

令和 6 年 5 月 31 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02670

研究課題名(和文) がん分子標的薬のOncocardiology研究

研究課題名(英文) Zebrafish-based oncocardiology research on molecular targeted drugs for cancer.

研究代表者

田中 利男 (TANAKA, Toshio)

三重大学・医学系研究科・特定教授

研究者番号：00135443

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、がん分子標的薬による心毒性機構解析及び心毒性防御遺伝子の発見により臨床における心毒性の予防や防御の実現を目指す事を目的とする。この目的を実現するため、異なる蛍光波長特性の蛍光蛋白が心臓選択的に発現するゼブラフィッシュを用意して、高感度高精度ハイスループットスクリーニングシステムを構築し、急激に増加しているがん分子標的薬の心毒性をリアルタイムに発見する。さらに、新たに心毒性が見出されたがん分子標的薬の定量的心機能障害の特徴を明らかにした。またその心毒性メカニズムを心筋トランスクリプトーム解析するだけでなく、心毒性制御を可能にする各がん分子標的薬の新規心毒性防御遺伝子を探索した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

急激に開発されているがん分子標的薬によりがん治療率は改善しているが、多くの新規がん分子標的薬の心毒性が明らかになり、がん患者の重大な課題となりつつある。我々は、この課題を克服するため、2015年に新しいがん分子標的薬sorafenibによる心毒性に対する新規制御遺伝子としてstanniocalcin1を発見報告して以来、臨床研究へ発展しており、臨床応用が近いと思われる。一方本研究においては、新規がん分子標的薬nilotinib心毒性に対する新しい遺伝子候補の探索研究が継続されており、最終的にはsorafenibとは異なる新規最重要nilotinib心毒性遺伝子を明らかにする。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to realise the prevention and protection of cardiotoxicity in clinical practice by analysing the mechanism of cardiotoxicity induced by cancer molecular target drugs and discovering cardiotoxicity defence genes. To realise this objective, a high-sensitivity, high-accuracy and high-throughput screening system has been constructed in zebrafish, in which fluorescent proteins with different fluorescence wavelength characteristics are selectively expressed in the heart, to detect cardiotoxicity of rapidly increasing cancer molecular target drugs in real time. Furthermore, the quantitative cardiotoxicity of the newly identified cancer molecular target drugs will be characterised. In addition to cardiac transcriptomic analysis of the cardiotoxicity mechanisms, novel cardiotoxicity defence genes of each cancer molecular target drug will be explored to enable cardiotoxicity regulation.

研究分野：ゼブラフィッシュ創薬科学

キーワード：zebrafish oncocardiology sorafenib stanniocalcin1 nilotinib

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

急激に開発されているがん分子標的薬によりがん治療率は改善しているが、多くの新規がん分子標的薬の生命予後に関する心毒性が明らかになり、がん治療学の重大な緊急課題となりつつある。我々はこの課題を克服するため、2015年に新しいがん分子標的薬 sorafenib による心毒性に対する新規防御遺伝子として stanniocalcin1 を発見報告(Toxicol Sci.2015,143:374-84)して以来、多数の臨床研究へ発展しており、臨床応用が近いと思われる。さらに本研究においては、新しく世界で初めての高精度高感度ハイスループット心毒性スクリーニングシステムを構築し、全く新しい3層の研究システムからなる新規 Oncocardiology 研究法を創生することにより、広範ながん分子標的薬における新規心毒性防御遺伝子の探索が可能となるとと思われる。その結果、最終的には先行する sorafenib の場合とは全く異なる新規最重要がん分子標的薬心毒性防御遺伝子が明らかとなる。

本研究では、がん分子標的薬の最も深刻な副作用である心毒性に焦点を当て、新しい in vivo ハイスループットスクリーニングシステムを構築し、大規模ながん分子標的薬スクリーニングを実施する。具体的には、以下の3層のシステムからなる新規 Oncocardiology 研究法を構築する。

第1層 高感度ハイスループット in vivo フェノタイプスクリーニングシステム

第2層 定量的心機能イメージングシステム

第3層 新規がん分子標的薬心毒性防御遺伝子探索

独自の高精度高感度 in vivo ハイスループットスクリーニングシステムを構築することにより、爆発的に増加しているがん分子標的薬の心毒性をリアルタイムに発見することを可能にし、その結果、新たに心毒性が見出されたがん分子標的薬の定量的心機能障害の特徴を明らかにする。そして、その心毒性メカニズムを心筋トランスクリプトーム解析するだけでなく、心毒性制御を可能にする各がん分子標的薬の新規心毒性防御遺伝子を探索し、その作用機序を解明する。

