

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08936

研究課題名(和文)酸化ストレス増強に基づく新たな低侵襲性急性白血病治療法の開発

研究課題名(英文)Development of a novel low-invasive treatment against acute leukemia adopting enhancement of oxidative stress

研究代表者

川田 浩志(KAWADA, Hiroshi)

東海大学・医学部・教授

研究者番号：20276801

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：癌に対する高濃度ビタミンC(H-VC)の臨床効果は依然議論の余地がある。申請者らは、H-VCの*in vitro*と*in vivo*の抗腫瘍効果の乖離が細胞外鉄イオン濃度の差異によっていると考えて本研究を実施した。その結果、H-VCは白血病細胞をapoptosisへ誘導するが、過剰鉄の存在下では阻止され、むしろ白血病細胞増殖を促進することを見出した。一方で鉄を減じると、H-VCによる抗白血病効果が、回復・増強することを明らかにした。以上の結果は、体内貯蔵鉄量の多い担癌患者へのH-VCの投与は慎重にすべきであるとともに、体内鉄貯蔵を低下させることでH-VCの抗癌効果を増強し得ることを示唆している。

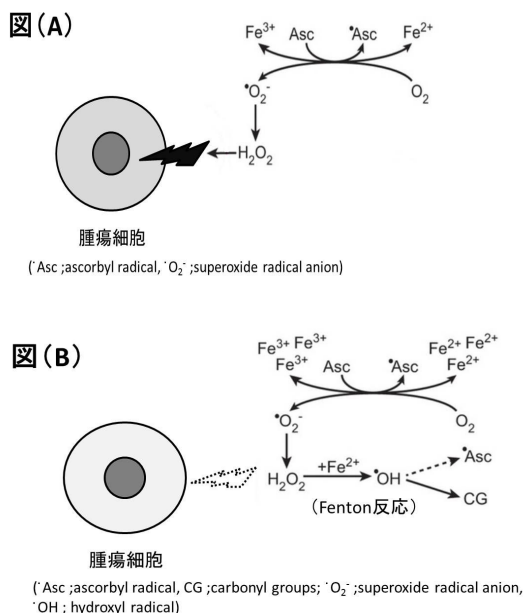
研究成果の概要(英文)：Although high concentrations of vitamin C (H-VC) have recently been used worldwide as an alternative cancer therapy, the clinical effects of H-VC have been controversial. We assumed that the discrepancy between the anti-cancer effects of H-VC *in vitro* and those *in vivo* is due to the difference of extracellular iron ion densities. In this study, we found *in vivo* that in the presence of excess iron, the anti-leukemic effect of H-VC was completely abrogated, although H-VC enhances anti-leukemic effect. We also demonstrated that a reduction of excess iron restores and enhances the anti-leukemic effects of H-VC *in vitro* and *in vivo*. These results suggest that H-VC should be cautiously used for cancer patients having high levels of body iron stores, and that lowering body iron stores may enhance the anti-cancer effects of H-VC in the clinical settings.

研究分野：血液腫瘍

キーワード：高濃度ビタミンC 過剰鉄 鉄

1. 研究開始当初の背景

比較的大量のビタミン C (L-ascorbic acid; 以下 L-AA) の投与が癌治療において最初に試みられたのは、1970 年代である。Pauling と Cameron は、末期の肝癌患者に 10g/日の L-AA を 10 日間点滴投与し、次いで経口で同量を維持投与することで、延命効果が認められたと報告した(Cameron E, Pauling L. Proc Natl Acad Sci USA 1976 & 1978)。しかし、L-AA の経口投与による追試でその効果が否定され、以後しばらくは L-AA が癌治療において顧みられることはほとんどなかった (Creagan ET et al. N Engl J Med 1979, Moertel CG et al. N Engl J Med 1985)。2000 年代になり、NIH の研究グループが、L-AA の抗腫瘍効果は、そのプロオキシダント作用によって過酸化水素を発生させることによっており、過酸化水素の分解能力が正常細胞よりも劣っている腫瘍細胞に対して L-AA が特異的に増殖抑制効果を発揮すること (図 A 参照)、さらに経口投与では血中濃度がじゅうぶん上昇せず、点滴静注することによって経口の 70 倍以上の濃度上昇が得られることがわかり、L-AA の抗癌効果を再評価するべきであると考えに至った。



