

平成29年度シニア・リサーチフェロー

# 研究成果報告書

平成30年4月30日 提出

公益財団法人 がん研究振興財団  
理事長 堀田 知光 殿

報告者氏名： 野中 美希



研究課題：アンメットディカルニーズに応える新規薬剤開発関す研究  
(テーマ) がん患者のQOL向上のための基礎研究を臨床開発につなげる橋渡し研究

研究期間： 自 平成 29年 4月 1日

至 平成 30年 3月 31日

研究指導者：氏名 上園 保仁



公益財団法人 がん研究振興財団

HOPE シニア・リサーチフェロー  
H29 年度 研究成果報告書

国立がん研究センター研究所 がん患者病態生理研究分野

野中 美希

(研究指導者:国立がん研究センター研究所

がん患者病態生理研究分野 分野長 上園 保仁)

## 序

国立がん研究センターがん対策情報センターの推計によると、日本人の2人に1人が生涯でがんになり、3人に1人はがんで死亡すると言われていることから、今やがんは身近な病気となっている(Hori *et al.*, 2015)。がんは、医療技術の進歩により治療可能な症例が増えている一方、近年患者の生活の質 Quality of life (QOL) の維持・向上を目指し、がん治療に伴う副作用の軽減を重要視する動きが世界的に広まっている(Fallowfield, 2002)。その中でも、抗がん剤や分子標的薬による副作用として、生命維持に重要な臓器である心臓に対する副作用、さらにはがん自身が起こす心機能障害が注目されており (Khakoo *et al.*, 2008; Minami *et al.*, 2010)、がん治療における心機能の管理が重要視されている。

抗がん剤が起こす心毒性としてもっともよく知られているアントラサイクリン系薬剤のドキソルビシン (DOX) は古くから使用されており、現在においても骨肉腫治療のファーストチョイスとして使用されている。DOX は最も強力で広い抗腫瘍効果をもつ抗がん性抗生物質であるが、その卓越した有効性にもかかわらず、心毒性、特に累積投与量に依存して発症する DOX 心筋症のリスクから治療継続の制限を余儀なくされることが多い。DOX 最終投与後から約1年で起こる心機能低下・心不全の発症頻度は3~26% (Yeh *et al.*, 2009) である。心不全は不可逆性の病変であるため、発症した場合、奏功する治療薬は現在のところ報告されていない。抗がん剤治療中に嘔気、脱毛、口内炎、神経性疼痛等の耐え難い痛みを苦しむ患者が、がん治癒後その苦しみから解放され快適な生活を送るためにも、さらに命に直結する循環器系の副作用は回避されるべきであり、DOX による心筋症を予防できる薬剤の開発は急務である。

摂食亢進ホルモンであるグレリンは胃から産生される成長ホルモン放出ペプチドで、アシル化修飾を受けているものがグレリン、受けていないものがデスアシルグレリンである (Kojima *et al.*, 1999)。アシル化修飾のないデスアシルグレリンは、これまで単にグレリンの不活性型と考えられていたが、近年デスアシルグレリンにも様々な生理活性作用があり、特に DOX による心筋アポトーシスを抑制することが *in vitro*、*in vivo* 研究で報告され(Baldanzi *et al.*, 2002; Pei *et al.*, 2014)、心筋症予防能が期待されている。しかし、デスアシルグレリンはグレリン受容体へは結合せず特異的受容体は未だ同定されていない。そのため、デスアシルグレリンの詳細な作用メカニズムについては不明な点が多い。そこで、本研究ではグレリン、デスアシルグレリンの DOX 誘発心毒性に対する新規予防薬、ならびに治療薬としての可能性を明らかにするため、ラット心筋由来 H9C2 細胞を用いた *in vitro* 実験と、C57BL/6 マウスを用いた *in vivo* 実験によるデスアシルグレリンの治療効果の詳細な解析を行った。加えてデスアシルグレリン受容体の同定も念頭に置いた検討を行った。

