

令和元年6月27日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10033

研究課題名(和文)薬物動態解析と代謝酵素活性分析による安全かつ効果的な小児造血細胞移植術の確立

研究課題名(英文) Establishment of safe and effective pediatric hematopoietic cell transplantation by pharmacokinetic analysis and metabolic enzyme activity analysis

研究代表者

河野 嘉文 (Kawano, Yoshifumi)

鹿児島大学・医歯学域医学系・教授

研究者番号：20260680

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)：CYの活性代謝物である4-hydroxy-cyclophosphamide (HCY) をヒト肝がん由来細胞株 HepG2 に曝露すると、CY心毒性の主因であるacroleinが代謝から想定される以上に急激に大量産生され、その後acroleinの除去物質とされるglutathione (GSH) が徐々に低下していることが判明した。一方で、CY代謝においてacrolein産生を抑えるアルデヒド脱水素酵素1の遺伝子をHepG2細胞でノックダウンさせてHCYを暴露させても、acrolein産生は更には増加しなかった。CY代謝で直接産生されるacrolein以外のacrolein産生系があ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

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、臨床上大きな問題である。そして、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心毒性の主因であるacrolein産生量はその除去剤でもあるglutathionの量が関係することが示唆された。glutathion産生能の個体差が、CY心毒性発症の個体差に繋がる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：4-hydroxy-cyclophosphamide (HCY) is an active metabolite of cyclophosphamide (CY). It is converted to cytotoxic metabolite acrolein. Human hepatoblastoma cell line HepG2 were exposed to HCY and the concentration of acrolein in cell culture supernatant were measured. Interestingly, the detected acrolein was higher than we expected. Furthermore, glutathione (GSH), an acrolein scavenger were reduced gradually in HepG2 cells. And then, to inhibit the production of acrolein, ALDH1 were knock downed by RNA interference. Against our expectations, the production of acrolein is not increased when ALDH1 knockdown HepG2 cells were exposed to HCY. It indicates that acrolein is not only produced directly by CY, but also is produced in another pathway.

研究分野：小児血液腫瘍

キーワード：cyclophosphamide 心毒性 acrolein glutathione

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Busulfan (BU)と Cyclophosphamide (CY)は造血幹細胞移植 (HSCT) の前処置に使用される DNA アルキル化剤で、半世紀以上にわたり HSCT の前処置薬として使用されているが、BU による肝臓障害 (肝類洞閉塞症候群: SOS) や肺障害 (BU-lung) また CY による急性心筋障害の発症は臨床上大きな問題となっている。またこの 2 剤は併用されることもある。BU による肺障害や肝障害は、経口投与による大量投与では腸管からの薬剤吸収率の変動から薬物動態が不安定になるため生じると考えられてきたが、注射剤でも致死的心毒性の発症を完全には予防できないことが臨床的に確認され、効果と毒性の発現については、その累積血中濃度-時間曲線下面積 (Area under the concentration-time curve; AUC) 管理の重要性が最近の研究でも再確認されている。

申請者らは小児例において HSCT を行う前に 1/16 量の BU を試験投与し、血中濃度・AUC を測定し移植時の至適投与量の決定を試みたが、試験投与時と実際の移植時 1 回目投与の AUC では相関を認めなかった ($r^2 = 0.2$; $p > 0.05$)。また BU の代謝酵素の中心であり Glutathione (GSH) 抱合を触媒する Glutathione S-transferase (GST) の遺伝子多型 (GSTA1, M1, T1) と BU 薬物動態の関係を解析したところ、GST 遺伝子多型だけでは、小児における血中濃度の個人差を説明できないことを見出した。

一方、CY の心毒性発症の予測因子は未だに確立されたものはない。CY はプロドラッグで、CYP2B6 など代謝活性化され

4-hydroxy-cyclophosphamide (4-HCY) となり、HCY は酸化されると aldocyclophosphamide (AldoCY) となる。AldoCY はアルデヒド脱水素酵素 1 (ALDH1) により細胞毒性のない o-carboxyethylphosphoramidate mustard (CEPM) へ代謝される一方で、acrolein へも代謝される (図 1)。申請者らはこれらの代謝産物の測定系を確立し、*in vitro* の実験において acrolein が CY 心毒性の主因であることを報告した。その中で、GSH の前駆物質である N-acetylcysteine (NAC) はラット心筋細胞を CY 毒性から保護することが明らかになった (図 2)。

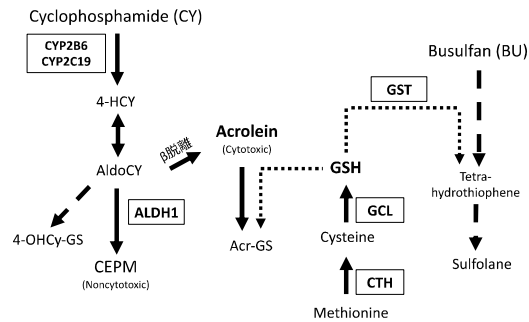


図 1 CY及びBUの代謝経路

2. 研究の目的

難治性血液腫瘍性疾患の根本的治療である造血幹細胞移植を、小児患者で安全かつ効果的に実施する方法を確立することを目的とする。移植前処置として同等の効果を有する代替薬がなく、併用することもある 2 つのアルキル化剤、BU と CY について、遺伝子多型で予測できない薬物動態を、GST 活性、GSH 濃度、ALDH1 活性と血中薬物・代謝物濃度の観点から致死的作用発現との関連を解析し、患児の薬物代謝能力に応じた至適投与方法を確立する。

