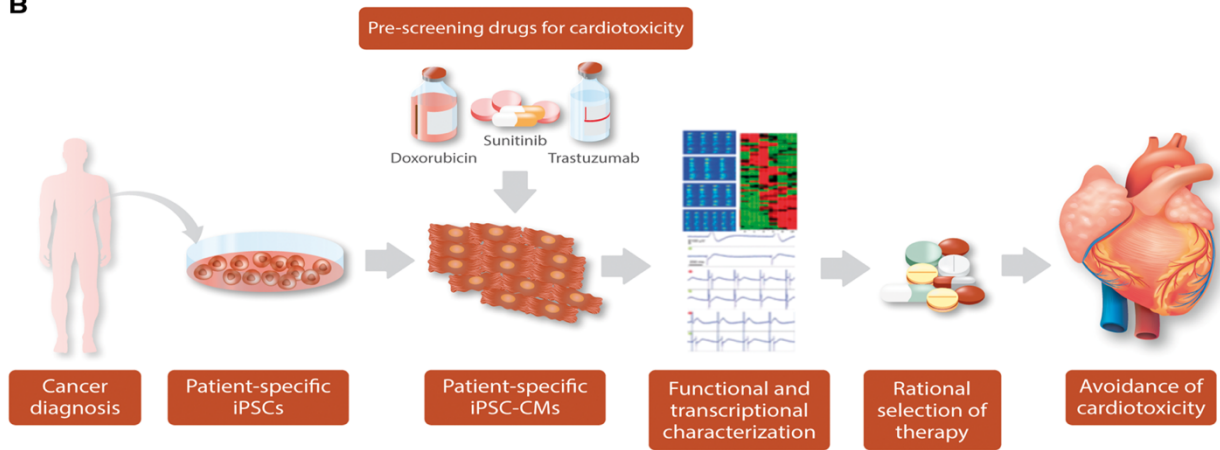


図 3B. iPS 細胞を用いた抗がん剤心毒性の再現

患者由来 iPS 細胞を用いることで、薬剤反応性を事前に患者遺伝情報を反映した心筋細胞で検査することが可能であり、それぞれの患者に最適な薬剤選択に役立つことが期待される。また、副作用予防方法の探索にも使用できる。Sayed N, Ameen M, Wu JC. Cardiovasc Res. 2019 Apr 15;115(5):949-959

て、患者由来 iPS 細胞を利用し、ドキソルビシン心毒性を引き起こす原因遺伝子や SNP の同定、およびゲノム編集技術による原因遺伝子の検証を予定した。研究は順調に進んでおり、当初の予定にはなかった CRISPR スクリーニングも取り入れ、予定以上に進捗していると考えられる。

【背景と目的】

近年、悪性疾患に対する化学療法施行後の予後改善に伴い、これまで以上に、抗がん剤による心毒性・心不全が問題となることが増えている。心毒性を示す抗がん剤は多岐にわたるが、特に、リンパ腫・白血病・卵巣癌・肺癌・乳癌等に対して広く使用されているドキソルビシンは高頻度に心毒性を引き起こす抗がん剤（急性期 11%、慢性期 36%）として古くからよく知られている。ドキソルビシンに対する耐性の低い患者ではドキソルビシン投与後に左室収縮能（EF）が著しく低下し重篤な心不全を発症する。患者のもつ合併症・投与量などのリスクファクターは報告されているものの、現在のところ、それぞれの患者の薬剤感受性（耐性）を投与前に評価することは困難で、心毒性の頻度の高い薬剤を投与した場合には、早期発見のために心臓超音波検査などを定期的に行っている。（図 3）。したがって、患者個人の薬剤感受性（耐性）の評価および心毒性予防法の開発が重要と考えられる。

ドキソルビシン心毒性の機序としては、細胞株や動物モデルの研究から、①活性酸素（ROS）の産生、②ミトコンドリア機能不全、③トポイソメラーゼ II 阻害による DNA 傷害が関与していることが示されている。しかし、実際の臨床でのドキソルビシン心毒性は個人差が大きく、遺伝的背景の関与が示唆されるが、その機序は不明であるため、心毒性を抗がん剤の投与前に予測することはできない。

ドキソルビシンによる心毒性の機序が未解明である原因は、これまでヒトの心筋細胞を用いた解析ができないことにあった。患者由来の心筋細胞を培養することは現実的に不可能であり、また、動物モデルではヒトの心筋細胞に対する毒性（特に個人差）を検討できないためである。iPS 細胞技術を用いることで、ヒトの心筋細胞を作成し培養することが可能であり、特に患者由来 iPS 細胞を使えば、患者の遺伝的背景を反映した心筋細胞を用いることができる。したがって、これまでの問題を克服でき、機序解明に繋げることができると考えられる。