申請者は、これまでに L-AA がヒト正常

造血幹細胞/前駆細胞の生存・増殖には影響を与えない濃度で、様々なヒト白血病細胞株とリンパ腫細胞株の生存・増殖に対して著明な抑制効果を発揮することを確認した。また、この L-AA の抗腫瘍効果は、過酸化水素の産生とともに、腫瘍細胞の HIF-1 を抑制することが大きく関与していることを、HIF-1 を過剰発現させたヒト白血病細胞株を皮下に移植した免疫不全マウスを用いた実験系で確認した (Kawada H et al. PLoS One 2013)。さらに、これらの知見を踏まえつつ、再発リンパ腫症例を対象に高濃度 L-AA の第 Ⅲ 相臨床試験を実施して、その安全性とともに、非投与時に比して 250 倍以上の L-AA 血中濃度が得られることも確認できた (Kawada H et al. Tokai J Exp Clin Med 2014)。

しかし、現在までのところ世界各地で様々な悪性腫瘍に対するビタミン C 点滴療法臨床試験が行われているが、じゅうぶんな抗腫瘍効果は観察されていないのが現状である (Hoffer LJ et al. Ann Oncol 2008)。同療法により腫瘍が縮小・消失したとする症例報告が散見されるに過ぎない (Padayatty SJ et al. CMAJ 2006)。

血液腫瘍の分野においては、急性白血病や悪性リンパ腫、多発性骨髄腫などの症例を対象に L-AA と arsenic trioxide (以下 ATO) との併用が臨床試験として試みられている (Aldoss I et al. Ann Hematol 2014, Chang JE et al. Hematol Oncol 2009, Röhlig C et al. Cancer Treat Rev 2009)。ATO の抗腫瘍メカニズムの一つは、腫瘍細胞内の reactive oxygen species (以下 ROS) を増加させて酸化ストレスを増大させることである。L-AA は、細胞内において ROS のスカベンジャーとして作用しているグルタチオン量を低下させて細胞内 ROS をさらに増加させる作用も有しているため、in vitro においては ATO との併用効果が認められ、本併用療法の臨床効果も期待された。しかし、臨床的には急性前骨髄球

性白血病を除いては、十分な抗腫瘍効果は認められなかった。したがって、更なる臨床的検討の前に、この L-AA の抗腫瘍効果の *in vitro* と *in vivo* での効果の乖離の原因を明らかにするべきであると考えた。

申請者らは、これまでにヒト白血病細胞株を移植した免疫不全マウスを用いて様々な検討を行った。その結果、マトリゲルに白血病細胞をマウスの皮下に移植させて腫瘍塊を形成させた系においては、高濃度 L-AA の投与によって明らかな腫瘍縮小効果が得られるが、鉄の豊富なマウス骨髄内に白血病細胞を移植した系においては、高濃度 L-AA の有意な抗白血病細胞効果が認められないこと、などを確認した。

最近、国外の研究グループからも、培養液中の鉄濃度を上昇させると、前立腺癌細胞株に対する L-AA の増殖抑制効果が著明に減弱するという *in vitro* での結果が報告された (Mojčić M et al. Sci Rep 2014)。そして、鉄による L-AA の抗腫瘍効果の減弱は、過剰な鉄によって Fenton 反応が起こる結果として過酸化水素の分解が促進されてしまうためと考えられた (図 B 参照)。

以上の結果は、L-AA 療法で臨床的に十分な抗腫瘍効果が得られないのは、担癌患者においては体内鉄が増加していることが多いためである可能性を示唆するものであった。

## 2 . 研究の目的

以上の研究結果と考察を踏まえ、生体内の鉄含有量を減じることで L-AA による *in vivo* における抗腫瘍効果の増強が得られるか明らかにするために本研究計画を立案した。

今回の研究においては、*in vitro* での検討とともに、ヒト白血病細胞移植マウスの実験系も用いて、体内鉄イオン濃度を変化させることで *in vivo* における H-VC の抗腫瘍効果の増強が得られるか確認し、同療法の有効性と限界性を明らかにして臨床の分野にフィードバックする。

## 3 . 研究の方法

まず *in vitro* においてヒト白血病細胞 (K562) に対する H-VC と鉄について評価を行った。次いで、作用機序について評価を実施し分子的メカニズムの解明も行った。さらに、ヒト白血病細胞を免疫不全マウスへ皮下移植することにより、*in vivo* において鉄と H-VC を投与することにより過剰鉄状態における H-VC の効果を評価した。次に *in vitro* において鉄キレート剤 (deferasirox: 以下 DFX) を用いた時の H-VC の効果の評価を実施し、分子メカニズムの解析も行った。最後に、体内過剰鉄の除去を H-VC 投与に併用することにより、*in vivo* において抗白血病効果の増強が得られるか否かを評価した。移植する白血病細胞は、あらかじめ luciferase 遺伝子を導入し、移植後の腫瘍塊を *In vivo* imaging system (IVIS) Spectrum imager を用いて光イメージとして描出するとともに定量的に観察した。

