

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08232

研究課題名(和文) アクロレイン除去によるシクロフォスファミド心筋障害予防法の研究

研究課題名(英文) Research on prevention of cyclophosphamide cardiotoxicity by removing acrolein

研究代表者

西川 拓朗(Nishikawa, Takuro)

鹿児島大学・医歯学域医学系・准教授

研究者番号：90535725

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：CY心筋障害の機序を解明し、予防手段の探索につなげるため、CY大量投与後のマウス心筋組織の構造解析ならびに網羅的な遺伝子変動解析を行った。C57BL/6Jマウスの腹腔内にCYを大量投与し7日後に解剖し、心筋組織を病理学的に観察した。すると電子顕微鏡検査で筋小胞体、横行小管、ミトコンドリア、細胞核膜などの多くの微細構造変化を認めた。また、CY大量投与3時間後の心筋細胞のマイクロアレイ解析では心筋収縮、カルシウムイオンシグナル経路に関する遺伝子群が殆ど抑制されており、それらは電子顕微鏡検査所見でみられた構造変化部位に合致していた。CY心筋障害の機序として、カルシウムイオン調節の破綻が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

造血細胞移植医療で欠かせない大量シクロフォスファミド(CY)療法であるが、その重大な副作用として致死性の心毒性が挙げられる。しかし、CY心毒性の機序や予防手段などはまだ解明されていない。今回のマウス実験、研究成果により、大量CY投与によりカルシウムイオンの恒常性破綻が心筋収縮能の低下につながっていることが推測された。これは今までの報告にないCY心筋障害の機序であった。そして、カルシウムイオンの恒常性を保つこともCY心筋障害の予防につながる可能性が見いだされた。

研究成果の概要(英文)：To elucidate acute structural changes in myocardial cells and pathways leading to myocardial damage in mice treated with high-dose CY, we performed detailed pathological analyses of myocardial tissue obtained from C57BL/6J mice that received high-dose CY. In addition, we analyzed the genome-wide cardiomyocyte expression profile of mice that received high-dose CY. Treatment with CY caused marked ultrastructural aberrations with electron microscopy. Expansion of the transverse tubule and sarcoplasmic reticulum, turbulence of myocardial fiber travel, and low contractile protein density in cardiomyocytes were observed. High-dose CY treatment changed cardiomyocyte expression of 1,210 genes associated with cell-cell junctions, inflammatory responses, cardiomyopathy, and cardiac muscle function, as detected by microarray analysis. Our results of gene expression profiles suggest that cardiotoxicity induced by CY is associated with a disruption of the Ca<sup>2+</sup> signaling pathway.

研究分野：小児科学

キーワード：心筋障害 シクロフォスファミド 造血細胞移植 アクロレイン マイクロアレイ解析

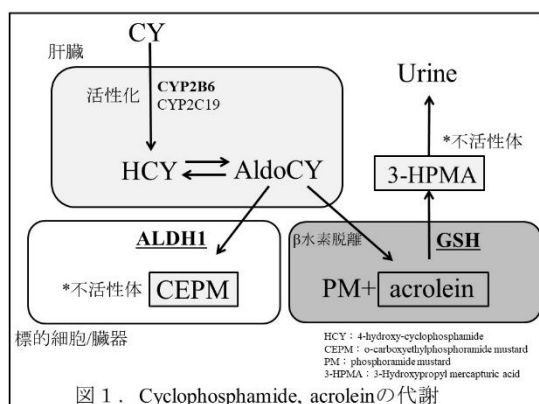
## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

Cyclophosphamide (CY)大量投与で生じる急性心筋障害はその数%が致死的であり、臨床で大きな問題となっている。しかしその発症機序は未だ不明でありその予防法も確立されていない。

CY は多くのがん種の治療のみならず急性白血病、骨髄造血不全症、原発性免疫不全症候群の疾患に対する造血細胞移植の前処置としても頻用される抗がん剤である。また最近では移植後早期に CY を大量に投与することで移植片対宿主病(GVHD)を予防するという治療法も行われており、CY を大量に投与する機会は今後も増えることが予想される。

