

令和元年6月10日現在

機関番号：32525

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K08246

研究課題名(和文) EGFR阻害がん分子標的薬による、非臨床心循環器毒性評価モデルの確立

研究課題名(英文) Establishment of non-clinical evaluating models in cardiotoxicities induced by a molecular targeted EGFR inhibitor for cancer

研究代表者

安東 賢太郎 (Kentaro, Ando)

千葉科学大学・薬学部・教授

研究者番号：90466904

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ハロセン麻醉犬モデルにおいてラパチニブの心臓電気生理学的作用、心臓収縮弛緩能、心筋トロポニンI濃度を評価した。ラパチニブの臨床使用で見つかった心循環器毒性はこれら項目を評価すれば非臨床試験でも捕捉できる事が明らかとなった。さらに、慢性房室ブロック犬モデルにおける評価によって、催不整脈性に関する安全性も示せる事が明らかとなった。我々の提案する詳細な安全性薬理試験フォローアップ試験の実施は臨床使用で認められた“予期しない”と言われた副作用を“予測できる”ものに変えることができる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん分子標的薬による“予期しない”心循環器毒性は、ハロセン麻醉犬モデルにおいて心臓電気生理学的検査、経胸壁心臓超音波検査、血漿中の心筋トロポニンI濃度測定の組み合わせ評価で十分に予想しうる事が明らかとなった。さらに、慢性房室ブロック犬モデルにおける評価によって、催不整脈性に関する安全性も示せる事が明らかとなった。非臨床試験における心循環器毒性の適切な予測は副作用の少ないがん分子標的薬の開発につながり、がん患者を有害作用から保護して、患者のQOL向上に貢献できる。

研究成果の概要(英文)：Effects of lapatinib on the cardiac electrophysiological action, contraction and relaxation, and plasma cardiac troponin I concentration were evaluated in the halothane anesthetized dog. Lapatinib-induced cardiotoxicities which first observed in clinical use can be detected in non-clinical studies by evaluation of the factors mentioned above. Furthermore, its safety in pro-arrhythmic potential can be evaluated by using the chronic atrioventricular-block dog. Implementation of precise safety pharmacology studies according to follow-up studies for the safety pharmacology core battery can change unexpected cardiac adverse events in clinical use to expect ones.

研究分野：安全性薬理

キーワード：安全性薬理 がん分子標的薬 Onco-Cardiology 心循環器毒性 ラパチニブ ハロセン麻醉犬モデル 慢性房室ブロックモデル 経胸壁心臓超音波検査

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

がん分子標的薬(以下、分子標的薬)は、がん特有の分子に作用するために従来のがん化学療法薬のように副作用が発現することはないと言われていた。しかしながら、臨床使用が開始されると分子標的薬による多数の“想定外”の副作用が報告されるようになった。特にがん細胞の細胞膜に作用する抗体薬であるにも関わらず抗HER2抗体のトラスツズマブは驚くべきことに左室機能障害を中心とした心循環器毒性を惹起することが明らかとなった。こうした心循環器毒性は以下の右のように抗体医薬に限らず、低分子の分子標的薬を含んだ多数に分子標的薬で“想定外”の心循環器毒性が認められることが判明した。

国際的な創薬ガイドラインでは致死的な疾患をターゲットにしており、開発が急がれる抗がん薬は非臨床試験における副作用の詳細な検討を免除されている。本研究課題の提案者は、この免除規定が“想定外”の心循環器毒性が認められる背景にあり、適切な評価を行えば、分子標的薬開発の早期に心循環器毒性の可能性を見出せるのではないかと考えた。

