

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08732

研究課題名(和文) 拡張型心筋症に対するiPS心筋細胞に基づくドラッグリポジショニング

研究課題名(英文) Drug repositioning using iPS cell-derived cardiomyocytes for dilated cardiomyopathy

研究代表者

小田 紀子(Oda, Noriko)

大阪大学・医学系研究科・特任准教授(常勤)

研究者番号：90373092

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：拡張型心筋症に対して、既存薬のドラッグリポジショニングによって有効性のある薬剤候補を探索する目的で、iPS細胞由来心筋細胞を用いたin vitro実験、および自然発症拡張型心筋症ハムスターモデルを用いて、安全性、有効性を評価した。その結果、既存薬のなかから6種類が、拡張型心筋症発症に伴う心機能低下に対して有効性を持つことが示された。また、これらを組み合わせて投与することで、相乗効果が期待できることも示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

希少疾病医薬品指定疾患である拡張型心筋症に対し、既存薬のドラッグリポジショニングによる探索として、iPS細胞由来心筋細胞を用いたin vitro実験、および自然発症拡張型心筋症ハムスターを用いたin vivo実験を組み合わせることで、複数の薬剤が有効性を持つことが見いだされた。iPS由来心筋細胞を用いることで、安全性のスクリーニングを効率的に実施することができ、開発にかかる期間・費用が圧縮できる。既存薬のデータを活用し、見出された薬剤は組み合わせ投与が可能でさらに有効性が高まる可能性があることも示唆され、より効率的な開発が可能である。

研究成果の概要(英文)：A therapeutic drug for dilated cardiomyopathy was searched for by drug repositioning of existing drugs. Candidate drugs were selected by in vitro screening using iPS cell-derived cardiomyocytes, and efficacy and safety were evaluated using a hamster model of spontaneous dilated cardiomyopathy. As a result, it was shown that 6 of the existing drugs are effective against the decrease in cardiac function associated with the onset of dilated cardiomyopathy. It was also shown that a synergistic effect can be expected by administering these in combination.

研究分野：再生医療

キーワード：ドラッグリポジショニング 拡張型心筋症 iPS細胞

1. 研究開始当初の背景

希少疾病医薬品指定疾患である拡張型心筋症 (DCM) は、末期心不全にあつては 1 年死亡率が 75%とされる。DCM に対する根本治療は心臓移植であるが、我が国においては、ドナー不足が深刻であり、新しい再生創薬医薬品の開発は喫緊の課題である。

我々はこれまでに重症心筋症患者に対して、自己骨格筋筋芽細胞シート移植法を開発し、2015 年に「再生医療等製品」として承認 (ハートシート) を得ている。また、移植細胞が産生する各種体内再生因子 (HGF、VEGF、SDF-1 等) による血管新生・心筋再生効果の知見に基づき、同様の作用機序を有する新規の低分子化合物 (ONO-1301) を見出した。この化合物の 4 週間徐放性マイクロスフェア製剤 (YS-1402) も開発し、心臓貼付投与にて重症心筋症を対象として医師主導治験 (P-I/IIa) を実施中であった。また、iPS 細胞由来心筋細胞シートを心臓貼付投与する方法も現在検討しており、近々、臨床研究を開始する状況であった。

しかし、これらの細胞療法や心臓貼付投与法は、心臓局所投与である分選択的効果は期待できるが、侵襲性、経済性、安全性、汎用性等において課題も多いとされている。

2. 研究の目的

本研究は、LVAD 装着、心臓移植、細胞療法、及び開胸手術に代わり、経口投与における早期治療介入により、DCM の重症化を抑制し、LVAD 装着や心臓移植の遅延及び回避を目指して、汎用性、経済性、安全性、及び低侵襲性の心血管・心筋再生療法剤を開発し、治験の施行、ひいては薬事法にて承認され、新しい心不全治療剤として臨床の現場で汎用されることを究極の目的と見据える。本研究の位置づけは図 1 に示すものである。