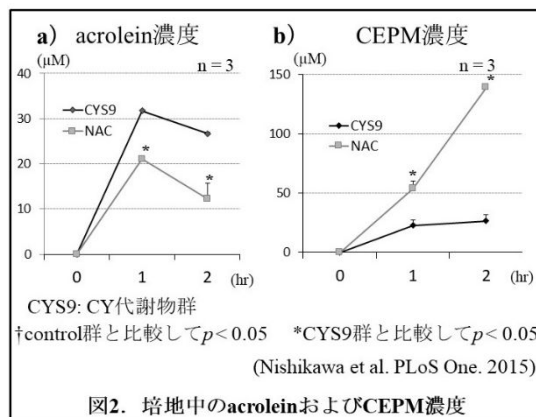
CY は肝臓で CYP2B6 や CYP2C19 により代謝されて抗がん作用を発揮するプロドラッグで、ヒドロキシ化を受け 4-hydroxycyclophosphamide (HCY)へと代謝される。ヒドロキシ体である HCY は互変異性体である aldocyclophosphamide (AldoCY)へと酸化され、AldoCY はβ脱離により抗がん効果を持つ phosphoramidate mustard (PM)へと変化する。この時、副生成物として反応性が高く細胞毒性の強い acrolein も生成される。一方で、アルデヒド体である AldoCY はアルデヒド脱水素酵素 1(aldehyde dehydrogenase 1; ALDH1)の触媒により、不活性で細胞毒性のない o-carboxyethylphosphoramidate mustard (CEPM)へと代謝される(図1)。



申請者らはこれまでのラット心筋細胞(H9c2)及びラット肝ホモジネート(S9)を用いた実験で、CY曝露により心筋細胞が障害される時(CYS9) acroleinの産生が増加し、一方で心筋細胞障害がN-acetylcysteine(NAC)により抑制される時にはCEPMの産生が増加することを明らかにした(図2)。これは、CY心筋障害の主因はacroleinで、その産生にALDH1が大きく関与しているのではないかと初めて報告した。

### 2. 研究の目的

次に本研究はin vivo研究として、CY大量投与後、acrolein大量投与後のマウス心筋組織の構造解析ならびに網羅的な遺伝子変動解析を行い、CY心筋障害の詳細な機序を解明し、予防手段の探索につなげることを目的とした。



### 3. 研究の方法

#### (1) CY心筋障害誘発モデルの作成

6週齢の雌のC57BL/6JマウスにCYを300 mg/kgから700 mg/kgを腹腔内に1回もしくは2日間連続投与し、1週間観察した。すると、400 mg/kgを2日間連日投与が18/20例で生存し、それ以上CYの投与量を増やすと7日間生存するマウスは存在しなかった。CYのdose-limiting toxicityは心毒性であることから、本マウスにおいては400 mg/kgを2日間連日投与である程度の心毒性が出現していると考えた。

#### (2) CY及びその代謝物の血中濃度測定

6週齢の雌のC57BL/6JマウスにCY 400 mg/kgをワンショットで腹腔内に投与した。投与から1時間後及び4時間後に尾静脈より採血を行い、血漿を回収した。液体クロマトグラフィー質量分析法(LC/MS/MS)にて血漿中のCY、HCY及びCEPM濃度を測定した。また得られた濃度を用いて血中濃度-時間曲線下面積(Area under the concentration-time curve; AUC<sub>0-∞</sub>)をone-compartment modelを用いて計算した。

#### (3) 心筋組織の病理組織学的評価

6週齢の雌のC57BL/6JマウスにCYを400 mg/kgを腹腔内に2日間連続投与し、1週間後に頸椎脱臼で安楽死させ、心臓を摘出した。その他に、同様のマウスにacrolein 5 mg/kgを腹腔内に2日間連続投与、NAC(200 mg/kg)をCY投与2時間前に連日腹腔内に投与後、CYを400 mg/kg投与、コントロールとしては腹腔内に生食を投与し、同じく1週間後に頸椎脱臼で安楽死させ、心臓を摘出した。摘出した心臓は4%パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液で固定後、hematoxylin and eosin(HE)染色を行った。また電子顕微鏡による解析も行った。

#### (4) 心筋組織のマイクロアレイ解析

6週齢の雌のC57BL/6JマウスにCYを400 mg/kgを腹腔内に2日間連続投与し、3時間後に頸椎脱臼で安楽死させ、心臓を摘出した。その他に、同様のマウスにacrolein 5 mg/kgを腹腔内に2日間連続投与、NAC(200 mg/kg)を