表1 抗癌剤による心毒性の種類と原因となる薬剤

コンセンサスガイドライン  
2013年11月号

心毒性の種類	原因となる薬剤
左室機能障害	アントラサイクリン(ドキシソルビシン、エピルビシン、イダルビシン) アルキル化剤(シクロホスファミド、イホスファミド) 代謝拮抗薬(クロファラビン) 微小管阻害薬(ドセタキセル) モノクローナル抗体型チロシンキナーゼ阻害薬(ヘバシズマブ、トラスツズマブ) プロテアソーム阻害薬(ボルテゾミブ) 低分子チロシンキナーゼ阻害薬(ダサチニブ、イマチニブ、ラパチニブ、スニチニブ)
心筋虚血	代謝拮抗薬(フルオロウラシル) 微小管阻害薬(パクリタキセル、ドセタキセル) モノクローナル抗体型チロシンキナーゼ阻害薬(ヘバシズマブ) 低分子チロシンキナーゼ阻害薬(エルロチニブ、ツラフェニブ)
高血圧	モノクローナル抗体型チロシンキナーゼ阻害薬(ヘバシズマブ) 低分子チロシンキナーゼ阻害薬(ソラフェニブ、スニチニブ)
静脈血栓症	プラチナ製剤(シスプラチン) 血管新生阻害薬(レナリドミド、サリドマイド) ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬(ボリノスタット)      —: 上皮成長因子受容体作用薬 低分子チロシンキナーゼ阻害薬(エルロチニブ)      ---: ラパチニブ併用薬
徐脈	血管新生阻害薬(サリドマイド) 微小管阻害薬(パクリタキセル)
QT延長	ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬(ボリノスタット) 低分子チロシンキナーゼ阻害薬(ダサチニブ、ラパチニブ、ニロチニブ) その他(三酸化ヒ素)

### 2. 研究の目的

抗がん薬において非臨床試験が十分に行われないのであれば、心循環器毒性の発現を早期に捕捉するために臨床試験においてヒトで何らかのバイオマーカーを検索する方法が考えられる。しかしながら、十分な根拠なしにヒトでの検討は倫理的に問題がある。そこで、提案者は従来から行われている安全性薬理試験をより詳細に行うことで、非臨床試験において分子標的薬の心循環器毒性を捕捉する方法を確立することを考えた。

方法を確立させるためには何らかの陽性薬が必要となる。そこで、申請者はトラスツズマブと同様のHER2受容体阻害作用を示す低分子がん分子標的薬であり、HER2受容体以外のEGFRチロシンキナーゼを選択的に阻害する低分子医薬品であるラパチニブを選択した。ラパチニブは特にQT延長作用の発現頻度が高く、左室機能障害を惹起することも知られていることから、ラパチニブを用いて非臨床心循環器毒性評価モデルの確立を図った。

評価モデルの確立だけでは機序の解析はできない。抗体であるトラスツズマブで心循環器毒性が生じるのは、EGFが結合した後のシグナル伝達経路の阻害が心毒性に関与しているということである。そこで、申請者は心筋細胞におけるミトコンドリア呼吸能に対するラパチニブの影響を評価することで心毒性機序を解明しようと考えた。

非臨床試験で副作用の種類や用量、頻度などが適切に予測できれば、副作用を予期した治験計画の立案、副作用惹起の場合の早期治療、副作用惹起性が高いと思われる抗がん薬候補物質の排除が可能となるはずで、がん患者を副作用から保護して、QOLの向上につなげる事ができる。

### 3. 研究の方法

#### (1) ハロセン麻酔犬における心循環器系に対する評価

すでに確立している安全性薬理試験のフォローアップ試験に相当するハロセン麻酔犬モデルを用いて、ラパチニブを0.3および3mg/kgを10分間かけて静脈内投与し、投与後の血圧、心拍数、心収縮力、左室内圧拡張末期圧、体表面心電図、ヒス束心電図、単相性活動電位持続時間、有効不応期、活動電位終末相の同時測定を行った。本研究では、これらに加え心臓の拡張、収縮能を測定するために経胸壁心臓超音波検査を行った。また、ラパチニブの血中濃度や心障害性マーカーとして心筋トロポニンI、ヒト脳性ナトリウム利尿ペプチド前駆体N端フラグメント(NT-proBNP)、クレアチンホスホキナーゼ、アスパラギン酸アミノ基転移酵素、乳酸脱水素酵素を測定した。

