

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08809

研究課題名(和文)チロシンキナーゼ阻害剤による動脈硬化促進に関わるバイオマーカーの網羅的探索研究

研究課題名(英文) Exploratory research of biomarkers associated arteriosclerosis by tyrosine kinase inhibitors

研究代表者

小野 孝明 (Ono, Takaaki)

浜松医科大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：40402276

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ダサチニブ(DAS)が投薬されたマウスではDMSO、イマチニブ、ニロチニブが投薬された場合と比較して大動脈全体と起始部で動脈硬化病変が減少した。総コレステロール、LDLコレステロールはDASが投薬されたマウスで上昇が認められた。骨髄由来マクロファージにおけるDiI-oxLDLの取り込みはDAS暴露群で低下していた。肝臓におけるRNAシーケンスによる網羅的解析ではDASにおいてSort1発現が低下していた。ウェスタンブロットングではSortilin発現は他のTKIと比較してDASで低下していた。一方、腹腔マクロファージではスカベンジャー受容体であるCd36発現が低下していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性骨髄性白血病はBCR-ABL1チロシンキナーゼ阻害剤(TKI)の導入により、健常人とほぼ同等の余命が得られるようになった。本研究は、長期にわたるTKI投与により併発する血管閉塞性イベントの機序を解明するために計画された。本研究において、ダサチニブは他のTKIと異なり、CD36発現低下を介し、酸化LDLの取り込みを障害していることが示された。さらに、コレステロールの取り込みと排出の両者に重要な役割を果たすSortilinの発現低下を認めた。本研究から、TKIごとで、コレステロールの代謝に異なる影響を与えることが示唆された。今後、さらに研究を進めていきたい。

研究成果の概要(英文)：Mice treated with dasatinib (DAS) had reduced arteriosclerotic lesions throughout the aorta and at the origin compared to DMSO, imatinib, and nilotinib. Total cholesterol and LDL cholesterol were elevated in DAS-treated mice. Uptake of DiI-ox LDL in bone marrow-derived macrophages was reduced in the DAS-exposed group. Comprehensive analysis by RNA sequencing in the liver showed that Sort1 expression was reduced in DAS. In Western blotting, Sortilin expression was reduced in DAS compared to other TKIs. On the other hand, the expression of Cd36, which is a scavenger receptor, was decreased in peritoneal macrophages.

研究分野：慢性骨髄性白血病

キーワード：慢性骨髄性白血病 チロシンキナーゼ阻害剤 動脈硬化 酸化LDL CD36 Sortilin ダサチニブ

## 1. 研究開始当初の背景

慢性期慢性骨髄性白血病の治療はチロシンキナーゼ阻害薬(TKI)により治療成績が改善し、CML患者の余命は健常人の余命とほぼ差がみられないまでになった(Haematologica.2016;101(5):541)。これまでTKIの有害事象は可逆的と考えられ、その多くは投与開始後3カ月以内に発症すると認識されていた。しかしながら、第二世代TKIの長期フォローアップで心血管イベントの頻度が予想以上に多いことが判明し(Leukemia.2016;30:1044-1054)、その予防はCML治療における重要な課題の一つとなっている。その発症リスクは糖尿病や脂質異常といった心血管イベントの高リスク群ほど合併しやすいことも判明しており(Leukemia.2016;30:1044-1054)、TKIによる心血管イベント発症メカニズムを解明するためにさまざまな検討が行われるようになった。

## 2. 研究の目的

慢性骨髄性白血病に対するTKIに関連した心血管イベント発症の要因を推察するため動脈硬化モデルマウスにイマチニブ、ニロチニブ、ダサチニブを投薬し、動脈硬化病変を組織学的に評価した。しかしながら、本実験ではコントロールと比較し、いずれも動脈硬化病変の増悪は認めなかった。一方、ダサチニブでは動脈硬化病変の抑制を認めた。次にTKIと血管内皮との関連を推察した。動脈硬化モデルマウスに各TKIを投薬し、血管内皮細胞を単離しRNAの抽出を試みた。しかしながら単離の手技確立が困難で、RNA抽出ができなかった。そこで、ダサチニブで動脈硬化が抑制される機序について検討を行うこととした。

## 3. 研究の方法

本研究は浜松医科大学動物実験委員会(No. 2016062)の承認を得て行われた。高脂血症モデルマウスである*Ldlr<sup>-/-</sup>/Apobec1<sup>-/-</sup>*マウスへ、ダサチニブ、比較対象のTKIであるイマチニブとニロチニブ、並びに溶媒であるDimethyl sulfoxide(DMSO)を8週齢から24週齢まで計16週間経口投与した。24週齢まで投薬後、マウスを屍殺し、血液を採取するとともに心臓、大動脈、肝臓を摘出した。

まず組織学的検討として摘出した心臓から大動脈起始部の標本作製し、動脈硬化病変を観察した。その後、ImageJを用い大動脈起始部の動脈硬化病変を比較した。また、摘出した大動脈を脂肪染色し、同様に大動脈全体の動脈硬化病変を比較した。その後、血中脂質の検討のため総コレステロール、LDLコレステロール、HDLコレステロールを測定した。

