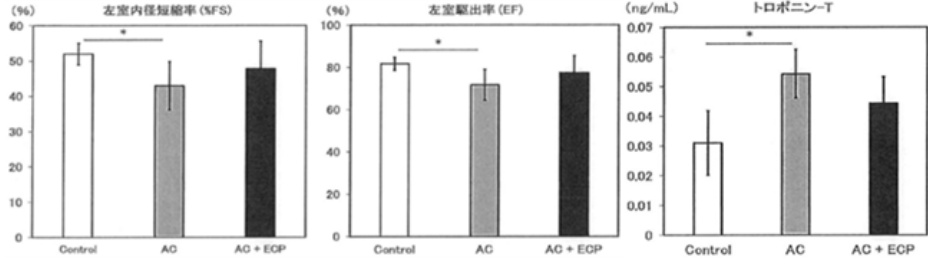
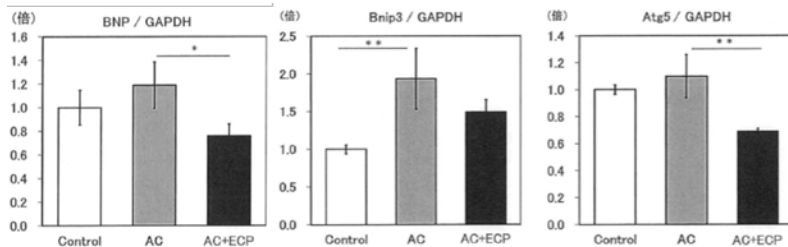


研究テーマ番号	IPSN202001																
研究・発明のタイトル	抗癌剤による心毒性及びオートファジー異常関連状態の予防改善薬																
研究分野	医薬、心機能保護薬																
<p>1) 研究・発明の概要</p> <p>2) 成果概要</p>	<p>ドキシソルビシン等の抗癌剤は多くの癌種で用いられているが、これら薬剤の副作用として心毒性を惹起することがよく知られている。近年、支持療法分野において、抗癌剤に起因する心毒性ならびに癌悪液質時に起こる心機能障害が問題視されているが、心毒性の予防あるいは症状改善薬といった薬剤は未だ上市されておらずその開発は喫緊の課題である。好酸球カチオン性タンパク質 ECP (eosinophilic cationic protein) は好酸球の塩基性顆粒に貯蔵される好酸球顆粒タンパク質の一つである。好酸球の活性化に伴い分泌するタンパク質で、殺菌・殺寄生虫作用、組織障害作用などを有することが知られている。今回、発明者らは、抗癌剤を投与したラットで誘導された心毒性を ECP が抑制すること、抗癌剤により上昇したオートファジー関連遺伝子 (Atg5、Bnip3) の発現量を ECP が正常レベルまで戻す作用を見出し、抗癌剤により誘導されたオートファジー細胞死に伴う心毒性を ECP が抑制する可能性を示した。抗癌剤を投与された癌患者の心機能保護薬として有望視される。</p> <p>2)・発明者らは、心毒性に対する ECP の抑制効果を検証すべく以下の実験を行った。</p> <p><b>【抗癌剤投与ラットにおける心筋障害に対する ECP の薬効評価】</b></p> <p>6 週齢 SD ラットを 1 週間馴化後に 3 群 (各群 n=6) に分け、1 週間間隔で 2 回、生理食塩水《C 群》、ドキシソルビシン(DOX) (20 mg/kg) +ハーセプチン(HER) (20 mg/kg) 《AC 群》、DOX (20 mg/kg) +HER (20 mg/kg) +ECP (160 µg/kg) 《AC+ECP 群》を腹腔内投与した。投与後に心エコーを用いて心機能を評価をしたところ、左室内径短縮率 (%FS) 及び左室駆出率 (EF) は C 群に比べ AC 群で有意に低下したが、AC+ECP 群では C 群と統計上差がなく、機能が維持されることがわかった (下図を参照)。心筋障害に伴い発現増加するトロポニン-T は、C 群に比べ AC 群で有意に増加したが、AC+ECP 群は C 群と統計上差がなかった。以上から、ECP の投与が抗癌剤により惹起される心筋障害や左室の収縮機能低下を抑制する</p>  <table border="1" data-bbox="507 1736 1439 1993"> <caption>Figure 1: Cardiac function parameters in control, AC, and AC+ECP groups.</caption> <thead> <tr> <th>Parameter</th> <th>Control</th> <th>AC</th> <th>AC + ECP</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>左室内径短縮率 (%FS)</td> <td>~52</td> <td>~43</td> <td>~48</td> </tr> <tr> <td>左室駆出率 (EF)</td> <td>~82</td> <td>~70</td> <td>~78</td> </tr> <tr> <td>トロポニン-T (ng/mL)</td> <td>~0.03</td> <td>~0.055</td> <td>~0.045</td> </tr> </tbody> </table>	Parameter	Control	AC	AC + ECP	左室内径短縮率 (%FS)	~52	~43	~48	左室駆出率 (EF)	~82	~70	~78	トロポニン-T (ng/mL)	~0.03	~0.055	~0.045
Parameter	Control	AC	AC + ECP														
左室内径短縮率 (%FS)	~52	~43	~48														
左室駆出率 (EF)	~82	~70	~78														
トロポニン-T (ng/mL)	~0.03	~0.055	~0.045														

