

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 12 日現在

機関番号：20101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659466

研究課題名(和文) MDS 進展における酸化的 DNA 傷害の意義とその修復を目論んだ鉄キレート療法の確立

研究課題名(英文) Establishment of iron chelation therapy to inhibit the development of MDS

研究代表者

小船 雅義 (Kobune, Masayoshi)

札幌医科大学・医学部・准教授

研究者番号：90336389

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000 円

研究成果の概要(和文)：MDSにおける遊離鉄とそれを介した酸化ストレスの病態生理に与える影響は不明である。本研究では、鉄キレート剤デフェラシロクス投与前後の、末梢血単核球(PBMC)中の8-OHdG量を解析した。MDS患者のPBMCの8-OHdG量は、健常人に比べて有意に高かった。さらに、血清フェリチン量、8-OHdG量および染色体異常との間に、正の相関が認められた。MDS患者のPBMC中の8-OHdG量は、鉄キレート剤投与により有意に減少した。したがって、MDSの病態生理に過剰鉄は関与し、鉄キレート療法が、MDSの病態進行を抑制できる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Most MDS patients eventually require red RBC transfusions for anemia and consequently develop iron overload. Excess free iron in cells catalyzes generation of reactive oxygen species that cause oxidative stress, including oxidative DNA damage. However, it is uncertain how iron-mediated oxidative stress affects the pathophysiology of MDS. We analyzed 8-OHdG levels in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) obtained from MDS patients before and after iron chelator, deferasirox, administration. We showed that the 8-OHdG levels in MDS patients were significantly higher than those in healthy volunteers and were positively correlated with SF and chromosomal abnormalities. Importantly, the 8-OHdG levels in PBMC of MDS patients significantly decreased after deferasirox administration, suggesting that iron chelation reduced oxidative DNA damage. Thus, excess iron could contribute to the pathophysiology of MDS and iron chelation therapy could improve the oxidative DNA damage in MDS patients.

研究分野：血液内科学

キーワード：MDS 8-OHdG 鉄キレート 酸化的DNA損傷

1. 研究開始当初の背景

MDSの発症は、男女比1.5~1.7と男性に多く、発症年齢は若年者からも見られるが40代から患者数が次第に増加し、死亡率では70歳代以上の高齢者で高い。このため、高齢化の進む我が国では患者数が増加してくるものと予測されるため、新規治療法の開発のみならず病気の発症・進展を予防する方策が必要と考えられる。MDSは、造血前駆・幹細胞レベルの異常により発症する疾患であり、造血細胞の遺伝子異常がその発症の主因とされているが、遺伝子異常を惹起する誘因に関しては不明である。最近、申請者らは鉄過剰状態がMDSの白血化と関連することを明らかにしたが(Kiluchi-S, Kobune-M, et al. Int. J. Hematology 2012)、その分子機構は未解決である。このことに関して、申請者らはMDS患者血球における酸化DNA損傷のマーカである8-OHdGの測定を行った結果、健康人に比較し有意に増加していることをpreliminaryながら見出した。これまで申請者らは、肝発癌過程には細胞内フリー鉄が触媒し誘導された活性酸素種(reactive oxygen species; ROS)による酸化DNA損傷が関与する可能性を提唱し、明らかにしてきた(Kobune M 2nd, et al. Cancer Res, 2001; Kobune M 3rd, et al. J Gastroenterol, 2007)。これらの背景から、MDS患者血球内においても遊離鉄により惹起されたROSが病態を進展させ、鉄キレート剤を投与することで、MDSの進展を抑制できる可能性を想定した。

2. 研究の目的

血清フェリチンのみならず、MDS患者血球における酸化DNA損傷のマーカである8-OHdGの測定を行い比較検討する。さらに、8-OHdG 予後因子としての意義、8-OHdG 量と鉄キレートによる造血回復との関連および8-OHdG 量とMDSの発症・白血化との関連8-OHdG 量からみた酸化療法および鉄キレート療法の新たな適応基準について検討することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 末梢血および骨髄細胞の採取