**Key words:** cardiotoxicity, chemotherapy, des-acyl ghrelin, doxorubicin, ghrelin

## 実験方法

### 1) 細胞培養

ラット心筋由来 H9C2 細胞は鹿児島大学大学院医歯学総合研究科医化学分野岸田昭世先生より譲渡いただいた。また、グレリン、デスアシルグレリンががん細胞に増殖作用を示すか検討するために用いたヒト肺腺がん由来細胞 PC9 細胞も岸田昭世先生より譲渡いただいた。培地については、H9C2 細胞は 10%FBS、5%P/S を含む high glucose の Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM) (Wako, Japan)、PC9 細胞は 10%FBS、5%P/S を含む Roswell Park Memorial Institute media (RPMI-1640) (Wako, Japan) を使用し、37°C、5%CO<sub>2</sub> の incubator にて培養を行った。

### 2) 細胞増殖・障害・生存アッセイ

H9C2 細胞、PC9 細胞ともに 96 ウェルプレートに  $0.5 \times 10^4$  cells/well 播種し、24 時間培養後 DOX (Wako, Japan) 0-1  $\mu$ M とグレリンまたはデスアシルグレリン (Peptide Institute, Inc., Japan) 1  $\mu$ M を 72 時間処置した。細胞増殖および障害像を、市販の CO<sub>2</sub> インキュベータ内でタイムラプス画像を全自動で取得・データ解析することができる IncuCyte ZOOM<sup>®</sup> live-cell imaging (Essen BioScience, Ltd., Japan) に静置し、1 時間ごとに撮影を行い、定量を行った。DOX 処置後 72 時間の細胞を、IncuCyte ZOOM<sup>®</sup> live-cell imaging から取り出し、細胞生存アッセイキットである Cell Counting Kit-8 (Dojindo Molecular Technologies, Inc., Japan) を 96 ウェルプレートに添加した 3 時間後に、プレートリーダー (Synergy H1 and Gen5 2.0 software, Biotek, USA) にて、吸光度 (450 nm) の測定を行った。

### 3) アポトーシスアッセイ

細胞を  $0.5 \times 10^4$  cells/well で播種し、DOX、グレリンまたはデスアシルグレリン処置を行った 96 ウェルプレートに CellPlayer 96-Well Kinetic Caspase-3/7 Apoptosis Assay Kit (Essen BioScience, Ltd., Japan) を添加し、IncuCyte ZOOM<sup>®</sup> live-cell imaging にて 2 時間ごとに撮影を行い 72 時間まで観察した。アポトーシスアッセイキットは Caspase3/7 による cleavage site を持った化合物を使用しており、Caspase3/7 が細胞内で発現すると、化合物が切断され化合物内の Dye 部分が遊離して核へ移行し、DNA に結合することで蛍光を発するというメカニズムとなっている。つまり蛍光強度を測定することでアポトーシスの程度が分かる。これらの情報をもとに、IncuCyte 内の解析システムで定量し、測定を行った。

### 4) 細胞内活性酸素種 (ROS) の測定

全般的な酸化ストレスの測定として CellROX Deep Red (Thermo Fisher Scientific) を使用した。細胞は 5  $\mu$ M の CellROX Deep Red で 37°C 30 分インキュベートした。ミトコンドリアからの superoxide ならびにミトコンドリア膜電位障害の測定には MitoSOX Red (Thermo Fisher Scientific)、JC-1 (Thermo Fisher Scientific) をそれぞれ使用した。MitoSOX Red は 5  $\mu$ M、JC-1 は

10 µg/mL で 10 分間 37°C の温度下でインキュベートした。ROS の測定は蛍光顕微鏡で撮影後 (BZ-700; Keyence, Osaka, Japan)、ハイブリッドセルカウント (BZ-700; Keyence, Osaka, Japan) を使用し蛍光を定量化した。