可能性が示された。

**【抗癌剤投与ラットにおける各種遺伝子発現に対する ECP の添加効果】**

上記試験で得たラット個体の凍結心臓試料から total RNA を抽出し、心不全マーカーである脳性ナトリウム利尿ペプチド (BNP)、オートファジー



関連遺伝子 (Atg5、Bnip3) に対する定量 PCR を行っ

た。なお、リファレンス遺伝子として GAPDH を用いた。BNP は心臓への過剰負荷により産生分泌される。BNP 遺伝子の発現は、AC 群で C 群と比べ上昇傾向を示したのに対し、AC+ECP 群では AC 群と比べ有意に低下した (上図左を参照)。一方、Atg5・Bnip3 は、心臓におけるミトコンドリア機能維持に必要であるものの、過剰発現は細胞死 (オートファジー細胞死) を惹起する可能性がある (上図中央、右を参照)。これらの遺伝子の発現は、いずれも C 群に比べて AC 群で上昇したが、AC+ECP 群では AC 群に見られた上昇は認められなかった。以上から、抗癌剤による心不全やオートファジー細胞死による心毒性を ECP が抑制する可能性が示された。

**【心筋細胞を用いた ECP のオートファジー細胞死抑制効果の解析】**

ERK1/2 や Akt といったリン酸化酵素は、オートファジーのシグナル伝達経路において Atg5・Bnip3 の上流に位置する。これらリン酸化酵素は自身のリン酸化 (活性化) を介してオートファジー機能を制御することが知られている。抗癌剤投与ラットで認めた Atg5・Bnip3 遺伝子の発現上昇に対する ECP の抑制効果にこれらリン酸化酵素の活性化が関与するかを調べるため以下の実験を行った。ラット心筋細胞 H9c2 細胞を①薬剤無添加培地《C 群》で 2 時間、②1 μM DOX 含有培地《DOX 群》で 2 時間、③1 μM DOX 含有培地で 1 時間 45 分間培養後に終濃度 1 μM の ECP を添加して 15 分間《DOX+ECP 群》培養した。培養後に各群から細胞内タンパク質を調製し、活性型リン酸化 (p-ERK1/2 及び p-Akt) のタンパク質量をウェスタンブロット法で解析したところ、これらのタンパク総量に変化は認めなかったものの、活性型はいずれも C 群に比べて DOX 群で有意に増加した。一方、DOX 群に比べて DOX+ECP 群ではいずれの活性型も有意に減少し、ECP が ERK1/2 及び Akt の活性状態に影響を及ぼすことがわかった (上図を参照)。DOX の代わりに過酸化水素を添加してもこれらタンパク質は活性化するが、ECP は意外にもこの活性状態をさらに亢進した。このことから、DOX は単純に酸化ストレスを細胞に及ぼしているだけではな

<p>3) 適用分野・目標</p> <p>4) 今の研究予定</p>	<p>Western blot analysis showing ERK1/2, p-ERK1/2, Akt, and p-Akt levels in Control, DOX, and DOX + ECP groups. Molecular weight markers (kDa) are indicated on the right: ERK1/2 (44, 42), p-ERK1/2 (44, 42), Akt (60), and p-Akt (60).</p> <p>Bar graphs show relative values for p-ERK1/2 (left) and p-Akt (right). The y-axis for p-ERK1/2 ranges from 0.0 to 6.0, and for p-Akt from 0.0 to 1.8. Control is set to 1.0. DOX treatment significantly increases both p-ERK1/2 and p-Akt levels (** p &lt; 0.01). Treatment with DOX + ECP significantly reduces these levels compared to DOX alone (** p &lt; 0.01).</p> <p>いことが示唆された。</p> <p>3) 本発明の ECP は、抗癌剤による心毒性を軽減する作用（心機能保護作用）を有し、癌患者の負担を軽減できる。また ECP を抗癌剤と併用することで、抗癌剤の用量や投与対象、適用可能疾患の制限を緩和できる可能性もある。さらにオートファジー異常状態に対しても適用が可能である。</p> <p>4) ・心毒性が危惧される DOX・HER 以外の抗癌剤との併用時において、抗癌剤の心毒性を改善または予防できる ECP の投与量、投与時期、投与頻度等に関するデータを蓄積する。</p>
<p>希望する提携の種類</p>	<p>提携形態は問わない。また、本件に係る ECP 技術にとどまらず、広く ECP の医薬用途開発に関心のある企業の参画を求める。</p>
<p>特許出願（予定）</p>	<p>出願済</p>
<p>関連特許の出願の有無</p>	<p>無</p>
<p>学術発表（予定）</p>	<p>有</p>
<p>共同研究の有無</p>	<p>無</p>

註：本資料は知的財産戦略ネットワーク（株）が全ての権利を有しており、本目的外の使用を禁ずる。