

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 5 月 20 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K09055

研究課題名(和文) マイクロPIXEによる骨髄異形成症候群の血球中微量元素の動態解明と新規治療薬開発

研究課題名(英文) Elucidation of the dynamics of trace elements in blood cells of myelodysplastic syndrome by micro-PIXE and development of new therapeutic agents

研究代表者

村上 博和 (Murakami, Hirokazu)

群馬大学・その他部局等・特別教授

研究者番号：40166260

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：目的：骨髄異形成症候群の無効造血や白血病への進展機序の解明のため、マイクロPIXE法を用いて腫瘍細胞内微量元素動態を解析した。対象と方法：細胞内微量元素測定は高崎量子応用研究所のシングルエンド加速器を用いた。白血病細胞株と骨髄腫細胞株(対照)の細胞内微量元素の比較、およびドキシルビシン(DXR)の影響を測定した。結果：白血病細胞株では骨髄腫細胞株に比しKピークが高かった。DXR処理の白血病細胞株では未処理に比べKのピークが低かった。考察：DXRの添加により白血病細胞株ではK濃度が低下しており、DXRが直接的または間接的にK濃度に影響し細胞死に関与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨髄異形成症候群(MDS)などの血液腫瘍において細胞内微量元素を解析した報告はなく、さらに新規治療薬の開発を目指した微量元素の解析報告はない。MDSの白血病への進展には、遺伝子異常、骨髄間質細胞との相互作用等が関与している。その相互作用は細胞間の接着やサイトカイン、ケモカインが担っているが微量元素の関与は明らかでない。マイクロPIXEによりMDSの白血病への進展および無効造血に関する元素を同定し、さらにその微量元素含有酵素および代謝酵素を中心とした治療ターゲットを同定することは新規治療薬の開発に結びつく。

研究成果の概要(英文)：Objective: To elucidate the mechanism of ineffective erythropoiesis and leukemia progression of myelodysplastic syndrome, we analyzed trace element dynamics in tumor cells using the micro-PIXE method. Subjects and methods: A single-ended accelerator from Takasaki Quantum Applied Laboratories was used for intracellular trace element measurement. The intracellular trace elements of the leukemia cell line and the myeloma cell line (control) were compared, and the effect of doxorubicin (DXR) was measured. Results: (1) The leukemia cell line had a higher K peak than the myeloma cell line. (2) The peak of K was lower in the DXR-treated leukemia cell line than in the untreated leukemia cell line. Discussion: The addition of DXR reduced the K concentration in leukemia cell lines, suggesting that DXR directly or indirectly affects the K concentration and is involved in cell death.

研究分野：血液検査学

キーワード：骨髄異形成症候群 急性白血病 PIXE 微量元素 アポトーシス

## 1. 研究開始当初の背景

我々は、平成 16 年から大気マイクロ PIXE 分析法(使用核種 H<sup>+</sup> X 以後、マイクロ PIXE)を、医学・生物学分野の研究へ応用するプロジェクト(21 世紀 COE プログラム)に参加してきた。(Nagamine T et al. Biol Trace Element Res, 2007)。その成果の一端として、カドミウム長期投与ラットのマイクロ PIXE によって、ヒトのイタイイタイ病患者の病態を解明する可能性を報告した。(Nakazato K et al. Biometals, 2008)。また、アスベスト肺に合併した肺がん組織中からマイクロ PIXE でアスベスト小体を検出した(Matsuzaki S, et al. Int J Immunopathol Pharmacol, 2010)。平成 21 年度以降は、赤血球を対象とし、マイクロ PIXE による貧血の病態解明を行ってきた。最初に、マイクロ PIXE 測定用赤血球試料の作成に取り組み、本邦で初めて成功した(Tokita Y, JAEA-Review, 2009)。次いで、マイクロ PIXE の赤血球元素分析技術の臨床応用として、透析患者の重篤な合併症である腎性貧血の解析を行い、赤血球の形態変化に加え、元素分布の異常をきたすことを報告した(第 27 回 PIXE シンポジウム, 宇治, 2010)。さらに多発性骨髄腫培養細胞において、新規治療薬ボルテゾミブ添加により、細胞内 Ca および P の量および分布が変化することを証明した(第 63 回北関東医学会, 前橋, 2016)。

骨髄異形成症候群 myelodysplastic syndromes(MDS)は、近年増加している血液の難治性悪性疾患である。MDS の本態は多能性造血幹細胞の単クローン性の造血障害である。この異常クローンにより無効造血を生じて造血不全を来すか、あるいは急性白血病に転化して死亡する。現在では造血幹細胞移植しか治療の望めない疾患である。MDS は無効造血により骨髄は過形成であるが、末梢血では血球減少を認め、血球形態異常の存在により診断される。WHO 分類に示されているように、MDS の病型分類は、分子病態的研究が進んでいるが、血球の異形成の程度や環状鉄芽球の有無などの形態学的な診断に依存しているのが現状である。また、鉄代謝の研究から、MDS では骨髄赤芽球が過形成であるにもかかわらず、鉄の利用率が低下して著名な貧血を来すことが分かっている。また、MDS の一型である Refractory anemia with ringed sideroblast (RARS)では鉄代謝異常により、ミトコンドリア内鉄蓄積による環状鉄芽球とアポトーシスが特徴的であり、診断には鉄染色による赤芽球の鉄の環状分布の有無が必要である。このように、MDS において鉄代謝の異常が知られているが、実際は赤血球における鉄の分布や動態は不明である。また、銅や亜鉛、鉛、カドミウム、ヒ素など様々な微量元素が貧血の原因として知られているが、これらの MDS 赤血球での分布や動態は不明である。