CY 投与 2 時間前に連日腹腔内に投与後、CY を 400 mg/kg 投与、コントロールとしては腹腔内に生食を投与し、同じく 3 時間後に頸椎脱臼で安楽死させ、心臓を摘出した。摘出した心臓から RNA を抽出し、それぞれマイクロアレイ解析を行った。

#### 4. 研究成果

(1) CY 400 mg/kg を腹腔内に投与後の CY、HCY、CEPM それぞれの  $AUC_{0-\infty}$  は  $246.4 \text{ h} \cdot \mu\text{g/mL}$ 、 $73.3 \text{ h} \cdot \mu\text{g/mL}$ 、 $269.1 \text{ h} \cdot \mu\text{g/mL}$  であり、CY 大量投与後の AUC としては妥当な結果であった。

(2) HE 染色の病理組織学的検査において、Control 群と CY 投与群、acrolein 投与群、NAC + CY 投与群それぞれにおける有意な変化は見られなかった。

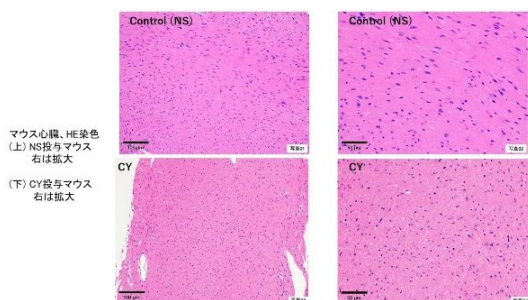


図3. CY投与後の心筋組織 (HE染色)

しかし、電子顕微鏡検査では CY 投与群で control 群と比して、筋小胞体や横行小管の内腔は著しく拡張し、ミトコンドリアのクリステ構造も乱れ疎になり、マトリックスは失われていた (図4)。また、ミトコンドリア内に lamellae body が認められた (図4)。細胞核膜変化や筋収縮繊維変化 (図5) も見られ、CY 投与後に多くの微細構造変化がみられていることが明らかになった。

- 筋小胞体変化
- 核膜変化
- ミトコンドリア変化
- lamellae body 変化

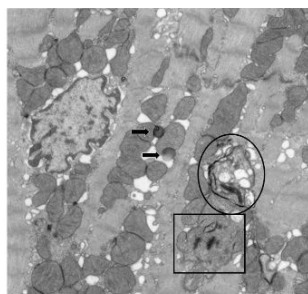


図4. CY投与後の電子顕微鏡所見 (1)

- 筋収縮繊維変化

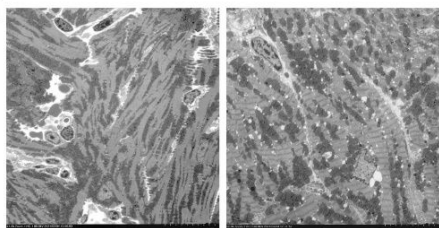


図5. CY投与後の電子顕微鏡所見 (2)

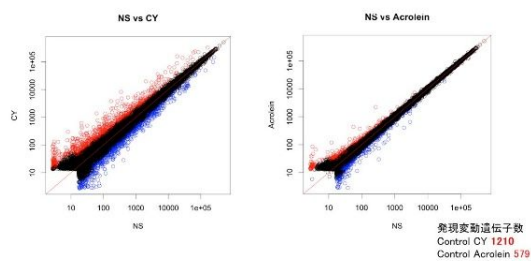


図6. CY/acrolein投与後マウス心筋細胞の発現変動遺伝子散布図

(3) CY 大量投与 3 時間後の心筋細胞のマイクロアレイ解析では acrolein 投与 3 時間後に比し発現変動がみられた遺伝子数が著しく多かった (図6)。

また、CY 大量後に発現変動がみられた遺伝子群は、心筋収縮、カルシウムイオンシグナル経路に関する遺伝子が多く、殆どが抑制されていた (図7)。

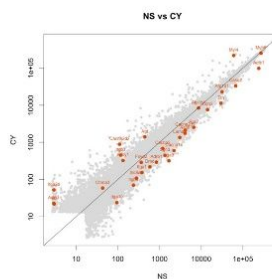


図7. CY投与後マウス心筋細胞の発現変動遺伝子 (心筋収縮関連強調) 散布図

そして、それらは電子顕微鏡検査所見で見られた構造変化の部位に合致していた。以上から CY 心筋障害の機序として、カルシウムイオン調節の恒常性破綻が考えられた。

Acrolein 投与後のマイクロアレイ解析では発現遺伝子変動はあまり認められず、暴露方法に改善の余地があるのではないかと考えた (図6)。

NAC 前投与後の CY 投与後のマイクロアレイ解析では NAC 非投与時に比して、病理組織学的所見はあまり変化なかったが、心筋収縮、カルシウムイオンシグナル経路に関する遺伝子群の発現変動が有意に乏しくなった。NAC 投与による CY 心筋障害予防の可能性が示唆された。