3. 研究の方法

(1) CY 曝露と GSH 濃度の変化の関係を明らかにするために、ヒト肝がん由来細胞株 HepG2 を様々な濃度の HCY に曝露し、代謝物の 1 つである acrolein の濃度を 3-aminophenol を用い、生じた 7-hydroxyquinoline の蛍光を測定することで検討した。HepG2 は CYP2B6 をほとんど発現していないため、CY が CYP2B6 に代謝されて生じる HCY を CY の代わりに用いた。続いて 20 μM の HCY に HepG2 細胞を曝露し、1 時間後から 24 時間後まで代謝物である acrolein の濃度を測定した。

(2) HCY 曝露による GSH 濃度の変化を確認するため、0, 20, 60 μM の HCY に HepG2 細胞を曝露し、2 時間後および 24 時間後の還元型グルタチオン GSH と酸化型グルタチオン GSSG を測定し、GSH/GSSG 比を求めた。

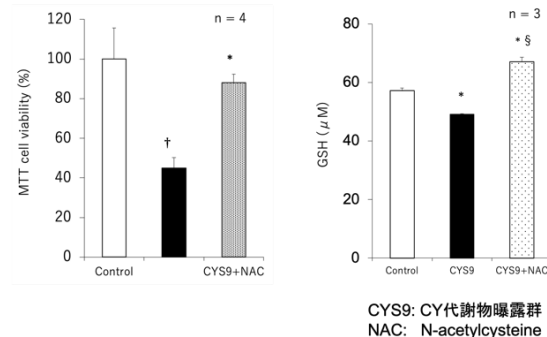


図 2 ラット心筋細胞へのCY代謝物曝露

(3) CY代謝において acrolein の産生に関与している ALDH1 に特異的な siRNA を用いて HepG2 の ALDH1A1 遺伝子を knock down (KD) し、20 μ M の HCY に曝露した。曝露から1時間後に培養液中の acrolein を測定し、2時間後に細胞中の GSH および GSSG を測定した。

(4) Acrolein などの CY 代謝物や BU を除去する働きを持つ GSH の合成に関与する酵素である cystathionine gamma-lyase (CTH) に特異的な siRNA を用いて HepG2 の CTH 遺伝子を KD し、20 μ M の HCY に曝露した。曝露から1時間後に培養液中の acrolein を測定し、2時間後に細胞中の GSH および GSSG を測定した。

4. 研究成果

(1) HCY 濃度依存的に acrolein は産生し、その産生量は加えた HCY よりも5倍ほど増加した(図3a)。また経時的な acrolein の産生量は曝露後1時間で最大値を示し24時間後には1/8ほどに減少した(図3b)。

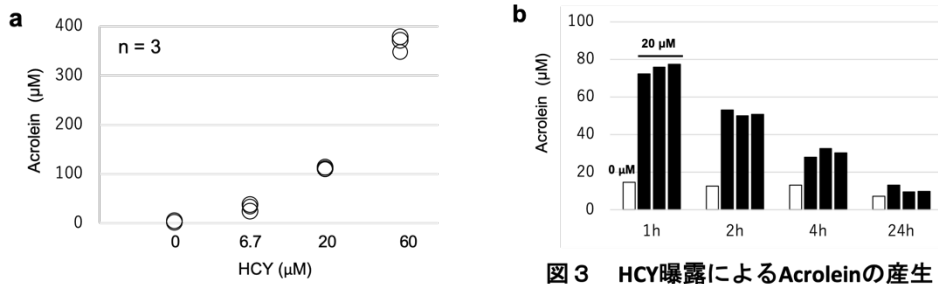
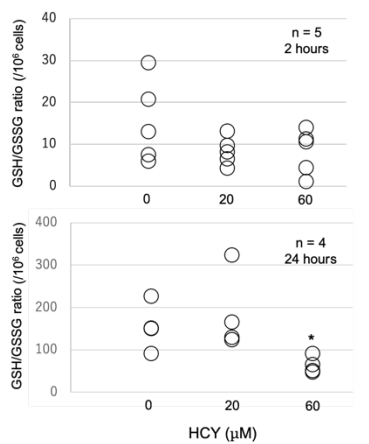


図3 HCY曝露によるAcroleinの産生

(2) HCY 曝露後2時間では HCY 曝露群と Control 群 (HCY 曝露なし) の GSH 濃度に有意な差は見られなかったものの24時間後には60 μ M の HCY 曝露群で GSH の有意な減少が見られた(図4)。



