

## 論文審査の要旨

報告番号	総研第 459 号		学位申請者	倉内 宏一郎
審査委員	主査	堀内 正久	学位	博士 (医学・歯学・学術)
	副査	上野 真一	副査	石塚 賢治
	副査	吉満 誠	副査	上野 健太郎

## Role of metabolites of cyclophosphamide in cardiotoxicity

(Cyclophosphamide 心毒性における cyclophosphamide 代謝物の及ぼす役割)

cyclophosphamide (CY) は造血細胞移植の移植前処置では高用量で使用される。CY は高用量 CY 療法後に観察される用量依存性の心毒性を示すが、その心毒性の機序や予防法は未確立である。ヒトにおいて、CY は肝臓内のチトクローム P450 で 4-hydroxycyclophosphamide (HCY) に代謝され、HCY は aldo-cyclophosphamide (AldoCY) となり、AldoCY は、phosphoramidate mustard (PM)、acrolein へと代謝される一方で aldehyde dehydrogenase (ALDH) により o-carboxyethyl-phosphoramidate mustard (CEPM) に代謝されることが知られている。心毒性は、CY 自体よりも、その代謝物によることが推定されていた。先行研究において、ラット肝ホモジネート (S9) 処理した CY によって、H9c2 細胞 (ラット心筋由来) は傷害され、抗酸化剤である N-acetylcysteine (NAC) 存在下では CY 心筋細胞傷害は抑制された。NAC は reactive oxygen species (ROS) や acrolein の産生も抑制したことから、CY 心筋細胞傷害には ROS 産生、acrolein 増加が関与することを明らかにした。本研究では、代謝物そのものを使用し、CY 心筋細胞傷害の機序を明らかにする目的で研究を行った。また NAC は acrolein 産生を抑制し、CEPM 産生を増加させたことから、AldoCY を CEPM に代謝する ALDH の役割の重要性についても合わせて検討した。学位申請者らは H9c2 細胞を CY、HCY、CEPM、acrolein にそれぞれ直接曝露し、MTT アッセイ、LDH 測定、ROS 測定、アポトーシス確認、GSH レベル測定、ALDH 活性測定を用いて、心筋細胞傷害を評価した。NAC による CY 心筋細胞傷害の抑制効果を確認するため、H9c2 細胞に NAC を前処理した後、同様の実験を行った。HCY が acrolein へ代謝されることを確認するため、H9c2 細胞を HCY に曝露後の培地中 acrolein 濃度を HPLC で測定した。また NAC により acrolein が捕捉 (抱合による除去) されるか評価するため、NAC 存在下、非存在下で H9c2 細胞を acrolein に曝露後の培地中 acrolein 濃度を HPLC で測定した。

その結果、本研究で以下の知見が明らかにされた。

- 1) CY による心筋細胞傷害は HCY や acrolein により用量依存性に引き起こされた。
- 2) NAC 処理は、HCY や acrolein による ROS 産生やアポトーシスを抑制した。
- 3) HPLC による濃度測定の結果、HCY の一部は acrolein に変換されていた。
- 4) acrolein により GSH レベルが低下し、NAC によりその GSH レベル低下を抑制した。
- 5) HCY、acrolein により ALDH 活性が低下し、NAC により ALDH 活性低下を抑制した。
- 6) NAC により培地中 acrolein 濃度が低下した。

以上の結果から、CY 心筋細胞傷害の機序として、CY 代謝物の中で HCY や acrolein が重要な物質であり、その機序としては、ROS 産生やアポトーシスによるものと考えられた。また NAC 投与効果の結果から、NAC による GSH レベル低下の抑制や ALDH 活性低下の抑制は心筋細胞を保護すると考えられ、CY 心筋細胞傷害における ALDH の役割の重要性を明らかにするとともに、NAC の予防効果の可能性を示した。

本研究は、心筋細胞を CY 代謝物に直接曝露することによって、CY 心筋細胞傷害の機序および NAC の細胞傷害抑制効果を明らかにした。本研究の結果は、CY 心毒性の抑制に役立つ基盤的な情報であると考えられる。よって本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。