

日本医療研究開発機構 創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業 事後評価報告書



I 基本情報

補助事業課題名: (日本語) 創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業
(プログラム名) (英語) Platform Project for Supporting Drug Discovery and Life Science Research

実施期間: 平成 29 年 10 月 16 日～令和 4 年 3 月 31 日

補助事業担当者 氏名: (日本語) 内藤 篤彦
(英語) NAITO Atsuhiko

補助事業担当者 所属機関・部署・役職:
(日本語) 東邦大学・医学部医学科・教授
(英語) Professor, Toho University Faculty of Medicine.

II 補助事業の概要

(日本語)

心臓に対する毒性は医薬品の開発過程における中止理由として最も大きな割合を占めており、開発候補化合物の心臓に対する安全性をより早期に、より正確に評価することは、創薬研究において最も重要な事項の一つである。本補助事業において我々は、アカデミア発の医薬品候補化合物の心血管系への安全性を評価するため、提供された医薬品候補化合物に対して hERG 試験およびヒト iPS 細胞由来心筋細胞 (ヒト iPS 心筋) を利用した in vitro 催不整脈性評価試験およびげっ歯類 (ラット、モルモット) および非げっ歯類 (イヌ) を利用した in vivo 心血管安全性評価試験を実施する体制を整備した。事業実施期間を通じて 2 件の in vitro 催不整脈性評価試験の依頼があり、1 件は hERG 試験を実施して支援を終了した。もう 1 件からは最終的に化合物の物性改善が十分でなく、提供されないまま支援を終了した。我々の特徴の一つであった in vivo 心血管安全性評価試験については依頼されないまま事業終了となった。

1990 年前後に複数の薬物の副作用として多くの患者が致死性不整脈の一種である Torsade de pointes で死亡したことを受け、現在、医薬品の開発過程において医薬品規制調和国際会議 (ICH) が示すガイドラインに沿った安全性薬理試験は必須となっている。アカデミアでの探索的な基礎研究および創薬標的を同定した後の創薬スクリーニングの結果、一定の有効性が示された化合物に対して我々が心臓に対する安全性を十分に検証することで製薬企業への導出が促進されるのではないかと考えていたが、十分な支援件数を確保できなかった理由としては以下を考えている。

BINDs では様々な創薬ステージのアカデミアを支援対象としているが、我々が支援対象とする安全性薬理試験を行うステージの件数は多くないと考えられる。また、安全性薬理試験を行う対象となるような「有望な化

化合物」が同定された場合であっても、心血管系に対する安全性薬理試験のみを実施可能な我々ではなく、その他の前臨床試験も実施できるような機関（企業、アカデミア）との共同研究が選択される可能性が高いと考えられる。また、比較的簡便に実施可能な hERG 試験で陽性となった化合物についてはその段階で開発中止が選択されることが多く、その他の試験を行うことで真に催不整脈性を示すかを評価するニーズは高くなかった可能性がある。

BINDs の成果報告会等を通じて、hERG 試験だけで催不整脈性の判断はできないことを verapamil (hERG 試験陽性となるが QT 延長作用を示さず、催不整脈リスクも低い) 等を例に挙げて周知してきた。事業実施期間中の支援件数は少なかったものの、本事業を通じて整備した試験体制を利用することで、将来的に hERG 試験陽性となるが他の性質が極めて優秀な医薬品候補化合物がアカデミアで同定された際には共同研究を通じて詳細な心血管系への安全性のリスク評価を行い、アカデミア創薬の支援に貢献することが可能と考えている。