2. 研究の目的

本研究は、がん分子標的薬による心毒性機構解析及び心毒性防御遺伝子の発見により、臨床における心毒性の予防や制御の実現を目指す事を目的とする。そのため、高精度高精度 in vivo ハイスループットスクリーニングシステムにより、爆発的に増加しているがん分子標的薬の心毒性をリアルタイムに発見する。その結果、臨床における心毒性出現頻度との相関から、臨床外挿性を推定する。さらに、新たに心毒性が見出されたがん分子標的薬の定量的心機能障害の特徴を明らかにし、臨床心毒性における心機能障害との相関を検討する。またその心毒性メカニズムを心筋トランスクリプトミクスにより解析するだけでなく、心毒性制御を可能にする各がん分子標的薬の新規心毒性防御遺伝子を探索し、その作用機序を解析することにより、その分子機構から臨床心毒性に対する応用を検討する。

3. 研究の方法

(1) 本研究の3層からなる Oncocardiology 研究戦略のうち、第1層においては、全自動高精度高精度心毒性スクリーニングシステムを構築し、臨床心毒性との相関性を解析した。

全自動高精度ハイスループットスクリーニングシステムを構築するため2種類の心筋選択的に蛍光タンパク質が発現する透明なゼブラフィッシュを創製した。

心筋に限局し GFP が発現する透明ゼブラフィッシュ MieKomachi009:MK009(GFP)は、ゼブラフィッシュ第15染色体に挿入された GFP と透明ゼブラフィッシュ(nacre)を交配することにより創製した。

赤色蛍光蛋白質(mRFP)を接続したレポーター遺伝子を内在し心臓形成過程から心臓選択的に mRFP が発現する Tg(my17:mRFP):Tg017 を、交配により透明化(nacre)し、MK069 を創製した。

これら2種類を交配により、心筋選択的に GFP(緑色)と RFP(赤色)がゲノム上の異なる位置から同時発現する透明(nacre)MK070 を創製した。

これら3種類のゼブラフィッシュを使用して独自の96ウエルプレート(ZFplate)によるがん分子標的薬の高感度ハイスループットスクリーニングを実施し、全自動イメージングにより、MK009、MK069 及び MK070 の心室面積、心室蛍光強度、心室面積×心室蛍光強度の3項目を自動計算した。

これらの解析から、臨床心毒性発症頻度や重症度などとの相関解析、がん分子標的薬の濃度反応解析から高感度性能、複数回の解析による精度解析を実施した。

これらの結果を総括し、がん分子標的薬の oncocardiology 一次スクリーニングとしては、これら3システムのうち最適なものを確立した。

(2) 第2層 Oncocardiology 研究戦略である定量的心機能イメージングシステムは、臨床心毒性における心エコーMモード解析と相関関係解析が可能であり、臨床外挿性についての検討が実現した。すなわち、本研究により見出された新規心毒性がん分子標的薬 nilotinib の臨床心毒性病態との類似性を、以下の測定項目などにより相関解析した。

独自の心機能測定項目である1) 拡張末期径(Vd)、2) 拡張末期容積(EDV)、3) 収縮末

期径(VDs)などの測定項目と臨床心エコーMモード測定項目の相関を解析し、非臨床(ゼブラフィッシュ)と臨床(ヒト)の心毒性における類似性を検討した。

新しくゼブラフィッシュ心毒性を見出したがん分子標的薬 nilotinib の臨床心毒性出現濃度や臨床心毒性病態プロフィールとの相関を解析し、臨床心毒性への外挿性を確立した。

(3) Oncocardiology 研究戦略の第3層では、心毒性が新しく見出されたがん分子標的薬について、心毒性発現濃度におけるトランスクリプトーム解析により、異常発現上昇遺伝子群と異常発現低下遺伝子群のネットワーク解析などから、新規がん分子標的薬心毒性防御遺伝子を探索した。そして、広範ながん分子標的薬による心毒性機構の解明及び心毒性防御遺伝子の発見により臨床における心毒性の予防や制御の実現を目指す事を目的とする。

がん分子標的薬 nilotinib を作用させ、心筋トランスクリプトーム解析を実施し、がん分子標的薬 nilotinib のできるだけ低濃度かつ早期に異常遺伝子発現増加する遺伝子群と異常遺伝子発現低下する遺伝子群を抽出した。

がん分子標的薬 nilotinib 心毒性関連遺伝子群から、新規心毒性防御遺伝子候補リストを作成し、nilotinib により遺伝子発現が上昇する場合は、モルフォリノアンチセンスオリゴによるノックダウンにより、nilotinib の心毒性に対する作用機構を解明した。

