

機関番号：31201
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2008 ～ 2010
 課題番号：20591138
 研究課題名(和文) アントラサイクリン誘起心毒性に対するカルノシン酸による保護作用の基礎的研究
 研究課題名(英文) The basic study of protective effects by carnosic acid against anthracyclin-induced cardiotoxicity
 研究代表者
 石田 陽治 (ISHIDA YOJI)
 岩手医科大学・医学部・教授
 研究者番号：70151389

研究成果の概要(和文)：HL-1 マウス心筋細胞株を用いて、ドキソルビシン(DXR)の酸化作用について研究した。DXR は HL-1 細胞に対して殺細胞効果を認めなかった (~100ng/ml) ため、より酸化作用の強いアセトアミノフェン(AA)を用いて殺細胞効果を検討した。AA による殺細胞効果はカルシノン酸(CA)によって軽減されることが明らかとなった。最大効果を示す CA を HL-1 細胞に添加したのち、RNA を抽出し、ライトサイクラーを用いて Phase II 酵素の発現をみたところ、発現量には変化を認めなかった。CA による抗酸化作用は、Phase II 酵素の発現に関係なく生じていることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We evaluated the oxidant effects of doxorubicine (DOX) on murine cardio-myocytic cell line. DOX did not have cytotoxic effects on HL-1 cells (~100 ng/ml). Therefore, we have evaluated the cytotoxic effect of acetaminophen (AA), which has much more oxidant effects, instead of DXR. The cytotoxic effect of AA was reduced by the addition of carnosic acid (CA). The RNA was extracted from HL-1 cells, cultured with CA, which concentration showed the maximum anti-oxidant effect. The quantitative RT-PCR was performed, resulting in that phase II enzymes were not highly expressed significantly. These results suggest that anti-oxidant effect of CA might be independent on the expression of Phase II enzymes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：アントラサイクリン、心筋障害、カルノシン酸、抗酸化作用

1. 研究開始当初の背景

1960年代に開発され現在でも急性白血病の化学療法に最も重要な役割を担っている抗腫瘍性抗生物質はダウノルビシン

(DNR)やドキシルビシン(DOX)に代表されるアントラサイクリン系薬剤である。最近ではイダルビシンやメトキサントロンなどが開発され臨床にも使用されてきてい

る。これらの薬剤によって、急性骨髄性白血病の完全寛解率は80%にも達している。主たる作用機序は、トポイソメラーゼ II の阻害である。いっぽう、これらの薬剤の副作用で重要なものは、慢性の心毒性である薬剤性心筋症である。累積毒性であり、投与量に比例して頻度が増加するため、治療中は心機能の評価をかならず施行しながら、使用していかねばならない。本薬剤の長期使用により、病理学的には心筋細胞の膨化や心筋繊維の消失などが認められる。この心毒性の原因といわれているのが、free radical の形成である。DOX は心筋の sarcoplasmic reticulum において semiquinone にあるいは dihydroquinone に還元される。この結果、生成された反応性の free radical は金属イオンの存在下で急速に酸素と反応し O_2^- , OH, H_2O_2 などを生成し、これらが DNA を障害することにより sarcoplasm の膜が障害され、膜の Ca 結合性が減弱し、心筋の収縮力が障害されるといわれている (Brit J Haematol 131:561-78, 2005)。では、何故に心筋が主として損傷を受けるのかという理由は Doroshow らの報告 (J Clin Invest 65:128-135, 1980) で明らかにされた。つまり、他の組織に存在する解毒作用としての glutathione peroxidase, superoxide dismutase, catalase の活性が心筋では低いためと考えられている。さらに、DOX には glutathione peroxidase の活性を低下する作用も報告されている。つまり、本薬剤は過酸化物の産生亢進、およびその分解酵素の抑制により心筋障害を生じると考えられている。心筋の catalase 発現を亢進させた transgenic マウスは、DOX に抵抗性であるという報

