

日本医療研究開発機構 医薬品等規制調和・評価研究事業
事後評価報告書

公開

I 基本情報

研究開発課題名：(日本語) ヒト iPS 細胞由来心筋細胞を用いた抗がん剤の心毒性評価法の開発と国際標準化
(英語) Development of cardiac safety testing induced by anti-cancer drugs using human iPSC-derived cardiomyocytes and AI/ML toward global standardization

研究開発実施期間：令和3年4月1日～令和6年3月31日

研究開発代表者 氏名：(日本語) 諫田 泰成
(英語) Yasunari Kanda

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：
(日本語) 国立医薬品食品衛生研究所・薬理部・部長
(英語) Head, Division of Pharmacology, National Institute of Health Sciences

II 研究開発の概要

研究開発の成果およびその意義等

がん治療の進歩により、がん患者の予後は大幅に改善し、がんサバイバーの数は増加している。しかし、乳がん患者の診断後 10 年以降は心血管系疾患による死亡率が乳がんによる死亡率を上回ることが報告されているように、抗がん剤による心毒性はがんサバイバーの生命予後や QOL に大きな影響を与えることから、医学的にも社会的にも重要な課題である。今まで以上に抗がん薬のリスク／ベネフィットのバランスを考慮する必要があると考えられることから、非臨床において抗がん薬の心毒性リスクを予測する評価法の開発が期待される。

近年、国際的に動物実験の 3Rs 原則の重要性が指摘されていることから、ヒト由来の細胞やインシリコモデルを活用した先進的な医薬品の評価法が必要である。これまで我々は、ヒト細胞の作製が可能なヒト iPS 細胞技術に着目し、ヒト iPS 細胞由来心筋細胞（以下、ヒト iPS 心筋）の電気活動を多点電極アレイ（MEA）システムで測定することにより、QT 間隔延長とそれに伴う不整脈発生リスクを評価できることを明らかにして、米国 FDA らと国際検証試験などを通じて、iPS 心毒性（急性の不整脈）に関するベストプラクティスを作成することにより、国際標準化に貢献した。

そこで本研究開発では、ヒト iPS 心筋を用いて抗がん剤による心毒性を評価する新たな安全性薬理評価法を世界に先駆けて開発し、標準化に取り組む。抗がん剤による心毒性をメカニズムにより収縮毒性などの機能的毒性と細胞障害などの器質的毒性に分類し、国際的に提言するために必要な研究データを先導的に取得する。また AI/機械学習などを活用してヒト iPS 心筋による収縮毒性、細胞毒性の予測モデルを構築し、動物や臨床データと比較検討することにより、心毒性シグナルを広く検出可能な非臨床試験バッテリーの構築を目指す。

まず、ヒト iPS 心筋はいまだに未成熟の懸念があることから、成熟化について検討した。成熟化誘導化合物（ERRy 作動薬）により、心筋トロポニン I など成熟マーカー遺伝子の発現上昇、ミトコンドリア機能の上昇、conduction velocity の上昇、最大活動電位振幅、立ち上がり速度の上昇などの電気生理学的特性の成熟化、サルコメア長の延長や T 管形成など構造的な成熟化が誘導されることを明らかにした。また ERRy 作動薬と伸展刺激を併用することにより、さらに心筋組織の組織化・成熟化を促進できることを明らかにした。

心筋細胞と心外膜細胞を用いて構築した立体心筋組織（心臓オルガノイド、Engineered Heart Tissue）を作製し、薬剤の毒性検査に使用可能なプラットフォームを確立した。同プラットフォームを用いて陽性対照の抗がん剤ドキソルビシンによる心筋障害に伴う変化を再現することが可能であったことから、抗がん剤心毒性の評価に有用であることが示唆された。また、ヒト iPS 心筋の立体心筋組織を長期培養する際に、組織内部の低酸素環境が課題であり、特に脂肪酸の酸化に多くの酸素が必要となると考えられる。酸素透過性シリコーンゴムで作製した培養器で組織を作製し、脂肪酸培地と組み合わせることで成熟化を誘導する方法を開発し、収縮力が向上することを見出した。

次に、ヒト iPS 心筋の Context of Use として収縮評価に対する期待が大きいことから、ヒト iPS 心筋の動きを高速ビデオ撮影してフレーム毎の動きをもとに速度を算出するイメージング法を開発し、本研究班で利用した。収縮にはイメージング法、インピーダンス法が利用されているが、同じサンプル標本で両者のパラメーターを直接比較することにより、両システムを活用できることを明らかにした。また、ドキソルビシンなどの抗がん剤の毒性を検出するためには急性曝露よりも慢性曝露が必要であることが分かり、新たに慢性収縮評価法のプロトコルを整備した。