#### 5) 動物実験

実験動物は 7 週齢で購入した雄性 C57BL/6 マウス (Japan SLC, Inc., Japan) を用い、室温 23 ± 3°C、湿度 50 ± 10%、明暗条件 12 時間サイクルの一般飼育室に 1 週間馴化後、8 週齢のマウスを実験に供した。実験群は DOX (15 mg/kg) 投与前日より vehicle (生理食塩水) を 1 日 2 回投与した群 (DOX 投与群, N = 3) と、DOX 投与前日よりデスアシルグレリン (100 µg/kg) を 1 日 2 回投与した群 (デスアシルグレリン投与群, N = 3) の 2 群とした。DOX は腹腔内へ 1 回投与を行い、vehicle、デスアシルグレリンはともに皮下投与を行った。デスアシルグレリン投与開始日を pre-treatment とし、DOX 投与を行った日を Day0 とした。pre-treatment、Day0、DOX 投与 3 (Day3)、7 (Day7) 日後に心エコー測定を行い、Day7 で全てのマウスを安楽死後、心臓と肺を摘出し、重量測定を行い、心臓は生化学実験用のサンプルに調製した。本研究では、マウスの心機能評価を行う必要があるが、申請者が所属する国立がん研究センター研究所内には心機能評価を行う設備がないため、動物実験は全て順天堂大学医学部薬理学講座 (呉林なごみ准教授による指導) にて行った。本研究に必要な動物実験の実施については、「動物の愛護及び管理に関する法律」、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」(平成 18 年環境省告示第 88 号)、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」(平成 18 年文部科学省告示第 71 号)に基づいて制定された順天堂大学動物実験等管理規則を遵守し、順天堂大学医学部実験動物委員会、ならびに国立がん研究センター動物実験倫理委員会に計画書を提出し、審査を受け許可された後に行った。

#### 6) 心エコー測定

M-mode 心エコー (Vevo®2100, Primetech Corporation, Japan) はイソフルラン吸入麻酔下にて測定を行った。

#### 7) 組織化学

DOX 投与後 3 日目のマウスに pentobarbital sodium (100 mg/kg i.p.) を投与後、心臓を摘出し、4% paraformaldehyde neutral-buffered solution に固定し、心室中央レベルで横方向に切断、パラフィンに包埋後、薄切切片を作製した。

#### 8) コネキシン 43 脱リン酸化 (NP-Cx43) 測定

作製した心筋組織の薄切切片を wheat germ agglutinin Alexa Fluor 488 conjugate (Thermo Fisher Scientific) で細胞膜の染色を行った後、NP-Cx43 の抗体 (rabbit anti-phospho-Cx43; polyclonal, Cell Signaling Technology, Danvers, MA) で染色を行った。二次抗体は anti-mouse IgG Alexa Fluor 594 で染色した。免疫染色した組織は、自家蛍光や、多重蛍光免疫染色時に蛍光色素の SN 比を向上させてそれぞれの蛍光シグナルを分離することができる CCD カメラ Nuance (Perkin El

mer, Japan) を搭載した蛍光顕微鏡 (Carl Zeiss) により撮影後、Image J を用いて定量した。

#### 9) デスアシルグレリン受容体同定

デスアシルグレリン受容体の同定については、鹿児島大学と共同研究を行い、デスアシルグレリン受容体を発現していると思われる細胞を用い、同定を試みた。

#### 10) 統計解析

測定値は mean  $\pm$  SEM で示した。2 平均値間の差は、unpaired *t*-test を用いて分析した。データが正規分布に従わなかった場合、平均値は、Welch's correction を用いて解析した。3 つ以上のグループの平均値は、one-way ANOVA に続いて post hoc Dunnett's または Tukey's multiple comparison test により比較した。0.05 以下の *p* 値を統計的に有意であるとみなした。