告 (J Biol Chem 271:12610-12616, 1996) や manganese superoxide dismutase (Mn-SOD) を過剰発現させた transgenic マウスは DOX 誘因性心筋障害を軽減することなどの報告 (J Clin Invest 98:1253-1260, 1996) は、上記の DOX 心筋障害の機序を支持している。これらの心筋障害の副作用を抑制するいろいろな処置がなされてきているものの、臨床の場で明らかな効果を示した薬剤の報告はほとんどない (flavonoid: cardiovascular Toxicology 7: 154-159, 2007, Coenzyme Q10: J Clin Oncol 22:4418-24, 2004)。

2. 研究の目的

われわれは、最近、植物から抽出したカルノシン酸が Keap1 のシステイン残基に結合することにより、Keap1/Nrf2 転写系を活性化し抗酸化作用のあるタンパク質の発現を介して、酸化ストレスからニューロンを保護することを報告した (Sato T et al. Journal of Neurochemistry 2007)。そこで、本研究では、カルノシン酸が、アントラサイクリン系抗生物質による酸化的心筋損傷から保護されるかどうかの有無について検討したい。

3. 研究の方法

(1) Claycomb ら (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 2979-2984, 1998) によって樹立された HL-1 細胞株が心筋細胞と類似の性質をもっているかどうかの検討をした。a-cardiac myosin heavy chain (MHC)、a-cardiac actin、connexin43、atrial natriuretic factor (ANF) などの遺伝子の発現を Reverse transcriptase-PCR (RT-PCR) で検討した。

(2)HL-1細胞とドキソルビシンとをin vitroで培養後、生存率を検討した。(MTTアッセイ)。フィブロネクチン処理した96穴マイクロプレート中にHL-1細胞をまき(2.5x10⁴, 5.0x10⁴/ml)、10%FCS RPMIで37°C、24時間培養した。24時間後に種々の濃度のドキソルビシン(0, 0.195, 0.39, 0.78, 1.56, 3.13, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 ng/ml)を加えてさらに24時間培養を継続した。培養終了後、MTTアッセイを測定した。培養時間を72時間まで延長しても検討した。

(3)HL-1細胞とアセトアミノフェンとをin vitroで培養後、生存率を検討する(MTTアッセイ)。フィブロネクチン処理した96穴マイクロプレート中にHL-1細胞をまき(1.0x10⁴/ml)、アセトアミノフェンを種々の濃度に加え、カルシノン酸0~30 μM加えて、10%FCS RPMIで37°C、24時間あるいは48時間培養した。培養終了後にMTTアッセイにて生存率を測定した。

(4)HL-1細胞に至適濃度のカルノシン酸を加えて24、48時間培養後のphase II enzymesの発現量を検討した(ライトサイクラー)。HL-1細胞からRNAを抽出し、reverse transcriptaseによりDNAを作成し以下のプライマーを用いて定量的PCRを行った。

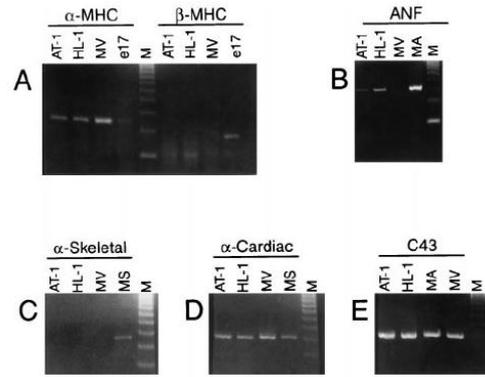
(5)マウスにアセトアミノフェンのin vivo投与を行い、心筋細胞障害の検討した。

4. 研究成果

(1) HL-1細胞株の特性

培養HL-1細胞におけるRT-PCR

(A) a-MHC and b-MHC, (B) ANF, (C) a-skeletal actin (a-skeletal), (D) a-cardiac actin (a-cardiac), and (E) connexin43 (C43)