## 2. 研究の目的

MDS の無効造血や白血病への進展機序の解明のため、in-air micro-Particle Induced Emission(マイクロ PIXE)分析法を用いて造血器腫瘍細胞の細胞内微量元素動態を解析し、これら微量元素含有酵素および代謝酵素を中心とした治療ターゲットを同定し、新規治療薬開発に結び付ける。

## 3. 研究の方法

### 1) マイクロ PIXE 試料の作成

細胞は TRIS-HNO<sub>3</sub> (pH 7.4) にて洗浄後、 $2 \times 10^6$  個/mL に再懸濁し、集細胞遠心装置にて 500 rpm、15 分遠心して 0.5 μm 厚のポリカーボネート膜に細胞を接着し、その後真空蒸着させた。

### 2) マイクロ PIXE による解析について

解析には、日本原子力研究開発機構高崎量子応用研究所の TIARA を使用する。実験当日、シングルエンド加速器から SB コースのビームを午前 9 時に受け取り、1 時間程度でマイクロビームの形成を行う。ビームサイズおよびビーム電流を確認後、用意した分析試料を大気マイクロ PIXE 分析チャンバーに装着し、順次測定する。測定時間は 1 試料 60 分とする。

### 3) 急性骨髄性白血病(AML)および MDS 細胞株と骨髄腫(MM)細胞株における細胞内微量元素の解析

はじめに、AML 細胞株 HL-60 (AML-M2 由来)、KG-1 (AML-M1 由来)、THP-1 (AML-M5) と骨髄腫細胞株 KMS11 の細胞内微量元素の差を検討した。

### 4) 薬剤添加による AML 細胞株の細胞内微量元素への影響の検討

AML 由来細胞株 HL-60、KG-1、THP-1 を用いて、アントラサイクリン系抗腫瘍薬ドキシソルビン (DXR) を添加し (HL-60;  $0 \mu\text{M} \cdot 0.85 \mu\text{M}$ 、KG-1;  $0 \mu\text{M} \cdot 100 \mu\text{M}$ 、THP-1;  $0 \mu\text{M} \cdot 1.4 \mu\text{M}$ ) 24 時間培養を行った。これらの細胞をマイクロ PIXE 試料とした。

## 4. 研究成果

1) AML と MM 細胞株における細胞内微量元素

HL-60 と KG-1 および KMS-11 のヒストグラムを図 1 に示す。1 細胞あたりを示す濃グレーのヒストグラムを比較すると、AML 細胞株である HL-60、KG-1 とともに、KMS-11 に比べ K のピークが高かった。他の元素では AML 細胞株と MM 細胞株による明らかな差は認められなかった。

2) 薬剤添加による AML 細胞株の細胞内微量元素への影響の検討

1 細胞あたりのヒストグラムを比較すると、DXR 処理の HL-60 および THP-1 では未処理に比べ、K のピークが低くなっていた(図 2)。一方、DXR 処理の KG-1 では K のピークに未処理との差は認められなかった。1 細胞あたりの K の分布は、未処理および DXR 処理共に分布の偏りは認められなかった。他の元素では DXR 処理による明らかな違いは認められなかった。

図 1 . The histogram of AML cell line and multiple myeloma cell line.