本研究は申請者らの所属施設における倫理委員会で承認済みであり、患者血清、末梢血および骨髄細胞のバンク化を進めている。本研究における患者登録に際しては、倫理委員会で承認された説明書を用い研究内容に対して十分なインフォームドコンセントを行い同意が得られたMDS患者および再生不良性貧血患者等からEDTA・Na2採血管に5mlの末梢血あるいは骨髄を採取する。適時CD34抗体あるいはCD45抗体を用いたblast gating法により、Auto MACSにより腫瘍細胞を分離する。一時-80にて凍結保存する。保険診療でえられた染色体分析結果、血球数、異形細胞数および芽球数を含めデータベース化

する。骨髄生検組織はホルマリン固定して病理組織学的検討および免疫組織学的検討に用いる。末梢血および凍結保存した骨髄細胞からは、後述するごとく、蛋白および高分子DNAを抽出し酸化DNA損傷、SNPsの検討、8-オキソ体およびDNA修復活性(OGG1/MutYH活性)の測定などに用いる。

(2) 8-OHdGの免疫組織学的検討

定法に従い、骨髄組織固定標本の4μm切片を作製し、FITC蛍光標識・抗8-OHdG抗体および抗Ogg1抗体を用いて免疫染色し、flow cytometry(OxyFlow)あるいは共焦点レーザー顕微鏡にてそれらの細胞内分布を検討する。また、分化マーカーや幹細胞マーカーと蛍光多重染色を行うことにより、8-OHdGが蓄積する血球のタイプについて詳細な検討を加える。

(3) 鉄キレート療法後の末梢血細胞および骨髄細胞におけるDNA損傷の定量(8-OHdG定量)

既報(Kato J et al, Cancer Res 2001)に準じて測定する。血球細胞から得られた高分子DNA 5-10μgをnuclease P1で消化した後、未消化の高分子DNAをspin columnで除去精製した後、HPLCで分画してelectrochemical detector (ECD)によって8-OHdGピークを検出する。なお定量には、8-OHdGおよびdG標準品(和光)を同様にロードして行い、dGとの含有比率を算出する。

(4) 末梢血および骨髄細胞におけるROS測定・脂質過酸化反応の評価

常法に準じて血球細胞中のOFR(oxygen free radicals)はRed-CC-1などのMolecular probeと反応させ、FACSCantollあるいはBiozero BZ-8000 蛍光顕微鏡(KEYENCE)を用いて蛍光信号を定量する。

4. 研究成果

それぞれの年度の研究成果の概要は以下のごとくであった。

平成24年度の成果

MDS患者から分離した単核球中の活性酸素をMolecular probeを用いて測定すると共に、ゲノム内の酸化DNA損傷を8-OHdG蛍光染色法を用いて検討した。その結果、MDS患者においては健康人に比し、単核球内の活性酸素が増加していることが示された。さらに8-OHdG蛍光染色の結果、MDS患者においては健康人に比し、8-OHdGが強く染色され、特に血清フェリチン500ng/mL以上を示す鉄過剰状態のMDS患者では、8-OHdGの染色性が増強することが明らかとなった。

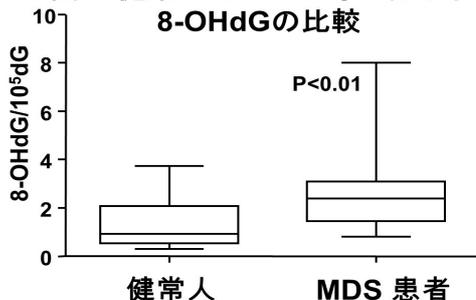
平成25年度の成果

血球内8-OHdGを高速液体クロマトグラフィー・電気化学検出器(HPLC-ECD法)を用いて定量を行った。MDS全症例の末梢血内8-OHdGレ

ペルは、健常人と比較し、有意に高値であった (2.287 ± 1.540 vs. $0.871 \pm 0.877 / 105dG$, $P=0.003$) (図1)。
8-OHdG 量と血清フェリチン値には正の相関が認められた ($r=0.495$, $P=0.003$) (図2)。