### 結果

#### 1) H9C2 細胞における DOX 誘発性細胞障害に対するグレリン・デスアシルグレリンの効果

DOX 0-1  $\mu$ M とグレリン、デスアシルグレリン 1  $\mu$ M を H9C2 細胞に処置し、IncuCyte ZOO M<sup>®</sup> live-cell imaging で細胞増殖および細胞障害を 72 時間観察後、DOX 誘発性心毒性に対してグレリン、デスアシルグレリンが心筋保護効果を有するか否かを検討するために、Cell Counting Kit-8 を用い評価を行った。DOX72 時間処置により用量依存的に細胞障害および細胞死が引き起こされた。一方、グレリン、デスアシルグレリンは、DOX 誘発性細胞障害および細胞死を有意に低下させ、その効果はデスアシルグレリンにおいてより優位であった。H9C2 細胞において、グレリン、デスアシルグレリンの単独処置は細胞増殖を引き起こしたが、ヒト肺腺がん由来細胞である PC9 細胞では、細胞増殖は観察されなかった。

#### 2) H9C2 細胞における DOX 誘発性アポトーシスに対するグレリン・デスアシルグレリンの効果

アポトーシスアッセイの結果より、DOX によって起こる細胞死はアポトーシスによるものであることが明らかとなった。アポトーシスアッセイの結果も細胞障害、細胞死の結果と同様に、グレリン、デスアシルグレリンにおいて DOX 誘発性心毒性に対して保護効果を示し、特にデスアシルグレリンにおいてその効果は高かった。

#### 3) H9C2 細胞における DOX 誘発性 ROS 産生に対するグレリン・デスアシルグレリンの効果

DOX による細胞障害ならびにアポトーシスは細胞内の ROS レベルの上昇によって起こることから、H9C2 細胞内の ROS レベル測定を行った。ROS の測定は、DOX0.3  $\mu$ M 投与 24 時間後の細胞に各 ROS 蛍光指示薬を添加し評価を行った。全般的な酸化ストレスを測定する CellROX

Deep Red の結果では、グレリン、デスアシルグレリンともに DOX によって起こる細胞内の酸化ストレスを有意に抑制する結果を得た。

ミトコンドリアの superoxide 検出を赤い蛍光により測定できる MitoSOX Red を用いたところ、細胞は DOX により赤い蛍光を惹起したが、グレリン、デスアシルグレリンはその蛍光を抑制し、その効果はデスアシルグレリンが優位であった。

ミトコンドリアの膜電位が消失（脱分極）すると膜構造の断片化を引き起こすことから、ミトコンドリアの膜変異はアポトーシスの早期の特徴であると考えられている。JC-1 は正常な細胞では赤色の蛍光を放ち、ミトコンドリアが脱分極を起こすと緑色にシフトすることから、赤色/緑色の蛍光強度比の減少によってミトコンドリアの脱分極が評価できる。DOX 処置細胞の、赤色/緑色の蛍光強度比は DOX 処置（-）の細胞に比べ有意に減少したのに対し、デスアシルグレリン処置細胞では、DOX を処置していない細胞と同等の赤色/緑色の蛍光強度比を示した。一方グレリンは、DOX によって起こる赤色/緑色の蛍光強度比減少の抑制がみられなかった。

#### 4) *in vivo* における DOX 誘発心毒性に対するデスアシルグレリンの効果

*in vitro* 実験より、デスアシルグレリンがグレリンに比し DOX 誘発心毒性を優位に抑制する結果が得られたので、*in vivo* 実験ではデスアシルグレリンに焦点を当て、その効果を検討した。DOX 投与群では収縮機能の低下が認められたのに対し、デスアシルグレリン投与群では DOX による収縮力の低下が有意に抑制された。

心エコーで認められた DOX による収縮機能の低下が何に起因するものか検討するために、心筋の興奮伝達に深く関与する細胞接着タンパクであるコネキシン 43 (Cx43) に着目し、Cx43 の脱リン酸化の免疫染色を行った。その結果 DOX 投与群の心筋組織では Cx43 の脱リン酸化レベルの上昇が認められた。一方、デスアシルグレリン投与群では、DOX による Cx43 の脱リン酸化レベルの上昇を有意に抑制する結果が得られた。

以上の結果より、*in vitro* においてグレリン、デスアシルグレリンは、DOX によって起こる ROS の産生を抑制し、その効果はデスアシルグレリンが優位であること、さらにデスアシルグレリンは *in vivo* において、DOX による Cx43 の脱リン酸化を介して起こる心筋収縮力の低下を抑制することが明らかとなった。

