

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：17701

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H07088

研究課題名(和文) ヒトiPS由来心筋細胞を用いたcyclophosphamide心筋障害の機序解明

研究課題名(英文) Mechanism of cyclophosphamide-induced fatal cardiotoxicity on cardiomyocytes derived from human iPS cells

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・特任研究員

研究者番号：20778427

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：Cyclophosphamide (CY)投与によりマウス血漿中のacrolein濃度は上昇した。N-acetylcysteineはaldehyde dehydrogenase 1 (ALDH1)活性を上げ、ALDH1活性が高い条件下ではCYは毒性の低いcarboxyethylphosphoramid mustardへと代謝され、マウスの心臓及び肝臓における空胞変性や好酸性化は抑制された。
以上の結果はCY投与後のacrolein濃度と、その産生に関与するALDH1活性がCY心毒性の誘導に大きく関与していることを示唆しており、これらはCY心筋障害を予防する上で重要な標的となり得る。

研究成果の概要(英文)：Administration of cyclophosphamide (CY) increased the acrolein-lysine adducts in mice plasma. Aldehyde dehydrogenase 1 (ALDH1) in mice white blood cells were activated by N-acetylcysteine (NAC). And under the active ALDH1, CY was metabolized to carboxyethylphosphoramid mustard, which is noncytotoxic metabolite of CY. Furthermore, vacuole degeneration or eosinophilic generation in the hearts and livers in mice were suppressed by NAC treatment. In these results indicate that the concentration of acrolein in the blood after administration of CY and ALDH1 activity are important factor on CY-induced cardiotoxicity. Therefore, these factors may contribute to prevent the CY-induced cardiotoxicity.

研究分野：毒性学

キーワード：毒性学 抗がん剤 シクロホスファミド 心筋障害 アクロレイン

1. 研究開始当初の背景

Cyclophosphamide (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、先天性免疫不全症等の疾患に対する造血細胞移植の前処置法としても頻用される抗がん剤である。大量 CY 療法後に生じる心筋障害は臨床上大きな問題となっているが、その発生機序は未だに不明であり、予防法も確立されていない。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世界で急速に広まっており、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 によりヒドロキシ体である 4-hydroxycyclophosphamide (HCY) へ代謝され、続いて aldocyclophosphamide (AldoCY) へと酸化される。そして AldoCY は 水素脱離により phosphoramidate mustard (PM) へと変化し、細胞内において抗腫瘍効果を発揮する。また PM 生成時には、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、AldoCY はアルデヒド脱水素酵素 (aldehyde dehydrogenase 1; ALDH1) の働きにより、不活性で細胞毒性のない o-carboxyethylphosphoramidate mustard (CEPM) へと代謝される (図 1)。

申請者は以前、ラット心筋細胞 (H9c2) 及びラット肝ホモジネートを用いた実験で CY 心筋障害の主因は acrolein ではないかと初めて報告した。

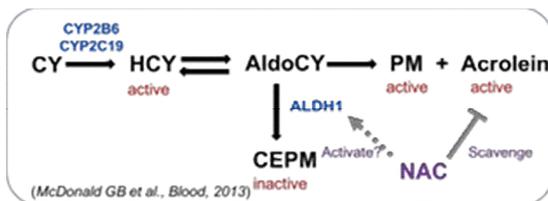


図 1 CY の代謝経路

2. 研究の目的

これまでのラット心筋細胞及びラット肝ホモジネートを用いた *in vitro* での研究において CY により心筋細胞障害が誘導される時 acrolein の産生が増加し、一方で心筋細胞障害が抑制される時には CEPM の産生が増加することを明らかにした (図 2) が、これは acrolein の産生に ALDH1 が関与していることを示唆している。

このことから本研究では CEPM や acrolein 産生の鍵を握る ALDH1 に着目して *in vivo* における CY 心筋障害の機序を解明しその予防法を確立することを目的とした。

