

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：16K10034

研究課題名(和文) アルデヒド代謝からみたシクロフォスファミド心筋障害予防法の探索

研究課題名(英文) Investigation for preventive method of cyclophosphamide induced cardiomyopathy from the viewpoint of aldehyde metabolism

研究代表者

西川 拓朗 (Nishikawa, Takuro)

鹿児島大学・医歯学域附属病院・講師

研究者番号：90535725

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：我々は以前のin vitro研究において、CY心筋障害の主因はCY代謝物の1つであるacroleinであり、その産生を抑え不活性代謝物に変換するアルデヒド脱水素酵素1 (ALDH1)が心筋障害発症に重要な役割を果たしているのではないかと考え、in vivoで検討した。ALDH1遺伝子ノックダウン(KD)マウスにCYを腹腔内投与し、血漿中CY代謝物濃度をcontrol群と比較した。その結果、control群に比してKD群においてCY不活性代謝物濃度は低値を示し、病理組織学的にも心筋障害の所見を強く認めた。In vivoにおいても、CY心筋障害の主因はacroleinである可能性が示唆された。

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。今回、in vivoの系でもacroleinがCY心筋障害の主因である可能性が示唆されたことで、acrolein除去薬の投与やacrolein産生を抑える薬剤投与などで予防につながる可能性がみいだせた。

研究成果の概要(英文)：In our previous in vitro study, we reported that acrolein is implicated in an onset of cardiotoxicity after exposure to cyclophosphamide (CY). Aldehyde dehydrogenase 1 (ALDH1) decrease the production of acrolein from CY whereas increase the induction of inactive metabolite o-carboxyethyl phosphoramidate mustard (CEPM). Therefore, ALDH1 plays a crucial role in CY-induced cardiotoxicity. To reveal the role of ALDH1 in CY metabolism, we assessed whether knockdown (KD) of Aldh1a1 gene expression sensitizes mice to CY. Aldh1a1 KD-mice exhibit lower concentration of CEPM in their plasma compared to the control group. Furthermore, knockdown of Aldh1a1 gene expression resulted in marked cardiomyopathy. It suggested that even in in vivo experiments, acrolein is responsible for CY-induced cardiotoxicity.

研究分野：小児血液・腫瘍学

キーワード：cyclophosphamide cardiotoxicity aldehyde metabolism acrolein

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 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、先天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法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 (Figure 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を用いた実験で、H9c2細胞が障害された時の培養液中のCY及びその代謝物濃度の測定から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

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* の研究においてCY曝露により心筋細胞が障害される時、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 (Figure 2)。これは、AldoCYを代謝するALDH1がacroleinの産生に関与することを示唆している。

本研究ではCY心毒性におけるacrolein産生とその産生に関与するALDH1の役割に着目し、*in vivo* の系を用いて機序を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) マウス肝臓におけるALDH1遺伝子の knock down (KD)

ALDH1はCYからacroleinの産生に関与していることが示唆されたが、このALDH1遺伝子をKDするとCYの代謝はどのように変化するか検討した。

6週齢の雌のC57BL/6Jマウス8匹を4匹ずつに分け、一方の群は肝臓のALDH1A1遺伝子をターゲットとしたsiRNAを尾静脈より投与し、ALDH1A1遺伝子をKDした。もう一方の群はControl群とし、siRNAを含まないトランスフェクション試薬のみを同量、尾静脈より投与した。KD群、Control群共に4匹中2匹にはCY (700 mg/kg, i.p.)を投与し、残りの2匹には生理食塩水 (NS)を同様に投与した。実験は3回行った (各 n = 6)。

(2) CY及びその代謝物の血中濃度測定

CY投与から1時間後及び3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_{0-∞}) を one-compartment model を用いて計算した。

CY投与から24時間後に麻酔下で下大静脈より採血を行い、得られた血清中のacrolein濃度を、lysine残基に結合したacrolein (Lysin-acrolein付加体) をELISA法で測定することで決定した。

(3) 心臓及び肝臓の病理組織学的評価

CY投与から24時間後に麻酔下で心臓及び肝臓を摘出した。摘出した心臓及び肝臓は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。また摘出した心臓及び肝臓のALDH1A1を免疫染色し、心臓でのALDH1A1の発現状況、肝臓でのRNA干渉による発現抑制の効果CY投与によるALDH1の発現の変化を確認した。