次にマクロファージにおける酸化LDL(oxLDL)の取込みの検討として高脂血症モデルマウスから造血細胞を採取し、マクロファージコロニー刺激因子を用い骨髄由来マクロファージへ分化させた。骨髄由来マクロファージへダサチニブ、イマチニブ、ニロチニブ、DMSOを暴露した。その後、oxLDLの取り込みを評価するため、各投薬群の骨髄由来マクロファージにDiI-oxLDLを暴露した。その後、ImageJで蛍光強度を比較した。

最後に分子生物学的検討としてダサチニブまたはDMSOが投薬されたマウスの肝臓におけるRNAシーケンスを行った。さらに、ダサチニブ、イマチニブ、ニロチニブのいずれかを投薬したマウスの肝臓からタンパクを抽出し、ウェスタンブロットングを行った。続いて、ダサチニブまたはDMSOを投与したマウスの腹腔マクロファージからRNAを抽出した。さらに、腹腔マクロ

ファージヘダサチニブまたは DMSO を暴露し RNA を抽出した。

#### 4 . 研究成果

ダサチニブが投薬されたマウスでは DMSO が投薬されたマウスと比較して大動脈起始部と大動脈全体ともに動脈硬化病変の減少が認められた。一方、イマチニブ、ニロチニブでは DMSO と比較し、特に変化はみられなかった。総コレステロール、LDL コレステロールはダサチニブが投薬されたマウスで上昇が認められた。骨髄由来マクロファージにおける Dil-oxLDL の取り込みはダサチニブ暴露群で低下していた。肝臓における RNA シーケンスによる網羅的解析ではダサチニブにおいて *Sort1* の発現の低下が認められた。ウェスタンブロットティングでは *Sortilin* の発現は他の TKI と比較してダサチニブで低下していた。一方、腹腔マクロファージでは *Sort1* の発現低下は認めなかったが、スカベンジャー受容体である *Cd36* の発現低下を認めた。

本研究では高脂血症モデルマウスに TKI を投薬し、動脈硬化を評価した。その結果、ダサチニブ投薬群ではマクロファージの oxLDL の取り込みを抑制することで動脈硬化病変が減少したと考えられた。ダサチニブは他の TKI と異なり、50 以上のチロシンキナーゼターゲットを持つマルチキナーゼ阻害剤である。これまで抗炎症作用や抗線維化作用が報告されている。今回の研究では、腹腔マクロファージを用いた実験で oxLDL の取り込みに重要である *Cd36* の発現低下が認められた。以上からダサチニブによる動脈硬化病変の抑制は、*Cd36* の発現低下を介し oxLDL の取り込みを抑制したことによる可能性が考えられた。さらなるターゲットの同定のため肝臓での RNA シーケンスを行い、*Sort1* をターゲット候補の 1 つとして同定した。*Sort1* はマクロファージ、肝細胞、神経細胞など幅広く存在し、コレステロールの取り込みを含めたマルチリガンド受容体として機能する。ダサチニブ投与による血中コレステロール値の上昇はダサチニブが肝臓での *Sort1* の発現を低下させ、コレステロール代謝に影響を及ぼした可能性が考えられた。一般に血中コレステロールが上昇すると動脈硬化は促進されるが、本研究では動脈硬化が抑制された。その原因として、ダサチニブがマクロファージにおける oxLDL の取り込みを抑制したことにより、動脈硬化が抑制されたと思われる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Takaba M, Ono T, Iwaki T et al	4. 巻 in press
2. 論文標題 Dasatinib suppresses atherosclerotic lesions by suppressing cholesterol uptake in a mouse model of hypercholesterolemia	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacological Sciences	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ono T	4. 巻 13(20)
2. 論文標題 Which Tyrosine Kinase Inhibitors Should Be Selected as the First-Line Treatment for Chronic Myelogenous Leukemia in Chronic Phase?	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 5116
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cancers13205116	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Ono Takaaki, Takahashi Naoto, Kizaki Masahiro, Kawaguchi Tatsuya, Suzuki Ritsuro, Yamamoto Kazuhito, Ohnishi Kazunori, Naoe Tomoki, Matsumura Itaru	4. 巻 111
2. 論文標題 Prognostic effect of comorbidities in patients with chronic myeloid leukemia treated with a tyrosine kinase inhibitor	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 3714～3725
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.14580	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kimura Shun-ichi, Japan Adult Leukemia Study Group (JALSG), Fujita Hiroyuki, Handa Hiroshi, Hiramoto Nobuhiro, Hosono Naoko, Minamiguchi Hitoshi, Takahashi Tsutomu, Kato Hideaki, Ono Takaaki, Kanda Yoshinobu, Kiyoi Hitoshi, Matsumura Itaru, Miyazaki Yasushi	4. 巻 112
2. 論文標題 Real-world management of infection during chemotherapy for acute leukemia in Japan: from the results of a nationwide questionnaire-based survey by the Japan Adult Leukemia Study Group	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Hematology	6. 最初と最後の頁 409～417
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12185-020-02921-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hino Masayuki, Matsumura Itaru, Fujisawa Shin, Ishizawa Kenichi, Ono Takaaki, Sakaida Emiko, Sekiguchi Naohiro, Tanetsugu Yusuke, Fukuhara Kei, Ohkura Masayuki, Koide Yuichiro, Takahashi Naoto	4. 巻 112
2. 論文標題 Phase 2 study of bosutinib in Japanese patients with newly diagnosed chronic phase chronic myeloid leukemia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Hematology	6. 最初と最後の頁 24 ~ 32
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12185-020-02878-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kitagawa Junichi, Kobayashi Ryo, Nagata Yasuyuki, Kasahara Senji, Ono Takaaki, Sawada Michio, Ohata Koichi, Kato Hayashi Hiroko, Hayashi Hideki, Shimizu Masahito, Itoh Yoshinori, Tsurumi Hisashi, Suzuki Akio	4. 巻 148
2. 論文標題 Polaprezinc for prevention of oral mucositis in patients receiving chemotherapy followed by hematopoietic stem cell transplantation: A multi institutional randomized controlled trial	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 1462 ~ 1469
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ijc.33316	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kizaki M, Takahashi N, Iriyama N, Okamoto S, Ono T, Usui N, Inokuchi K, Nakaseko C, Kurokawa M, Sumi M, Nakamura F, Kawaguchi T, Suzuki R, Yamamoto K, Ohnishi K, Matsumura I, Naoe T	4. 巻 109(4)
2. 論文標題 Efficacy and safety of tyrosine kinase inhibitors for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia over a 5-year period: results from the Japanese registry obtained by the New TARGET system.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Hematology	6. 最初と最後の頁 426-439
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12185-019-02613-1.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計7件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Masamitsu Takaba, Takayuki Iwaki, Tomohiro Arakawa, Takaaki Ono, Kazuo Umemura.
2. 発表標題 Reducing cholesterol uptake by suppressing Sort1 by dasatinib in a hypercholesterolemic mouse model.
3. 学会等名 第83回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2021年

