

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870460

研究課題名(和文)シクロフォスファミドの心筋障害のメカニズムと発症予防法の探求

研究課題名(英文)Mechanisms of fatal cardiotoxicity following high-dose cyclophosphamide therapy and a method for its prevention

研究代表者

西川 拓朗(Nishikawa, Takuro)

鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・助教

研究者番号：90535725

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ラット心筋細胞(H9c2)とラット肝ホモジネート(S9)を用いて、シクロフォスファミド(CY)の代謝、心筋障害モデル(CY 250 μM以上)を再現した。そしてN-acetylcysteine(NAC)を併用することで、このモデルでのCY心筋障害を抑制できることを見出した。また、NAC併用でもCYの代謝(4-hydroxyCY産生量)や活性酸素の産生量は抑えられることなく、acrolein産生が抑制され、不活性代謝物o-carboxyethyl-phosphoramidate(CEPM)の著しい増加を認めた。これらよりCY心毒性の主体はCY代謝物の一つであるacroleinであろうと報告した。

研究成果の概要(英文)：We investigated the poorly understood cardiotoxic mechanisms of high-dose cyclophosphamide (CY). A rat cardiac myocardial cell line, H9c2, was exposed to CY metabolized by S9 fraction of rat liver homogenate mixed with co-factors (CYS9). CYS9 exhibited myocardial cytotoxicity when CY concentration was 250 μM or more. Inhibition of CYS9-induced cytotoxicity occurred with N-acetylcysteine (NAC). Pre-treatment with NAC, however, did not inhibit the metabolism of CY: compared to control samples, we observed no difference in 4-hydroxy-cyclophosphamide (HCY), a significant increase of o-carboxyethyl-phosphoramidate (CEPM), and a significant decrease of acrolein. Furthermore, NAC pre-treatment did not affect intracellular amounts of ROS produced by CYS9. Since acrolein seems to be heavily implicated in the onset of cardiotoxicity, any competitive metabolic processing of CY that reduces its transformation to acrolein is likely to be an important mechanism for preventing cardiotoxicity.

研究分野：小児血液・腫瘍

キーワード：シクロフォスファミド 心筋障害 造血細胞移植 代謝 活性酸素 抗酸化剤 アルデヒド脱水素酵素
グルタチオン

1. 研究開始当初の背景

シクロフォスファミド (CY) はアルキル化剤に分類され、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、先天性免疫不全症等の疾患に対する造血幹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。大量 CY 投与を受けた患者の数%で、1 週間以内に急性心筋障害を生じ、致命的になることが知られている¹⁾。そして造血幹細胞移植の成績向上に伴い、このような致命的合併症がクローズアップされるようになってきている。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) を予防するという新しい治療法も世界で急速に広まっており、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¹⁾。

CY は肝臓で代謝され、4-hydroxycyclophosphamide (HCY)、aldocyclophosphamide (AldoCY) となり、細胞内で phosphoramidate mustard (PM) としてアルキル化作用を示す。その際に acrolein が副反応物として生成される。一方、細胞内 ALDH (アルデヒド脱水素酵素: aldehyde dehydrogenase) 活性が高いとアルデヒド体である AldoCY を不活性代謝物の o-carboxyethylphosphoramidate mustard (CEPM) へと代謝できる²⁾ (図 1)。CY 心筋障害は、このような複雑な代謝経路のため研究が殆ど行われておらず、代謝物の中で CY 心筋障害の主因がどの代謝物なのかも分かっていない¹⁾。

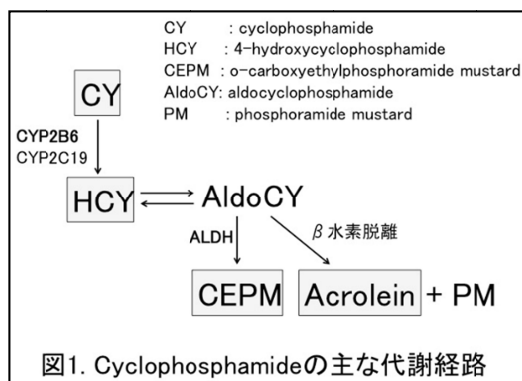


図1. Cyclophosphamideの主な代謝経路

2. 研究の目的

HCY が抗白血病作用の主であり、acrolein が出血性膀胱炎の主な原因であることはわかっているが、CY 心毒性の主因がどの代謝物なのかは分かっていない¹⁾。今回、薬物代謝曝露を用いた細胞実験により、心筋障害のメカニズムの解明と発症予防法の確立をすることを目的とする。

3. 研究の方法

ラット心筋細胞 (H9c2) を S9 で代謝させた CY (CYS9) に曝露する。心筋障害は MTT(3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)

