

令和 6 年 5 月 27 日現在

機関番号：12601

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化(B)）

研究期間：2020～2023

課題番号：20KK0196

研究課題名（和文）担がん状態が心機能および血圧に及ぼす影響の解析

研究課題名（英文）Analysis of the effects of cancer-bearing status on cardiac function and blood pressure

研究代表者

武田 憲彦（Takeda, Norihiko）

東京大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：40422307

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 14,400,000円

研究成果の概要（和文）：血管新生阻害薬によるがん関連心毒性の機序を明らかにするために心臓における VEGFA機能について解析した。その結果、成体マウスの心臓では心筋細胞が VEGFA の大部分を産生しているが、定常状態及び後負荷時の心機能に影響しなかった。一方、骨髄系由来 VEGFA は、量的に極めて少ないが後負荷時の心機能及び血管恒常性維持に重要であった。以上から、血管新生阻害薬はマクロファージ由来 VEGFA シグナルを阻害することで心毒性を惹起していると考えられた。また、Zurich 大学 Stockmann 教授との共同研究の中でワクチンによる組織線維化予防が可能であることを明らかにした。今後、がん関連心毒性の予防が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果により、血管新生阻害薬による心毒性発症機序が明らかとなることでがん化学療法を行う際に心臓の炎症状態が血管新生阻害薬投薬の判断基準となり得る。また、抗線維化ワクチンの開発は、がん化学療法関連心毒性の予防を可能とし、抗がん剤の安全な継続治療を押し進めることが容易となることでがん化学療法の治療効果を向上させることが期待される。

研究成果の概要（英文）：It is not well-understood how cancer-bearing status and cancer chemotherapy cause heart disease. We studied the VEGFA function in the heart to reveal the mechanism of cancer chemotherapy-related cardiotoxicity. We found that although cardiomyocytes produced the majority of VEGFA in an adult murine heart, the deletion of cardiomyocyte-derived VEGFA did not affect its function. The amount of myeloid cell-derived VEGFA is significantly small, however, deletion of VEGFA in myeloid cells disrupts vascular integrity and left ventricular systolic function. These results suggest that we wonder if angiogenesis inhibitors cause cardiotoxicity by suppressing macrophage-derived VEGFA signaling. In addition, we developed vaccination based therapy against tissue fibrosis in the cooperative study with Prof. Stockmann at Zurich University. It is likely that vaccination-based immunotherapy will become a preventive approach to the cardiotoxicity caused by cancer chemotherapy.

研究分野：循環器内科

キーワード：VEGFA マクロファージ 心筋細胞 血管新生 ワクチン 組織線維化

## 1. 研究開始当初の背景

近年、がんに対する化学療法が劇的に進歩した結果、がんと診断された後に長期的に生存する症例が少なからず認められるようになってきた。その一方でがん治療後に心不全などのがん関連心臓病を発症する症例が増えており、社会的・医学的に大きな課題となっている。しかしながらその病態についての理解は未だ不十分である。担がん状態やがん化学療法に伴ってなぜ心臓病が発症するのかという疑問は明らかにされていない。その原因として心臓超音波検査など心機能の詳細な評価には循環器的な専門技術と経験が必要であり、がん研究者が心臓病研究を遂行する事が容易では無いことが指摘されてきた。また、このような背景からがん化学療法における患者に初期の心機能低下を呈しても心不全症状を認めることは少なく、患者が症状を自覚する頃には高度な心機能低下へ進行してしまっており、抗がん剤治療を中止せざるを得なくなる。その為、がん化学療法による心毒性を引き起こす病態機序の解明と伴に心毒性を回避する抜本的な対策が必要である。

## 2. 研究の目的

本研究では研究代表者らが明らかにしてきた心血管リモデリングに関する知見をもとに血管新生阻害薬などによるがん化学療法関連心不全の病態機序を解明するとともにがん関連心臓病を回避する治療法の開発につながる知見を得ることを目指す。

