

令和 4 年 6 月 27 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07179

研究課題名(和文) がん分子標的治療薬起因性肝障害モデル樹立とメカニズム解析

研究課題名(英文) Elucidating Molecular Mechanisms of the Hepatotoxicity associated with Targeted Cancer Therapies

研究代表者

藤阪 保仁 (Fujisaka, Yasuhito)

大阪医科薬科大学・医学部・特別職務担当教員(教授)

研究者番号：50411369

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：非小細胞肺癌の治療薬ゲフィチニブの肝障害を予測できるアッセイ系の確立を目的とした。ゲフィチニブ投与により肝障害を発症した患者群(H群)と発症しなかった患者群(N群)から採血し、得られた血液細胞からiPS細胞(iPSCs)を樹立し、肝細胞への分化を行った(iPS-heps)。乳酸脱水素酵素(LDH)アッセイでゲフィチニブによる細胞障害性の違いを検討したところ、iPS-hepsでは両群で有意差はなかったが、iPSCsでは、H群の方が有意に細胞障害性が強いことが分かった。以上から、iPSCsを用いた細胞障害アッセイが、臨床における肝障害を予測できる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ゲフィチニブは非小細胞性肺癌の主要な治療薬であるが、たとえ奏効していたとしても、肝障害により約10%の患者で治療の中断や多剤への変更を余儀なくされているのが現状である。本研究では、治療前の患者サンプルから作製したiPS細胞を用いてゲフィチニブによる細胞障害アッセイを行うことにより、事前に肝障害を予測でき、治療薬選択に役立てることができる可能性を示唆しており、ゲフィチニブの投与が最適治療であると考えられるがん患者には有用であると思われる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to establish an assay system predicting liver injury by gefitinib used in the treatment of non-small cell lung cancer. Patient-derived iPSCs (PD-iPSCs) were generated by reprogramming peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) obtained from two groups of gefitinib-treated patients with moderate hepatotoxicity (H group) or no hepatotoxicity (N group). PD-iPSCs were partly differentiated into hepatocytes (PD-iPS-heps). Cytotoxicity in PD-iPSCs and PD-iPS-heps after gefitinib treatment was evaluated using a lactate dehydrogenase (LDH) release assay. The gefitinib-induced cytotoxicity in PD-iPSCs from the H group was significantly higher than those from the N group, whereas there were no significant differences between the groups in PD-iPS-heps. These results suggest that using PD-iPSCs in preclinical assessment may be a good indicator for the prediction of gefitinib-induced cytotoxicity in clinical use.

研究分野：臨床腫瘍学

キーワード：ゲフィチニブ 肝障害 iPSC細胞 肝細胞分化

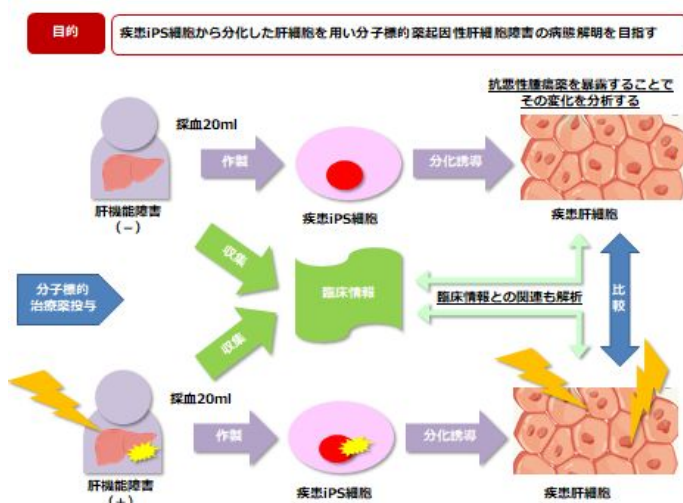
様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

がんの発生・進展に直接的に重要な役割を果たす遺伝子をドライバー遺伝子という。がん発生メカニズムに対する理解が進み、このドライバー遺伝子のコードするタンパク質分子（ドライバー分子）を標的とする低分子阻害剤や抗体が分子標的治療薬として開発され臨床導入された。分子標的治療薬は、シスプラチンを代表とする細胞障害性抗がん剤とは明らかに異なる作用メカニズムと副作用プロファイルを持ち、劇的にがん薬物療法を向上させた。しかし、投薬を受けた患者の何割かはその副作用に苦しみ、いったん重篤な副作用が顕在化すると、該当薬剤の投与休薬や中止、他剤への治療変更も余儀なくされている。この分子標的薬による副作用は治療開始前には予想不能で、早期開発臨床試験を中心に長年副作用評価がなされてきたにもかかわらず、その副作用発症のメカニズムは全く解明されていない。死に直面するがん患者の予後を改善することが第一に重要ではあるが、同じドライバー分子に対して複数の薬剤がある現在、いかにその個人に適した副作用の少ない分子標的治療薬を選択していくか、その為に副作用は事前に予測可能か、予防は可能なのか、など未解答な臨床的問いは非常に多い。進行がん患者であっても長期生存が現実となり、長期間にわたりがん薬物療法を受けるケースが着実に増加しており、より副作用対策が重要になってきている。

