

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 4月 19日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590504

研究課題名（和文） 白血病治療薬三酸化ヒ素の有害反応軽減法の確立

研究課題名（英文） Development of the method for reducing the adverse effect of arsenic trioxide

研究代表者

藤村 昭夫（FUJIMURA AKIO）

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：90156901

研究成果の概要（和文）：急性前骨髄性白血病治療薬である亜ヒ酸の心毒性に対する克服薬として、 α -リポ酸が有用であるか否かを、動物モデルを用いて検討した。 α -リポ酸の併用は、亜ヒ酸単回投与時の心電図の急性変化を軽減し、反復投与時の突然死を抑制した。さらに、その機序として、 α -リポ酸が亜ヒ酸と複合体を形成し、亜ヒ酸の I_{Ks} 電流抑制作用を抑制することが判明した。本研究の成果は、直ちに臨床開発につなげることが可能であり、急性前骨髄性白血病の治療の安全性向上に大きく寄与するものと期待される。

研究成果の概要（英文）：We investigated whether α -lipoic acid reduces the cardiotoxicity of arsenic trioxide, an effective medication for acute promyelocytic leukemia, in animal models. Co-treatment with α -lipoic acid attenuated ECG abnormalities acutely caused by a single dose of arsenic trioxide, and prevented sudden death during repeated administration of the drug. We further found in vitro that α -lipoic acid and arsenic trioxide form a complex and, therefore, α -lipoic acid attenuates the arsenic trioxide-induced I_{Ks} reduction in isolated myocytes. These findings may lead to the improvement of treatment for acute promyelocytic leukemia.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
2012年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・応用薬理学

キーワード：臨床薬理学

1. 研究開始当初の背景

(1) 三酸化ヒ素（亜ヒ酸）は急性前骨髄性白血病の標準的な治療薬だが、有害反応の発現頻度が非常に高く、そのために臨床での使用が制限されることが少なくない。特に心電図のQT延長は約半数の患者に認められ、QT

延長は致死的不整脈につながることから、この有害反応により治療が中止されることは多い。また、亜ヒ酸は腎障害や肝障害も惹起することが知られており、白血病細胞のみならず、各種正常細胞に対しても傷害性をもつことが問題となっている。したがって、急性

前骨髄性白血病の治療法を向上させるためには、亜ヒ酸の有害反応を克服する方策を開発する必要がある。

(2) 研究代表者らは亜ヒ酸の細胞毒性のメカニズムを明らかにする目的で、ヒト腎初代培養細胞とヒト腎細胞株 HEK293 細胞に亜ヒ酸を暴露し、DNA マイクロアレイを用いて遺伝子発現への影響を網羅的に解析した (Exp Hematol 35:252, 2007)。その結果、亜ヒ酸の用量・時間依存的に発現が増加する遺伝子群の中から酸化ストレスと関連する HMOX1 遺伝子を見出し、HEK293 細胞では亜ヒ酸により活性酸素種の生成が惹起されること、HMOX1 の過剰発現により亜ヒ酸の毒性が軽減することを明らかにした。さらに、亜ヒ酸の細胞毒性に対する抗酸化物質 (α -リポ酸) の効果を検討し、 α -リポ酸は急性前骨髄性白血病細胞株 (HL-60 細胞および NB4 細胞) に対する亜ヒ酸の細胞障害性を減ずることなく、ヒト腎初代培養細胞と HEK293 細胞に対する亜ヒ酸の細胞毒性を軽減させることを明らかにした。したがって、 α -リポ酸は亜ヒ酸による有害反応を軽減する可能性がある。

(3) α -リポ酸はサプリメントとして市販されており、安全性は十分に高いことが知られている。したがって、基礎研究により α -リポ酸の有用性が確認された場合には、直ちに臨床開発につなげることが可能である。

2. 研究の目的

動物モデルを用い、 α -リポ酸の併用投与が亜ヒ酸の有害反応、特に QT 延長や致死性不整脈を軽減できるか否かを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 亜ヒ酸反復投与実験 (ラット)

雄性 Wistar ラットを 4 群に分け、亜ヒ酸 (5 mg/kg、腹腔内)、 α -リポ酸 (35 mg/kg、経口)、両者または vehicle のみをそれぞれ 8 週間連日投与し、体重や臓器障害の推移を観察した。

(2) 亜ヒ酸単回投与実験 (ラット)

雄性 Wistar ラットに亜ヒ酸 0.15、1.5、または 5 mg/kg を単回静脈内急速投与し、心電図変化を 120 分間観察した。次に、亜ヒ酸 5 mg/kg の作用に対する α -リポ酸 (70 mg/kg、亜ヒ酸投与 10 分前に静脈内投与) の効果を検討した。