#### (2) 慢性房室ブロック犬における催不整脈性に対する評価

慢性房室ブロック犬モデルは薬物性QT延長症候群の高リスク患者と類似の解剖・組織学的(心肥大・心拡大・間質の線維化)・生化学的(カテコールアミン高値、アンジオテンシンII高値、ANP高値)・電気生理学的(再分極予備力減少)な致死性不整脈(TdP)発生基盤を有することが明らかになっている。既報に従って、房室結節付近をカテーテルで焼灼後、慢性房室ブロック犬モデルを完成させた。この慢性房室ブロック犬に覚醒下でホルター心電図を装着し、ラパチニブを0.3mg/kgを10分間かけて静脈内投与し、投与前および投与後21時間にわたって心電図を測定し、不整脈の惹起性および致死性不整脈惹起のバイオマーカーとなるQT間隔の変動を評価した。

#### (3) ヒトiPS細胞誘導心筋細胞におけるミトコンドリア呼吸能の測定

当初はラットの心筋細胞を利用する予定であったが、ヒトの安全性を予測する上ではヒトの細胞で評価した方が有効と考えていたところ、東京大学医学部特任助教（現東邦大学医学部教授）の内藤篤彦先生がヒト iPS 細胞誘導心筋細胞を提供してくれた。そこで計画を変更したヒト iPS 細胞誘導心筋細胞を使用してミトコンドリア呼吸(OCR)と解糖系(ECAR)に対するラパチニブの影響をXF24 Analyzer (Seahorse Biosciences)を用いて測定した。

#### 4. 研究成果

##### (1) ハロセン麻酔犬に対する作用

本検討における薬物の血中濃度はヒトの臨床用量とほぼ同等であった。この血中濃度においてラパチニブは血中の心筋トロポニン I 濃度および抹消血管抵抗を増加させ、心電図 QT 間隔、QTc を延長させ、単相性活動電位持続時間も延長させた。この延長は逆頻度依存的なものであった。また、心不全惹起の指標となる心臓の収縮弛緩能には影響しないことが明らかとなった。

