

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15255

研究課題名(和文) DNAアルキル化剤による肝類洞閉塞症候群(SOS)発症の機序解明とその予防

研究課題名(英文) Elucidation and prevention of the mechanism of hepatic sinusoidal obstruction syndrome (SOS) induced by DNA alkylating agents

研究代表者

宮原 恵弥子 (Miyahara, Emiko)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・客員研究員

研究者番号：20778427

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：ALDH1遺伝子をsiRNAで発現抑制したC57BL/6JマウスにCYを投与、7日後の肝臓組織を電子顕微鏡で観察した。肝臓実質細胞内にlamellar体を含む小型の脂肪滴が認められ、小葉間胆管の萎縮、類洞壁細胞内にlamellar体を含む脂肪滴が観察された。肝臓中のlamellar体の蓄積を特徴とするリン脂質貯蔵障害である薬剤性脂質異常症(PL)のバイオマーカーであるDi-docosahexaenoyl (C22:6)-bis(monoacylglycerol)phosphate (BMP)の測定を行ったが上昇は見られず、CYにより生じたリン脂質は通常の典型的なPLとは異なることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

DNAアルキル化剤大量投与後に発症する肝類洞閉塞症候群(SOS)は、発症及び経過の予測が難しい。SOS発症には個人差があり、それはDNAアルキル化剤から生じる様々な代謝物の産生や除去に関与する因子に由来することが予測される。これらの因子を明らかにすることはSOSの発症予測や予防、重症化予防に役立つ。Busulfan (BU)やcyclophosphamide (CY)など大量のDNAアルキル化剤を用いた造血幹細胞移植においてBUやCYは同じ効果を有する代替薬のない抗がん剤として使用され続けているため社会的意義は大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)：C57BL/6J mice whose ALDH1 gene expression was suppressed by siRNA were treated with CY. After the treatment, the liver tissue was observed by electron microscopy. Small lipid droplets containing lamellar bodies were observed in liver parenchymal cells, atrophy of interlobular bile ducts, and fat droplets containing lamellar bodies in sinusoidal wall cells. Since accumulation of the lamellar bodies was observed after CY administration, Di-docosahexaenoyl (C22:6)-bis(monoacylglycerol)phosphate (BMP), a biomarker for drug-induced dyslipidemia (PL) was measured by liquid chromatography-mass spectrometer. PL is a phospholipid storage disorder characterized by the accumulation of lamellar bodies in the liver. BMP measurements showed no significant differences between the CY-treated and non-treated groups, suggesting that the phospholipids produced by CY are different from the usual typical PL.

研究分野：毒性学

キーワード：DNAアルキル化剤 シクロフォスファミド プスルファン 肝類洞閉塞症候群(SOS)

様式 C-19、F-19-1、Z-19
(共通)

1. 研究開始当初の背景

Busulfan (BU)や cyclophosphamide (CY)など大量の DNA アルキル化剤を用いた造血幹細胞移植後早期に生じる肝類洞閉塞症候群 (Sinusoidal obstruction syndrome; SOS) は重篤な合併症の1つで、発症頻度は10~15%、重症化すると死亡率は85%以上になる¹⁾。DNA アルキル化剤の使用により類洞内で内皮細胞が脱離することで閉塞が生じ、これらは薬剤代謝が活発な小葉を中心に起こると考えられている。

BU や CY は移植前処置において同じ効果を有し、代替薬のない抗がん剤として使用され続けておりこの2剤が併用されることもある。

これまで SOS 発症の機序に迫る報告はあるものの、何が類洞内皮細胞を傷害するのか、また血中濃度時間曲線下面積 (AUC) をモニタリングしながらの投与にも関わらず SOS 発症に個体差があるのはなぜか明らかになっておらず、完全な発症予防にも至っていない。

CY が代謝される際に生じる acrolein は、生体内分子と結合し毒性を発揮する。アルデヒド脱水素酵素 1 (ALDH1)は CY 代謝物である aldocyclophosphamide (AldoCY)を細胞毒性のないカルボン酸 (CEPM)へ代謝することで、acrolein の産生に抑制的に働く (図1)。我々は、マウス肝臓の ALDH1 発現抑制下で CY を投与すると、肝細胞変性が増加することを見出した。さらに acrolein 除去剤である N-acetylcysteine (NAC)を CY 投与前に投与したところ、肝細胞変性が減弱したことから CY による肝毒性に、CY の求電子性代謝物である acrolein が関与しているのではないかと思いついた。

一方で、BU の一部は glutathione-S-transferase (GST) の触媒で glutathione (GSH)抱合を受け求電子性で細胞毒性のある γ -glutamyl-dehydroalanyl-glycine (EdAG)へ代謝される。我々は BU の薬物動態に関する臨床研究で、GST 遺伝子の多型と BU 代謝能の間に明らかな関係を見出せず、SOS 発症には GSH 産性能など他の因子の関与も予想された²⁾。

BU や CY など DNA アルキル化剤の代謝物は求電子性で反応性が高く、細胞傷害性が強い。また GSH と結合を作りやすく、それを消費することから求電子性代謝物を処理する能力も SOS 発症の鍵を握ることが予想される。

DNA アルキル化剤による SOS 発症において、EdAG や acrolein などの求電子性代謝物の産生とその代謝に関わる酵素が重要な役割を果たしているのではないかと予想される。