(3) 亜ヒ酸単回投与実験 (モルモット)

雄性 Hartley モルモットに亜ヒ酸 0.15、または 1.5 mg/kg を静脈内投与し、心電図変化を 120 分間観察した。次に、亜ヒ酸 5 mg/kg の作用に対する α -リポ酸 (0.35、3.5、35

mg/kg、静脈内投与) の併用効果を検討した。

(4) エレクトロスプレーイオン化飛行時間型質量分析 (ESI-TOF MS)

亜ヒ酸 (10 nM) と α -リポ酸 (20 または 200 nM) の混合液を作製し、ESI-TOF MS 法により生成物の分子量を測定した。

(5) In vitro 電気生理学的試験

モルモットより心筋細胞を単離し、アンホテリシン B 穿孔パッチクランプ法により膜電流におよぼす亜ヒ酸および α -リポ酸の影響を検討した。

4. 研究成果

(1) α -リポ酸は亜ヒ酸の突然死を防止する

ラットに亜ヒ酸を反復投与したところ、4 週間以内に 50% のラットが突然死した。一方、 α -リポ酸を単独投与した群や両者を併用した群では死亡例は認めなかった。亜ヒ酸投与による体重減少や尿中 8-OHdG (酸化ストレスマーカー) の増加は、 α -リポ酸の併用により軽減されなかったことより、 α -リポ酸は抗酸化作用以外の作用により突然死を抑制することが示唆された。

(2) α -リポ酸は亜ヒ酸による心電図異常を軽減する

ラットに高用量 (5 mg) の亜ヒ酸を単回投与したところ、5~30 分後に ST-T 変化、10~120 分後に PQ 延長を認めた。一方、これらの心電図変化は α -リポ酸を併用した場合には認められなかった。

(3) α -リポ酸は亜ヒ酸による QT 延長を軽減する

ラットでは亜ヒ酸による QT 延長が観察されなかったため、モルモットでも同様の検討を行った。ラットとは異なり、モルモットでは亜ヒ酸 (1.5 mg/kg) の投与 30 分後より有意な QT 延長を認めた。次に、 α -リポ酸を亜ヒ酸と同時に投与したところ、 α -リポ酸は亜ヒ酸の QT 延長作用を用量依存的に軽減した (図 1)。さらに、 α -リポ酸を亜ヒ酸投与 60 後に投与した場合にも、QT 延長軽減効果が認められた (図 2)。

(4) α -リポ酸は亜ヒ酸と複合体を形成する

これまでの結果から、 α -リポ酸は亜ヒ酸の心毒性を軽減することが判明したが、その作用の発現は極めて速く、抗酸化作用を介するものではないことが示唆された。また、 α -リポ酸はキレート作用を有することが知られている。そこで、 α -リポ酸と亜ヒ酸が複合体を形成する可能性を ESI-TOF MS 法を

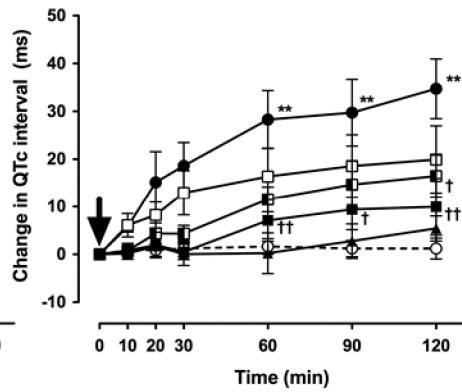


図1 QT 間隔におよぼす亜ヒ酸および α リポ酸の影響

- Vehicle
- 亜ヒ酸
- 亜ヒ酸+ α -リポ酸 (0.35 mg/kg)
- 亜ヒ酸+ α -リポ酸 (3.5 mg/kg)
- ▲ α -リポ酸 (35 mg/kg)

値は平均±標準誤差 ($n=4-5$)

** $P<0.01$ vs. Vehicle

† $P<0.05$, †† $P<0.01$ vs. 亜ヒ酸

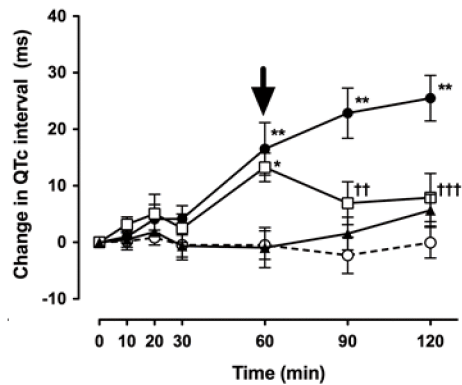


図2 亜ヒ酸の QT 延長作用におよぼす α リポ酸追加投与の影響

- Vehicle
- 亜ヒ酸
- 亜ヒ酸+ α -リポ酸 (35 mg/kg)
- ▲ α -リポ酸 (35 mg/kg)