ドラッグリポジショニングスクリーニングにおける本研究の位置づけ

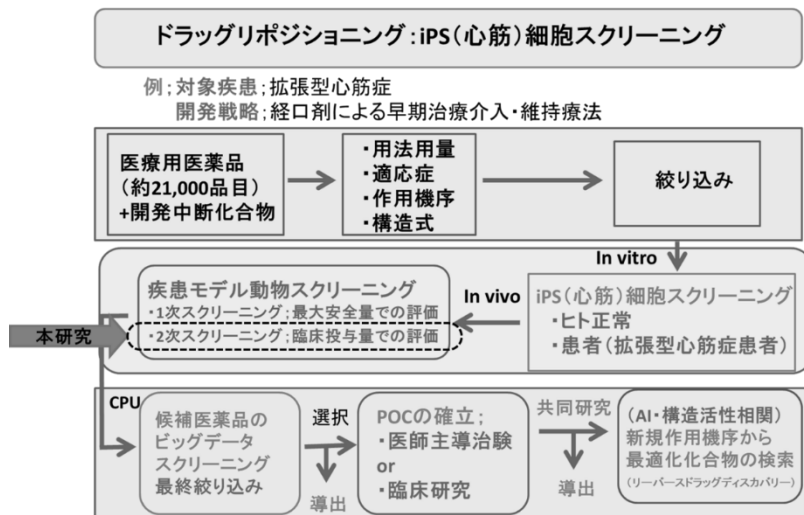


図 1. 本研究の位置づけ

3. 研究の方法

DCM 発症機序検討から、血管新生作用、抗線維化作用、間葉系幹細胞誘導作用、及び体内再生因子誘導作用を有する医薬品類の併用投与が必要と考えている。また、DCM 患者には、通常降圧剤である β -ブロッカー、又はアンジオテンシン II 受容体拮抗剤 (ARB) 等がすでに投薬されて

いるため、DCM 病因論から併用効果を考えると、新規医薬品類は降圧作用を示さない医薬品類を選択する必要がある。これらの考察に基づき、初年度は、In vivo スクリーニング①により選択されたこれらの6種の医薬品類を用いて、スクリーニング②として、各々の臨床投与量を基準として設定された低投与量により、自然発症拡張型心筋症ハムスターモデル系にて心機能のエコー評価による再評価を実施する予定である。また組織化学的評価も行う。

尚、 δ -筋グリカン欠損自然発症拡張型心筋症モデル（日本 SLC）である J2N-k 雄性ハムスターは、20 週齢の心機能 (EF) は、 $43 \pm 3\%$ 程度であり、すでに心機能は $1/2$ 程度低下している。また、同 28 週齢では $31 \pm 4\%$ (差分 $\Delta -12 \pm 4\%$) とさらに悪化 (低下) する。一方、正常ハムスター (J2N-n 系) は、20 週齢では、EF は $88 \pm 2\%$ 程度であり、28 週齢でも 80% 以上を維持している。

次年度、及び最終年度は、選択された最適医薬品類を用いて、現在 DCM 患者に投薬されている β -ブロッカー又はアンジオテンシン II 受容体拮抗剤 (ARB) との併用効果について検討を行う。併用効果は、自然発症拡張型心筋症 (J2N-k) ハムスターモデルを用いて、各々単独及び併用投与にて比較検討を行う。

4. 研究成果

(1) 方法

今回用いた薬剤は下記のとおりであり、それぞれすでに疾患への薬剤として用いられているものである。() は適応症例。

A: ON01301 プロスタサイクリン受容体アゴニスト

B: カモスタットメシル酸塩 タンパク質分解酵素阻害剤 (慢性膵炎における急性症状の緩解および術後逆流性食道炎)

C: オザグレル塩酸水和物 TXA2 合成酵素阻害剤 (気管支喘息)

D: シロスタゾール PDEIII 活性阻害剤 (慢性動脈閉塞症に基づく潰瘍、疼痛、および冷感等の虚血性諸症状の改善、脳梗塞発症後の再発抑制)

E: ピルフェニドン 抗線維化作用 (特発性肺線維症)