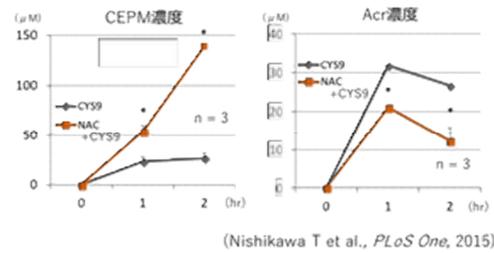


図 2 *In vitro* における CY 代謝物濃度

3. 研究の方法

- (1) 6 週齢の雌の C57BL/6J マウス (n = 24) を 6 匹ずつ 4 群に分け、CY 投与群には CY (700 mg/kg) を腹腔内投与し 1 時間、3 時間後尾静脈より採血した。血漿を回収し、CY 及び HCY、CEPM の血漿中濃度を液体クロマトグラフィー質量分析 (LC/MS/MS) 法で測定した。また CY 投与後 24 時間の時点で解剖を行った際に心臓から採血を行った。Acrolein の血漿中の濃度は lysine 残基との結合体である、acrolein-lysine 結合体を ELISA 法にて測定する事で測定した。CY 投与群の対照群には生理食塩水のみを同様の方法で同体積投与した。また 4 群のうち 2 群 (12 匹) は acrolein 除去剤でもある N-acetylcysteine (NAC) を 1 日 1 回、200 mg/kg を 5 日間連続で前投与した。その後 6 匹ずつ同様に CY あるいは生理食塩水を投与し、1 時間、3 時間後の CY 及びその代謝物の血漿中濃度を測定した。得られた血中濃度を用いて CY 及び HCY、CEPM の血中濃度-時間曲線下面積 (Area under the concentration-time curve; AUC₀₋) を one-compartment model を用いて計算した。
- (2) CY 投与後 3 時間の採血で得られた白血球の ALDH1 活性を ALDEFLUOR®を用い、フローサイトメトリー法で測定した。
- (3) CY 投与から 24 時間後、麻酔下においてマウスの心臓及び肝臓を摘出し、4%パラホルムアルデヒドで固定後 HE 染色を行った。また HE 染色の結果、肝臓においてびまん性の空胞が観察されたことからその原因を確かめる目的で Oil red O 染色も行い、病理学的評価を行った。Oil red O 染色の陽性部分の面積の解析は Image J 1.50i ソフトを用いて行った。

4. 研究成果

- (1) CY 投与後の CY 及びその代謝物血中濃度測定の結果、血漿中の acrolein 濃度は CY 投与群が非投与群より有意に高値を示した ($p < 0.05$, 図 3)。CY 投与により死亡した群は死亡しなかった群に比べ HCY の血中濃度-時間曲線下面積 (AUC) が高い傾

向にあった ($p < 0.1$)。また CEPM の AUC は CY 投与群 (842 ± 535) より NAC+CY 投与群 (1234 ± 726) の方が高値の傾向を示したことから NAC 存在下では HCY から CEPM が産生する経路が亢進することが示唆された (表 1)。

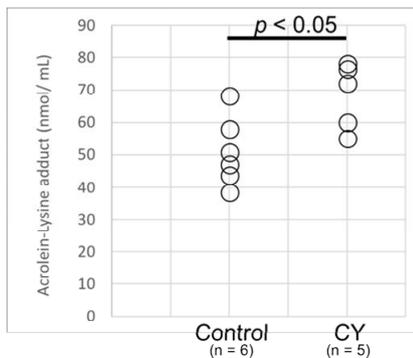


図 3 CY 投与後の acrolein-lysine 濃度

表 1 CY, HCY 及び CEPM の AUC

	AUC _{0-∞} (mg*h/L)		
	CY	HCY	CEPM
CY (700 mg/kg)	5917 ± 3185	627 ± 131	842 ± 535
NAC+CY (700 mg/kg)	3803 ± 1859	805 ± 263	1234 ± 726

mean ± Standard division

- (2) NAC はマウスの白血球の ALDH1 活性を有意に上昇させることが明らかになった ($p < 0.05$, 図 4)。

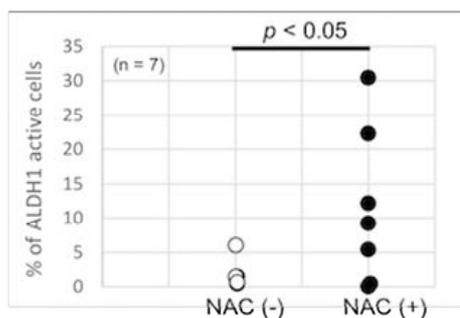


図 4 NAC は ALDH1 を活性化する

- (3) HE 染色の病理組織学的検査において CY 投与後 24 時間の時点で、マウスの心筋に空胞変性や好酸性化、single cell necrosis、アミロイド様沈着などの変性が見られた (図 5)。また肝臓において小葉中心性肝細胞内空隙形成が見られたため (図 6)、この原因を確認すべくさらに Oil red O 染色を行ったところ中性脂肪滴の沈着であることが明らかになった。さらにこれらの心臓や肝臓における変性は NAC の前投与により抑制された (図 7)。
- Image J を用いた解析では、全視野に対する Oil red O 陽性エリアの割合は Control