-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromide) 測定、LDH 測定、活性酸素種産生、アポトーシス誘導、還元型グルタチオン (GSH) 測定により評価した。また、心筋保護剤候補として抗酸化剤である N-acetylcysteine (NAC)、isorhamnetin (ISO)、CYP 阻害剤である ionone (BIO) を併用し心筋障害を同様に評価した。培地中の CY、CYS9 中の CY 代謝物濃度を liquid chromatography/tandem mass spectrometry (LC/MS/MS) や high performance liquid chromatography (HPLC) で測定した。また心筋保護効果が認められた薬剤に関しては、それを併用することで CY の抗がん作用効果も抑えることにならないか、白血病細胞 cell line である HL-60 細胞を用いて検討した。

次に H9c2 細胞を各種 CY 代謝物 (HCY, CEPM, acrolein) に曝露した。心筋障害は同様に MTT 測定、LDH 測定、活性酸素種産生、アポトーシス誘導、GSH 測定により評価した。また、各種 CY 代謝物に曝露したときの ALDH 活性も評価した。心保護剤候補としては、NAC を併用し心筋障害の抑制効果や ALDH 活性を評価した。最後に HCY に曝露後の培地中の acrolein 濃度を HPLC で測定した。

4. 研究成果

CY 単独や低濃度の CYS9 曝露では心筋障害を認めなかったが、250 μM 以上の CY 濃度では CYS9 で 24 時間後、48 時間後には心筋障害を MTT 測定で認めた (図 2A、B)。そして、その S9 で代謝された CY (CYS9) の培養液中には 1 時間、2 時間後には生体内と同濃度の CY 代謝物 (HCY、CEPM、acrolein) を認めた (図

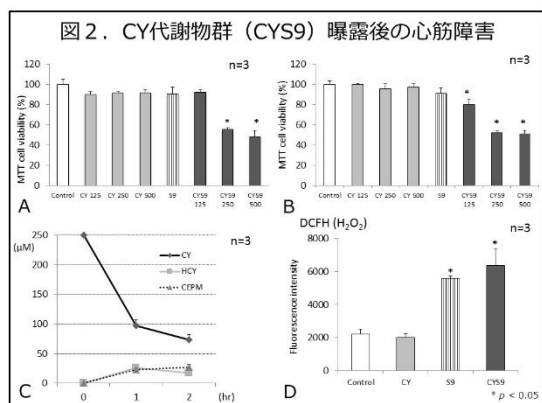


図2. CY代謝物群 (CYS9) 曝露後の心筋障害

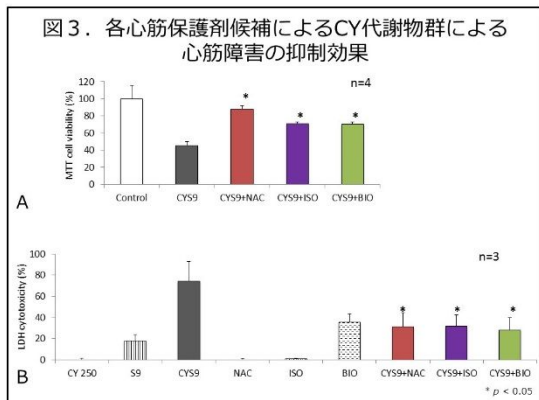
2C)。また、S9 曝露、CYS9 曝露により活性酸素種 (過酸化水素) の産生を認めた (図 2D)。

NAC、ISO、BIO を併用することにより、CYS9 曝露による心筋障害は、抑制されることが MTT 測定、LDH 測定により確かめられた (図 3)。

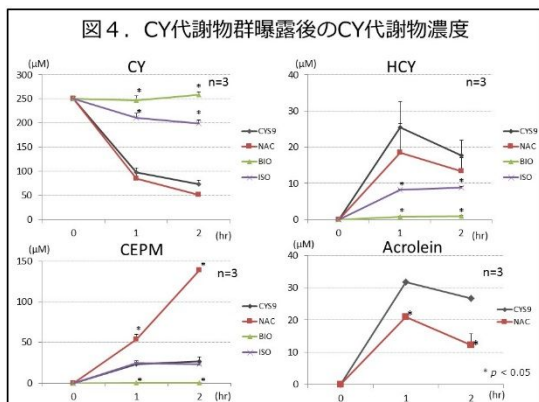
ただし、ISO、BIO は CY の代謝自体を阻害することで心筋障害を抑制していたが、NAC は CY の代謝を抑えることなく心筋障害を抑制していた。