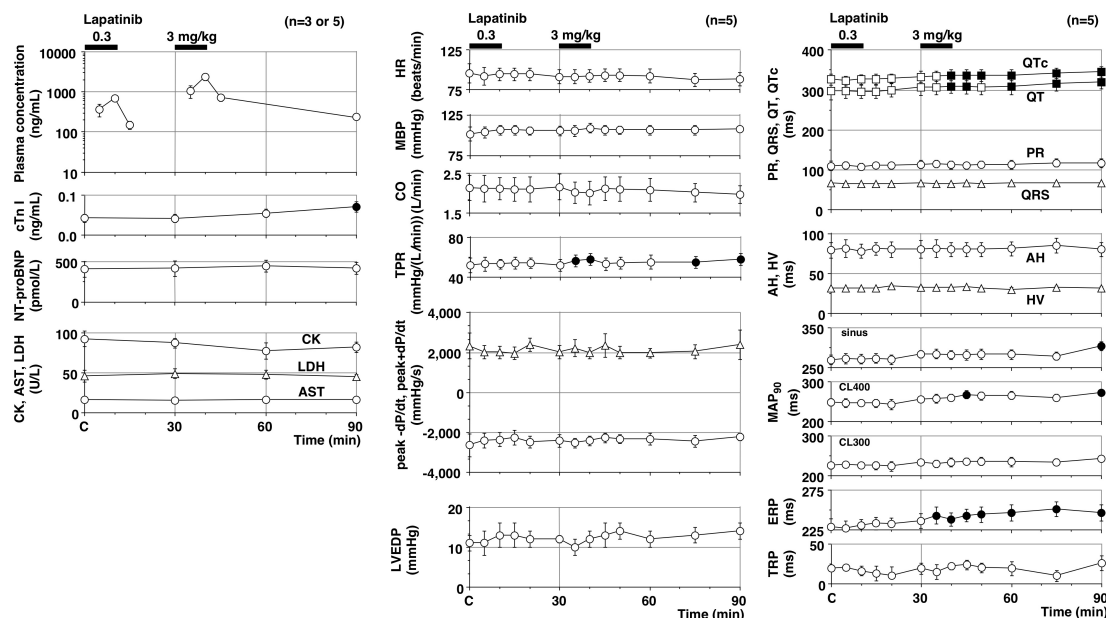


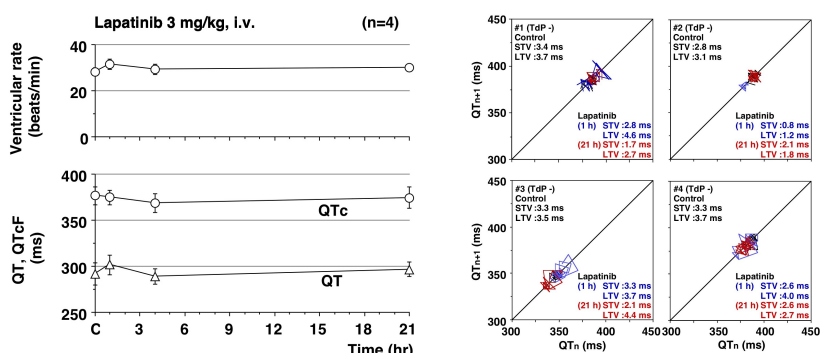
Table 1. The effects of lapatinib on the variables of the echocardiogram and left ventricular pressure

Cardiac cycle	Variables	Control	0.3 mg/kg		3 mg/kg		P value
			30 min	30 min	60 min		
Dimensions	End-diastole						
	LVDd (mm)	25 ± 1	24 ± 1	23 ± 1	24 ± 1	0.54	
	LVEDV (mL)	22 ± 3	21 ± 2	19 ± 2	20 ± 2	0.52	
	LVDs (mm)	17 ± 1	16 ± 1	16 ± 1	16 ± 1	0.39	
End-systole	LVESV (mL)	9 ± 1	8 ± 1	7 ± 1	9 ± 2	0.24	
	EF (Teich) (%)	62 ± 2	61 ± 2	63 ± 3	62 ± 2	0.18	
Systolic function	%FS (%)	31 ± 2	31 ± 1	33 ± 3	32 ± 2	0.27	
	E/A	1.27 ± 0.22	1.28 ± 0.25	1.29 ± 0.27	1.10 ± 0.19	0.52	
Diastolic function	Passive filling						
	E' (m/s)	0.064 ± 0.011	0.064 ± 0.013	0.060 ± 0.013	0.064 ± 0.012	0.87	
	E/E'	7.77 ± 0.8	7.7 ± 0.79	8.45 ± 0.96	7.25 ± 0.50	0.42	
	EDPVR (mmHg/mL)	0.46 ± 0.07	0.59 ± 0.08	0.68 ± 0	0.72 ± 0.17	0.14	
Active relaxation	IRT (ms)	89.9 ± 6.6	93.0 ± 8.6	99.7 ± 9.7	114.5 ± 6.8	0.17	

Data are presented as mean±S.E.M. (n=5). P values represent the statistical significances within a parameter evaluated with one-way repeated-measures analysis of variance. LVDd: Left ventricular end-diastolic diameter; LVEDV: left ventricular end-diastolic volume; LVDs: left ventricular end-systolic diameter; LVESV: left ventricular end-systolic volume; EF (Teich): ejection fraction assessed by Teichholz method; %FS: % fractional shortening; E/A: the peak velocities of E-wave/A-wave; E': the peak velocity of E'-wave; E/E': the peak velocities of E-wave/E'-wave; EDPVR: end-diastolic pressure-volume relationship-left ventricular end-diastolic pressure/LVEDV; and IRT: isovolumic relaxation time.

