

令和 6 年 5 月 31 日現在

機関番号：13101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2023

課題番号：21K20861

研究課題名（和文）メダカモデルを用いた分子標的薬の副作用の発症予測マーカーと予防法の新規開発

研究課題名（英文）Development of new predictive markers for the onset of side effects of molecularly targeted drugs and their prevention using a medaka (Japanese killifish) model

研究代表者

酒井 規裕 (Norihiro, Sakai)

新潟大学・医歯学総合病院・特任助教

研究者番号：00911984

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：肝細胞癌の治療薬であるレンバチニブをメダカモデルに投与し、濃度依存性のレンバチニブの毒性が認められることを確認した。具体的には、濃度依存性に浮腫、体重増加が認められ、尾ひれの血管面積、血流速度も減少していた。また、ヒスチジンを同時に投与すると、尾ひれの血管面積や血流速度が保たれることを発見した。レンバチニブ投与前後のヒト血清のエクソソームをプロテオーム解析すると、投与前後で1/4以下となった蛋白 55蛋白（CXCL7 0.13倍、COL1A1 0.20倍など）4倍以上となった蛋白15蛋白（LMTK2（アポトーシス関連）13.6倍、TGM3（表皮角化、毛髪形成）10.0倍などが認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

レンバチニブは肝細胞癌の全身化学療法として、その有効性から肝癌ガイドラインでも推奨されている標準治療のひとつである。いっぽうで、その副作用（手足症候群など）により継続が困難となる場合も多い。（日本人で手足症候群の発症率が高いという報告もされている。）そこで、レンバチニブを投与する際の副作用予測マーカーや、副作用予防薬を探索することで治療を受ける患者様の予後の延長やQOLの改善につなげていきたいと考え、本研究を開始した。

研究成果の概要（英文）：Lenvatinib, a drug used in the treatment of hepatocellular carcinoma, was administered to a medaka (Japanese killifish) model, and a concentration-dependent lenvatinib toxicity was observed. Specifically, concentration-dependent edema and weight gain were observed, as well as decreased vascular area and blood flow velocity in the tail fin. We also found that the vascular area and blood flow velocity of the tail fin were maintained when histidine was administered simultaneously. Proteomic analysis of exosomes of human serum before and after lenvatinib treatment revealed that 55 proteins (CXCL7 0.13-fold, COL1A1 0.20-fold, etc.) were reduced by less than 1/4 before and after treatment, and 15 proteins (LMTK2 (apoptosis-related) 13.6-fold, TGM3 (epidermal keratinization, hair formation) 10.0-fold were observed.

研究分野：肝臓

キーワード：レンバチニブ メダカ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

レンパチニブ(Lenvatinib; 以下 LEN)を含むマルチキナーゼ阻害剤は肝細胞癌の抗腫瘍治療として有効である。一方で、これらの薬物は高血圧、手足症候群、肝機能低下といった副作用を引き起こすことが知られている。

本教室では、これまでにソラフェニブ (Sorafenib; 以下 SOR) で、独自のメダカモデルによる副作用発症機序の解明¹⁾と副作用予防の解析²⁾³⁾を進め、その有用性を報告している。

そこで本研究では、LEN 投与メダカモデルの確立と副作用評価、副作用改善効果の検証を行い、新たな治療法やモデルの確立を目指し研究を開始した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、メダカを用いた LEN の副作用評価モデルの確立と、LEN 投与したヒト・メダカの血中エクソソームが血清学的マーカー、あるいは副作用の治療法として有用か評価することである。学術的独自性の点では、国内外で同様の試みによる副作用予防・評価の報告は未だ無く、類似した研究は申請者ら自身の行った SOR に対する研究のみである。臨床への発展という点では、本研究で得られた結果を基に、ヒトにおいて、LEN 治療の臨床研究に応用していくことができ、創造性の高い研究内容であると考え、研究を開始した。

3. 研究の方法 (予定)

LEN 投与メダカモデル、ヒトにおいて、副作用評価と血管拡張作用のあるヒスチジン (Histidine; 以下 HIS)投与の及ぼす影響の評価、および血中エクソソームの解析を行う。具体的には以下の研究方法を予定した。

メダカモデルへの LEN 投与、HIS 投与による評価

申請者らが以前に SOR で報告した方法で、水槽内のメダカへ LEN 投与、HIS 投与を行う。その後、尾ひれの血管径から血管障害の程度を評価する。

LEN 投与メダカモデル、ヒト血清エクソソームの解析

メダカモデルの血清と LEN 投与したヒト血清、臨床病態で、副作用の出た患者血清と出ていない患者血清からエクソソームを抽出し、miRNA や蛋白を網羅的に検証した後に、real time PCR や Western Blot、質量分析計で解析して比較検証する。

以上より、メダカモデルとヒト血清を用いて、LEN 投与時の副作用評価と HIS の及ぼす影響、および血清エクソソームを同定し、さらにエクソソームそのものが発症予測のバイオマーカーとなるか検証する。

4. 研究成果

肝細胞癌の治療薬である LEN をメダカモデルに投与し (図 1) 濃度依存性の LEN の毒性が認められることを確認した。具体的には、LEN 投与群では浮腫、体重増加が認められ (図 2) その変化は LEN の濃度依存性に認められていた (図 3)、LEN 投与群のメダカモデルにおいては、尾ひれの血管面積、血流速度も減少していた (図 4 (次頁))。

