

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462101

研究課題名(和文) プロテオミクスを用いた抗癌剤Naive患者における肝障害メカニズムの解析

研究課題名(英文) Hepatotoxicity investigated in chemo-naive patients by proteomics

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：抗癌剤副作用のジヌソイド閉塞症候群(SOS)に対してデフィブリド(DF)の効果を検討した。ジヌソイド内皮細胞(SEC)を、各種濃度のDFと作用させ、共焦点顕微鏡とフローサイトメトリーを利用して、DF-SEC相互作用、endocytic pathways、internalization kineticsを検討した。DFとSEC膜との相互作用は主に、SEC膜表面で起こり、その後、SEC内部に取り込まれる形となった。細胞核に到達しなかった。フローサイトメトリーでは、SECのDF取り込みは、濃度、温度、および時間依存で、DFのSEC障害に対する予防薬としての作用メカニズム解明の一助となった。

研究成果の概要(英文)：Defibrotide (DF) is recognized as an endothelial protective agent. The aim of the study was to investigate the interaction of DF with endothelial cells (ECs). A human hepatic EC line was exposed to different DF concentrations. Using inhibitory assays and flow cytometry techniques along with confocal microscopy, we explored: DF-EC interaction, endocytic pathways, and internalization kinetics. Confocal microscopy showed interaction of DF with EC membranes followed by internalization, though DF did not reach the cell nucleus even after 24 hours. Flow cytometry revealed concentration, temperature, and time dependent uptake of DF in 2 EC models but not in other cell types. Moreover, inhibitory assays indicated that entrance of DF into ECs occurs primarily through macropinocytosis. The antiinflammatory and antioxidant properties of DF seem to be caused by the interaction of the drug with the cell membrane.

研究分野：外科学

キーワード：ジヌソイド閉塞 抗癌剤起因性肝障害 デフィブリド ヒトジヌソイド内皮 共焦点顕微鏡 フローサイトメトリー

1. 研究開始当初の背景

切除不能・再発の結腸癌および直腸癌において、オキサリプラチンをベースとした化学療法の効果は既に一般的なものであるが、大腸癌肝転移の oxaliplatin-induced hepatotoxicity は、周術期の合併症死亡のリスクファクターである [1]。その hepatotoxicity の主体は、sinusoidal obstruction syndrome (SOS) で、類洞の閉塞、拡張、periosis、nodular regenerative hyperplasia などの病理組織学的変化である。[2, 3]特に最近では、oxaliplatin-induced の食道静脈瘤破裂、肝不全が報告されている。Oxaliplatin-induced hepatotoxicity に関する治療が検討されるべきであるが、近年、Defibrotide (DF) という (90%リン酸ジエステル一本鎖オリゴヌクレオチドと 10% リン酸ジエステル二本鎖オリゴヌクレオチドの混合物) が SOS 抑制剤として開発された。DF の hemostasis に関連する機能などが、DF の作用として報告されているが、その作用機序は不明である。

2. 研究の目的

本研究では DF の作用メカニズムを検討し、SOS に及ぼす影響について調査することを目的とした。

3. 研究の方法

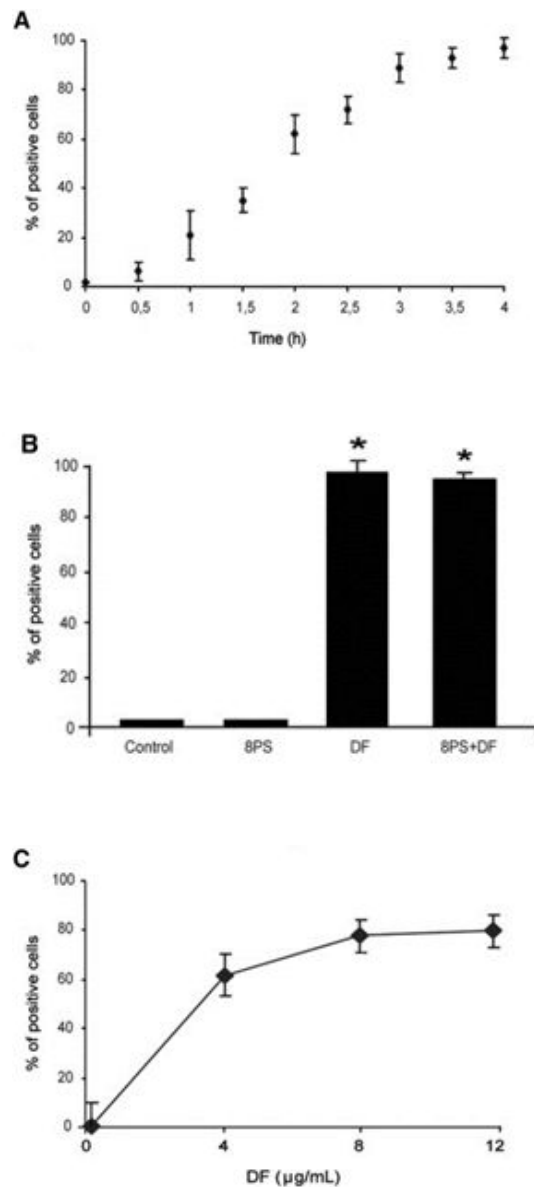
(1) ヒトジヌソイド内皮培養細胞を用いて、DF の相互作用を検討した。この interaction が細胞膜で起こっているのか、ジヌソイド内皮の cytoplasm で発生しているのかを検討した。Fluorophore-labeled DF を作用させ、4 時間 インキュベートした後にジヌソイド内皮細胞の DF uptake を調査した。DF uptake された蛍光色素を flowcytometry で検討した。Saturable assay は DF 濃度 0 から 12 $\mu\text{g}/\text{ml}$ にてセッティングし行った。Temperature dependent assay として、ヒトジヌソイド内皮培養細胞を 14 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、37 および 4 で 2 時間、温度依存性にインキュベートした。ヒトジヌソイド内皮培養細胞アデノシン受容体についての検索では、10 μM の 8-p-sulfophenyltheophylline (8PS) をジヌソイド内皮培養細胞に加えた。Confocal image は Leica TCS SP5 microscope にて capture した。Fixed-cell confocal fluorescence image は、Leica TCS SP5 を用いて施行した。ヒトジヌソイド内皮培養細胞の oxidative stress induced cell death は、Palmera らの方法に準じて行った。[4]