#### 5) デスアシルグレリン受容体の同定

同プロジェクトは現在、鹿児島大学と共同研究で進めているが、現在のところデスアシルグレリンが特異的に結合するタンパク質の同定に至っており、現在その機能を詳細に解析しているところである。

## 考察

DOX による心毒性は、ミトコンドリア機能の破壊、ならびに活性酸素種の産生によって心筋アポトーシスが引き起こされる等、様々なメカニズムが提唱されている(Menna *et al.*, 2010; Mordente *et al.*, 2012; Carvalho *et al.*, 2014)。近年、DOX による心筋症は、Top2 $\beta$ を介して活性酸素種産生を増やし、心不全へと進展することが明らかとなった(Zhang *et al.*, 2012)。現在 DOX 治療を行った約3割の患者に心機能低下が起こることが報告されているが(Yeh *et al.*, 2009)、その予防薬は上市されていない。

DOX 治療を受けているがん患者の血漿中定常 DOX 濃度は、0.025~0.25  $\mu\text{M}$  であり(Minotti *et al.*, 2004)、*in vitro* 実験においては、患者の血中 DOX 濃度と差異のない範囲 (0.1~1  $\mu\text{M}$ ) を用いた。H9C2 細胞を用いた *in vitro* 実験では、血中 DOX 濃度範囲内である 0.1、0.3  $\mu\text{M}$  において、グレリン、デスアシルグレリンともに DOX 誘発性の細胞障害、細胞死を抑制し、さらにデスアシルグレリンは 0.5  $\mu\text{M}$  の高濃度 DOX 処置細胞においても効果を示した。また、グレリン、デスアシルグレリンによる DOX 誘発性細胞障害および細胞死の抑制は、アポトーシスを抑制することによって起こっていることを明らかにした。グレリン、デスアシルグレリンによる DOX 誘発性心毒性の抑制効果のメカニズム解明は、今後研究を進めていく予定であるが、*in vitro* 実験に供した H9C2 細胞には、グレリン受容体である GHSR1a は発現していない(Baldanzi *et al.*, 2002; Callaghan *et al.*, 2014)。加えて、デスアシルグレリンは、GHSR1a への結合能はない(Kojima *et al.*, 1999)。現在までにデスアシルグレリン特異的受容体は明らかとなっていないが、本研究で見出されたデスアシルグレリンによる、DOX の細胞障害、細胞死およびアポトーシス抑制効果は、おそらく H9C2 細胞に発現しているデスアシルグレリン特異的受容体を介してしている可能性が示唆される。また、H9C2 細胞にはグレリン受容体が発現していないが、グレリン、デスアシルグレリンともに同様の効果を持つことから、グレリン、デスアシルグレリンを共通に結合する受容体も同細胞に存在し、H9C2 細胞に発現するデスアシルグレリン特異的受容体と両者を結合しうる受容体との結合能の違いにより、抑制効果に差が出ている可能性も考えられる。いずれにせよ、これらの細胞をソースとし、デスアシルグレリンが結合しうる受容体を見出せる可能性は極めて高く、長年明らかとなっていないデスアシルグレリン受容体を同定できる可能性も高く、現在その同定を進めているところである。国立がん研究センター研究所がん患者病態生理研究分野は、G protein-coupled receptor (GPCR) を含めたすべての細胞膜受容体活性を評価できる CellKey アッセイシステムを所有しており、この CellKey システムは、新規受容体スクリーニング法の一つとして、当研究分野を始めとして発展応用されてきた(Miyano *et al.*, 2014)。したがって、同システムを用い、デスアシルグレリン結合タンパク (デスアシルグレリン受容体) の同定を行えば、同受容体を介したデスアシルグレリンの効果の詳細な解明が可能となり、ひいては DOX 心毒性に対する新規予防薬の臨床開発が加速化されるものと期待している。