また、心筋組織の張力と細胞外電位の同時計測システムの開発にも取り組んだ。独自に開発した薄膜電極の上で培養した心筋シートの張力を測定するシステムを開発することにより、ヒト iPS 心筋組織の張力と細胞外電位の同時計測に成功した。これにより、左室内圧変化の終点と左室再分極過程（T 波）の終点の時間差で

ある **Electro-mechanical Window** を解析できる評価法を構築した。ドキソルビシンなどの評価に利用できることを示した。同様に、平面培養のヒト **iPS** 心筋を用いて、イメージングによる収縮と **MEA** システムの同時測定によっても **Electro-mechanical Window** が解析可能であることを明らかにした。

心収縮評価の重要性を理解する上で、**case study** は非常に重要である。そのため、国際的な議論を行い、心不全により開発が中止された **BMS-986094** の評価を実施することにした。**BMS-986094** は、**C** 型肝炎ウイルスの非構造タンパク質 **5B (NS-5b)** 阻害薬で、**C** 型肝炎治療候補薬として臨床開発が進められたが、4 週間投与された患者が左心室駆出率の減少を伴う心不全により死亡し、他の患者でも左心室駆出率の減少が報告されたことから、第二相臨床試験が中止された。そこでヒト **iPS** 心筋の収縮能に対する **BMS-986094** の影響を評価した結果、動物実験より推定される最高血中濃度 (**Cmax**) を含む濃度域で慢性曝露することにより、濃度依存的に収縮速度および弛緩速度が有意に減少することを見出した。一方、**BMS-986094** と同様に **NS-5b** を阻害する **C** 型肝炎治療薬ソホスブビル (商品名ハーボニー) について検討を行った。ソホスブビルは臨床試験において心収縮能に対する影響が見られないことが報告されているが、ヒト **iPS** 心筋においても収縮・弛緩速度に対して有意な影響は認められなかった。ヒト **iPS** 心筋データと臨床データと比較すると、**BMS-986094** は **Cmax** 付近でヒト **iPS** 心筋の収縮・弛緩速度が減少するのに対して、ソホスブビルは **10 x Cmax** の濃度の曝露によっても有意な影響を及ぼさなかった。また、抗がん剤ドキソルビシンによって治療域で収縮、弛緩ともに濃度依存的に減少することを確認した。さらに、ドキソルビシンによるミトコンドリア毒性評価を行ったところ、心毒性リスクとミトコンドリア形態に一定の相関があることを明らかにした。従って、ヒト **iPS** 心筋の評価法は抗がん剤の心毒性リスクを非臨床の段階で予測できることが示唆された。

これらの取り組みをもとに、米国 **FDA**、米国環境保健科学研究所 (**the Health and Environmental Sciences Institute; HESI**) 製薬企業などと協力して、抗がん剤の心毒性評価には急性曝露よりも慢性曝露を行う必要があることを議論して、ヒト **iPS** 心筋による慢性心毒性に関する国際検証試験を実施した。評価すべき化合物に関して、**golden standard** としてドキソルビシンを決定し、そのほかに **BMS-986094**、チロシンキナーゼ阻害剤ニロチニブなど抗がん剤を含む **12** 化合物を選定した。評価項目としては、収縮、ミトコンドリア毒性、細胞毒性、遅延性 **QT** 延長、バイオマーカーを選定した。**HESI** からブラインド化合物を受け取り、主に収縮データを取得した。他施設と解析を進めたところ、収縮のフェノタイプとして施設間で一定の相関が得られていることを明らかにした。現在、データの詳細な解析方法などを検討している。

さらに、ヒト **iPS** 心筋から得られたインビトロ結果の臨床外挿性を検証するため、チロシンキナーゼ阻害剤ニロチニブの **in vivo** 評価を行った。イソフルラン麻酔下の正常犬を使用し、ニロチニブの心血管系に対する急性および慢性毒性を評価した。ニロチニブの単回静脈内投与は、左室の収縮能を亢進したが、その能動的拡張能を抑制し、さらに早期再分極相の遅延を伴う **QT** 間隔延長を誘発した。一方、ニロチニブの 4 週間反復経口投与は、投与開始前と比較し、左室の収縮能を亢進したが、左室の能動的拡張能および **QT** 間隔を変化させなかった。イソフルラン麻酔下の正常犬から得られた結果は、上記の **iPS** 細胞由来心筋細胞シートを用いた評価結果と類似しており、さらに臨床で認められているニロチニブの心血管有害事象である心不全および **QT** 延長の病態の一部を反映していると考えられた。この結果から、ヒト **iPS** 心筋シートおよびイメージング法による抗がん剤の収縮毒性評価法は、臨床の予測性の高い非臨床試験系として有用であることを示した。