値は平均±標準誤差 ($n=5-7$)

* $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs. Vehicle

†† $P<0.01$, ††† $P<0.001$ vs. 亜ヒ酸

用いて検証した。その結果、 m/z 450.98 にピークが認められ、これは両薬物が 1:1 の割合で結合したものであると推察された。

さらに、モルモットモデルにおいて、 α -リポ酸の代わりにキレート薬である BAL (3.5

または 35 mg/kg、腹腔内)を投与したところ、 α -リポ酸と同様に、BAL は亜ヒ酸による QT 延長を用量依存的に軽減した。このことから、 α -リポ酸は少なくとも一部にはキレート作用により亜ヒ酸の心毒性を軽減するものと考えられた。

(5) 亜ヒ酸は in vitro において I_{Ks} 電流を抑制する

亜ヒ酸と α -リポ酸の心筋細胞への作用機序を確認するために、電気生理学的試験を実施した。モルモットの単離心筋を用い、パッチクランプ法により検討したところ、亜ヒ酸は I_{Ks} 電流を抑制することが判明した (図 3)。一方、 α -リポ酸自体にはカリウムイオン電流への影響を認めず、亜ヒ酸の作用は α -リポ酸の添加により速やかに減弱した。この結果は、 α -リポ酸の QT 延長軽減効果がキレート作用によりもたらされるとの仮説を支持する。

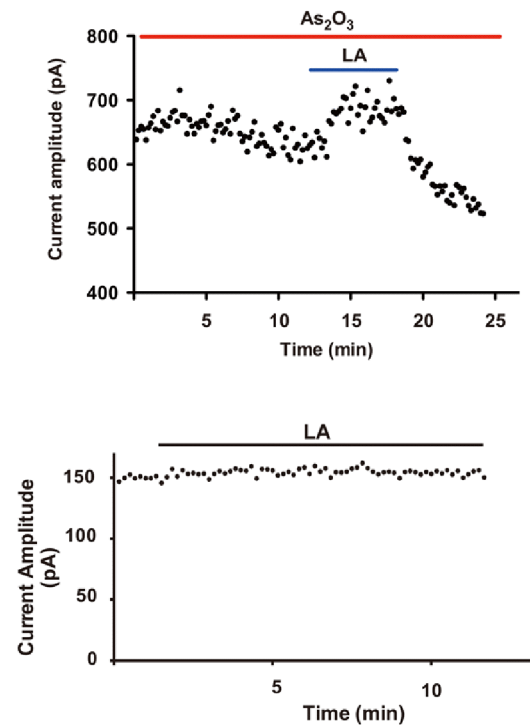


図3 モルモット単離心筋細胞における I_{Ks} 電流振幅に対する亜ヒ酸および α -リポ酸の影響

以上より、 α -リポ酸は、動物モデルにおいて、急性前骨髄性白血病治療薬である亜ヒ酸の心毒性を速やかに軽減することが明らかになった。今後は、同様の効果がヒトにおいても認められるか否かを明らかにする臨

床研究が必要である。

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2件)

① Kumazaki M, Ando H, Takei M, Ushijima K, Taniguchi Y, Yoshida M, Yamato S, Washino S, Koshimizu TA, Fujimura A. α -Lipoic acid protects against arsenic trioxide-induced acute QT prolongation in anesthetized guinea pigs. Eur J Pharmacol 705:1-10, 2013. 査読有
doi: 10.1016/j.ejphar.2013.02.027

② Kumazaki M, Ando H, Sasaki A, Koshimizu TA, Ushijima K, Hosohata K, Oshima Y, Fujimura A. Protective effect of α -lipoic acid against arsenic trioxide-induced acute cardiac toxicity in rats. J Pharmacol Sci 115:244-8, 2011. 査読有
doi: 10.1254/jphs.10280SC

[学会発表] (計1件)

① 藤村 昭夫、トキシコゲノミクス研究による毒性発現機序の解明とその対処法の探索、第31回日本臨床薬理学会年会、2010年12月1日、国立京都国際会館(京都市)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤村 昭夫 (FUJIMURA AKIO)
自治医科大学・医学部・教授
研究者番号: 90156901

(2) 連携研究者

安藤 仁 (ANDO HITOSHI)
自治医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 50382875

(3) 連携研究者

輿水 崇鏡 (KOSHIMIZU TAKAAKI)
自治医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 20392491

(4) 連携研究者

熊崎 雅史 (KUMAZAKI MASAFUMI)
自治医科大学・医学部・大学院博士課程
研究者番号: 50547966