心臓に対する毒性として、薬物が不整脈を誘発する毒性、即ち催不整脈性がよく知られているが、doxorubicin や itraconazole、trastuzumab、sunitinib 等の一部薬物は心臓の「動き」を障害し、心機能を低下させるような毒性（心臓収縮・拡張毒性）を示す。一方、人間に対する心臓収縮・拡張毒性を前臨床試験で予測する手法は十分には確立しておらず、患者に投与されてはじめて明らかになる場合も存在する。本事業において我々は、特定の幅で培養することでヒト iPS 心筋の収縮・弛緩に配向性を付与した培養モデルを利用して、心臓収縮・拡張毒性を評価する手法の確立を試みた。心臓収縮・拡張毒性について近年特に注目されている抗がん薬に着目し、心臓収縮・拡張毒性を示す抗がん薬およびそのような抗がん薬と同じ作用機序であるにもかかわらず心臓収縮・拡張毒性を示さない抗がん薬の評価を行なったところ、doxorubicin では収縮速度や弛緩速度、1 拍動あたりの移動距離といった指標が低下したのに対して、心臓収縮・拡張毒性を示すその他の分子標的薬ではそれらの指標は低下せず、収縮と弛緩の一斉性が低下することを見出し、特に分子標的抗がん薬が心臓収縮・拡張毒性を示すかを予測する指標として有用である可能性が示された。また、抗体薬である trastuzumab は心臓収縮・拡張毒性を示すものの、我々の評価ではその毒性による変化を捉えることができなかった。そこで、trastuzumab を作用させた際のヒト iPS 心筋の動きについて畳み込みニューラルネットワークを利用して分類モデルを作成し、trastuzumab を作用させたヒト iPS 心筋の分類が 80%近い精度で可能な人工知能プログラムのプロトタイプを作成した。

我々はさらに、心臓収縮・拡張毒性を評価するための培養モデルを利用して doxorubicin 心筋症（抗がん薬である doxorubicin の投与によって発症する心不全）を再現する細胞モデルを作成した。Doxorubicin は強い毒性を有しており、これまでに報告された論文で利用されているプロトコルで作用させると 2 日程度でほぼ全ての心筋細胞が死滅するが、これは doxorubicin 投与後に患者で認められる心臓における変化を当然のことながら再現していない。そこで独自のプロトコルを開発し、蓄積性に心臓の収縮・拡張機能を障害し、ドキソルビシン投与後に患者で認められる心臓における変化により近い変化を再現する細胞モデルを作成した。作成した in vitro ドキソルビシン心筋症モデルと、通常のヒト iPS 心筋の遺伝子発現を比較検討した。In vitro ドキソルビシン心筋症モデルでは、心筋症だけでなく、心筋梗塞後の患者において発現が変化する遺伝子と類似の遺伝子発現の変化が認められたことから、作成したモデルは in vitro 心不全モデルとしてドキソルビシン心筋症を含む心不全治療薬の創薬スクリーニングや、心臓に対する毒性が出現しやすい心不全患者における医薬品安全性を評価するために利用できる可能性が考えられた。

In vitro doxorubicin 心筋症モデルについて BINDs 成果報告会にて発表を行なったところ、1 件の支援依頼を受け、提供された薬物が doxorubicin による心筋障害を予防できるか検証した。提供された薬物でヒト iPS 心筋を処理した後に doxorubicin を作用させたところ、doxorubicin によるヒト iPS 心筋の動きの減弱を予防できることが見出された。予防効果は、現在心筋症の発症を予防するために利用されている dexrazoxane よりも高く、doxorubicin 心筋症発症予防薬として有用である可能性を報告して支援を終了した。

アカデミアから支援依頼があった際に対応する体制を整備するため、非げっ歯類を利用した in vivo 心血管

安全性評価試験に関しては心血管系への有害事象が報告されている一方で因果関係が明らかでない複数の既存薬の評価を行い、技術の維持を行なった。双極性障害の躁病エピソードの治療に利用されている炭酸リチウムが様々な不整脈を起こす可能性がインタビューフォーム等に記載されているものの、炭酸リチウムと不整脈の直接的な因果関係については明らかでなかった。非げっ歯類を利用した心血管安全性評価試験を行なったところ、炭酸リチウム単独であれば治療濃度と心電図変化が認められる濃度には十分な安全域が存在することが明らかになった。また、抗がん薬の一種で Bcr/Abl 阻害薬である dasatinib について、非げっ歯類を用いた *in vivo* での心血管安全性評価を行なった。Dasatinib は再分極時間を軽度延長させたが不整脈は誘発されなかった。また、dasatinib を投与された患者の一部で認められる出血傾向を再現できることが確認され、心血管系以外の項目についても注目して評価を行うことの重要性が示された。

(英語)

Cardiac toxicity is one of the most important reasons for the discontinuation of drug development. International Consortium on Harmonization (ICH) provides the guideline for evaluating the potential arrhythmogenicity of drug candidates based on *in vitro* assessment of IKr inhibition by hERG test and *in vivo* measurement of QT interval. In this project, we established a system to evaluate the cardiovascular safety of drug candidates developed in academia by an hERG test and *in vivo* QT assay using canines. We also prepared a follow-up system to perform *in vitro* proarrhythmia assay using human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes.