派遣先（スタンフォード大学 Wu lab）では、ドキソルビシンによる心毒性を起こした患者由来の iPS 細胞を心筋細胞に分化させ（iPSC-CM）、患者の心毒性の起こりやすさ（ドキソルビシン感受性）を正確に再現できる実験系を確立した[Burridge PW et al. Nat Med 2016][Sharma A et al. Sci Transl Med 2017]（図 4）。この手法を用いて、ドキソルビシン感受性の原因となる遺伝子多型（SNP）を同定し、ドキソルビシン心毒性の分子機序を解明することを目的とする。

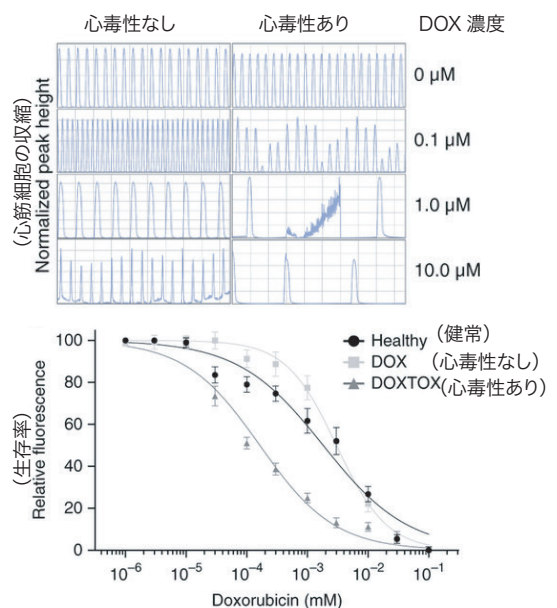


図 4. 患者由来 iPS 細胞でのドキソルビシン（DOX）感受性の再現

DOX 心毒性を示した患者由来 iPSC-CMs では in vitro で心毒性が再現される。Burridge PW et al. Nat Med 2016

【方法】

派遣先では、乳癌に対してドキソルビン投与後に心機能低下 (EF<40%) を認めた症例および認めなかった症例を登録し、患者由来 iPS 細胞を作成・ストックしている。本研究計画では、このストックされた iPS 細胞を用いて、以下の研究計画①および②を予定した (図 5)。

研究計画① (ドキソルビン感受性の定量評価および病態の原因となる遺伝子多型の同定) : まず、患者 iPS 由来心筋細胞 (iPSC-CM) でのドキソルビン感受性を生化学的解析 (ドキソルビン負荷下での cell viability・ROS 産生・ミトコンドリア機能解析) にて定量化する。これらの解析は派遣先ですでに確立されており多検体での解析も可能である。

研究計画② (ゲノム編集技術によるドキソルビン感受性再現および抵抗性獲得) : ゲノム編集技術 (TALEN および CRISPR-Cas9) を使い、計画①で同定した SNP を健常 iPS 細胞に導入してドキソルビン感受性を再現する。逆に、特にドキソルビン感受性の高い iPSC-CM の SNP をゲノム編集にてドキソルビン耐性に改変されるか確認する。

当初の計画では、多数例のドキソルビン心毒性患者から作製した iPS 細胞を心筋細胞に分化させ、遺伝子発現と SNP を比較することで、eQTL や重要な遺伝子をスクリーニングし、その上で、一つ一つの遺伝子や SNP をゲノム編集にて knockout あるいは knock-in して解析する予定であった。しかし、近年のゲノム編集技術の急速な進歩により、ゲノム上の全遺伝子を網羅的に knockout (knockdown) あるいは activate することで、原因遺伝子を High-throughput にスクリーニングすることが比較的容易になってきた。そのため、eQTL のアプローチとは別に、CRISPR スクリーニングによる心毒性の原因遺伝子