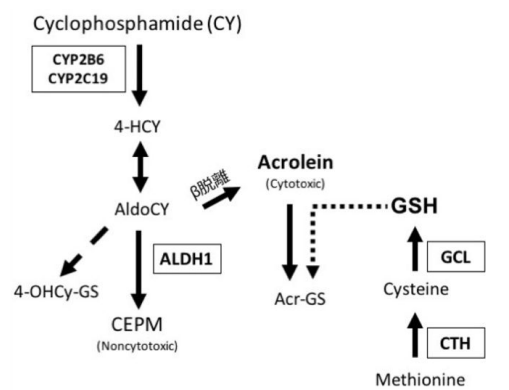


Figure 1 CYの代謝経路

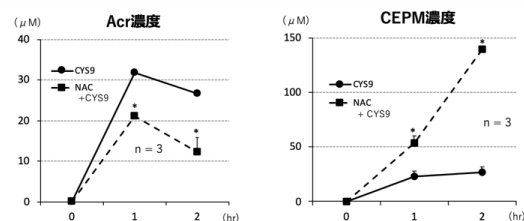


Figure 2 培地中のacroleinおよびCEPM濃度

(4) 肝臓中の glutathione (GSH)及び glutathione disulfide (GSSG)の測定

解剖時に得られた肝臓 100 mg あたりの GSH 及び GSSG 濃度を、酵素サイクリング法を用いた 2-nitrobenzoic acid (DTNB)の発色 ($\lambda=412 \text{ nm}$) を測定することで決定し、ALDH1 遺伝子発現抑制の影響を評価した。

4. 研究成果

(1) ALDH1 遺伝子に特異的な siRNA により、mRNA レベルで 90 %、タンパク質レベルで 60 %、ALDH1 の発現を抑制できた。

KD 群、Control 群共に、CY 投与を受けたマウス 6 匹中 2 匹が、CY 投与後 24 時間以内に死亡した。

(2) 各群、6 匹中 4 匹の解析を行うことができた。LC/MS/MS による測定の結果、CY 及び HCY、CEPM の血中濃度は、KD 群において CY 投与後 1 時間でそれぞれ $424.1 \pm 92.7 \mu\text{g/mL}$ 、 $97.0 \pm 26.0 \mu\text{g/mL}$ 、 $104.5 \pm 28.0 \mu\text{g/mL}$ であった。一方、Control 群ではそれぞれ $300.8 \pm 43.9 \mu\text{g/mL}$ 、 $65.5 \pm 8.4 \mu\text{g/mL}$ 、 $90.7 \pm 18.4 \mu\text{g/mL}$ であった。また KD 群の投与後 3 時間での CY 及び HCY、CEPM の血中濃度はそれぞれ、 $27.6 \pm 19.2 \mu\text{g/mL}$ 、 $20.9 \pm 19.2 \mu\text{g/mL}$ 、 $51.8 \pm 28.5 \mu\text{g/mL}$ であったのに対し、Control 群ではそれぞれ $20.6 \pm 7.6 \mu\text{g/mL}$ 、 $6.2 \pm 1.1 \mu\text{g/mL}$ 、 $31.0 \pm 11.6 \mu\text{g/mL}$ であった。得られた CY、HCY 及び CEPM の血中濃度をもとに $AUC_{0-\infty}$ を計算した (表 1)。血液中の Lysin-acrolein 付加体の濃度は、Control 群、KD 群共に CY 投与により有意に上昇した。しかし両群の CY 投与マウスの Lysin-acrolein 付加体の濃度に有意な差はみられなかった。

(3) HE 染色の病理組織学的検査において、Control 群の NS 投与マウスの心筋線維や間質には異常を認めなかった。また心筋線維の横紋も明瞭に認められた (Figure 3a →部分)。一方、Control 群の CY 投与マウスでは心臓の右心耳 (Figure 3b 黒色 →) 左心室 (Figure 3b 黄色 →) 大動脈 (Figure 3b 青色 →) 等に血液の鬱滞が高度に認められた。そして ALDH1A1 遺伝子を KD 後に CY を投与されたマウス (Figure 3c) では Control/NS マウスで認められたような心筋線維の横紋が全く消失し、かつ細胞質の染色性の低下が認められた。

また KD/CY マウスでは左心室壁、心室中隔、右心室壁の菲薄化が中程度認められ、心筋線維の横紋減少、細胞質の染色性の低下が高度に認められ、心筋線維の変性が著しく、これらは明確な病変と考えられた (表 2)。

表 1 CY, HCY および CEPM の $AUC_{0-\infty}$

	$AUC_{0-\infty}$		
	CY	HCY	CEPM
Control/CY (700 mg/kg)	3471.96 ± 200.74	799.91 ± 253.12	1889.65 ± 1189.43
KD/CY (700 mg/kg)	4332.24 ± 1850.91	1010.03 ± 448.97	1121.50 ± 426.92

そして ALDH1A1 遺伝子を KD 後に CY を投与されたマウス (Figure 3c) では Control/NS マウスで認められたような心筋線維の横紋が全く消失し、かつ細胞質の染色性の低下が認められた。

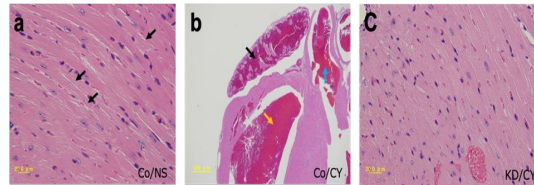


Figure 3 心臓のHE染色

心臓、及び肝臓の ALDH1A1 免疫染色の結果、C57BL/6J マウスの心臓に ALDH1A1 タンパク質の発現は全く認められなかった (Figure 4a) が、肝臓では Control/CY マウスの肝細胞の細胞質において ALDH1A1 の高度な発現を認めた (Figure 4b)。またこの発現は組織内においては小葉間静脈周囲に強くみられた。CY 投与がない場合、小葉間静脈周囲での ALDH1A1 発現は軽度 (1/5 ほど) になり、中心静脈付近でも軽度な発現が観察された。一方、ALDH1A1 遺伝子 KD 下では中心静脈周囲での軽度な ALDH1A1 発現がみられるのみであった。