##### (2) 慢性房室ブロック犬における催不整脈性に対する作用

ラパチニブは単相性活動電位持続時間を延長させたことから、致死的な催不整脈を誘発する可能性が考えられたが、本検討により心電図 QT 間隔は延長せず、致死性不整脈惹起のバイオマーカーとなる QT 間隔の変動も生じていないことが明らかとなった。



### (3) ヒト iPS 細胞誘導心筋細胞におけるミトコンドリア呼吸能に対する作用

XF24 Analyzer (Seahorse Biosciences)を用いて、ヒト iPS 細胞誘導心筋細胞におけるミトコンドリア呼吸(OCR)と解糖系(ECAR)に対するラパチニブの影響を評価してみたが、ヒト iPS 細胞誘導心筋細胞の培養条件を安定させることが難しく、結果を出すことができなかった。

以上をまとめると、本研究を通じて機序を明らかにできなかったが、ラパチニブには急性投与においてQT延長作用が認められ、この作用は臨床の有害事象に一致するものであった。また、末梢血管抵抗が増加することを見出したが、この作用が慢性的に生じることにより臨床で報告されている心不全に至る可能性の一部を示せたと考えられた。さらに、心筋トロポニンI上昇が認められていることからラパチニブには心臓障害性があることは明らかで、ヒト臨床においても心筋トロポニンIを測定することで早期に心毒性が惹起されていることを捕捉できる可能性を示すことができた。

今回実施した内容と同様の検討手法でスニチニブ、ダサチニブ、イマチニブの検討を行っている。これらの結果も心毒性を予測するに足る有効な結果が示されており、安全性薬理試験フォローアップ試験の実施は、本研究課題の目的である非臨床心循環器毒性評価モデルとなり得ることが明確となった。

### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Wada T, Ando K, Naito AT, et al (9名省略), Sunitinib does not acutely alter left ventricular systolic function, but induces diastolic dysfunction. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2018;82:65-75 (査読あり) 他に投稿中2件

〔学会発表〕(計6件)

Kentaro Ando (招待), Bridging studies of lapatinib for onco-cardiology assessed by using

in vivo canine models, The 9th Chinese Toxicology Annual Meeting (中国), 2019年

安東賢太郎(招待) がん分子標的薬の心循環器系に対する安全性薬理的評価、山梨

Onco-Cardiology /Cardiovascular pharmacology Forum、2019年

安東賢太郎(招待) 機序の異なるがん分子標的薬の心循環器系に対する安全性薬理的評価、第28回日本循環薬理学会、2018年

安東賢太郎(代表)、LapatinibはQT間隔を延長するが、致死的な不整脈を誘発しない、第45回日本毒性学会学術年会、2018年

安東賢太郎(代表)、LapatinibはQT間隔を延長するが、致死的な不整脈を誘発しない、第138回日本薬理学会関東部会、2018年

安東賢太郎(招待)、機序の異なるがん分子標的薬の心循環器系に対する安全性薬理的評価、第4回Onco-Cardiology Meeting、2017年

### 6. 研究組織

#### (1)研究分担者

研究分担者氏名：杉山 篤

ローマ字氏名：Atsushi Sugiyama

所属研究機関名：東邦大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号(8桁)：60242632

研究分担者氏名：中瀬古 寛子

ローマ字氏名：Hiroko Nakaseko

所属研究機関名：東邦大学

部局名：医学部

職名：講師

研究者番号(8桁)：80408773

研究分担者氏名：中村 裕二

ローマ字氏名：Yuuji Nakamura

所属研究機関名：東邦大学

部局名：医学部

職名：助教

研究者番号（8桁）：10614894

(2)研究協力者

研究協力者氏名：和田 剛

ローマ字氏名：Takeshi Wada

研究協力者氏名：曹 新

ローマ字氏名：Cao Xin

研究協力者氏名：千葉 浩輝

ローマ字氏名：Koki Chiba

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。