(生食のみ投与)で $0 \pm 1.6 \times 10^{-2}$ 、CY 投与群で 19.9 ± 22 、NAC 群 (NAC を前投与し生食を投与)で $0 \pm 2.0 \times 10^{-4}$ 、NAC+CY 群で 1.83 ± 3.7 となり CY 投与により生じた中性脂肪沈着は NAC の併用で抑えられる事が明らかとなった。

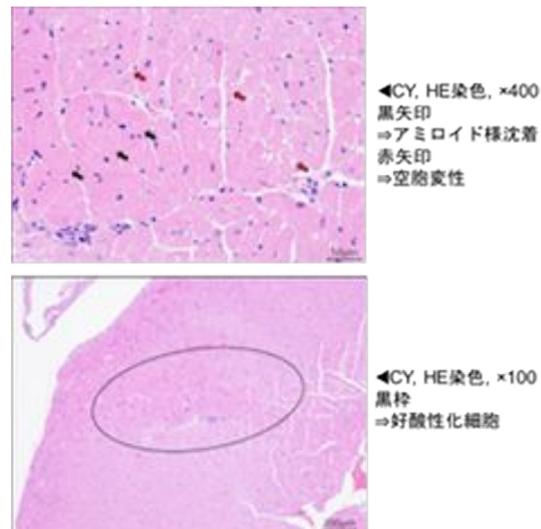
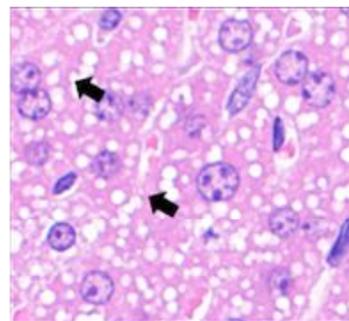
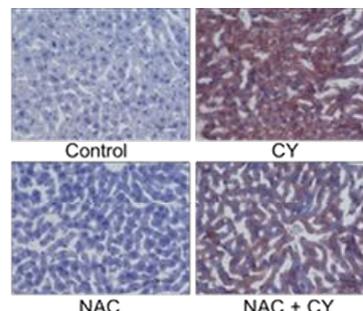


図 5 CY は心筋に叢状変性を誘導した



A 肝臓、HE染色、X400
黒矢印：空胞変性

図 6 CY は肝臓に空胞変性を誘導した



×400, Oil red O染色,
赤い部分は脂肪沈着を示す

図 7 CY は肝臓に脂肪沈着を誘導した

- (4) 以上のことから、ALDH1 活性が高く、HCY が CEPM へ代謝される経路が亢進した場合 CY の心筋毒性は軽減し、HCY が acrolein

へ代謝される経路が亢進するとCY毒性が誘導されることが分かった。これはCY投与によって生じるacroleinの濃度と、その産生に關与するALDH1活性がCY心毒性の誘導に大きく關与していることを示唆しており、これらはCY心筋障害を予防する上で重要な指標あるいは標的となり得ると考えられる。

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 1 件)

- (1) Kurauchi K, Nishikawa T, Miyahara E, Okamoto Y, Kawano Y: Role of metabolites of cyclophosphamide in cardiotoxicity. BMC Research Notes. 査読有, 10(1):406, 2017, doi: 10.1186/s13104-017-2726-2.

〔学会発表〕(計 2 件)

- (1) Miyahara E, Nishikawa T, Ikawa K, Ushikai M, Kawaguchi H, Okamoto Y, Morikawa N, Kawano Y: Pharmacokinetics and toxicological evaluation of cyclophosphamide in mice. 15th International Congress of Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology, 2017.9.24-27, Kyoto International Conference center (Kyoto・Kyoto city)
- (2) 宮原 恵弥子、西川 拓朗、猪川 和朗、牛飼 美晴、黒田 英志、川口 博明、岡本 康裕、森川則文、堀内正久、河野嘉文: マウスにおける大量シクロホスファミドの薬物動態及び毒性の評価、第79回日本血液学会学術集会、2017年10月20日～22日、東京国際フォーラム(東京都・千代田区)

6. 研究組織

(1) 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・特任研究員
研究者番号: 20778427