報告書：iPS 細胞を用いた化学療法誘発性心毒性の機序解明

Stanford University　西賀 雅隆

【要旨】

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。抗がん剤の心毒性を対象とする研究は、Cardio-oncology として、急速に注目されるようになってきている。

患者それぞれの薬剤感受性は、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。そのため、それぞれの患者の遺伝情報を反映できる患者由来 iPS 細胞は機序解明や新たな薬剤探索に有用である可能性が高い。留学先の 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、Biobank としてストックしている。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 1）。

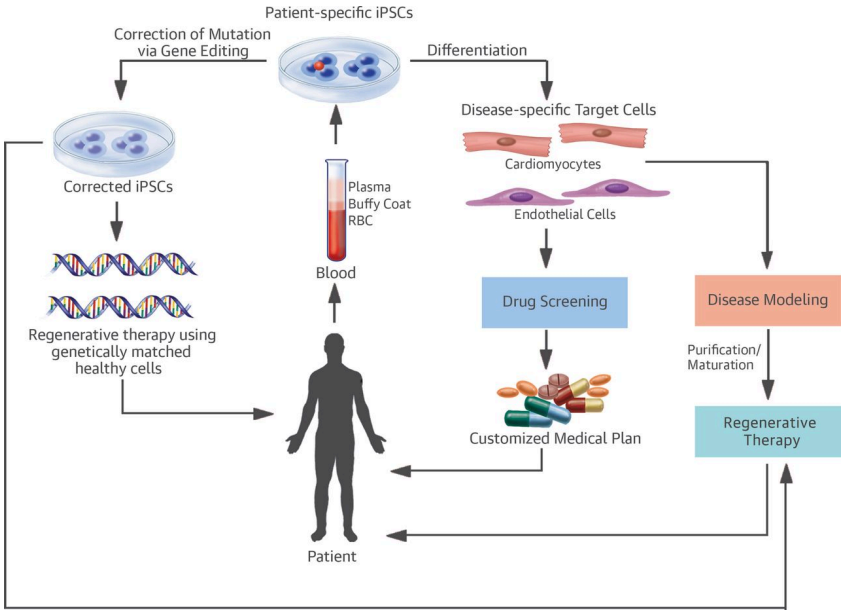

図 1. 患者由来 iPS 細胞を用いた疾患研究

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):

今回、公益財団法人アステラス病態代謝研究会の留学補助金のサポートを頂き、Stanford 大学にて、ドキソルビシン（DOX）心毒性の機序解明を目的として、患者由来 iPS 細胞を利用し、DOX 心毒性を引