これまで述べてきたようなヒト **iPS** 心筋による抗がん剤の心毒性評価が、実臨床で起きている抗がん剤による心毒性の臨床像とどのくらい相関しているかを明らかにするため、国立研究開発法人国立がん研究センターにおいて、対象とする抗がん剤、その症例数、スタディスケジュールの調整等を行い、「抗がん剤性心機能障害の早期診断バイオマーカーの同定に関する観察研究」に関する臨床研究を実施している。心臓由来バイオマーカー (ナトリウム利尿ペプチド、心筋トロポニン)、心臓超音波検査 (標準法、**GLS**)、心電図検査の情報を一定間隔で取得し、心機能低下との関連性を解析中である。

以上のように、本研究開発課題において、ヒト iPS 心筋を用いた抗がん剤の心毒性に関する評価法を構築し、動物実験データ等との比較により、その有用性を明らかにした。また、米国 FDA など産官学 22 施設で国際検証試験を実施し、日本からも化合物の選定や評価法、データの提出などに貢献しており、非常に大きな成果を上げたと考えられる。引き続き、国内外の産官学で連携しながら評価法開発と標準化に取り組むことにより、国際規制調和の促進が期待される。

Outline of Research and Development

Human iPSC cells have revolutionized the drug development and have been widely used from drug discovery to safety evaluation. The purpose of the AMED project is to develop a new cardiac safety evaluation method against anticancer drugs using fit-for-purpose human iPSC-derived cardiomyocytes (iPSC-CMs). To date, we all-Japan consortium Japan iPSC Cardiac Safety Assessment (JiCSA) has developed a standardized method using multi-electrode array (MEA) technology to evaluate the proarrhythmia risk using iPSC-CMs. Furthermore, by conducting the large-scale validation study using 60 compounds with different Torsades de Pointes (TdP) risk, we have shown that the new method using human iPSC-CMs has high reproducibility and predictability to predict TdP risk.

In the present study, we first have worked on the maturation of human iPSC-CMs for cardiotoxicity. By using oriented plates and substrates, we have generated more mature iPSC-CMs and 3D cardiac models. We confirmed that longer treatment with the golden standard anticancer drug doxorubicin showed cardiotoxicity using these models.

Next, we established the imaging-based chronic contractility assay using human iPSC-CMs and performed case studies. After international discussions, we decided to evaluate BMS-986094, a hepatitis C virus (HCV) nonstructural protein 5B (NS-5b) inhibitor, which was developed as a candidate drug for the treatment of HCV. One patient died of heart failure with decreased left ventricular ejection fraction after 4 weeks of treatment, and other patients also reported decreased left ventricular ejection fraction, so the phase II clinical trial was terminated. Based on these clinical studies, we evaluated the effect of BMS-986094 on contractility using human iPSC-CMs. We found that chronic exposure to BMS-98609 at C_{max} significantly decreased contractility and relaxation velocity in a concentration-dependent manner. In contrast, the approved drug sofosbuvir showed no significant effects on contraction/relaxation. These results suggest that contractility assessment using human iPSC-CMs can predict the cardiotoxicity risk in a non-clinical setting.

Based on our studies, we participated in the international validation studies on chronic cardiotoxicity with HESI and FDA using 12 blinded compounds including doxorubicin and BMS-986094. The evaluation can be divided into functional toxicity (such as contractility) and structural toxicity (cell damage). We found that contractile phenotypic changes showed a good correlation between the platforms. We also continued the international discussion on *in silico* models of human iPSC-CMs, and found that there were large differences between the existing models, and that the drug responses are different. Therefore, the causes of these model differences need to be further clarified.

To investigate the predictive value of the test method using human iPSC-CMs, we evaluated the acute cardiovascular toxicity in normal dogs under isoflurane anesthesia. We found that the *in vivo* results using the tyrosine kinase inhibitor nilotinib were similar to those evaluated using human iPSC-CMs. These data suggest that human iPSC-CMs can be useful to detect the clinically observed cardiovascular adverse events of anti-cancer drugs, such as QT interval prolongation and heart failure. To further clarify the added value of human iPSC-CMs for the clinical settings, we are working on the prospective clinical research with National Cancer Center Hospital.

Taken together, we believe that this research group has achieved very significant results using human iPSC-CMs toward regulatory consideration. We will continue our international collaborations to develop and standardize new methods for evaluating cardiotoxicity by anticancer drugs.