表 2 病理学的診断結果

	Co/ CY (-)	Co/ CY (+)	KD/ CY (+)
左心耳、右心耳、大動脈、大静脈、左心室、右心室の血液うっ滞	—	+++	+++
左心室壁、心室中隔、右心室壁の菲薄化	—	—	++
心筋線維 (細胞) の横紋の減少、細胞質の染色性の低下	—	—	+++

各群、3 匹分の結果を示した

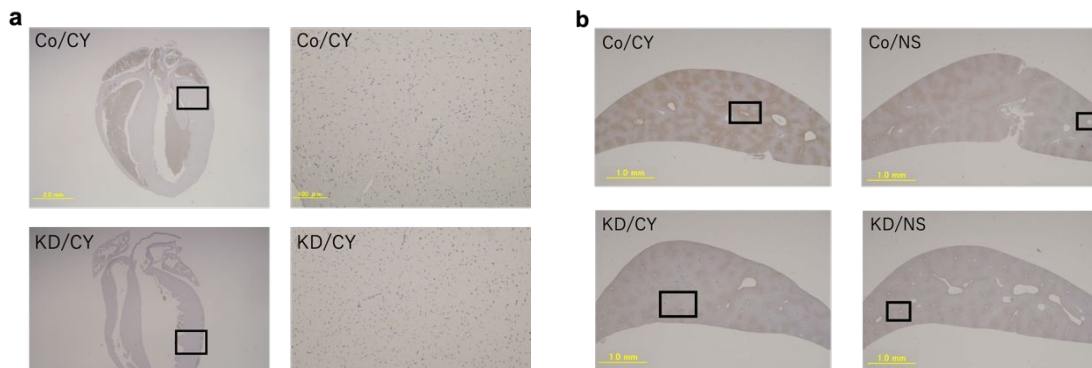


Figure 4 心臓および肝臓のALDH1A1染色

(4) 各群、6 匹中 4 匹の解析を行うことができた。肝臓中の還元型グルタチオン GSH 濃度の中央値は Control 群の CY 投与ありとなしでそれぞれ 182.7 μ M、101.2 μ M で、KD 群ではそれぞれ 129.0 μ M、114.2 μ M であった。(Figure 5) 両群ともに有意差はなかったものの CY 投与により GSH 濃度の中央値が低下したことから CY 代謝により GSH の消費が起こることが示唆された。

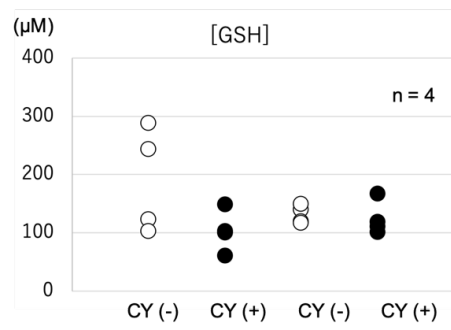


Figure 5 肝臓のGSH濃度

以上より、ALDH1A1 を KD した状態で CY を投与すると、有意差はなかったものの CEPM の $AUC_{0-\infty}$ は Control 群に比べ低値を示し、一方で細胞毒性のある HCY の $AUC_{0-\infty}$ は Control 群に比べ高値を示した。またこの時の心臓の病理学的観察では ALDH1A1 の KD 群において左心室壁、心室中隔、右心室壁の菲薄化や心筋線維の横紋減少、細胞質の染色性の低下といった明確な病変が見られた。このことから ALDH1 は CY の代謝において心筋障害を発症させるかどうかを決定する重要な因子の 1 つであることが示唆された。Lysin-acrolein 付加体の濃度は、KD 群と control 群で有意な差はみられなかったが、測定したタイミングを再度検討する必要があると考えた。また、今回の測定は、acrolein そのものを測定しているわけではなく、付加体を測定しているので acrolein 産生の正確な評価はできていない可能性がある。Acrolein 自体、反応性が非常に高く、正確な測定が難しい物質であるとされる。

GSH の測定では、有意差はなかったものの CY 投与により GSH 濃度の低下が見られた。GSH は CY 代謝物の 1 つで、我々の *in vitro* の研究で心筋細胞障害性の主因と考えられた acrolein のスカベンジャーでもあることから、CY 心毒性の発症には acrolein を産生する系と、acrolein を消去する系の働きが特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：河野 嘉文

ローマ字氏名：Kawano Yoshifumi

所属研究機関名：鹿児島大学

部局名：医歯学域医学系

職名：教授

研究者番号（8桁）: 20260680

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。