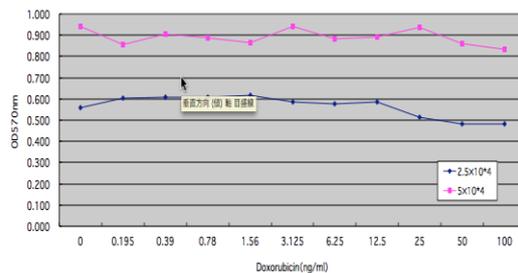
これらの結果から、このHL-1細胞は、心筋細胞と類似している性質を持つものと考え、以下の実験を行った。

(2) HL-1細胞とドキソルビシンとをin vitroで培養後、生存率をMTTアッセイで測定した。

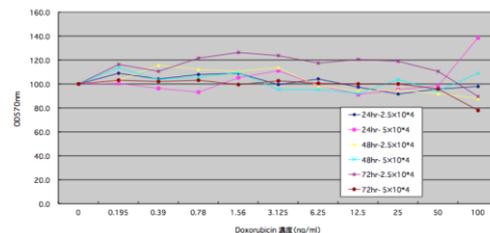
X軸：ドキソルビシン濃度 (ng/ml)

Y軸：OD570nm、赤線：5x10⁴/200 μl

青線：2.5x10⁴/200 μl



ドキソルビシンとの24時間培養では、100ng/mlの濃度においても生存率は低下しなかったため、培養時間を延長させた。

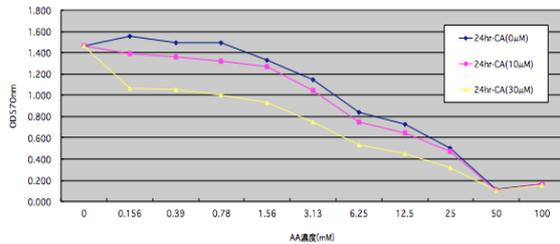


X軸：ドキソルビシン濃度 (ng/ml)

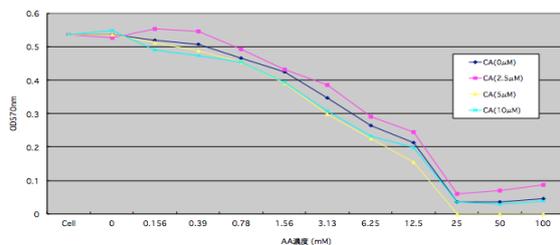
Y軸：% of OD570nm

青、赤：24時間培養。黄色、緑：48時間

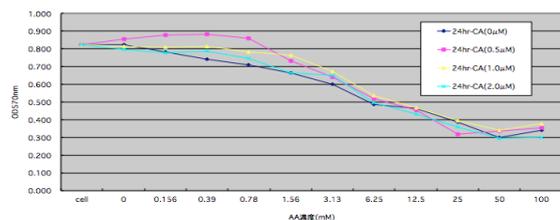
培養。紫、茶色：72 時間培養
 72 時間まで培養時間を延長させても生存率の低下を認めなかったため、以後の実験は酸化作用の強いアセトアミノフェンを用いて in vitro 実験を行った。
 (3)HL-1細胞とアセトアミノフェン(AA)とをin vitroで培養後、生存率をMTTアッセイで測定した。



青：24 時間培養、カルノシン酸 (CA) 0 μ M
 赤：24 時間培養、CA 10 μ M
 黄色：24 時間培養、CA 30 μ M
 X 軸：AA 濃度、Y 軸：OD570nm

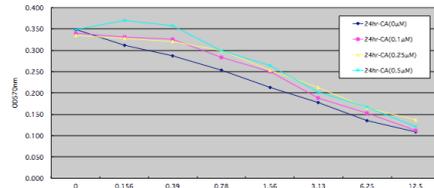


青：24 時間培養、CA 0 μ M
 赤：24 時間培養、CA 2.5 μ M
 黄色：24 時間培養、CA 5.0 μ M
 緑：24 時間培養、CA 10 μ M
 X 軸：AA 濃度、Y 軸：OD570nm