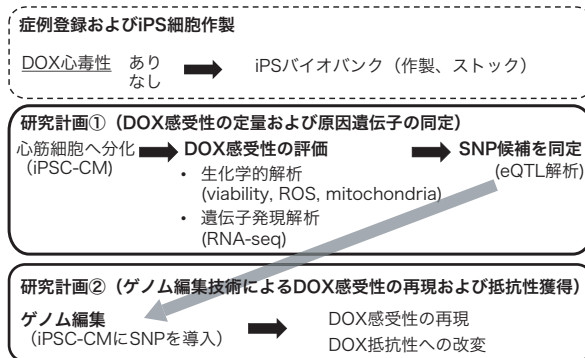


図 5. 研究計画

研究計画①: ドキソルビン (DOX) 心毒性の原因遺伝子や SNP の探索

研究計画②: ゲノム編集による遺伝子改変や SNP 導入で表現系を検証

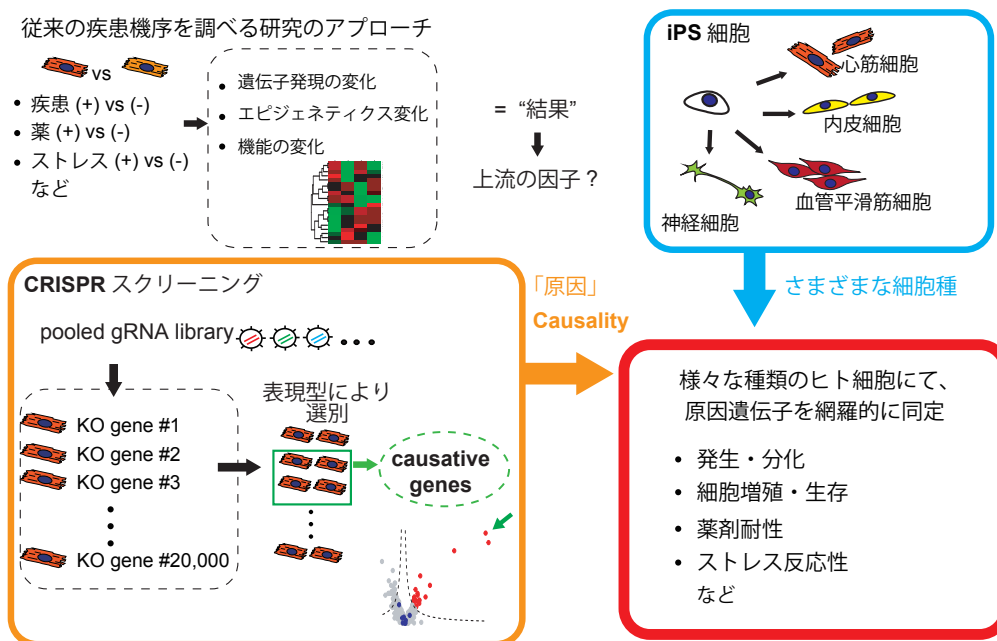


図 6. CRISPR スクリーニングと iPS 細胞を用いた心毒性の原因遺伝子スクリーニング

CRISPR スクリーニングでは、網羅的に遺伝子を欠損 (Knock-out, KO)、ノックダウン (Knock-down)、あるいは活性化 (Activation) させ、表現型により細胞を選択 (例えば、薬剤に耐性のある細胞のみを回収) することで、原因となる (causative) 遺伝子を unbiased に同定することができる。さらに、iPS 細胞技術と組み合わせることで、ヒトの様々な臓器を構成している多様な細胞種での遺伝子スクリーニングが可能となる。この方法を用いて、がん化学療法の薬剤に耐性な心筋細胞を回収することで、薬剤耐性・感受性に寄与する原因遺伝子を high-throughput に同定することが可能である (Nishiga M, Qi LS, Wu JC. Methods in Molecular Biology 2021 参照)。

の探索も開始している。

従来より、疾患の機序を解明するための研究では、疾患モデルの細胞やマウス等を用いて、遺伝子発現やエピジェネティクスの変化を調べ、その上でその変化を生じさせている上流の遺伝子やパスウェイを同定するというアプローチがしばしば用いられる。この方法では、causative な遺伝子を同定するためには上流の遺伝子を過去の文献等から推測し、一つ一つの可能性を実験にて検証する必要があり、治療ターゲットを同定するまでに長い時間を要する。一方で、CRISPR screening といった網羅的な介入を用いる方法では、causative な遺伝子を比較的短期間で同定することができる。(図 6)。

さらに、ヒトの様々な種類の細胞を効率的に作成できる iPS 細胞技術と組み合わせ、ヒト iPS 細胞から分化させた様々な細胞にて CRISPR スクリーニングすることで、臓器・細胞特異的な遺伝子やパスウェイの研究を効率的にすすめることができる。しかも、CRISPR スクリーニングで得られる候補遺伝子は causative な遺伝子であるため、新たな drug target の候補と考えられる(図 6)。

この方法は、ドキソルビシンに限らず、他の心毒性を有する抗がん剤、分子標的治療薬、放射線治療など幅広い応用が考えられる。現在、すでに iPS 細胞を用いたこのシステムを確立しており、iPS 細胞から分化させた心筋細胞にて、ドキソルビシンを含めた数種類の抗がん剤心毒性を回避するための新たな治療ターゲット遺伝子の候補を得ている。これらの治療ターゲットを臨床応用可能な創薬に繋げるため、化合物での効果を確認中である。