DOX による心毒性は直接的あるいは間接的に ROS の産生を増加させることによって起こることが知られている(Menna *et al.*, 2010; Mordente *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2012; Carvalho *et al.*, 2014; Burrige *et al.*, 2016)。ROS はミトコンドリア電子伝達系などで常に産生されている



が、superoxide dismutase やカタラーゼといった抗酸化酵素により通常はバランスが保たれている。しかし心臓はこのような抗酸化酵素群が少ないため、いったん ROS が過剰に産生されると細胞障害を受けやすい(Dong *et al.*, 2014)。また、細胞内での ROS の主たる産生部位はミトコンドリアであるため、ミトコンドリアに軽度の障害が生じても ROS の産生が増加し、増加した ROS はさらにミトコンドリアを傷害し、その機能を低下させる。心筋細胞はミトコンドリアの多い細胞であるため、細胞障害を受ける可能性は非常に高い(Chen *et al.*, 2014)。本研究結果より、グレリン、デスアシルグレリンは、ともに DOX によって起こる細胞内の酸化ストレスを抑制すること、さらにミトコンドリアからの ROS の産生に対する抑制効果はデスアシルグレリンが優位であることを明らかにした。ミトコンドリアの膜電位変異は、DOX によって起こるアポトーシスの早期の指標となることが知られている(Green *et al.*, 2002)が、本結果よりグレリン、デスアシルグレリンによる DOX 誘発性細胞障害ならびにアポトーシス抑制効果は、細胞内の ROS の産生により抑制される可能性が示唆された。DOX 誘発性心毒性は、細胞内  $Ca^{2+}$  レベルを低下させることによって、ROS の産生およびアポトーシスによるミトコンドリア機能の破壊を阻害することが報告されている(Kim *et al.*, 2006)。したがって、今後 ROS 産生酵素である Nox1 や  $Ca^{2+}$  シグナルに対するグレリン、デスアシルグレリンの効果についても検討し、作用メカニズムをさらに明らかにしていく必要がある。

抗がん剤治療は予定治療であるため、*in vivo* 実験ではデスアシルグレリン投与を DOX 投与前日より開始した。DOX 投与前日と DOX 投与日の心機能にデスアシルグレリンは影響を与えなかった。DOX 投与群ではデスアシルグレリン投与群に比べ収縮機能の著しい低下が認められたが、デスアシルグレリン投与によりその影響は軽減することができた。さらに、DOX によって起こる心筋収縮力の低下は、心臓の興奮伝導に関与する Cx43 の脱リン酸化上昇によって起こることが明らかとなった。Cx43 の脱リン酸化は細胞内  $Ca^{2+}$  の上昇ならびに pH の低下によって起こることが知られており、Cx43 の脱リン酸化によりギャップジャンクションの閉鎖が促進される(Kurebayashi *et al.*, 2008)。その結果細胞間結合が減少し、細胞間の興奮伝導を遅延させ不整脈の原因となる(Saffitz *et al.*, 2000; Laird, 2005; Kurebayashi *et al.*, 2008)。本研究によりデスアシルグレリンは、DOX による Cx43 脱リン酸化の上昇を抑制することで、心筋収縮力低下を防ぐことが明らかとなった。したがって、DOX 治療を開始する患者へのデスアシルグレリン投与は、予防的医療として用いられうる可能性がある。心臓の収縮は  $Ca^{2+}$  により調節されており、心筋細胞内の  $Ca^{2+}$  過負荷は心筋収縮力低下に伴って起こり、致死的不整脈の発生リスクを上昇させる(Nonaka *et al.*, 2015)。Cx43 の脱リン酸化は細胞内  $Ca^{2+}$  の上昇を反映することから、*in vitro* 実験同様、今後  $Ca^{2+}$  signal に対するデスアシルグレリンの作用を観察することで、デスアシルグレリンの作用メカニズムをさらに明らかにしていく。また、*in vivo* 実験に供したマウスの心筋サンプルは、生化学実験(標的タンパク質のウエスタンブロット解析およびリアルタイム RT-PCR)に使用するため採取、保存しており、心筋組織を用いたマイクロレイ解析を行い、関連するネットワークを同定することで、デスアシルグレリンによる DOX 心毒性抑制メカニズムの解明をさらに詳細に行っていく予定である。