## 4 . 研究成果

H-VC はヒト慢性骨髄性白血病由来 K562 細胞のアポトーシスを有意に誘導して生存を阻害したが、この効果はクエン酸第二鉄アンモニウム (FAC) の添加によって減弱した。

次に、H-VC の抗白血病作用に対する鉄の抑制作序について検討した。培養液に H-VC を単独で添加した場合、過酸化水素が有意に生成されたが、さらに FAC を添加した場合には、過酸化水素の量が著しく減少した。これらの結果は、過剰鉄が H-VC によって生成された過酸化水素の分解をフェントン反応を介して促進することを示唆した。

さらに、過剰鉄が白血病細胞における NF- $\kappa$ B の活性化にも影響するか否かを調べた。申請者らは、H-VC が白血病細胞における I $\kappa$ B のリン酸化を阻害して、NF- $\kappa$ B の活性化お

よび HIF-1 mRNA の発現を阻害することをこれまで明らかにしていたが、FAC 添加により H-VC で起こる上記の分子の動きが阻害された。これらの研究から、過剰鉄がフェントン反応を介して H-VC によって生じた過酸化水素の分解を促進し、NF- $\kappa$ B 抑制を抑制することによって H-VC の抗白血病効果を減少させることが示唆された。

次に、ルシフェラーゼ遺伝子を導入した K562 細胞を皮下移植した NOD / SCID マウスを用いて H-VC の抗白血病効果に対する過剰鉄の影響を *in vivo* で検討した。マウスを Vehicle、H-VC、糖酸化鉄 (SFO) または H-VC と SFO を併用の 4 群にわけ、移植後 7 日目からそれぞれの投薬を実施し、腫瘍サイズを測定した結果、H-VC を投与したマウスでは Vehicle または SFO を投与したマウスに比べて腫瘍サイズが有意に小さかった。しかし、H-VC とともに SFO を併用投与したマウスでは、腫瘍サイズが他の 3 群に比して有意に大きかった。以上より、過剰鉄の存在下では H-VC の抗白血病効果は消失し、むしろ *in vivo* における白血病増殖を促進させる可能性が示唆された。

次に、過剰の鉄によって阻害された H-VC の抗白血病効果が、鉄キレーターであるデフェラシロックス (DFX) の添加によって影響を受けるのか *in vitro* において検討した。FAC を培地に添加すると H-VC によるアポトーシス細胞の割合は著しく減少したが、DFX も添加するとアポトーシス細胞の割合が有意に増えた。同時に、H-VC 添加により生成された過酸化水素の量は、FAC の添加によって減少したが、DFX をともに添加することにより過酸化水素の発生量が増すことを確認した。さらに、H-VC による白血病細胞の I $\kappa$ B リン酸化、NF- $\kappa$ B 活性化、および HIF-1 発現の阻害はすべて FAC によって抑制されたが、これらの変化は DFX の添加によって阻害された。

最後に、低鉄飼料を与え、さらに瀉血およ

び経口 DFX により作成した鉄欠乏を伴う NOD / SCID マウスを用いて H-VC の抗白血病効果を検討した。体内鉄分量の減少は、血清フェリチンレベルを測定することによって確認した。この低鉄マウスに Luc-K562 細胞を移植し、H-VC を投与して経時的に腫瘍量を測定した。その結果、体内鉄量を減じることによって H-VC の抗白血病効果を有意に増強できることがわかった。以上より、臨床的にも体内貯蔵鉄量の多い担癌患者への H-VC の投与は慎重にすべきであるが、体内鉄貯蔵を低下させることで H-VC の抗腫瘍効果を増強し得る可能性が示唆された。

## 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)

[学会発表](計 1 件)

(1) 金子 光代

発表標題: 体内鉄分量低減は悪性腫瘍に対する高濃度ビタミン C の効果を増強させる

学会名: 第 17 回日本抗加齢医学会総会

発表年: 2017 年

## 6 . 研究組織

(1) 研究代表者

川田 浩志 (KAWADA, Hiroshi)

東海大学・医学部・教授

研究者番号: 20276801

(2) 研究分担者

安藤 潔 (ANDO, Kiyoshi)

東海大学・医学部・教授

研究者番号: 70176014

(3) 研究協力者

金子 光代 (KANEKO, Mitsuyo)

東海大学・医学部・研究補助員

研究者番号: 40738598