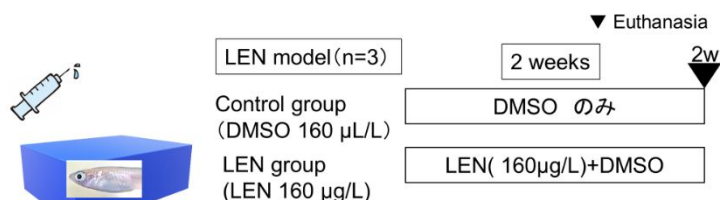


図1: SORでの先行研究(Shinagawa-Kobayashi Y et al, BBRC. 2018)などを基に上記の薬物濃度、投与期間を決定した。

(参考: SOR 400mgでのCmax 1.21mg/L, LEN 8mgでのCtrough 40µg/L)



	体長	体重	肝重量
Control群	3.5±0.1	0.45±0.08	0.030±0.002
LEN群	4.1	0.99	0.014

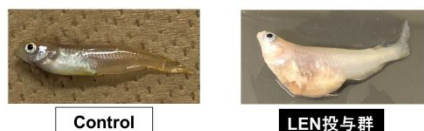
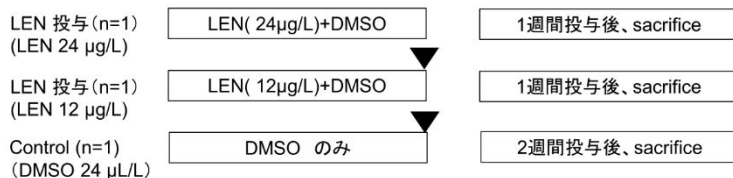


図2: LEN投与で著明な浮腫・体重増加を認めた。



	体長	体重
Control	3.7	0.473
LEN 12µg/L	3.7	0.641
LEN 24µg/L	3.8	0.743



図3: LEN投与で濃度依存性に浮腫・体重増加を認めた。

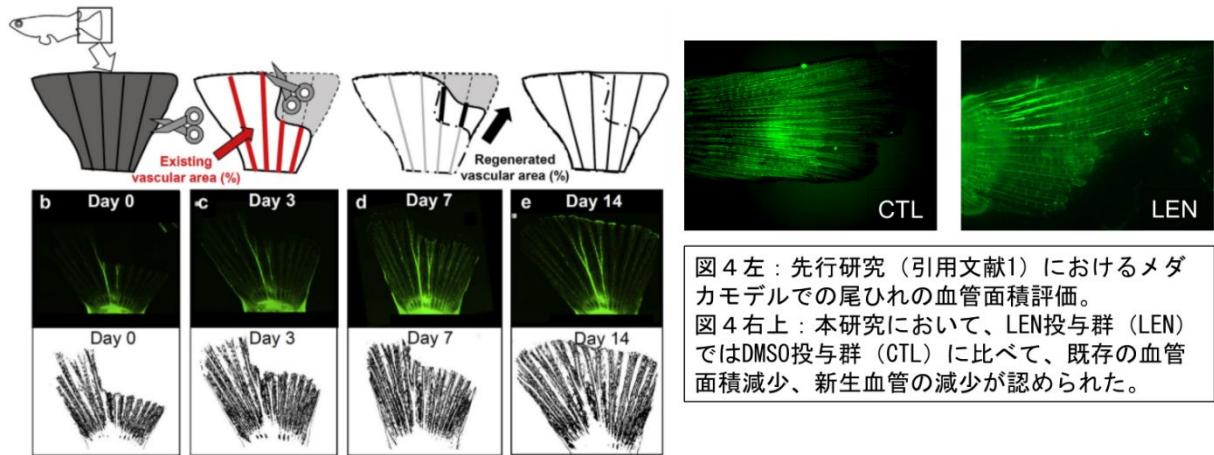


図4左：先行研究（引用文献1）におけるメダカモデルでの尾ひれの血管面積評価。
 図4右上：本研究において、LEN投与群（LEN）ではDMSO投与群（CTL）に比べて、既存の血管面積減少、新生血管の減少が認められた。

また、HISを同時に投与すると、尾ひれの血管面積や血流速度が保たれる傾向を認めた。

さらに、LEN投与前後のヒト血清中のエクソソームをMagCapture Exosome Isolation Kitを使用し分離した後、プロテオーム解析すると、1832蛋白を解析でき、CD9, CD81といったエクソソームマーカー蛋白も含まれており、適切なエクソソーム分離・解析ができたと考えられた。また、投与前後で1/4以下となった蛋白55蛋白（CXCL7 0.13倍、COL1A1 0.20倍など）、4倍以上となった蛋白15蛋白（LMTK2(アポトーシス関連) 13.6倍、TGM3(表皮角化、毛髪形成) 10.0倍などが認められた。

以上のように、メダカモデルを用いたLEN投与モデルでは、濃度依存性の浮腫・体重増加・尾ひれの血管面積減少、血流低下といったヒトでの副作用を体現した変化が認められ、その変化は血管拡張作用を持つHIS投与で軽減されることが示唆された。また、メダカモデルでは血清が微量であり、メダカモデルから血清エクソソームを抽出するところまでは至らなかった。LEN投与前後のヒト血清からエクソソームを抽出し、プロテオーム解析したところ、CD9, CD81といったエクソソームマーカーを含めて多くの蛋白の変化を解析することができ、投与前後で変化の大きかった蛋白を数十種類見出すことができた。ウエスタンプロットやreal time PCRを用いた個々の蛋白解析や遺伝子変化の解析までは行えなかったが、これらの変化を解析することで副作用発現予測や副作用軽減などへの治療応用が期待され、今後も検討を重ねていく。

<引用文献>

- 1) Shinagawa-Kobayashi Y, Kamimura K, et al, BBRC. 2018
- 2) Sakai N, Kamimura K, et al. Cancer Manag Res, 2019.
- 3) 上村顕也、他．癌と化学療法，2016

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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