2. 研究の目的

これまで分子標的治療薬の副作用発症に関するメカニズム解析は、細胞障害性抗がん剤と同様に、その血中濃度や代謝の視点から検討されてきた。しかし実際に副作用発症患者で何が生じたのかを検証しなければ真のメカニズム解明にはつながらない。ところが、この目的の為に必要



な肝臓生検など侵襲的な検査を、まさにがん薬物療法を行っている患者に施行するのは事実上困難である。そこで本研究では、自ら治療を行っている分子標的治療薬を投与し肝障害を発症したがん患者から iPS 細胞を作製し、それを用いて in vitro で薬剤による副作用発現をモデル化すること、そして最終的には肝障害のメカニズム解明に迫ることを目指して研究を行った(左図)。

3. 研究の方法

(1) 研究対象者の選定方法

がんと診断され、分子標的治療薬単剤の投与歴のある患者で、N 群：肝機能障害を起こさなかった患者群と H 群：肝機能障害を起こした患者群（AST (Alanine transaminase) 100IU/l 以上または ALT (Aspartate transaminase) 100IU/l 以上) を選定した。それぞれの患者から 被験者本人より文書による同意を得たのち、研究に参加していただいた。

(2) 具体的方法

in vitro モデル化を滞りなく進める上で対象となる患者が多く、研究参加者を募り易いことは極めて重要であるため、肝機能障害の頻度の高いゲフィチニブを取り上げた。ゲフィチニブは EGFR 遺伝子変異陽性肺癌に対する分子標的薬として世界に先駆けて本邦で上市され、当院でキードラッグとして約 30-40%前後の患者に使用している。その一方、投薬を受けた 11%の患者で肝機能障害が生じている。

上述した条件により N,H 群から 3 名ずつの患者を選定し、以下の実験プロトコールで研究を進めた。

= = =

(当初の研究計画)

- a) 採血と得られた血液細胞からのエピゾーマルベクターを用いた iPS 細胞 (iPSCs) 作製 (合計 6 名)
- b) iPSCs 株の品質評価と選別 (遺伝子発現、増殖能、分化能、核型異常の有無等によりそれぞれの患者から質の良い 2 クローン、合計で 12 クローンを選別)
- c) サイトカインや化学物質を用いた iPSCs の肝細胞 (iPS-heps) への分化誘導
- d) (既報に従い分化誘導)
- e) 免疫染色等による分化効率評価 (最終的な iPS-heps への分化はアルブミン発現で判定)
- f) 各細胞株により分化に用いる条件を最適化し、iPS-heps を効率的に作製
- g) iPS-heps をゲフィチニブで処理
- h) 薬剤処理による細胞死、細胞障害を測定 (LDH 濃度測定等)

H 群由来 iPS-heps で N 群と比べ顕著な細胞死、細胞障害が認められた場合、モデルが樹立できたと判断する。

= = =

4 . 研究成果

本研究は、非小細胞肺癌のキードラッグである分子標的治療薬ゲフィチニブの引き起こす数多くの副作用の中でも特に臨床上問題となる肝機能障害を取り上げた。非小細胞肺癌でゲフィチニブによる治療を行った患者の中で、ゲフィチニブ投与により肝機能障害を発症した患者群 (グループ H) と発症しなかった患者群 (グループ N) から採血し、得られた血液細胞から iPS 細胞を樹立 (iPSCs) し、肝細胞への分化に成功した (iPS-heps) 。肝細胞への分化を見極めるために、分化細胞であることを見極めるための幹細胞マーカーと肝細胞に分化していることを見極める肝細胞マーカーを用いた。グループ H2 人、グループ N2 人の計 4 人から、iPS-heps を作製し、乳酸脱水素酵素 (LDH) アッセイにより、ゲフィチニブによる細胞障害性を検討した。その結果、グループ H の方が、グループ N よりもゲフィチニブによる細胞障害性が強い傾向にあったが、有意な差ではなかった。iPS-heps による解析は、細胞間にばらつきが出るのが原因と考えられたため、当初の計画を変更して、分化する前の iPSCs を用いてゲフィチニブによる細胞障害性を検討した。その結果、グループ H の方が、グループ N よりも有意に細胞障害性が強いことが分かった。iPSCs でも、患者の薬剤性肝障害を引き起こす遺伝的背景が反映していると考えられ、iPSCs を用いた細胞障害アッセイが、臨床における肝障害を予知できる可能性が示唆された。ゲフィチニブによる肝障害の分子メカニズムについては途上であり、今後検討していく必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 朝日通雄、友田紀一郎、渡辺満里奈、藤阪保仁
2. 発表標題 ヒトiPS細胞を用いたゲフィチニブ起因性肝障害のin vitroモデルの樹立とメカニズム解析
3. 学会等名 日本臨床薬理学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤阪 保仁、朝日 通雄、友田 紀一郎、渡辺 満里奈、中川 孝俊、田村 洋輔、鶴岡 健二郎、松永 仁綜、辻 博行、池田 宗一郎
2. 発表標題 がん分子標的治療薬起因性肝障害モデル樹立
3. 学会等名 第62回日本肺癌学会学術集会
4. 発表年 2021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	朝日 通雄 (Asahi Michio) (10397614)	大阪医科薬科大学・医学部・教授 (34401)	
研究分担者	友田 紀一郎 (Tomoda Kiichiro) (50362843)	大阪医科薬科大学・医学部・非常勤講師 (34401)	

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