NAC を併用すると HCY・活性酸素種産生に変化なかったが、acrolein は著減し、CEPM は著増していた (図 4)。これは CY の活性化代

謝産物である AldoCY は、ALDH 活性が高いと不活性

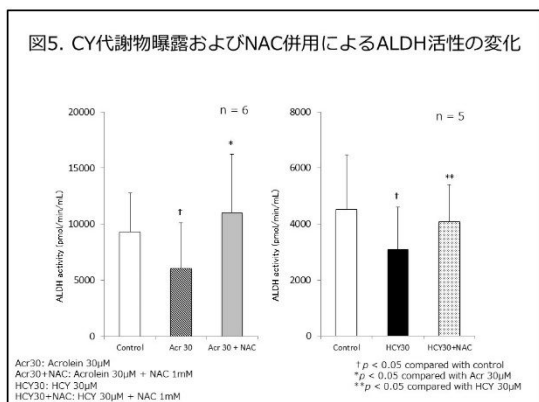


代謝物である CEPM に代謝されるので (図1)、CY 心筋障害には細胞内の ALDH 活性が関与するのではないかと考察した。GSH も CYS9 曝露により枯渇がみられ、NAC を併用することで、その枯渇がみられなくなることから CY 心筋障害の機序に関与があると考えられた。



また、NAC を併用しても白血病細胞である HL-60 細胞に対する CY の抗腫瘍作用は抑制されなかった。

CEPM の曝露では心筋細胞障害を示さなかったが、HCY、acrolein をそれぞれ曝露すると活性酸素を産生し、心筋細胞障害を示した。NAC を併用すると、HCY と acrolein による心筋障害はいずれも抑制された。NAC 併用で活性酸素産生量は減少し、GSH の枯渇も抑制できた。また、HCY と acrolein 曝露により心筋細胞内の ALDH 活性は減少し、NAC 併用でその減少を防ぐことができた (図5)。そして、HCY は培養液内で acrolein に変化していることもわかった。



CY 心毒性の主体は acrolein で、NAC は acrolein 産生、活性酸素産生、GSH の枯渇抑制、ALDH 活性の維持などにより CY 心毒性を予防する可能性がある。

参考文献

- 1) Emadi A et al., Nat Rev Clin Oncol. 6:638-647, 2009
- 2) McDonald GB et al., Blood. 101(5):2043-2048, 2003

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6件)

1. Nishikawa T, Miyahara E, Kurauchi K, Watanabe E, Ikawa K, Asaba K, Tanabe T, Okamoto Y, Kawano Y. Mechanisms of Fatal Cardiotoxicity following High-Dose Cyclophosphamide Therapy and a Method for Its Prevention. PLoS One. 査読あり, 26;10(6):e0131394, 2015. DOI: 10.1371/journal.pone.0131394.
2. Watanabe E, Nishikawa T, Ikawa K, Yamaguchi H, Abematsu T, Nakagawa S, Kurauchi K, Kodama Y, Tanabe T, Shinkoda Y, Matsumoto K, Okamoto Y, Takeda Y, Kawano Y. Trough level monitoring of intravenous busulfan to estimate the area under the plasma drug concentration-time curve in pediatric hematopoietic stem cell transplant recipients. Int J Hematol. 査読あり, 102(5):611-6, 2015. DOI: 10.1007/s12185-015-1853-6.
3. Inagaki J, Moritake H, Nishikawa T, Hyakuna N, Okada M, Suenobu S, Nagai K, Honda Y, Shimomura M, Fukano R, Noguchi M, Kurauchi K, Tanioka S, Okamura J. Long-Term Morbidity and Mortality in Children with Chronic Graft-versus-Host Disease Classified by National Institutes of Health Consensus Criteria after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. Biol Blood Marrow Transplant. 査読あり, 21(11):1973-80, 2015. DOI: 10.1016/j.bbmt.2015.07.025.
4. Nishikawa T, Okamoto Y, Maruyama S, Tanabe T, Kurauchi K, Kodama Y, Nakagawa S, Shinkoda Y, Kawano Y. Acute encephalomyelitis complicated with severe neurological sequelae after intrathecal administration of methotrexate in a patient with acute lymphoblastic leukemia. Rinsho Ketsueki. 査読あり, 55(11):2306-10, 2014

5. Kodama Y, Okamoto Y, Shinkoda Y, Tanabe T, Nishikawa T, Yamaki Y, Kurauchi K, Kawano Y. Bone marrow transplant for a girl with bone marrow failure and cerebral palsy. *Pediatr Int*. 査読あり, 56(3):424-6. DOI: 10.1111/ped.12297.
6. Miyahara E, Nishikawa T, Takeuchi T, Yasuda K, Okamoto Y, Kawano Y, Horiuchi M. Effect of myeloperoxidase inhibition on gene expression profiles in HL-60 cells exposed to 1, 2, 4,-benzenetriol. *Toxicology*. 査読有り, 20;317:50-57, 2014. DOI:10.1016/j.tox.2014.01.007.

