

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460720

研究課題名(和文) マイクロPIXEによる骨髄腫細胞における微量元素の動態解明と新規治療薬の開発

研究課題名(英文) Measurement of trace elements with micro-PIXE method in myeloma cells and development of novel drugs

研究代表者

村上 博和 (Murakami, Hirokazu)

群馬大学・大学院保健学研究科・教授

研究者番号：40166260

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)：大気micro-PIXE法を用いた骨髄腫(MM)細胞内微量元素測定法の確立と抗腫瘍薬添加後の微量元素の変化を検討した。MM細胞株を用いて、プロテアソーム阻害薬のボルテゾミブとアルキル化薬のメルファランを添加した。細胞を集細胞遠心装置にてポリカーボネート膜に接着させ、真空蒸着後、大気micro-PIXE法にて細胞内微量元素を解析した。高濃度ボルテゾミブ処理では、1細胞あたりのCaが増加し、PおよびCaの分布が変化した。アルキル化薬では変化はなかった。集細胞遠心装置を用いたMM細胞の大気Micro-PIXE法による微量元素測定法を確立できた。プロテアソーム阻害薬によるPとCaの変動が確認された。

研究成果の概要(英文)：We introduced an in-air micro-PIXE (micro-PIXE) method in the measurement of trace elements in cultured myeloma cells and analyzed the change of trace elements before and after the treatment with bortezomib (proteasome inhibitor) and melphalan (alkylating agent). The cells were gathered on polycarbonate film with cytocentrifuge and measured with micro-PIXE. We established the micro-PIXE method to analyze trace elements in free cultured cells. Phosphate and Calcium changed by high-dose bortezomib treatment, but not by melphalan.

研究分野：血液検査学

キーワード：多発性骨髄腫 マイクロPIXE 微量元素 ボルテゾミブ

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⁺)(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)。

多発性骨髄腫(MM)は、形質細胞が腫瘍化した疾患であり、骨髄抑制による貧血、感染症、出血、モノクロナール免疫グロブリンの増加による過粘稠度症候群や腎障害、破骨細胞の活性化による骨病変など多彩な臨床症状を呈する。人口の高齢化に伴い患者数は著増しているが、従来の標準療法であるMP療法(メルファラン+プレドニゾロン)では、生存期間中央値は約3年であった。近年プロテアソームインヒビターや免疫調整薬(IMiDs)の導入によりその治療成績は飛躍的に進歩したが、未だ治癒が望めない疾患である。そこで、新たな薬剤の開発や有用な新規薬剤の併用療法の開発が進められている。

新たな薬剤の開発には、MMの生存・増殖や治療抵抗性の機序の解明が必須である。この機序の解明は、様々な方向からアプローチする必要がある。MM細胞における微量元素動態の解析は、これらの解明に有用な手法である。

2. 研究の目的

我々は、MMの治療抵抗性機序の解明と新規治療薬の開発を研究目的としている。本年度は、骨髄腫細胞培養株を用いて、サイトカイン等の増殖刺激前後、および各種治療薬添加前後の微量元素の動態をin-air micro-Particle Induced X-ray Emission(大気マイクロPIXE)分析法を用いて解析する。次年度は、MM患者の抗腫瘍薬(特に新規薬剤)治療前後の骨髄中骨髄腫細胞を解析する。これらの結果より、MM細胞の増殖・維持、治療抵抗性に重要な微量元素の動態を把握し、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たい。

3. 研究の方法

平成26年度は、所有しているMM細胞株11種、白血病細胞株4種、骨髄異形成症候群細胞株1種においてマイクロPIXEにて微量元素含量と分布を解析し、比較する。次いで、骨髄腫細胞株にサイトカインを添加した前後に微量元素の変化を解析する。さらに、抗腫瘍薬を添加した前後で、同様に微量元素の変化を解析し、同時にアポトーシス関連分子を解析する。平成27、28年度は、同意を得たMM患者15名の骨髄穿刺液より、CD138抗体を用いてMM細胞を純化し、マイクロPIXEを用いて微量元素の含量および分布を解析する。さらに各種抗腫瘍薬の治療後において、同様に骨髄穿刺液から純化したMM細胞の微量元素含量と分布の変化を解析する。同時にアポトーシス関連分子の変化を解析する。