1 . 発表者名 Ono T, Hino M, Matusmura I, Fujisawa S, Ishizawa K, Sakaida E, Sekiguchi N, Ono C, Aizawa M, Tanetsugu Y, Koide Y, Takahashi N
2 . 発表標題 Efficacy and Safety of Bosutinib in Japanese Patients with Newly Diagnosed Chronic Phase Chronic Myeloid Leukemia: Final 3-Year Results of a Phase 2 Study.
3 . 学会等名 American society of hematology (ASH) Annual Meeting & Exposition Atlanta, USA, (国際学会)
4 . 発表年 2021年

1 . 発表者名 1.Takaaki Ono, Naoto Takahashi, Masahiro Kizaki, Tatsuya Kawaguchi, Ritsuro Suzuki, Kazuhit Yamamoto, Kazunori Ohnishi, Tomoki Naoe, and Itaru Matsumura.
2 . 発表標題 No association between age itself and survival in patients with chronic myeloid leukemia.
3 . 学会等名 第82回日本血液学会総会
4 . 発表年 2020年

1 . 発表者名 高羽理光・岩城孝行・松本祐直・梅村和夫
2 . 発表標題 Evaluation of atherosclerotic lesions by BCR/ABL1 tyrosine kinase inhibitor effects in a familial type a model mouse
3 . 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4 . 発表年 2020年

1 . 発表者名 Takaaki Ono, Naoto Takahashi, Masahiro Kizaki, Tatsuya Kawaguchi, Ritsuro Suzuki, Kazuhito Yamamoto, Kazunori Ohnishi, Tomoki Naoe, and Itaru Matsumura
2 . 発表標題 Prognostic Effects of Pretreatment Statuses at Diagnosis in Patients with Chronic Myeloid Leukemia: Results of the New Target Observational Study 1
3 . 学会等名 American society of hematology (ASH) 52nd Annual Meeting & Exposition (国際学会)
4 . 発表年 2019年

1. 発表者名 Takaaki Ono, Naoto Takahashi, Masahiro Kizaki, Tatsuya Kawaguchi, Ritsuro Suzuki, Kazuhito Yamamoto, Kazunori Ohnishi, Tomoki Naoe, and Itaru Matsumura
2. 発表標題 Clinical features and outcomes of elderly patients with chronic myeloid leukemia according to the New TARGET observational study 1
3. 学会等名 第81回日本血液学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takaaki Ono, Naoto Takahashi, Masahiro Kizaki, Tatsuya Kawaguchi, Ritsuro Suzuki, Kazuhito Yamamoto, Kazunori Ohnishi, Tomoki Naoe, and Itaru Matsumura
2. 発表標題 Impact of pre-treatment status on outcome in patients with chronic myeloid leukemia: results of the New TARGET observational study 1
3. 学会等名 第81回日本血液学会総会
4. 発表年 2019年

〔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
研究分担者	岩城 孝行  (Iwaki Takayuki)  (70509463)	浜松医科大学・医学部・准教授    (13802)	

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