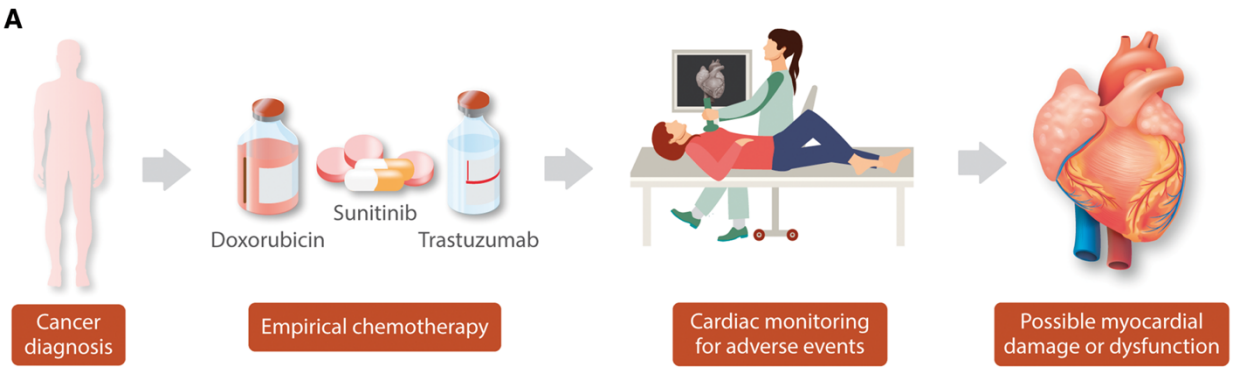

図 2A. 現在の抗がん剤による心毒性の検査

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

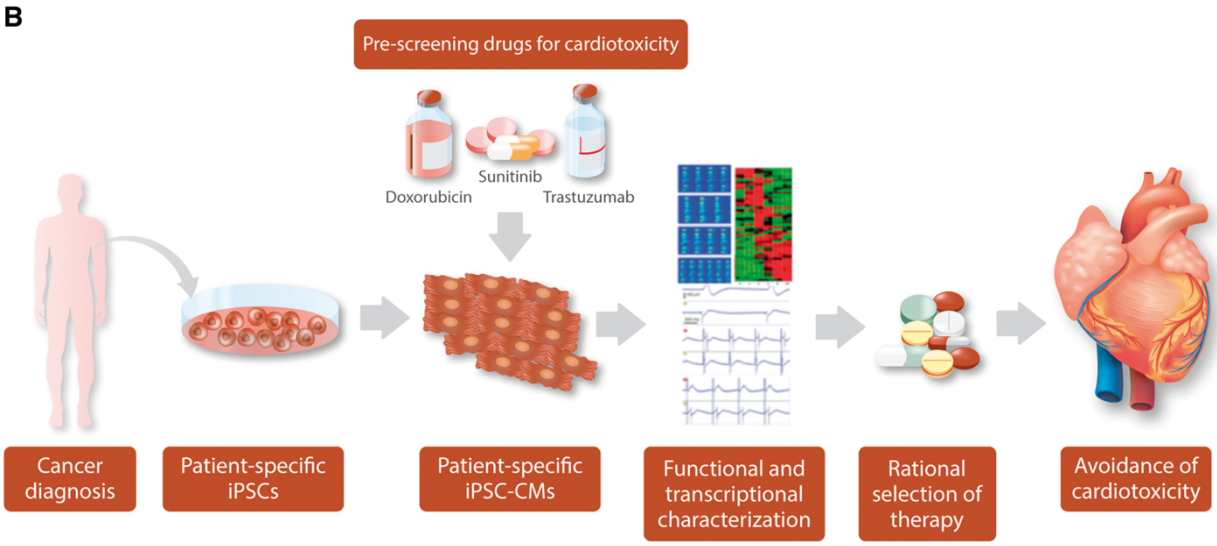

図 2B. iPS 細胞を用いた抗がん剤心毒性の再現

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

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。また、当初の予定にはなかった CRISPR を用いた high-throughput screening も取り入れて原因遺伝子の解明を進めている。

【研究の背景】

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（DOX）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。DOX に対する耐性の低い患者では DOX 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 2A）。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。

DOX 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 DOX 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。

DOX 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。近年急速に発達した iPS 細胞技術を用いることで、この問題を克服でき、機序解明に繋げることができると考えられる。

留学先（スタンフォード大学 Wu lab）では、DOX 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（DOX 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]（右、図 3）。この手法を用いて、DOX 感受性の原因となる遺伝子多型（SNP）を同定し、DOX 心毒性の分子機序を解明することを目的とする。

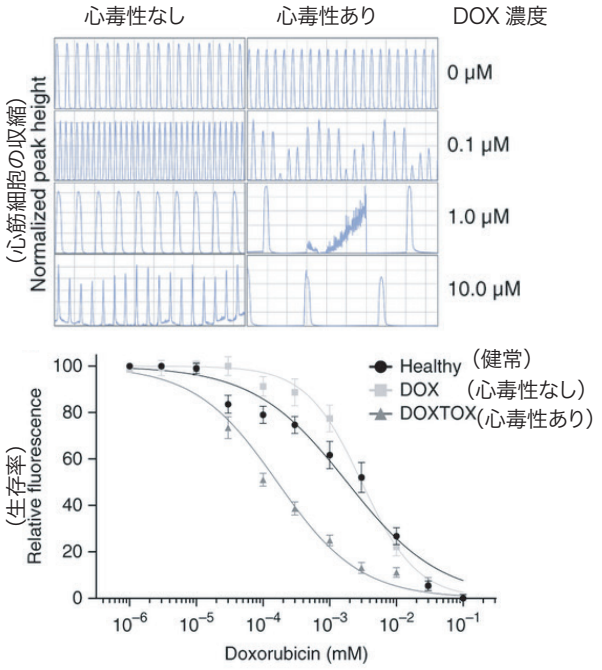

図 3. 患者由来 iPS 細胞での DOX 感受性の再現

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

【方法と進捗状況】

乳癌に対して DOX 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。研究計画当初、このストックされた iPS 細胞を用いて、以下の研究計画を予定した（下、図 4）。

研究計画①（DOX 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 DOX 感受性を生化学的解析（DOX 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 DOX 感受性再現および抵抗性獲得）

ゲノム編集技術（CRISPR-Cas9）を用い、計画①で同定した SNP を健常 iPS 細胞に導入して DOX 感受性を再現する。逆に、特に DOX 感受性の高い iPSC-CM の SNP をゲノム編集にて DOX 耐性に改変されるか確認する。

当初の計画では、多数例の DOX 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

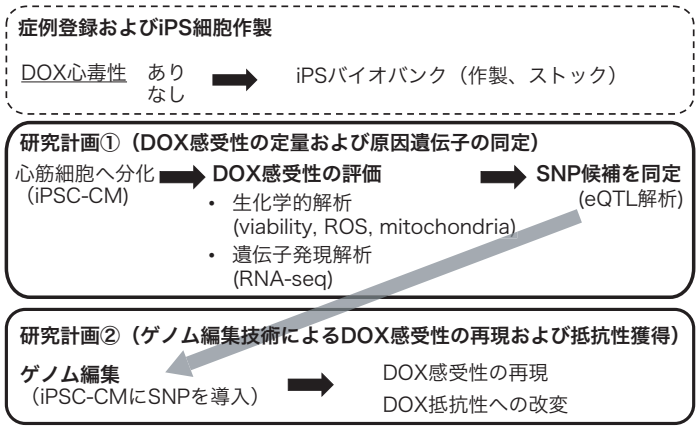

図 4. 研究計画

研究計画①: 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

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 screening による心毒性の原因遺伝子の探索も開始している（図 5）。この方法は、causative な遺伝子を網羅的に同定できるため、新たな drug target の発見に繋がる。さらに、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の確立を行っており、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探索を行っているところである。