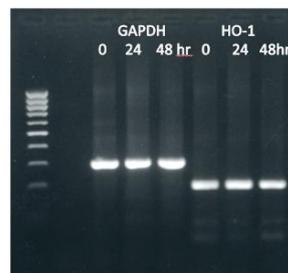
青：24 時間培養、CA 0 μ M
 赤：24 時間培養、CA 0.5 μ M
 黄色：24 時間培養、CA 1 μ M

緑：24 時間培養、CA 2 μ M
 X 軸：AA 濃度、Y 軸：OD570nm



青：24 時間培養、CA 0 μ M
 赤：24 時間培養、CA 0.1 μ M
 黄色：24 時間培養、CA 0.25 μ M
 緑：24 時間培養、CA 0.5 μ M
 X 軸：AA 濃度、Y 軸：OD570nm
 これらの結果から、0.5 μ Mのカルニシン酸添加がアセトアミノフェンによる酸化作用から最も保護されたという結論を得た。

(4) HL-1 細胞に至適濃度のカルノシン酸を加えて 24、48 時間培養後の phase II enzymes (NQO-1, γ-GCS, GST, HO-1) の発現量をライトサイクラーを用いて定量した。



左図に 24, 48 時間培養後の GAPDH と HO-1 の発現量の電気泳動図を示す。

Phase II enzyme	mouse	Phase II enzyme/GAPDH			
		CA濃度(μ M)	0	0.5	5
Phase II enzyme	mouse NQO-1		1.23	1.26	1.25
Phase II enzyme	mouse GCS		1.59	1.64	1.63
Phase II enzyme	mouse GST		1.63	1.73	1.66
Phase II enzyme	mouse HO-1		1.69	1.83	1.73

上表にライトサイクラーで定量した値を示すが、CA 0.5 μ Mで培養後も phase II 酵素の発現量は変化がなかった。

(5) AA の in vivo 投与

AA(600mg/kg)の投与前 3 時間 (あるいは 24 時間) 前に CA(1mg/kg)を腹腔投与した。AA 投与後 24 時間後に採血して ALT ならびに CPK

		ALT	CPK
10%DMSO/生食	生食	35	104
		70	124
		47	139
		26	102
		28	121
		36	156
10%DMSO/生食	AA	292	167
		4270	148
		645	150
		794	132
カルシノ酸	生食	47	104
		34	152
		49	145
		24	114
		24	164
		30	184
カルシノ酸	AA	283	121
		45	128
		27	165
		292	171

を測定した。

左表に示すように、CA によって、肝機能障害の軽減は認められるものの、心筋障害のマーカである CPK は、AA の投与前後で全く変化を示さなかった。これらから、

AA の 1 回投与では心筋障害を起こすことは難しいと考えられた。

考察：DXR の殺細胞性に関しては、in vitro でも長い期間が必要なのかもしれない。しかしながら、細胞株を用いての検討では、1 週間以上の培養は不可能であるので、心筋細胞の培養法を確立した上で、これらの障害性を検討すべきかもしれない。今回は DXR の代用としてより酸化作用の強い AA を用いて検討した。AA は心筋細胞株にも明らかな酸化作用を及ぼし生存率の低下を起こした。この細胞障害性は低濃度の CA によって軽減された。が、その至適濃度では Phase II 酵素の発現上昇がみられず、Phase II 酵素を介さない経路の存在が示唆された。いっぽう、AA の in vivo 投与により、肝細胞障害が引き起こされるものの、事前に CA 投与を行えば、軽減されることが明らかとなった。しかしながら、心筋細胞の障害は認められず、酸化作用による心筋細胞障害性をつくるには、長期の酸化剤の投与が必要になると考えられた。最近、

滝川ら(Hepatol Res 41(1). 87-92. 2011) は、CA の長期投与によってラットの脂肪肝が組織的にも血清学的にも改善することを報告している。心臓においても心毒性を立証するためには長期の酸化剤の投与が必要となると考えられた。いっぽう、その酸化的効果を減弱するためには、CA の長期投与が必要になってくる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

1. Ito S, Oyake T, Murai K, Ishida Y:

Deguelin suppresses cell proliferation via the inhibition of surviving expression and STAT3 phosphorylation in HTLV-1-transformed T cells. Leuk Res. 34(3): 352-7, 2010