以上本研究より、DOX 心毒性に対してグレリン、デスアシルグレリンは治療効果を有する薬

剤となる可能性が考えられた。特にデスアシルグレリンは DOX 誘発性心毒性の発生に關与する ROS の産生を抑え、Cx43 の脱リン酸化を抑えることから、新規の DOX 心毒性予防薬として有力な候補になり得ると考えられる。今後、作用メカニズムを含めたより詳細な機能解析、ならびに既存の心不全治療薬との比較による治療効果の有益性についての慎重な検討が必要であると考えられる。

### シニア・リサーチフェロー期間中の研究成果を、今後の研究にどのように役立てたいと考えているか

近年、心機能とがんの予後との相関を含めた心機能とがんとの関係が注目されている。こうした背景から、がんサバイバーの循環器系動態を把握し、がん治療の有効性を高めるためにも、心臓腫瘍学 Cardio-oncology/Onco-cardiology という学際領域が確立し、臨床現場でもその取り組みが開始されている。がん治療における心機能の低下は以前から知られていたものの、がん治療で得られるベネフィットが心機能低下よりも上回ると考えられていたため、これまで特に考慮されてこなかった。しかしながら、近年登場した免疫チェックポイント阻害薬においても心毒性の発現が認められており、さらには死亡例も報告されており(Johnson *et al.*, 2016)、がん治療分野での Cardio-oncology/Onco-cardiology 分野の重要性が増している。

申請者はこれまで循環薬理学を専門領域として研究を行ってきており、がん患者が生きる希望を持てる研究としてこの Cardio-oncology/Onco-cardiology 分野についてシニア・リサーチフェローとして3年間行ってきた。自身の研究成果はもちろん、世界的な動向や日本国内での Cardio-oncology/Onco-cardiology に対する認識も広がり、当分野の研究は大きな輪となり始めている。今後は平成30年度採択のAMED研究「ヒトiPS細胞由来心筋細胞を用いた統合的心臓安全性評価法の開発と国際標準化」事業において、抗がん剤治療を受けた患者に対する Cardio-oncology/Onco-cardiology の臨床研究に国立がん研究センター研究所の研究スタッフとして国立医薬品食品衛生研究所ならびに国立循環器病研究センター研究所とともに参加する予定である。この3年間、シニア・リサーチフェローとして培った経験を活かし、新たな発展分野となるであろう Cardio-oncology/Onco-cardiology 分野での研究を今後も精力的に進めていければと考えている。

## References

Baldanzi G, Filigheddu N, Cutrupi S, Catapano F, Bonisconi S, Fubini A, *et al.* (2002). Ghrelin and des-acyl ghrelin inhibit cell death in cardiomyocytes and endothelial cells through ERK1/2 and PI 3-kinase/AKT. *The Journal of cell biology* 159: 1029-1037.

Burridge PW, Li YF (2016). Human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes recapitulate the predilection of breast cancer patients to doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Nature medicine* 22: 547-556.

Callaghan B, Furness JB (2014). Novel and conventional receptors for ghrelin, desacyl-ghrelin, and pharmacologically related compounds. *Pharmacological reviews* 66: 984-1001.

Carvalho FS, Burgeiro A, Garcia R, Moreno AJ, Carvalho RA, Oliveira PJ (2014). Doxorubicin-induced cardiotoxicity: from bioenergetic failure and cell death to cardiomyopathy. *Medicinal research reviews* 34: 106-135.

Chen YR, Zweier JL (2014). Cardiac mitochondria and reactive oxygen species generation. *Circulation research* 114: 524-537.

Dong Q, Chen L, Lu Q, Sharma S, Li L, Morimoto S, *et al.* (2014). Quercetin attenuates doxorubicin cardiotoxicity by modulating Bmi-1 expression. *British journal of pharmacology* 171: 4440-4454.