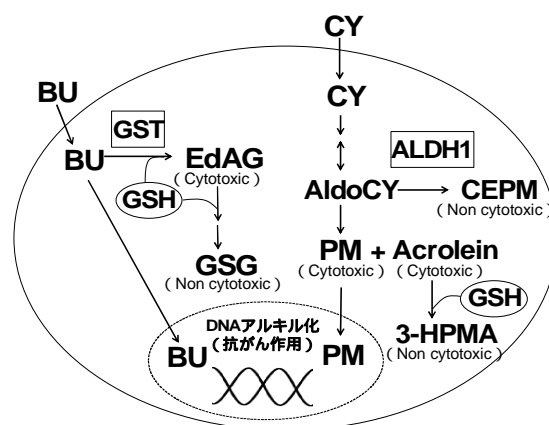


図1 肝細胞におけるBUおよびCYの代謝

2. 研究の目的

BU や CY 大量投与後に発症する SOS は、1) BU や CY の代謝物が直接、肝細胞あるいは類洞内皮細胞を傷害することで起こるのか、または炎症性細胞の浸潤によるサイトカインの誘導などで二次的に起こるのか明らかにする。さらに SOS 発症における GSH の重要性を明らかにする。

2) GST や ALDH1、GSH 合成に関する酵素の遺伝子多型と代謝物濃度の関係から EdAG や acrolein の産生系と消去系のどちらがより細胞障害に影響を与えるか明らかにし、BU や CY の抗がん効果を落とすことなく SOS 発症予防を目指す。

3. 研究の方法

CY 投与

6 週齢の雌の C57BL/6J マウスの肝臓の ALDH1 遺伝子を、siRNA を用いて knock down した。siRNA の投与から 72 時間後に CY (400 mg/kg) を 1 日 1 回、2 日間連続で腹腔内投与し、7 日後に解剖して肝臓を摘出。Control マウスには生理食塩水 (NS) を同様に投与した。2.5% グルタルアルデヒド及び 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) の固定液中にて固定後、電子顕微鏡での観察を行なった。

di-22-6-BMP の測定

電子顕微鏡での観察により肝臓中に lamellar 体の蓄積を確認したが、この lamellar 体の蓄積を特徴とするリン脂質貯蔵障害である薬剤性脂質異常症 (PL) のバイオマーカーである Di-22-6-bis(monoacylglycerol)phosphate (BMP) を、液体クロマトグラフィー質量分析計 (LC/MS) にて測定した (n=1)。

4. 研究成果

CY 投与後の電子顕微鏡での観察

CY (400 mg/kg×2 days) 投与の結果、肝臓実質には細胞質が明るくなり寿命がきて消退を疑う細胞が認められた他、小型の脂肪滴が認められ、脂肪滴中や形質膜に覆われた円形状の中に多様な lamellar 体

の存在を認めた(図2の↑)。小葉胆管においては収縮がみられ(図3Aの内)、小葉胆管上皮細胞の細胞質内にも lamellar 体の存在が認められた(図3Bの)。類洞壁細胞内には脂肪滴の蓄積が見られ、lamellar 体の存在も確認された(図

与により生じたリン脂質は、通常の典型的な PL とは異なることが示唆された。

- 1) Yakushijin K, et al. Bone Marrow Transplant. 2016; 51:403-409.
- 2) Nishikawa T, et al. Pediatrics International. 2019; 61:558-565

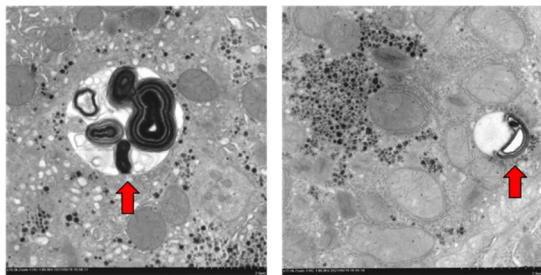


図2 肝臓実質で見られたlamellar体

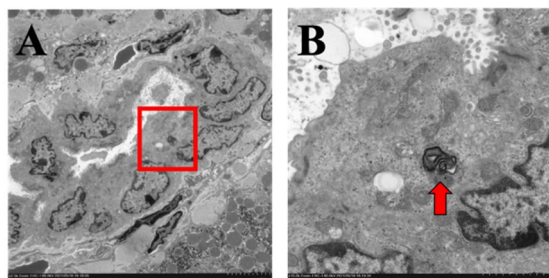


図3 小葉胆管の収縮と小葉胆管上皮細胞質内のlamellar体

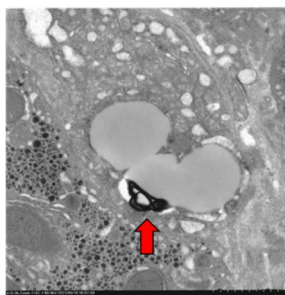
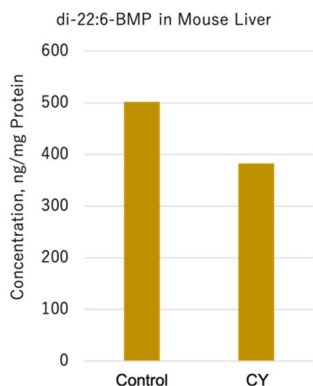


図4 類洞壁細胞内の脂肪滴中のlamellar体

4の)

di-22-6-BMP の測定

測定を行なった Control (NS 投与) マウスの肝臓中の total protein は 55.11 mg/mL で、そのうち di-22-6-BMP の濃度は 27641.06 ng/mL であった。一方、CY 投与マウスの肝臓中の total protein は 65.00 mg/mL で、そのうち di-22-6-BMP の濃度は 24890.86 ng/mL であった。



CY 投与による di-22-6-BMP の上昇は見られず、CY 投

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|