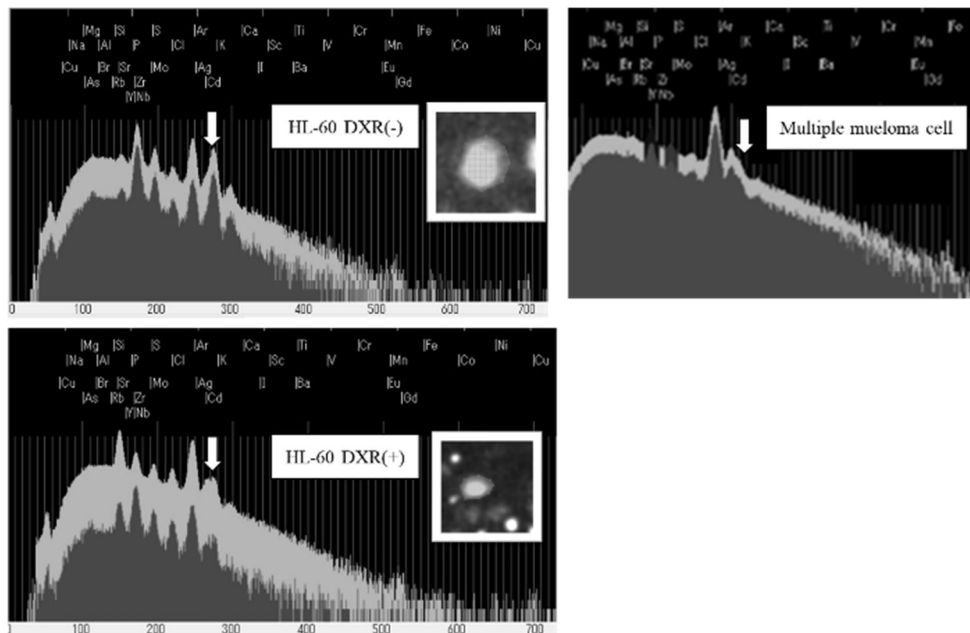
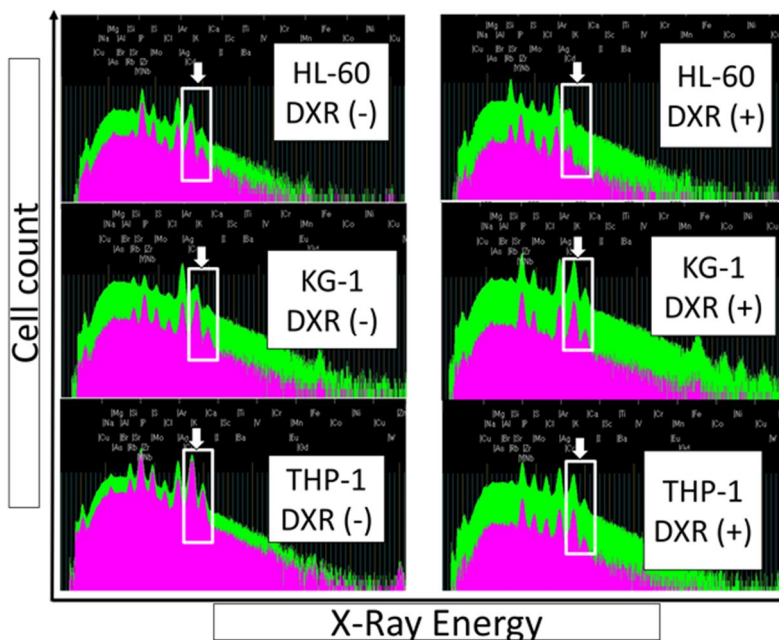


図 2 . The histogram of AML cells. The Pink color indicates distribution per cell.



3) 考察

一般的に K は約 90%が細胞内液に存在し、神経や筋肉の興奮や伝達に重要な働きをしている。細胞膜に存在するカリウムチャンネルによって細胞内の K の恒常性が保たれている。神経や筋以外の非興奮系細胞ではカリウムチャンネルによる K の細胞外への流出は細胞容積を減少させ、細胞種により異なるが、ミトジェンの活性化による細胞増殖に働く場合と、カスパーゼやエンドヌクレアーゼ活性を上昇させアポトーシスが誘発される経路が存在している [1]。HL-60、KG-1 とともに非興奮系細胞であるが、K の流出により細胞増殖と細胞死のどちらが活性化されるかは明らかではない。

DXR は腫瘍細胞の DNA と複合体を形成することによって、DNA polymerase や RNA polymerase 反応を阻害し、DNA 複製、RNA の合成、ひいては蛋白合成を阻害し、腫瘍細胞の増殖を抑制する。本研究で DXR の添加により AML-M3 由来の HL-60 では K 濃度が低下しており、DXR が直接的または間接的に K 濃度に影響し細胞死に関与していることが示唆される。一方で、AML-M2 由来の KG-1 では K 濃度の変化が認められなかったため、AML の病型または AML 細胞の分化段階によりその機序が異なることが示唆される。今後 DXR によりカスパーゼやエンドヌクレアーゼの発現が上昇することを確認していきたい。さらに MDS 細胞株や異なる抗腫瘍薬を用いた検討を行っていく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 笠松 哲光、村上 博和
2. 発表標題 大気Micro-PIXE法を用いた急性骨髄性白血病細胞株の微量元素動態解析
3. 学会等名 QST高崎サイエンスフェスタ2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金井敬海, 笠松哲光, 粟田真彩, 村田圭祐, 半田寛, 齋藤貴之, 村上博和.
2. 発表標題 大気Micro-PIXE法を用いた急性前骨髄性白血病細胞内微量元素の動態解析
3. 学会等名 第55回関甲信支部・首都圏支部医学検査学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	笠松 哲光  (Kasamatsu Tetsuhiro)  (60737542)	群馬大学・大学院保健学研究科・助教   (12301)	
研究分担者	神谷 富裕  (Kamiya Tomihiro)  (70370385)	群馬大学・大学院理工学府・教授   (12301)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	齋藤 貴之 (Saitoh Takayuki)  (80375542)	群馬大学・大学院保健学研究科・教授   (12301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関