Fallowfield L (2002). Quality of life: a new perspective for cancer patients. *Nature reviews. Cancer* 2: 873-879.

Green PS, Leeuwenburgh C (2002). Mitochondrial dysfunction is an early indicator of doxorubicin-induced apoptosis. *Biochimica et biophysica acta* 1588: 94-101.

Hori M, Matsuda T, Shibata A, Katanoda K, Sobue T, Nishimoto H (2015). Cancer incidence and incidence rates in Japan in 2009: a study of 32 population-based cancer registries for the Monitoring of Cancer Incidence in Japan (MCIJ) project. *Japanese journal of clinical oncology* 45: 884-891.

Johnson DB, Balko JM, Compton ML, Chalkias S, Gorham J, Xu Y, *et al.* (2016). Fulminant Myocarditis with Combination Immune Checkpoint Blockade. *The New England journal of medicine* 375: 1749-1755.

Khakoo AY, Yeh ET (2008). Therapy insight: Management of cardiovascular disease in patients with cancer and cardiac complications of cancer therapy. *Nature clinical practice. Oncology* 5: 655-667.

Kim SY, Kim SJ, Kim BJ, Rah SY, Chung SM, Im MJ, *et al.* (2006). Doxorubicin-induced reactive oxygen species generation and intracellular Ca<sup>2+</sup> increase are reciprocally modulated in rat cardiomyocytes. *Experimental & molecular medicine* 38: 535-545.

Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K (1999). Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 402: 656-660.

Kurebayashi N, Nishizawa H, Nakazato Y, Kurihara H, Matsushita S, Daida H, *et al.* (2008). Aberrant cell-to-cell coupling in Ca<sup>2+</sup>-overloaded guinea pig ventricular muscles. *American journal of physiology. Cell physiology* 294: C1419-1429.

Laird DW (2005). Connexin phosphorylation as a regulatory event linked to gap junction internalization and degradation. *Biochimica et biophysica acta* 1711: 172-182.

Menna P, Salvatorelli E, Minotti G (2010). Anthracycline degradation in cardiomyocytes: a journey to oxidative survival. *Chemical research in toxicology* 23: 6-10.

Minami M, Matsumoto S, Horiuchi H (2010). Cardiovascular side-effects of modern cancer therapy. *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society* 74: 1779-1786.

Minotti G, Menna P, Salvatorelli E, Cairo G, Gianni L (2004). Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacological reviews* 56: 185-229.

Miyano K, Sudo Y, Yokoyama A, Hisaoka-Nakashima K, Morioka N, Takebayashi M, *et al.* (2014). History of the G protein-coupled receptor (GPCR) assays from traditional to a state-of-the-art biosensor assay. *Journal of pharmacological sciences* 126: 302-309.

Mordente A, Meucci E, Silvestrini A, Martorana GE, Giardina B (2012). Anthracyclines and mitochondria. *Advances in experimental medicine and biology* 942: 385-419.

Nonaka M, Morimoto S, Murayama T, Kurebayashi N, Li L, Wang YY, *et al.* (2015). Stage-dependent benefits and risks of pimobendan in mice with genetic dilated cardiomyopathy and progressive heart failure. *British journal of pharmacology* 172: 2369-2382.

Pei XM, Yung BY, Yip SP, Ying M, Benzie IF, Siu PM (2014). Desacyl ghrelin prevents doxorubicin-induced myocardial fibrosis and apoptosis via the GHSR-independent pathway. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 306: E311-323.

Saffitz JE, Laing JG, Yamada KA (2000). Connexin expression and turnover : implications for cardiac excitability. *Circulation research* 86: 723-728.

Yeh ET, Bickford CL (2009). Cardiovascular complications of cancer therapy: incidence, pathogenesis, diagnosis, and management. *Journal of the American College of Cardiology* 53: 2231-2247.

Zhang S, Liu X, Bawa-Khalfe T, Lu LS, Lyu YL, Liu LF, *et al.* (2012). Identification of the molecular basis of doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Nature medicine* 18: 1639-1642.