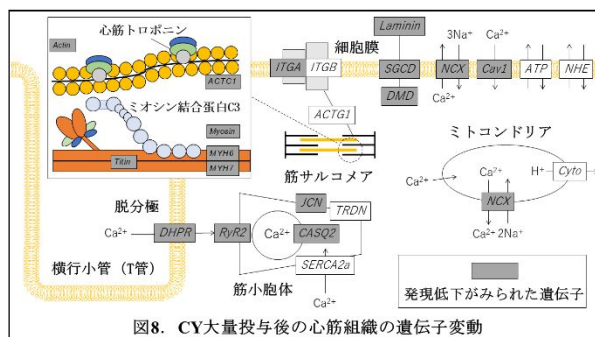


図8. CY大量投与後の心筋組織の遺伝子変動

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 13件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Abematsu T, Nishikawa T, Shiba N, Iijima-Yamashita Y, Inaba Y, Takahashi Y, Nakagawa S, Kodama Y, Okamoto Y, Kawano Y.	4. 巻 68
2. 論文標題 Pediatric acute myeloid leukemia co-expressing FLT3/ITD and NUP98/NSD1 treated with gilteritinib plus allogeneic peripheral blood stem cell transplantation: A case report	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pediatr Blood Cancer.	6. 最初と最後の頁 e29216
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/pbc.29216.	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 Abematsu T, Nishikawa T, Nakagawa S, Kodama Y, Okamoto Y, Kawano Y.	4. 巻 44
2. 論文標題 Successful Salvage of Very Early Relapse in Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia With Inotuzumab Ozogamicin and HLA-haploidentical Peripheral Blood Stem Cell Transplantation With Posttransplant Cyclophosphamide	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Pediatr Hematol Oncol.	6. 最初と最後の頁 62-64
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/MPH.0000000000002079.	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 Rindiarti A, Okamoto Y, Nakagawa S, Hirose J, Kodama Y, Nishikawa T, Kawano Y.	4. 巻 63
2. 論文標題 Changes in intracellular activation-related gene expression and induction of Akt contribute to acquired resistance toward nelarabine in CCRF-CEM cell line	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Leuk Lymphoma.	6. 最初と最後の頁 404-415
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/10428194.2021.1992617.	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 Nishikawa Takuro, Okamura Ken, Moriyama Mizuki, Watanabe Kenji, Ibusuki Atsuko, Sameshima Seiji, Masamoto Izumi, Yamazaki Ieharu, Tanita Kay, Kanekura Takuro, Kanegane Hirokazu, Suzuki Tamio, Kawano Yoshifumi	4. 巻 47
2. 論文標題 Novel AP3B1 compound heterozygous mutations in a Japanese patient with Hermansky Pudlak syndrome type 2	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Dermatology	6. 最初と最後の頁 185 ~ 189
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1346-8138.15177	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 Imakiire Ryo, Nishikawa Takuro, Tominaga Hiroyuki, Tawaratsumida Hiroki, Imuta Naoko, Koriyama Toyoyasu, Nishi Junichiro, Taniguchi Noboru, Kawano Yoshifumi	4. 巻 39
2. 論文標題 Bacillus Calmette-Guerin-Associated Cervical Spondylitis in a 3-Year-Old Immunocompetent Girl	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pediatric Infectious Disease Journal	6. 最初と最後の頁 e466 ~ e469
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/INF.0000000000002893	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 Sugita Koshiro, Kaji Tatsuru, Muto Mitsuru, Nishikawa Takuro, Okamoto Yasuhiro, Imamura Mari, Ieiri Satoshi	4. 巻 -
2. 論文標題 Successful laparoscopic extirpation of a vasoactive intestinal polypeptide secreting neuroblastoma originating from the right adrenal gland: A report of an infantile case	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Asian Journal of Endoscopic Surgery	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) 10.1111/ases.12916	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 Abematsu Takanari, Nishikawa Takuro, Nakagawa Shunsuke, Kodama Yuichi, Okamoto Yasuhiro, Kawano Yoshifumi	4. 巻 -