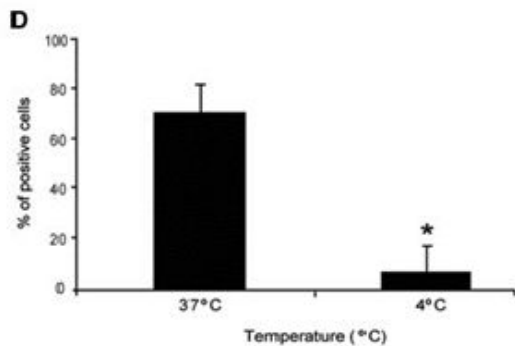
4. 研究成果

(1) flowcytometry 調査したジヌソイド内皮培養細胞 (SEC) における DF-interaction は、図 1A のごとく時間とともに DF 陽性細胞頻度が増加した。Adenosine receptor blockade により、影響を受けなかった (図 1B)。DF-saturable assay では、8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ がピークであった (図 1C)。

(2) DF internalization において、DF は SEC 内の cytoplasm に存在していることが観察された。

(3) flow cytometry において、DF-internalization は、macropinocytic mechanism によることが示された。





Uptake of defibrotide by endothelial cells.

(A) SECs were incubated with DF (4 µg/mL final concentration), labeled with Alexa 488, for the indicated period of time (from 0-4 h). (B) The addition of 10 µM adenosine receptor antagonist (8-p-sulphophenyltheophylline) to SEC monolayers for 1 hour before the incubation with DF (4 h) did not interfere with SEC-DF interaction. (C) For saturation assays, SEC monolayers were exposed to increasing doses of DF (from 0-12 µg/mL) for 2 hours. (D) For temperature dependence assays, SECs were incubated with 4 µg/mL for 2 hours at 37 °C and 4 °C.

結語。本研究により、DFはSECにより、macropinocyticにcytoplasmに吸収され、antiinflammatory作用、そしてantioxidant作用を及ぼすことが示された。

<引用文献>

1. Nakano H, Oussoultzoglou E, Rosso E et al. Sinusoidal Injury Increases Morbidity After Major Hepatectomy in Patients With Colorectal Liver Metastases Receiving Preoperative Chemotherapy. *Ann Surg* 2008; 247: 118-124.
2. Rubbia-Brandt L, Audard V, Sartoretti P et al. Severe hepatic sinusoidal obstruction associated with oxaliplatin-based chemotherapy in patients with metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol* 2004; 15: 460-466.
3. Rubbia-Brandt L, Giostra E, Brezault C et al. Importance of histological tumor response assessment in predicting the outcome in patients with colorectal liver metastases treated with neo-adjuvant

chemotherapy followed by liver surgery. *Ann Oncol* 2007; 18: 299-304.

4. Palomo M, Mir E, Rovira M et al. What is going on between defibrotide and endothelial cells? Snapshots reveal the hot spots of their romance. *Blood* 2016; 127: 1719-1727.

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. Katayama M, Nakano H, et al. A Splenic Volume Increase Due to Preoperative Chemotherapy May Impair the Long-Term Outcome After Hepatectomy in Patients with Initially Non-Optimally Resectable Colorectal Cancer Liver Metastases. *Hepatogastroenterology*. 2013 Aug9;60(126):1420-1425.doi:10.5754/hge13266.(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*. 2013 Jun;4(2):203-9.doi:10.3978/j.issn.2078-6891.2013.016.(査読有)

[学会発表](計0件)

[図書](計0件)

[産業財産権]
出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6．研究組織

(1)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