## 3. 研究の方法

心臓内 VEGFA の機能解析には VEGFA コンディショナル欠損(VEGFA flox) マウスを用いる。VEGFA flox マウスについては Zürich 大学 Stockmann 教授より供与いただき、自治医科大学で行った。心臓の発生に異常が出ることが報告されている心筋細胞での機能解析にはタモキシフェン誘導性 cre リコンビナーゼ(cre)を心筋で発現するマウスと掛け合わせることで樹立したマウスを用いた。また、マクロファージにおける VEGFA の解析には lysosome 特異的に cre を発現するマウスと掛け合わせて樹立したマウスを用いた。心機能は、心エコーを実施し評価した。

抗線維化ワクチンの開発では、抗原候補遺伝子の選定は、活性化線維芽細胞(筋線維芽細胞)で特異的に発現し、背景の正常組織には低レベルでしか発現しない遺伝子を検索する。免疫原性自己ペプチドは In-silico エピトープ予測により選定する。選定した候補ペプチドは、樹状細胞で発現させ、細胞傷害性 CD8+ T 細胞と共培養することで CD8+ T をより活性化するものに絞り込む。候補抗原ペプチド投与によるワクチン効果の検証は、四塩化炭素暴露による肝臓線維化モデル、プレオマイシン投与による肺線維化モデルを用いた。以上については Zürich 大学 Stockmann 教授のもとで行う。また、ワクチン療法による正常新組織への影響評価については国際共同研究として自治医科大学循環病態代謝学研究部にて行った。

## 4. 研究成果

### (1) 心臓における VEGFA の機能解析

Bevacizumab など VEGF 阻害薬は血管新生阻害薬として抗がん剤と併せて広く使用されているが、心血管系への副作用が指摘されている。しかしながら血管新生阻害薬による高血圧・心不全発症機序は未だ明らかではない。我々は、VEGFA シグナル阻害による心機能への影響を解明するために心筋細胞特異的誘導性 VEGFA 欠損マウスを作成した。タモキシフェン投与後の心臓における VEGFA 遺伝子発現量について検討したところ心臓における VEGFA 量のほぼ完全に消失していた。にもかかわらず、心機能に影響はなかった。さらに、大動脈弓縮窄術 (TAC) による心不全下でも影響を認めなかった。不全心ではマクロファージの浸潤が起こる。そこで、骨髄球系由来 VEGFA をロックアウトしたところ心機能の低下及び血管新生の低下が認められた。さらに、骨髄球系細胞に赤色蛍光タンパクである tdTomato を発現するマウスを用いて TAC を行ったところ微小血管に隣接してマクロファージが存在していた。In vitro の共培養実験を行ったところマクロファージと内皮細胞の接着は VEGFA 依存的な血管新生を促進することが分かった。以上の知見から、血管新生阻害剤による心毒性はマクロファージによる VEGFA シグナル送達を抑制することで惹起されていることが示唆される。現在、論文投稿を準備しているところである。

### (2) 線維化ワクチンによる免疫療法

【組織線維化病態特異的な Adam12 の発現と免疫原性自己抗原ペプチドの選定】

がん化学療法関連心不全の回避はがん化学療法の安全な継続治療にとり重要である。最近、線維芽細胞を標的としたキメラ抗原受容体 (CAR) T 細胞が、マウス心臓線維化モデルで効果的であることが示された。また、がん免疫療法が米国食品医薬品局 (FDA) により承認

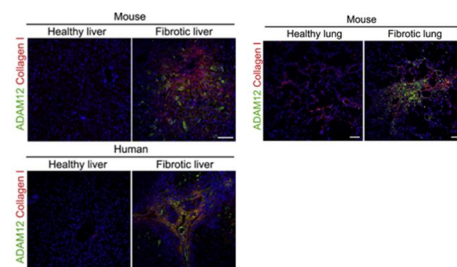


図1. Adam12は組織線維化病態特異的に発現する

されるなど、免疫療法が注目されている。全ての体細胞表面にある MHC クラス I 分子は、細胞内タンパク質の「自己」ペプチドを T 細胞に常に提示する。それ故、静止状態では発現せず、活性化した線維芽細胞でのみ発現する遺伝子の自己ペプチドは抗線維化ワクチンとなるのではないかと考え、探索することで Adam12 を見出した (図 1.)。続いて、*In-silico* エピトープ予測により MHC クラス I エピトープに提示される複数の候補ペプチドを選定し後、得られた候補ペプチド中で CD8+T 細胞を最も活性化するペプチドに絞り込み、免疫原性自己ペプチドとした。