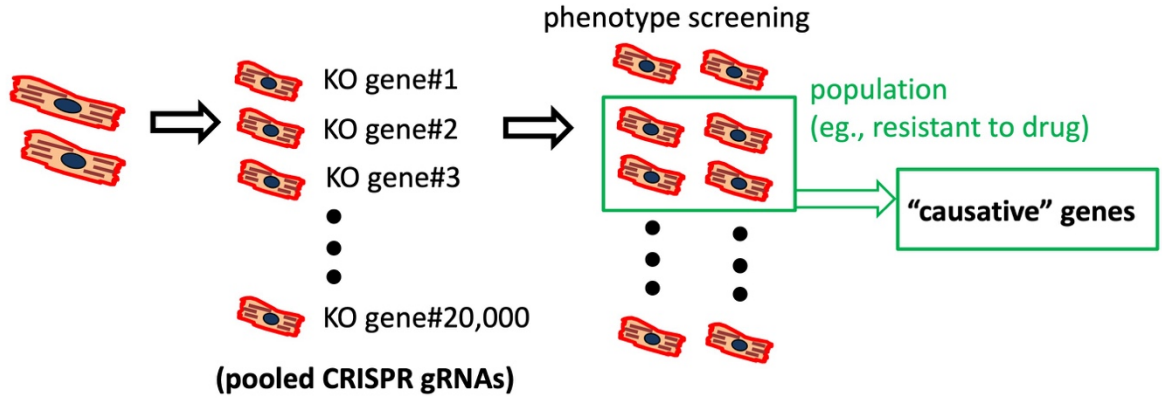

図 5. CRISPR screening を用いた心毒性の原因遺伝子スクリーニング

CRISPR screening により、網羅的に遺伝子を knockout あるいは activate し、薬剤に耐性な心筋細胞を回収することで原因遺伝子を high-throughput に同定することが可能である。

【留学先での Publication】

1. Kitani T, **Nishiga M**, Wu JC. Stem Cells and Genomics for Cardiovascular Precision Medicine. ***Shinzo* (心臓)**. 2018;50(4):464-473
2. **Nishiga M**, Guo H, Wu JC. Induced pluripotent stem cells as a biopharmaceutical factory for extracellular vesicles. ***Eur Heart J***. 2018;39(20):1848-50.
3. Yang H, Qin X, Wang H, Zhao X, Liu Y, Wo HT, Liu C, **Nishiga M**, Chen H, Ge J, Sayed N, Abilez OJ, Ding D, Heilshorn SC, Li K. An in Vivo miRNA Delivery System for Restoring Infarcted Myocardium. ***ACS Nano***. 2019;13(9):9880-94.
4. **Nishiga M**, Qi LS, Wu JC. Therapeutic genome editing in cardiovascular diseases. ***Adv Drug Deliv Rev***. 2020.
5. **Nishiga M**, Wang DW, Han Y, Lewis DB, Wu JC. COVID-19 and cardiovascular disease: from basic mechanisms to clinical perspectives. ***Nat Rev Cardiol***. 2020.

【謝辞】

今回、公益財団法人アステラス病態代謝研究会の留学補助金に採択いただき、大変ありがとうございました。おかげさまで米国にて大変貴重な経験を積むことができています。

米国ではフェローシップや研究費を獲得できるかどうかが日本以上に重視されますので、留学当初からこの補助金をいただけたことは留学をスムーズに開始するために大変役立ちました。面接は、新型コロナウイルスのパンデミック以降は、日常的に行われているインターネット上の会議システムを当時から取り入れられていたため、面接のために一時帰国する必要もなく、大変スムーズに受けることができました。審査員の先生方からは研究内容に対する質問やコメントだけでなく、留学先での研究生活に対する貴重なアドバイスも頂くことができました。2020 年に入ってから、米国は新型コロナウイルスのパンデミックで生活が一変してしまいましたが、今回のパンデミックに際し、補助金の期間終了後であるにも関わらず、海外に滞在している我々に対し、財団から現状の心配と問い合わせのメールを頂きました。単に留学のフェローシップの支給というだけでなく、留学全般のサポート・アドバイスをいただけたことに大変感激しました。ここで得られた貴重な経験を今後に活かしていきたいと思います。財団関係者の皆様および審査員の先生方に厚く御礼申し上げます。