2. Suzuki K, Murai K, Suwabe A, Ishida Y:

Factor XII Ofunato: Lys346Asn mutation associated with blood coagulation factor XII deficiency causes impaired secretion through a proteasome-mediated degradation. Thromb Res. 125(5):438-43, 2010

3. Nakagawa Y, Suzuki K, Ishida Y,

Urabe A et al. Clinical efficacy and safety of biapenem for febrile neutropenia in patients with underlying hematopoietic diseases: a multi-institutional study J Infect Chemother 2010 (in press)

4. Sato Y, Yang P, An Y, Matsukawa K,

Ito K, Imanishi S, Matsuda H, Uchiyama Y, Imai K, Ito S, Ishida Y, Suzuki K A palmitoyl conjugate of insect pentapeptide Yamamarin arrests cell proliferation and respiration Peptides 31; 827-833, 2010

5. Nomura K, Mizumachi E, Yamashita M, Ohshiro M, Komori T, Sugai M, Taniwaki M, Ishida Y. Drug susceptibility and clonality of methicillin-resistant Staphylococcus epidermidis in hospitalized patients with hematological malignancies. *Ir J Med Sci* 179(3): 351-6, 2010
5. Kanbayashi Y, Nomura K, Fujimoto Y, Yamashita M, Ohshiro M, Okamoto K, Matsumoto Y, Horiike S, Takagi T, Ishida Y, Taniwaki M; Japan Haematology/Oncology Study (J-HOST) Group. Risk factors for infection in haematology patients treated with rituximab. *Eur J Haematol.* 82(1):26-30, 2009
7. Nomura K, Fujimoto Y, Yamashita M, Morimoto Y, Ohshiro M, Sato K, Oyake T, Kowata S, Konishi H, Yoshikawa T, Ishida Y, Taniwaki M; Japan Hematology/Oncology Study (J-HOST) Group Kyoto. Absence of pseudomembranes in Clostridium difficile-associated diarrhea in patients using immunosuppression agents. *Scand J Gastroenterol.* 44(1):74-78, 2009

[学会発表] (計 50 件)

1. Murai K, Kowata S, Abo A, Oyake T, Ishida Y et al. Bortezomib induced thrombocytopenia might be due to the inhibition of proplatelet formation of megakaryocyte. 52nd American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition December 6th, 2010 Orland, USA
2. Oyake T, Kowata S, Murai K, Ishida Y et al. Micafungin versus voriconazole for empirical anti-fungal therapy in febrile neutropenic patients with acute myeloid leukemia: A Randomized, controlled study. 52nd American Society of Hematology Annual Meeting and

Exposition December 4th, 2010 Orland, USA

3. Ito S, Oyake T, Murai K, Ishida Y. Resveratrol Induces cell growth arrest and cell death of adult T-cell leukemia cells via deacetylation of STAT3 bySIRT1. 52nd American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition December 5th, 2010 Orland, USA
4. Kowata S, Oyake T, Murai K, Ishida Y et al. The role of actin nucleating factors, Arp3 and mDial, during proplatelet formation of megakaryocytes. 51st American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition December 6th, 2009 New Orleans, USA
6. Oyake T, Ito S, Kowata S, Ishida Y et al. Deguelin induced cell growth arrest and cell death via the suppression of BCR-ABL and Survivin expression in BCR-ABL-T315 mutant cells. 51st American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition December 7th, 2009 New Orleans, USA
7. Ito S, Oyake T, Murai K, Ishida Y. Deguelin induces cell growth arrest and cell death by destabilizing phosphorylated STAT 3 and survivin in adult T-cell leukemia cells. 51st American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition December 7th, 2009 New Orleans, USA

[図書] (計 15 件)

石田陽治 臨床検査ガイド 2010 文光堂、東京
他 14 件

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :

権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
特になし。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石田 陽治 (ISHIDA YOJI)
岩手医科大学・医学部・教授
研究者番号：70151389

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし