

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 5 月 20 日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22591509

研究課題名（和文）プロテオミクスを用いた化学療法 Naive 患者の肝予備能障害メカニズムの解析

研究課題名（英文）Proteomics analysis of a mechanism of sinusoidal endothelial cell injury after receiving oxaliplatin-based chemotherapy in colorectal liver metastases.

研究代表者：中野 浩 (NAKANO HIROSHI)

聖マリアンナ医科大学・医学部・准教授

研究者番号：10241035

研究成果の概要（和文）：大腸癌抗がん剤治療、特にオキザリプラチンによるジヌソイド閉塞症候群のモデルとして、ヒト培養ジヌソイド内皮細胞にオキザリプラチンを反応させ、ジヌソイド内皮細胞の抗がん剤投与前後のプロテオミクス解析を施行した。2次元電気泳動後のプロテオミクス LC/MS/MS 解析では、Peroxioredoxin6、Aldehyde dehydrogenase2、 α -methylacetyl-CoA racemase、Protein disulfide-isomerase A3、60-S-acid ribosomal protein P0、Glutathione S-transferase M1 など、合計 23 個の蛋白に有意な変化を認めた。これら 23 個の変動タンパクのうち、ジヌソイド内皮細胞内の Glutathione S-transferase M1 が、oxaliplatin 投与により顕著に減少していることが、Mascot 解析にて証明された。ジヌソイド内皮保護作用を有すると考えられる sphingosine 1 phosphate (S1P) を投与したジヌソイド内皮細胞と S1P を投与しなかったジヌソイド細胞と比較したところ、S1P の投与により Glutathione S-transferase M1 の減少が有意に抑制されることが示された。ラットを用いて、オキザリプラチン肝障害モデルを作成した。オキザリプラチン投与後 48 時間後に採取した肝組織において、正常肝組織に比較して、有意に Glutathione S-transferase M1 が低下していた。oxaliplatin 投与によるジヌソイド内皮細胞障害が、Glutathione S-transferase M1 と関連している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Oxaliplatin-based chemotherapy in patients with colorectal liver metastases has been shown to be significantly associated with sinusoidal obstruction syndrome (SOS). In the present study, our proteomics study using 2-Dimensional electrophoresis and LC/MS/MS showed that Peroxioredoxin6, Aldehyde dehydrogenase 2, α -methylacetyl-CoA racemase, Protein disulfide-isomerase A3, 60-S-acid ribosomal protein P0, and Glutathione S-transferase M1 (GST-M1) significantly differed as compared with the control sinusoidal cells. Among them, GST-M1 significantly decreased in human sinusoidal endothelial cells after the administration of oxaliplatin. In addition, an administration of sphingosine 1 phosphate (S1P), which has a protective effect on sinusoidal endothelial injury, significantly attenuate the oxaliplatin-induced sinusoidal injury and showed the maintenance of GST-M1 concentration. These results suggests that GST-M1 and S1P have a crucial role of oxaliplatin-induced sinusoidal endothelial injury.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
2012 年度	300,000	90,000	390,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：大腸癌肝転移術前化学療法、oxaliplatin-based chemotherapy、sinusoidal obstruction syndrome、プロテオミクス、glutathione S-transferase M1、sphingosine 1 phosphate

1. 研究開始当初の背景

近年の大腸癌化学療法の進歩は目覚ましく、切除不能肝転移の切除可能病巣への conversion 率の増加には目覚ましいものがある。一方、化学療法関連肝障害という新たな問題点も提唱され、chemotherapy-associated steatohepatitis, oxaliplatin-induced sinusoidal obstruction syndrome (SOS)が、肝切除後の肝不全などの術後合併症の点からクローズアップされている。

2. 研究の目的

本研究では、oxaliplatin 投与時のジヌソイド内皮細胞のタンパク変動をプロテオミクス解析することにより、変動蛋白を解析し、内皮保護作用を有する sphingosine 1 phosphate (S1P)の有用性を検討した。

3. 研究の方法

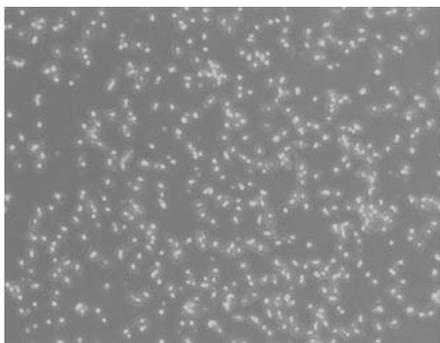
①ジヌソイド内皮培養細胞に対して、oxaliplatin を作用させる実験を行った。投与 oxaliplatin 投与濃度は、1 mM, 10mM の濃度で行った。

②ジヌソイド内皮培養細胞に対して、oxaliplatin を 1 mM, 10 mM の投与し、同時に、S1P を 0.5 mM, 5 mM 作用させた。

③10 時間の薬品投与時間後に、ジヌソイド内皮培養液を二次元電気泳動にかけ、LC/MS/MS 解析し、有意に変動した蛋白を mascot 解析した。

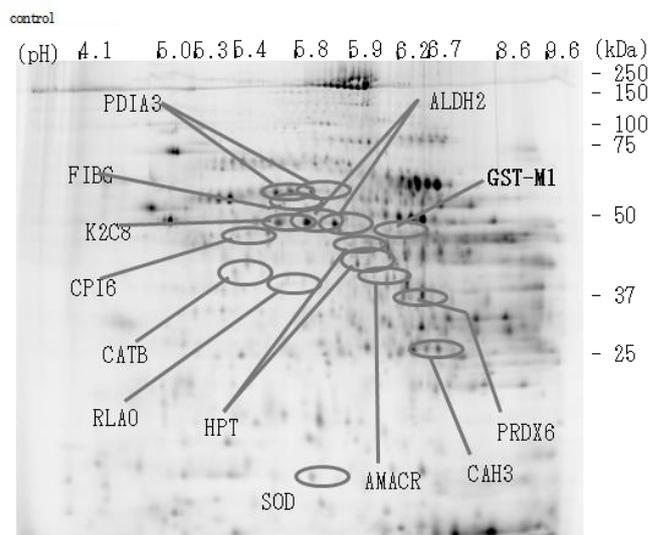
4. 研究成果

① ジヌソイド内皮培養細胞に対して、10 mM の oxaliplatin を作用させたところ、図

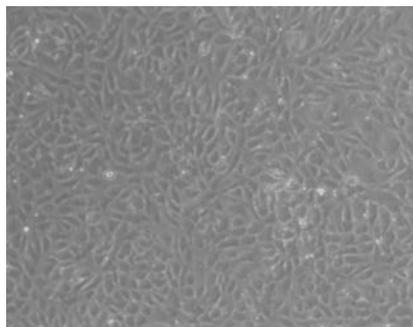


のごとく、ジヌソイド内皮細胞の高度障害が認められた。

② Oxaliplatin により障害が認められたシヌソイド内皮のプロテオミクス解析において、下図のごとく、Peroxiredoxin6、Aldehyde dehydrogenase2、 α -methylacetyl-CoA racemase、Protein disulfide-isomerase A3、60-S-acid ribosomal protein P0、GST-M1 など、合計 23 個の蛋白に有意な変化を認めた。

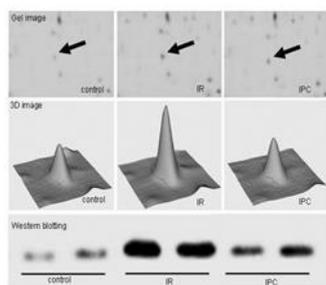


③ 5 mM の S1P 投与により 7、下図のごとく、ジヌソイド内皮保護作用が顕著に認められた。



④ S1P 投与により、プロテオミクス解析上、シヌソイド内皮の GST-M1 は有意に改善効果が認められた。

Fig. 2



- ⑤ 以上の結果から、oxaliplatin-induced sinusoidal injury に、GST-M1 減少が関与している可能性が指摘され、S1P 投与によって、GST-M1 濃度が改善され、ジヌソイド内皮細胞障害が改善されることが示され、S1P 投与の有用性が示唆された。

基礎臨床的に SOS 阻害作用の注目されている薬剤としては、Bevacizumab, Sorafenib などが注目され、また、ジヌソイド内皮障害時に起因する血小板活性を抑制する目的でバイアスピリン投与なども注目されている。

GST-M1 は、ヒトの遺伝子でグルタチオン S 転移酵素 (グルタチオン・S-トランスフェラーゼ) を発現する遺伝子の一つである。一般に酵素は、体液に溶ける細胞質ゾル型と、膜に結合する膜結合型の 2 つに分けられる。グルタチオン・S-転移酵素にもこの両方の型がある。この 2 種は、明確に異なった超遺伝子族によってエンコードされている。哺乳類のグルタチオン S 転移酵素の内、水溶性で細胞質性なのは、アルファ、カッパ、ミュー、オメガ、パイ、シグマ、シータ、ゼッタの 8 つが特定されている。GSTM1 は、ミュー類に属する酵素をエンコードする。グルタチオン・S-転移酵素のミュー類は、発ガン性物質、治療薬剤、環境有害物質の内、求電子化合物の解毒作用を持つ。また、グルタチオンとの共役による酸化ストレスによる産物なども解毒する。GSTM1 は、染色体 1p13.3 上の遺伝子群の中に構成されており、非常に多様性がある。この遺伝的多様性によって、生物の薬剤、発ガン性物質、有毒物質などの物質への感受性が変わる。増加する環境有害物質や発ガン性物質に対する感受性が増大すると、GSTM1 がヌル変異すると言われている。これにより、ガンが増加している可能性がある。多様な蛋白質イソ型はこの遺伝子の転写変異体 (transcript variant) によってエンコ

ードされている。

S1P は生体膜を構成するスフィンゴ脂質の代謝産物であり、リゾホスファチジン酸 (LPA) と並ぶリズリン脂質の一種である。これらは酵素により膜から切り出されて遊離した後に細胞膜上に発現している G タンパク質共役受容体に結合することによって細胞遊走などを引き起こす生理活性物質でもある。S1P はスフィンゴシンキナーゼ (SphK) と呼ばれる酵素によって産生され、S1P の濃度は炎症状態 (気管支喘息、自己免疫疾患など) において上昇する。S1P に対する受容体として、G タンパク質共役受容体である S1P 受容体が知られており、現在までに報告されている S1P 受容体には S1P₁-S1P₅ の 5 種類が存在する。上記に示したような機構で産生された S1P は ABC トランスポーターを介して細胞外へ放出された後に産生細胞そのものあるいは近傍の細胞の表面に存在する S1P 受容体に結合し、その作用を発現する。5 種類の S1P 受容体の発現は細胞により大きく異なるが、S1P₁ の分布は比較的広く、他の受容体は限局されている。T 細胞では S1P₁ および S1P₄ の発現が見られるが、マスト細胞やマクロファージ等では S1P₁ および S1P₂ が発現している。S1P₅ は近年、樹状細胞や NK 細胞で発見された新規の受容体であり、細胞遊走に関与していることが報告されている。免疫抑制薬であるフィンゴリモド (FTY720) は生体に投与された後に SphK によってリン酸化を受け、S1P₁ 受容体に対するアゴニストとして働く。FTY720 の投与により、S1P₁ 受容体の発現はダウンレギュレーションする。スフィンゴシン自体は細胞をアポトーシスに導く活性を有するが、S1P は逆に細胞増殖を促進する働きを持つ。また、S1P は血漿中に多く存在し、10-100nM の低濃度で細胞遊走を促進することが報告されている^[4]。マスト細胞はアレルギーに関与しており、細胞内にヒスタミンなどのメディエーターを有する免疫細胞であるが、細胞表面に S1P に対する受容体を保有しており、リガンドの結合によって顆粒内物質の細胞外放出が引き起こされる。他にも S1P は細胞外からのカルシウムイオン流入を引き起こすセカンドメッセンジャーとして様々な細胞内プロセスに関与することが知られており、細胞運動の制御や細胞増殖、細胞骨格の形成等を引き起こす。

今回、S1P の、oxaliplatin-induced sinusoidal injury に対する、ジヌソイド内皮への保護作用が認められた点は、

注目すべき SIP の作用であると考えられた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① Katayama M, Nakano H, et al.
Splenic Volume Increase due to Preoperative Chemotherapy may Impair Long-Term Outcome after Hepatectomy in Patients with Initially Non-Optimally Resectable Colorectal Cancer Liver Metastases.
Hepatogastroenterol 2013 in press. (査読有)
- ② Sato S, Nakano H, et al.
The aspartate aminotransferase to platelet ratio before chemotherapy predicts adverse events for FOLFOX and XELOX regimens including bevacizumab as the first-line therapy for stage IV, recurrent and metastatic colorectal cancer.
J Gastrointest Oncol 4 (2): 203-209; 2013 (査読有)
- ③ Takeba Y, Matsumoto N, Nakano H, Kobayashi S, et al.
Comparative study of culture conditions for maintaining CYP3A4 and ATP-binding cassette transporters activity in primary cultured human hepatocytes.
J Pharmacol Sci 115 (4): 516-524; 2011. (査読有)
- ④ Miura K, Nakano H, et al.
Splenomegaly in FOLFOX-naive stage IV or recurrent colorectal cancer patients due to chemotherapy-associated hepatotoxicity can be predicted by the aspartate aminotransferase to platelet ratio before chemotherapy.
Int J Clin Oncol 16 (3): 257-263; 2011. (査読有)
- ⑤ Nakano H, et al
Chemotherapy-induced hepatotoxicity in patients with colorectal cancer liver metastases.
Nihon Rinsho 69 (3): 536-540; 2011. (査読無)

[学会発表] (計 2 件)

- ① Nakano H, et al.
The aspartate aminotransferase to platelet ratio before chemotherapy predicts adverse events for FOLFOX and XELOX regimens including bevacizumab as the first-line therapy for stage IV, recurrent and metastatic colorectal cancer.
The best oral Session,
The 10th Concreass of the International Hepato-Pancreato-Biliary Association.

July 2012, in Paris, France.

- ② 中野 浩、他
進行・再発大腸癌の化学療法関連肝障害：脾容積、AST/血小板比による chemotherapy-naive patients の抽出。
第 112 回日本外科学会総会
2012 年 4 月、千葉

[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：中野 浩
(聖マリアンナ医科大学・医学部・准教授)
研究者番号：10241035
- (2) 研究分担者：なし
- (3) 連携研究者：なし