この第3層 Oncocardiology 研究戦略により、最も明白ながん分子標的薬 nilotinib の心毒性防御作用を示す遺伝子を、nilotinib の新規心毒性防御遺伝子として、その作用機構を解明し、臨床応用の可能性を検討する。

4. 研究成果

本研究は、がん分子標的薬による心毒性機構解析及び心毒性防御遺伝子の発見により臨床における心毒性の予防や制御の実現を目指す事を目的とする。この目的を可能にするため、異なる蛍光波長特性の蛍光蛋白が心臓選択的に発現するゼブラフィッシュを用意して、高感度高精度ハイスループットスクリーニングシステムを構築し、急激に増加しているがん分子標的薬の心毒性をリアルタイムに発見した。その結果、この独自のハイスループットスクリーニングシステムにおいて、臨床的に比較的心毒性の報告が少ない gefitinib や imatinib は、蛍光心室面積、心室蛍光強度、心室面積 × 心室蛍光強度の3項目の測定値に有意な変化が認められないことを見出した。一方、臨床的に心毒性が高頻度に認められる nilotinib や sunitinib は、蛍光心室面積や心室蛍光強度において有意な変化が確認された。これらの結果から、本研究独自のハイスループットスクリーニングシステムは、高感度に臨床心毒性に対する外挿性が示唆された。

さらに、新たに心毒性が見出されたがん分子標的薬 nilotinib や sunitinib の定量的心機能障害が sorafenib などとは異なる特徴を明らかにした。また、各がん分子標的薬による心筋トランスクリプトーム解析により、各がん分子標的薬の心毒性機構解明を試み、心毒性制御を可能にする各がん分子標的薬の新規心毒性防御遺伝子を探索した。その結果、明らかに心蛍光面積や心蛍光強度に対する濃度依存性変化が全く異なる sorafenib と nilotinib による心トランスクリプトーム変化の明確な差異が認められた。すなわち sorafenib 選択的に異常発現上昇する 214 遺伝子、異常発現低下する 7 遺伝子、nilotinib 選択的に異常発現上昇する 83 遺伝子、異常発現低下する 292 遺伝子を見出した。さらに nilotinib により選択的に発現が増加するヒト相同心筋遺伝子は、MYH2,6,7, SRL, RYR2, TNNC1 などであった。現在これらの nilotinib による心筋毒性機構や心筋毒性防御機構における機能的役割を解析している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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 1件）

1. 著者名 田中利男	4. 巻 82巻 4月増刊号
2. 論文標題 ゼブラフィッシュ腫瘍循環器学の新しい展開	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 日本臨牀増刊 腫瘍循環器学-新しい学際領域の最新知見-	6. 最初と最後の頁 P563-568
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 田中利男	4. 巻 -
2. 論文標題 In vivo assessment of individual and total proteinuria in zebrafish larvae using the solvatochromic compound ZMB741	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Chemical & Biomedical Imaging	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/cbmi.4c00029	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田中利男
2. 発表標題 ゼブラフィッシュ創薬とグローバル展開
3. 学会等名 日本実験動物技術者協会東海北陸支部第9回春季大会 『医療を支える実験動物』（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 田中利男
2. 発表標題 ゼブラフィッシュ発生毒性トランスクリプトームのLSKB/AI (BERT)解析
3. 学会等名 第50回日本毒性学会学術年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 田中利男
2. 発表標題 新しいハイスループット個別蛋白尿治療薬スクリーニングシステムの構築と応用
3. 学会等名 第9回ゼブラフィッシュ・メダカ創薬研究会 (ZMDD2023)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 田中利男
2. 発表標題 ゼブラフィッシュ心毒性試験からoncocardiologyへの展開
3. 学会等名 第49回日本毒性学会学術年会
4. 発表年 2022年

〔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	寺見 文宏 (Terami Fumihiro) (50370599)	三重大学・医学系研究科・研究員 (14101)	
研究分担者	山田 佳代子 (Yamada Kayoko) (90866948)	三重大学・医学系研究科・技術補佐員 (14101)	
研究分担者	山本 恭子 (Yamamoto Kyoko) (90892480)	三重大学・医学系研究科・技術補佐員 (14101)	削除：2022年7月28日

6. 研究組織（つづき）

	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	杉本 和史 (Sugimoto Kazushi) (60378370)	三重大学・医学部附属病院・准教授 (14101)	
研究分担者	為田 雅彦 (Tameda Masahiko) (10626493)	三重大学・医学部附属病院・助教 (14101)	

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