We received two requests for an hERG test and completed one request during the project period. We could not perform an hERG test for one of the requests because we did not receive the compound within the project period. There was no request for *in vivo* QT assay. We initially postulated that we could facilitate the out-licensing of the compounds developed in academia by verifying the cardiac safety of the compounds, but the demand for such support seemed to be small. Through the annual progress meeting of a BINDs program, we repeatedly emphasized that the proarrhythmic potential cannot be determined by the hERG test alone, using verapamil (which inhibits an hERG channel but does not show QT prolongation) as an example. Although we could not satisfactorily support enough cases during the project period, we hope to contribute to supporting drug discovery in academia in the future.

Several drugs such as doxorubicin, itraconazole, trastuzumab, and sunitinib show toxicity that impair cardiac function and induce heart failure (contractile toxicity). However, a strategy to predict cardiac contractile toxicity has not been fully established. In this project, we attempted to establish a method for evaluating cardiac contractile toxicity by analyzing the movement of line-cultured human induced pluripotent stem (iPS) cell-derived cardiomyocytes (iPSCMs) with a motion vector image analysis system. We analyzed the effect of anticancer drugs that show cardiac contractile toxicity and anticancer drugs with the same mechanism of action but do not show such toxicity. Doxorubicin strongly impaired the contraction speed, relaxation speed, and deformation distance of iPSCMs reflecting its strong toxicity on cardiomyocytes. On the other hand, molecule-targeted anticancer drugs such as sunitinib did not impair those parameters but impaired the parameter that may reflect the synchronicity of cardiomyocyte contraction/relaxation suggesting that such parameters may be useful in predicting cardiac contractile toxicity of small-compound drugs.

We also investigated the effect of trastuzumab, an antibody drug that exhibits cardiac contractile toxicity, but failed to identify any changes induced by the drug in a current motion vector imaging system. We, therefore, developed a convolutional neural network model that could distinguish the movement of iPSCMs after trastuzumab treatment with an accuracy of nearly 80%, suggesting the usefulness of artificial intelligence in the field of safety pharmacology.

We also established an *in vitro* model that mimics doxorubicin cardiomyopathy (heart failure caused by doxorubicin) by treating iPSCMs with a protocol that reproduces the *in vivo* pharmacokinetics of doxorubicin. Gene expression analysis revealed that our *in vitro* doxorubicin cardiomyopathy model showed changes in gene expression similar to those seen in

patients after myocardial infarction and cardiomyopathy. Therefore, the model may be used as an in vitro heart failure model for drug discovery screening for heart failure drugs, including doxorubicin cardiomyopathy, and for evaluating drug safety in heart failure patients, who are prone to cardiac toxicity.

We introduced our in vitro doxorubicin cardiomyopathy model at the annual progress meeting of a BINDs program and received one request to test whether their drug candidate could prevent doxorubicin-induced impairment in iPSCM contraction/relaxation. The provided drug candidate can prevent doxorubicin-induced impairment in iPSCM contraction/relaxation better than dexrazoxane, a drug currently used to prevent doxorubicin cardiomyopathy.

We evaluated several drugs with the arrhythmia as a potential side effect using non-rodents. Lithium carbonate, which is used to treat manic episodes of bipolar disease, has been reported to cause various types of arrhythmias. We performed a cardiovascular safety pharmacological study of lithium carbonate and revealed a sufficient safety margin between the therapeutic concentration and the concentration at which lithium carbonate cause electrocardiographic changes. We also performed a cardiovascular safety pharmacological study of dasatinib, a Bcr/Abl inhibitor. We found that dasatinib mildly prolonged repolarization time but did not induce arrhythmias. We also found that bleeding diathesis, one of the side effects of dasatinib, is also observed in canine model indicating the importance of noncardiovascular parameters during safety pharmacological study.