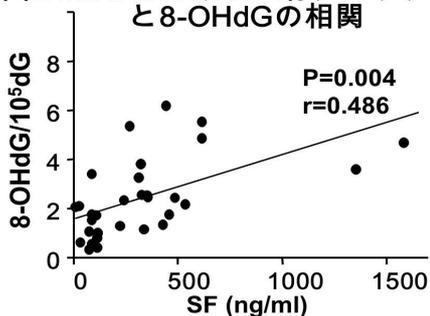
すなわち、鉄過剰が進行する程、酸化的 DNA 損傷が高度になる可能性が示唆された。さらに、High リスク MDS (Int-2 および High) の末梢血球ゲノム内 8-OHdG 量は Low リスク MDS

図1 健常人とMDS血球における 8-OHdGの比較



(Low および Int-1) と比較し有意に高値であった (3.191 ± 1.792 vs. 1.564 ± 0.821

図2 MDSにおける血清フェリチン値と 8-OHdGの相関

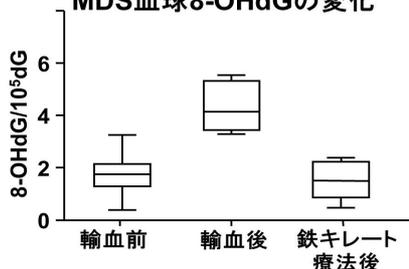


$/105dG$, $P=0.016$)。IPSS の各予後因子である血球減少、骨髓芽球比率および染色体異常別に 8-OHdG を検討した結果、染色体異常の有無のみが 8-OHdG と相関があった (正常核型 vs. 異常核型 : 1.538 ± 0.833 vs. $3.036 \pm 1.756 / 105dG$, $P=0.019$)。MDS 患者末梢血単核球中の 8-OHdG 量は、Deferasirox 投与後に、ほぼ正常値まで回復した (図3)。

平成 26 年度の成果

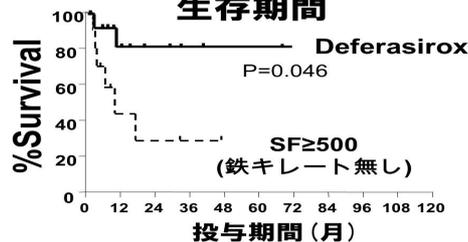
MDS に対する鉄キレート療法の効果を、鉄キレート群 13 例および非鉄キレート群 47 例に分け後方視的に検討した結果、鉄キレート群で 2 例の死亡例が認められたが (感染症および肝不全)、白血病に移行した症例は認められなかった。一方、非鉄キレート群では、観

図3 輸血および鉄キレート療法による MDS血球8-OHdGの変化



察期間内の生存率が 40%で、約 50%に白血病への移行が認められた (Log rank Test, $P<0.05$) (図4)。

図4 Deferasirox投与例の生存期間



平成 24 ~ 26 年度の本研究期間の成果により、MDS 患者では、血球内の酸化ストレスが増加しており、鉄キレート剤により酸化ストレスを軽減できることが示された。また、後方視的ながら、鉄キレート療法群で、白血病移行率が低下することが明らかとなった。今後、MDS において、酸化ストレスが亢進する分子機構を解明することで、新たな治療アプローチを開発する他、前向き臨床試験によって、MDS に対する治療効果を検討する必要があると考えられた。

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)

[雑誌論文] (計 4 件)