写真:分析チャンバー

4. 研究成果

1) MM細胞株と臨床検体において、マイクロPIXEにて細胞内微量元素の含量と分布の解析を開始したが、フリーな細胞であるため試料作成の条件設定が困難であった。マイラー膜に細胞を固着する技術、および約1mmの範囲に細胞を均一に固着させる技術の確立が必要であった。そのため核の無い赤血球において初めに検討した。正常人5例および各種貧血患者15例に用いて、赤血球中の微量元素含量と分布の測定系は確立した。その結果、骨髄異形成症候群等の疾患ではS(硫黄)の赤血球内分布と含量が正常と異なることを見出した。

2) MM細胞株において細胞内微量元素検討した。細胞内微量元素測定に最も影響が少ない希釈液はTris-HNO₃(pH 7.4)であった。細胞数は $5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ /mlが最適であった。以上のように条件設定はほぼ終了し、5種類のMM細胞株における細胞内微量元素の含量と分布測定は終了した。

3) ついで、MM細胞株(KMS11)を用いて、プ

ロテアソーム阻害薬のボルテゾミブを 0 nM、20 nM、50 nM の濃度で添加し、24 時間培養を行った。またアルキル化薬のメルファランを 0 μM、50 μM の濃度で添加し、10 時間培養を行った。細胞を TRIS-HNO₃ (pH 7.4) にて洗浄後、3 × 10⁵ 個/mL に再懸濁後、集細胞遠心装置にて、500 rpm、15 分遠心し、0.5 μm 厚のポリカーボネート膜に細胞を接着させ、真空蒸着させた。量子機構・高崎研のシングルエンド加速器から SB コースのビームを受け取り、マイクロビーム形成を行い、ビームサイズおよびビーム電流を確認後、分析試料を大気 micro-PIXE 分析チャンバーに装着、順次測定し、MM 細胞内微量元素を解析した。1 細胞あたりの元素ヒストグラムの比較では、0 nM と 20 nM では各元素のピークに差は認められなかった。しかし、50 nM では 0 nM に比べ、Ca のピークが高かった (図 1)。さらに、P、S、Cl、Ca の元素分布を比較したところ、0 nM と 20 nM では各元素の分布に差は認められなかった。50 nM では他の濃度と比較し、P 分布が断片化しており、細胞死による核の断片化を反映していると考えられた (図 2)。また、50 nM では Ca 分布の核への集積が認められた。

図 1 . ボルテゾミブ添加後による MM 細胞株 KMS11 の細胞内微量元素の Spectrum。濃グレーは 1 細胞当たりの Spectrum であり、矢印は Ca のピークを示す。

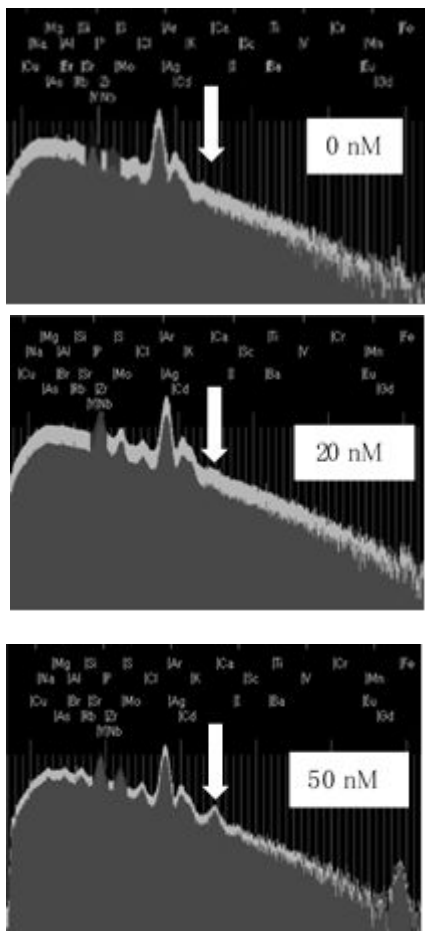
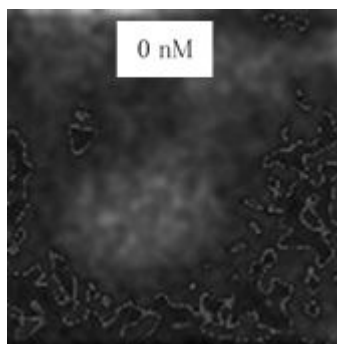
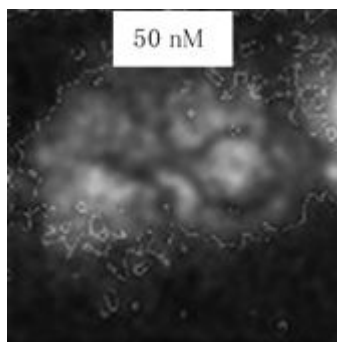