2. 論文標題 Successful Salvage of Very Early Relapse in Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia With Inotuzumab Ozogamicin and HLA-haploidentical Peripheral Blood Stem Cell Transplantation With Posttransplant Cyclophosphamide	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Pediatric Hematology/Oncology	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) 10.1097/MPH.0000000000002079	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 Hozaka Yuto, Sasaki Ken, Nishikawa Takuro, Onishi Shun, Noda Masahiro, Tsuruda Yusuke, Uchikado Yasuto, Kita Yoshiaki, Arigami Takaaki, Mori Shinichiro, Maemura Kosei, Ieiri Satoshi, Kawano Yoshifumi, Natsugoe Shoji, Ohtsuka Takao	4. 巻 7
2. 論文標題 Successful treatment of post chemotherapy esophageal cicatricial atresia in a pediatric patient with anaplastic large cell lymphoma through minimally invasive esophagectomy: a case report	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Surgical Case Reports	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) 10.1186/s40792-021-01108-8	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 Kanimura M, Nishikawa T, Takahashi Y, Nagahama J, Nakagawa S, Ninomiya Y, Yoshinaga M, Okamoto Y.	4. 巻 28
2. 論文標題 Anthracyclines for acute promyelocytic leukemia in a female with congenital long QT syndrome	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Pediatr Blood Cancer.	6. 最初と最後の頁 e30323.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/pbc.30323.	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 Nagahama J, Nishikawa T, Tasaki T, Yasudome Y, Nakamura T, Abematsu T, Nakagawa S, Kodama Y, Tanimoto A, Okamoto Y.	4. 巻 70
2. 論文標題 Systemic Epstein-Barr virus-positive T-cell lymphoma of childhood treated with the ICE regimen and allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Pediatr Blood Cancer.	6. 最初と最後の頁 e30041.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/pbc.30041.	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 Nakagawa S, Kawahara K, Okamoto Y, Kodama Y, Nishikawa T, Kawano Y, Furukawa T.	4. 巻 19
2. 論文標題 Association between Dysfunction of the Nucleolar Stress Response and Multidrug Resistance in Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancers (Basel).	6. 最初と最後の頁 5127
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers14205127.	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 Iwaizako H, Nishikawa T, Kitazono I, Tanimoto A, Okamoto Y.	4. 巻 64
2. 論文標題 Unknown primary malignant small round cell tumor masquerading as acute leukemia	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pediatr Int.	6. 最初と最後の頁 e15158.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ped.15158.	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 Horiguchi T, Nishikawa T, Shiokawa N, Imakiire R, Okamoto Y.	4. 巻 64
2. 論文標題 Intermittent abdominal pain in cardiac tamponade due to pericardial cysts.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pediatr Int.	6. 最初と最後の頁 e15056.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ped.15056.	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2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Takuro Nishikawa, Kazuro Ikawa, Takanari Abematsu, Shunsuke Nakagawa, Yuichi Kodama, Takayuki Tanabe, Yuichi Shinkoda, Yasuhiro Okamoto, Yoshifumi Kawano
2. 発表標題 Comparative pharmacokinetic (PK) study of two conditioning and one post-transplant cyclophosphamide regimens
3. 学会等名 第43回日本造血細胞移植学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西川拓朗、中村達郎、精松貴成、中川俊輔、児玉祐一、岡本康裕、河野嘉文
2. 発表標題 gilteritinibで寛解に達したFLT3-ITD、NUP98-NSD1共発現の急性骨髄性白血病8歳男児
3. 学会等名 第82回日本血液学会
4. 発表年 2020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	河野 嘉文  (Kawano Yoshifumi)  (20260680)	鹿児島大学・医歯学域医学系・教授    (17701)	

6. 研究組織（つづき）

	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	児玉 祐一  (Kodama Yuichi)  (20535695)	鹿児島大学・医歯学域鹿児島大学病院・講師    (17701)	
研究分担者	宮原 恵弥子  (Miyahara Emiko)  (20778427)	鹿児島大学・医歯学総合研究科・客員研究員    (17701)	
研究分担者	岡本 康裕  (Okamoto Yasuhiro)  (30398002)	鹿児島大学・医歯学域医学系・教授    (17701)	

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