F: ベラプロスト Na PGI_2 誘導体 (慢性動脈閉塞症に伴う潰瘍、疼痛および冷感の改善、原発性肺高血圧症)

G: ニンテダニブエタンスルホン酸塩 チロシンキナーゼ阻害剤 (特発性肺線維症)

H: テオフィリン 非選択的 PDE 阻害剤 (キサンチン系気管支拡張剤)

I: シルデナフィルクエン酸塩 PDE V 阻害剤 (勃起不全)

J: ロバスタチン HMG-CoA 還元酵素阻害剤 (高コレステロール血症)

A から E までを用いた投与実験、および F から J までを用いた投与実験について、それぞれコントロール群を設け、独立に行った。

ラットへの反復経口投与から、それぞれ無毒性量を設定し、安全量としての最大投与可能量を設定した。投与時期は 20 週齢から解剖日前日までとした。

心機能等の評価は、投与 4 週間後、8 週間後に心エコーにて心機能の測定を行い、左室内径短縮率 ($\%FS = (LVIDd - LVIDs) \times 100 / LVIDd$) および駆出率 ($EF = (LVIDe3 - LVIDd3) / LVIDd3$) を算出した。組織学的評価は心臓短軸断面写真により、左室壁厚および左室面積を測定した。

(2)結果

投与後 4、8 週間において、コントロール群の EF が低下したが、投与群においては、右に示す通りであり、いずれも EF 悪化を抑制することが示された。

EF(%)	control	A	B	C	D	E
pre	43±2	43±2	43±3	43±2	43±2	43±2
4wk	36±2	45±3	42±3	43±3	43±3	42±3
8wk	31±4	43±3	41±3	42±2	41±3	40±3

%FS	control	A	B	C	D	E
pre	17±1	17±1	17±1	17±2	17±1	17±1
4wk	14±1	18±2	17±1	17±1	17±1	17±0
8wk	12±1	17±2	16±2	17±1	16±2	16±1

左室が形態的にどれだけ収縮したかを示す指標である %FS(左室内径短縮率)について、A~E、および F~J は下記の通り %FS 低下を抑制することが示された。

%FS	control	A	B	C	D	E
pre	17±1	17±1	17±1	17±2	17±1	17±1
4wk	14±1	18±2	17±1	17±1	17±1	17±0
8wk	12±1	17±2	16±2	17±1	16±2	16±1

%FS	control	F	G	H	I	J
pre	18±1	17±1	17±2	17±1	17±1	17±2
4wk	15±1	16±1	16±2	15±1	17±1	15±1
8wk	12±1	15±1	15±1	14±1	15±1	14±1

組織学的解析では、左室面積で有意な増加が認められた A:ONO-1301、C:オザグレル塩酸塩水合物、および D:シロスタゾールは、心臓の組織・形態においても強い改善効果が示唆された。(被験物質 F~J については解析が終了していない。)

(3)併用投与における心機能の評価

上記の検討により拡張型心筋症の病態進行を抑制する薬剤について、これらと降圧剤との併用による相乗効果・相加効果を検討した。臨床的に降圧剤として使用されているβブロッカーであるカルベジロール(被験物質 K)を用い、これに降圧作用を示さない末梢循環改善剤である C:オザグレル塩酸塩水合物、および TGF-β 関連薬剤である E:ピルフェニドンを設定し、二剤あるいは三剤で併用投与して心機能の評価した。

群	投与量	動物数
control	媒体のみ 5 mL/kg)	8
K	0.17 mg/kg	7
C	3.3 mg/kg	7
E	15 mg/kg	7
K+C	0.17 mg/kg + 3.3 mg/kg	7
K+E	0.17 mg/kg + 15 mg/kg	7
K+C+E	0.17 mg/kg + 3.3 mg/kg + 15 mg/kg	7