*p < 0.05 Compared with HCY 0 μ M, Mann-Whitney's U test

図4 HCY曝露後のGSH/GSSG

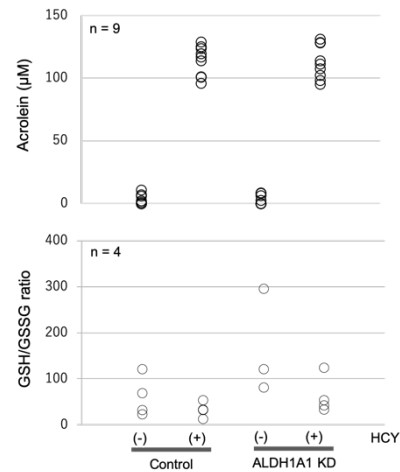
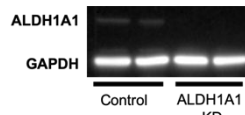


図5 ALDH1発現抑制下でのHCY曝露

(3) HepG2 細胞の ALDH1 遺伝子を KD した状態で 20 μ M の HCY への曝露を行ったところ、HCY 曝露により acrolein 産生は有意に増加したものの、KD の有無で HCY 曝露による acrolein 産生量及び GSH 濃度に有意な差は見られなかった(図5)。

(4) HepG2 細胞の CTH 遺伝子を KD した状態で3)と同様の実験を行ったところ、HCY 曝露により acrolein 産生は有意に増加したものの、KD の有無で HCY 曝露による acrolein 産生量及び GSH 濃度に有意な差は見られなかった(図6)。

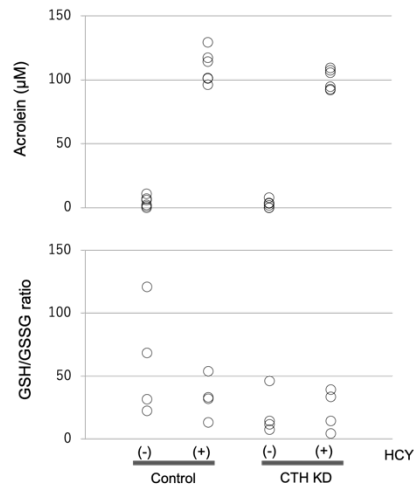
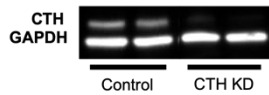


図6 CTH発現抑制下でのHCY曝露

以上より HCY から生じる acrolein の量は、加えた HCY の量より多かった。生体内においては活性酸素 (ROS) 等による脂質の酸化でも acrolein が生じることが知られており、これが CY の投与量から毒性を予想することを困難にしている可能性も考えられた。

HCY 曝露後、生じた acrolein の濃度は 1 時間後をピークに減少していくが、GSH/GSSG 比の有意な低下は曝露後 2 時間の時点では起こっていなかった。GSH の消耗が起こるタイミングや、消耗した GSH が再生するかどうかの検討は今後必要であると思われる。

申請者らは ALDH1 を KD すると、HCY 曝露後に産生する acrolein の濃度は上昇すると予想していたが、KD した群と KD しなかった群とでは acrolein の産生量に有意な差は見られなかった。しかし申請者らが *in vitro* で行なった実験では、マウスの ALDH1 を KD 後、CY を投与すると、細胞毒性のない CEPM の血中濃度低下とともに CY 投与による心臓へのダメージが病理学的に認められた。このことから CY の代謝のされかたが CY 心毒性の発症に関わることが予想された。また今回の実験で、HCY は GSH を有意に減少させたが、BU や CY 投与後の GSH の消耗のタイミングを明らかにすることは至適投与に重要であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

(1) Influence of GST polymorphisms on busulfan pharmacokinetics in Japanese children. Nishikawa T, Yamaguchi H, Ikawa K, Nakayama K, Higashi E, Miyahara E, Abematsu T, Nakagawa S, Kodama Y, Tanabe T, Shigemi A, Shinkoda Y, Okamoto Y, Takeda Y, Kawano Y. *Pediatr Int.* (査読有) 2019 Apr 9. doi: 10.1111/ped.13859. [Epub ahead of print]

(2) Giant radiation-induced cavernous haemangioma before reduced-intensity bone marrow transplantation for acute lymphoblastic leukaemia.

Saito A, Nishikawa T, Oyoshi T, Nakagawa S, Kodama Y, Yamada A, Kinoshita M, Okamoto Y, Arita K, Moritake H, Kawano Y. *Bone Marrow Transplant.* (査読有) 2019 Feb;54(2):312-315.

〔学会発表〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：西川 拓朗

ローマ字氏名：Nishikawa Takuro

所属研究機関名：鹿児島大学

部局名：医歯学域附属病院

職名：講師

研究者番号(8桁): 90535725

研究分担者氏名：岡本 康裕

ローマ字氏名：Okamoto Yasuhiro

所属研究機関名：鹿児島大学

部局名：医歯学域医学系

職名：准教授

研究者番号(8桁): 30398002

研究分担者氏名：児玉 祐一

ローマ字氏名：Kodama Yuichi

所属研究機関名：鹿児島大学

部局名：医歯学域附属病院

職名：講師

研究者番号(8桁): 20535695

(2)研究協力者

研究協力者なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。