〔学会発表〕(計 11 件)

1. 西川拓朗, 山口博樹, 猪川和朗, 中山一隆, 渡辺英里香, 精松貴成, 中川俊輔, 倉内宏一郎, 児玉祐一, 田邊貴幸, 新小田雄一, 岡本康裕, 森川則文, 武田泰生, 河野嘉文. グルタチオン S トランスフェラーゼ (GST) A1、M1、T1 遺伝子多型が造血細胞移植前処置の静注ブスルファン (ivBu) 薬物動態へ及ぼす影響. 第 38 回日本造血細胞移植学会総会 名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市) 2016.3.3-5
2. 引地美菜子, 西川拓朗, 中村達郎, 精松貴成, 中川俊輔, 児玉祐一, 田邊貴幸, 新小田雄一, 岡本康裕, 河野嘉文. 移植後シクロフォスファミドを用いた HLA 半合致末梢血細胞移植とハプロ DLI を施行した急性骨髄性白血病. 第 57 回日本小児血液・がん学会学術集会 甲府富士屋ホテル (山梨県甲府市) 2015.11.27-29
3. Nishikawa T, Miyahara E, Kurauchi K, Okamoto Y, Kawano Y. High-dose cyclophosphamide induced cardiotoxicity: the roles of acrolein and ALDH1 activity. 第 77 回日本血液学会学術集会 石川県立音楽堂 (石川県金沢市) 2015.10.16-18
4. 西川拓朗, 渡辺英里香, 猪川和朗, 宮原恵弥子, 倉内宏一郎, 精松貴成, 中川俊輔, 児玉祐一, 田邊貴幸, 新小田雄一, 松元一明, 岡本康裕, 森川則文, 武田泰生, 河野嘉文. シクロフォスファミド大量療法施行患児における薬物動態 - CY、CY 代謝物濃度と CYP 遺伝子多型および急性心筋障害発症との関係 -. 第 32 回日本 TDM 学会・学術大会 キッセイ文化ホール (長野県松本市) 2015.5.23-24
5. 渡辺英里香, 西川拓朗, 猪川和朗, 精松貴成, 中川俊輔, 倉内宏一郎, 児玉祐一, 田邊貴幸, 新小田雄一, 松元一明, 岡本康裕, 武田泰生, 河野嘉文. 小児造血細胞移植患児における血漿中 busulfan 濃度-時間曲線下面積算出のための limited sampling strategy. 第 32 回日本 TDM 学会・学術大会 キッセイ文化ホール (長野県松本市) 2015.5.23-24
6. 西川拓朗, 宮原恵弥子, 倉内宏一郎, 岡本康裕, 河野嘉文. シクロフォスファミド心筋障害のメカニズムとその予防法の探求. 第 85 回日本衛生学会学術集会 和歌山県民文化会館 (和歌山県和歌山市) 2015.3.26-3.28
7. 宮原恵弥子, 西川拓朗, 倉内宏一郎, 岡本康裕, 河野嘉文. acrolein とシクロフォスファミド心筋障害 - ALDH1 の役割 -. 第 85 回日本衛生学会学術集会 和歌山県民文化会館 (和歌山県和歌山市) 2015.3.26-28
8. 西川拓朗, 渡辺英里香, 岡本康裕, 児玉祐一, 田邊貴幸, 中川俊輔, 倉内宏一郎, 精松貴成, 新小田雄一, 武田泰生, 河野嘉文. シクロフォスファミド (CY)、CY 代謝物濃度と大量 CY 投与後の急性心筋障害の検討. 第 37 回日本造血細胞移植学会総会 神戸国際会議場 (兵庫県神戸市) 2015.3.5-7
9. Nishikawa T, Miyahara E, Kurauchi K, Okamoto Y, Kawano Y. Mechanisms and prevention of fatal cardiotoxicity following high-dose cyclophosphamide therapy. 第 76 回日本血液学会学術集会 大阪国際会議場 (大阪府大阪市) 2014.10.31-11.2
10. 西川拓朗, 宮原恵弥子, 出雲公子, 堀内正久, 岡本康裕, 河合慶親, 河野嘉文, 竹内亨. ベンゼン発がんの機構解析. 第 84 回日本衛生学会学術総会 岡山コンベンションセンター (岡山県岡山市) 2014.5.25-27
11. 宮原恵弥子, 西川拓朗, 出雲公子, 堀内正久, 岡本康裕, 河合慶親, 河野嘉文, 竹内亨. マイクロアレイを用いたベンゼントリオール曝露による遺伝子発現変動解析-MPO の影響-. 第 84 回日本衛生学会学術総会 岡山コンベンションセンター (岡山県岡山市) 2014.5.25-27

〔その他〕
ホームページ等なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西川 拓朗 (NISHIKAWA, Takuro)

鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・助教
研究者番号: 90535725