開始投与時期の週例を 5 週齢とし、8 週間にわたり、経口投与した。投与量と群分けを右に示す。投与後 4 週、8 週時の心機能(左室駆出率

EF) および左室内径短縮率(FS)を測定した結果を下記に示す。

コントロール群において、5 週齢から EF, %FS とともに低下したが、K:カルベジロール、および C:オザグレル塩酸塩水合物の単独投群に

群	EF (%)			FS (%)		
	pre	4wk	8wk	pre	4wk	8wk
control	77.4 ± 2.6	70.6 ± 22.9	63.2 ± 2.2	39.8 ± 3.9	33.6 ± 2.1	28.4 ± 1.4
K	76.9 ± 3.4	71.7 ± 2.3	65.8 ± 1.9	39.2 ± 2.3	34.4 ± 1.8	30.3 ± 1.3
C	77.3 ± 2.9	72.3 ± 2.0	66.6 ± 2.8	39.1 ± 2.7	34.9 ± 1.5	30.7 ± 2.0
E	77.1 ± 3.4	71.3 ± 2.4	65.2 ± 2.6	39.0 ± 3.0	34.1 ± 1.9	29.7 ± 1.8
K+C	77.4 ± 2.2	71.7 ± 2.7	66.5 ± 2.0	39.1 ± 2.0	34.5 ± 2.1	30.6 ± 1.4
K+E	77.2 ± 2.2	72.1 ± 2.2	66.5 ± 2.0	38.9 ± 1.9	34.7 ± 2.1	39.8 ± 3.9
K+C+E	76.7 ± 3.3	72.0 ± 2.8	67.5 ± 2.4	38.6 ± 2.7	34.7 ± 2.2	31.3 ± 1.6

においては EF, FS の低下の有意な抑制がみられた。一方、E:ピルフェニドン単独投与は対照との有意差はなかった。

二剤併用投与として、K:カルベジロールと E:ピルフェニドンでは、投与後 8 週の EF, FS が

コントロールと比べ有意に高値であり、症状悪化の抑制が認められた。また、三群投与においては、投与後8週で、EF、FSが有意に高値であり、症状悪化の抑制が認められた。

一方、K:カルペジロールとC:オザグレル塩酸塩水和物の併用投与は、C:オザグレル単独投与と有意差が無く、併用投与による相加効果は認められなかった。三剤併用投与においては、いずれの単独投与あるいは二剤併用投与よりも効果が増強され、相乗効果が示された。

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 1件）

1. 著者名 5. Takeda M, Miyagawa S, Ito E, Harada A, Mochizuki-Oda N, Matsusaki M, Akashi M, Sawa Y.	4. 巻 11(1)
2. 論文標題 Development of a drug screening system using three-dimensional cardiac tissues containing multiple cell types	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 5654
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-85261-y.	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 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Iseoka H, Miyagawa S, Sakai Y, Harada A, Sawa Y
2. 発表標題 In vitro Drug Screening Model for Cardiac Fibrosis Using Human Induced Pluripotent Stem Cell Derived Cardiac Tissue Provides Drug Repositioning of Anti-fibrotic Drugs for Cardiac Fibrosis
3. 学会等名 American Heart Association Scientific Meeting 2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊勢岡 弘子、宮川 繁、酒井 芳紀、原田 明希摩、澤 芳樹
2. 発表標題 ヒトiPS細胞由来心筋細胞を用いた心臓線維化モデルの開発
3. 学会等名 第18回 日本再生医療学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊勢岡 弘子、宮川 繁、酒井 芳紀、原田 明希摩、澤 芳樹
2. 発表標題 ヒトiPS細胞由来心筋細胞を用いた心臓線維化モデルによる抗線維化薬の探索
3. 学会等名 第57回日本人工臓器学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ito E, Miyagawa S, Kawamura T, Kawamura A, Takeda M, Harada A, Oyama K, Mochizuki-Oda N, Sawa Y
2. 発表標題 Establishment Of Administration Protocol Of Immunosuppressive Drug For iPS Cell Derived Cardiomyocytes Patch Transplantation In Rat Myocardial Infarction Model,
3. 学会等名 American Heart Association Scientific Sessions (国際学会)
4. 発表年 2020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
研究協力者	酒井 芳紀 (Sakai Yoshiki)		

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
---------	---------