図 2 . ボルテゾミブ添加後による MM 細胞株 KMS11 の細胞内 P 分布。0 nM に比べ 50 nM



は P 分布の高い核 (淡色) の断片化が見られる。



4) 以上より、集細胞遠心装置を応用した MM 細胞の大気 Micro-PIXE 法による微量元素の測定法を確立できた。また、プロテアソーム阻害薬による MM 細胞内の P と Ca の変動が確認されたが、アルキル化薬ではこのような変化は見られなかった。

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)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 5 件)

笠松哲光, 長嶋友海, 山田尚人, 喜多村茜, 佐藤隆博, 江夏昌志, 神谷富裕, 長嶺竹明, 村上博和. 大気 Micro-PIXE 法を用いた多発性骨髄腫細胞内微量元素の動態解析. 第 1 回 QST 高崎研シンポジウム, 2017 年 1 月, 高崎.

金井敬海, 笠松哲光, 栗田真彩, 村田圭祐, 長嶋友海, 山田尚人, 喜多村茜, 佐藤隆博, 江夏昌志, 神谷富裕, 長嶺竹明, 村上博和. 大気 Micro-PIXE 法を用いた多発性骨髄腫細胞内微量元素の動態解析. 第 63 回北関東医学会総会, 2016 年 9 月, 前橋.

笠松哲光, 永井清絵, 長嶋友海, 山田尚人, 喜多村茜, 佐藤隆博, 江夏昌志, 神谷富裕, 村上博和. 大気 micro-PIXE 法を用いた多発性骨髄腫細胞株の微量元素測定. 第 10 回高崎量子応用研究シンポジウム, 2015 年 10 月, 高崎.

永井清絵, 長嶋友海, 笠松哲光, 山田尚人, 喜多村茜, 佐藤隆博, 江夏昌志, 神谷富裕, 長

嶺竹明,村上博和,大氣 micro-PIXE 法を用いた骨髓異形成症候群 (MDS) における赤血球内微量元素の測定. 第 62 回北関東医学会総会, 2015 年 10 月,前橋

笠松哲光,長嶋友海,永井清絵,山田尚人,喜多村茜,佐藤隆博,江夏昌志,神谷富裕,嶺竹明,村上博和,大氣 micro-PIXE 法を用いた骨髓異形成症候群 (MDS) における赤血球内微量元素の測定. 第 9 回高崎量子応用研究シンポジウム,2014 年 10 月,高崎.

〔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

村上博和 (Murakami, Hirokazu)

群馬大学・大学院保健学研究科・教授

研究者番号: 40166260

(2) 研究分担者

神谷富裕 (Kamiya, Tomihiro)

群馬大学・大学院理工学府・教授

研究者番号: 70370385

齋藤貴之 (Saitoh, Takayuki)

群馬大学・大学院保健学研究科・教授

研究者番号: 80375542

長嶺竹明 (Nagamine, Takeaki)

群馬大学・名誉教授

研究者番号: 901805520

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

(4) 研究協力者

()