### 【線維化病態モデルを用いた抗線維化ワクチン予防効果の評価】

Adam12 は肝臓線維化病態において高発現していることが報告されている。また、組織損傷後のコラーゲン高産生線維芽細胞で発現しているとの報告もある。そこで、Adam12 抗原ペプチドによる抗線維化ワクチンの有効性について四塩化炭素(CCl<sub>4</sub>)肝線維化モデルを用いて検証を行った。その結果、αSMA 陽性筋線維芽細胞が減少(図 2A)し、コラーゲン量の低下が認められた(図 2B)。次に、組織損傷による他の組織線維化モデルとしてブレオマイシン肺線維症においても検証を行った。肝臓線維化モデルと同様、肺線維化モデルにおいても αSMA 陽性筋線維芽細胞は減少し(図 2C)、肺線維化病態中のコラーゲン量も低下していた(図 2D)。

### 【抗線維化ワクチンによる生体への有害事象の検証】

ワクチン投与下の生体組織に異常が認められないかについてヘマトキシレンエオジン(HE)染色による細胞学的・組織学的検証を行ったところ、正常組織に異常な所見は認められなかった(図 3A)。さらに、マウスの血液検査を行ったが、肝臓、腎臓及び膵臓における組織破壊を示唆するような異常を認めなかった(図 3B)。

以上の結果からワクチンによる組織線維化予防療法は線維化病態に対し有効な手法であると考えられた。今後、心線維化モデルマウスにおいてワクチン療法の有用性の検証を行う。それに引き続き、担癌マウスモデルを用いた血管新生阻害薬による心毒性に対するワクチン予防療法についても評価・検証していきたいと考えている。

線維化ワクチン療法によるがん化学療法由来心毒性の予防が可能となれば、心毒性による投薬中止が減少し、がん化学療法に大きく貢献することが期待される。また、今回開発した線維化ワクチン療法は、活性化線維芽細胞を標的とすることから「超高齢化社会」が進む我が国において老化に伴う心不全リスクを低下させることで健康長寿社会の実現に大きく貢献する可能性も期待できる。

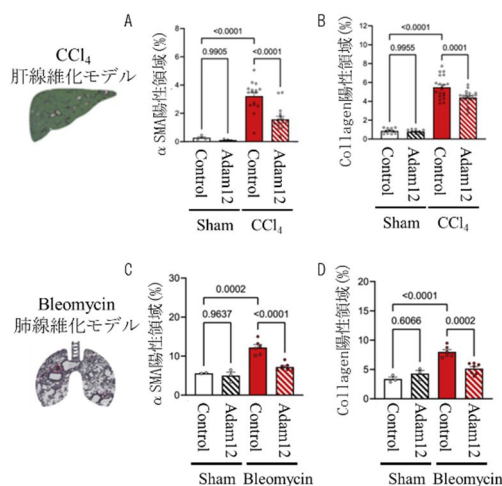


図2. Adam12ワクチンは組織線維化を予防できる

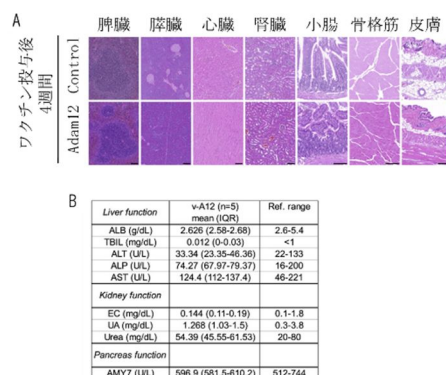


図3. ワクチン療法による生体への有害事象は認められない

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sato Tatsuyuki, Takeda Norihiko	4. 巻 81
2. 論文標題 The roles of HIF-1 signaling in cardiovascular diseases	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Cardiology	6. 最初と最後の頁 202 ~ 208
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jjcc.2022.09.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	砂河 孝行 (Isagawa Takayuki) (40418637)	自治医科大学・医学部・講師  (32202)	
研究分担者	仙波 宏章 (Semba Hiroaki) (80747923)	自治医科大学・医学部・客員研究員  (32202)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
スイス	Zurich大学	Christian Stockmann教授	