1. Iyama S, Murase K, Sato T, Hashimoto A, Tatekoshi A, Horiguchi H, Kamihara Y, Ono K, Kikuchi S, Takada K, Kawano Y, Hayashi T, Miyanishi K, Sato Y, Takimoto R, Kobune M, Mori S, Kato J, Yamashita T, Kato J. Narrowband ultraviolet B phototherapy ameliorates acute graft-versus-host disease by a mechanism involving in vivo expansion of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *Int J Hematol* 2014;99:471-476. 査読有り . DOI : 10.1007/s12185-014-1530-1
2. Ono K, Sato T, Iyama S, Tatekoshi A, Hashimoto A, Kamihara Y, Horiguchi H, Kikuchi S, Kawano Y, Takada K, Hayashi T, Miyanishi K, Sato Y, Takimoto R, Kobune M, Kato J. A novel strategy inducing autophagic cell death in Burkitt's lymphoma cells with anti-CD19-targeted liposomal rapamycin. *Blood Cancer J* 2014;4:e180. 査読有り . DOI : 10.1038/bcj.2014.2
3. Kobune M, Iyama S, Kikuchi S, Horiguchi H, Sato T, Murase K, Kawano Y, Takada K, Ono K, Kamihara Y, Hayashi T, Miyanishi K, Sato Y, Takimoto R, Kato J. Stromal cells expressing hedgehog-interacting protein regulate the proliferation of myeloid neoplasms. *Blood Cancer J* 2012;2:e87. 査読有り .

DOI : 10.1038/bcj.2012.36

4. Kikuchi S, Kobune M, Iyama S, Sato T, Murase K, Kawano Y, Takada K, Ono K, Kaneko Y, Miyanishi K, Sato Y, Hayashi T, Takimoto R and Kato J. Improvement of iron-mediated oxidative DNA damage in patients with transfusion-dependent myelodysplastic syndrome by treatment with deferasirox. *Free Radic Biol Med* 2012;53: 643-648. 査読有り . DOI:10.1016/j.freeradbiomed.2012.06.006

〔学会発表〕(計5件)

1. Horiguchi H, Kobune M, Kikuchi S, Jomen W, Murase K, Iyata S, Iyama S, Sato T, Kamihara Y, Miyanishi K, Sato Y, Hayashi T, Takimoto R, Kato J. Exosomes derived from AML/MDS cells could be involved in stromal dysfunction and bone marrow failure. 56th ASH Annual Meeting and Exposition : 2014 Dec 6-11 : San Francisco, U.S.A
2. Horiguchi H, Kobune M, Kikuchi S, Iyama S, Takada K, Murase K, Ono K, Kamihara Y, Hashimoto A, Tatekoshi A, Hayashi T, Sato T, Miyanishi K, Sato Y, Takimoto R, Kato J. Myelodysplastic syndrome-derived stromal cells support leukemia-initiating cells and contradirectly eliminate normal CD34 + clonogenic cells. 55th ASH Annual Meeting and Exposition : 2013 Dec 7-10 : New Orleans, U.S.A.
3. Kobune M, Kikuchi S, Iyama S, Takada K, Murase K, Ono K, Horiguchi H, Kamihara Y, Hashimoto A, Tatekoshi A, Hayashi T, Sato T, Miyanishi K, Sato Y, Takimoto R, Kato J. Iron chelation therapy could rapidly reduce oxidative DNA damage in CD34+ hematopoietic cells before decrease of serum ferritin level. 55th ASH Annual Meeting and Exposition : 2013 Dec 7-10 : New Orleans, U.S.A.
4. 小船雅義, 菊地尚平, 加藤淳二. 骨髄異形成症候群における鉄代謝異常 第36回日本鉄バイオサイエンス学会学術集会 : 2012年9月1-2日 : 札幌(シンポジウム)
5. Kobune M, Iyama S, Kikuchi S, Horiguchi H, Sato T, Murase K, Kawano Y, Takada K, Ono K, Kamihara Y, Hayashi T, Miyanishi K, Sato Y, Takimoto R, Kato J. Stromal cells expressing hedgehog-interacting protein regulate the proliferation of myeloid neoplasms. 54th ASH Annual Meeting and Exposition : 2012 Dec 8-11

: Atlanta, U.S.A.

〔図書〕(計6件)

1. 小船雅義, 加藤淳二. 瀉血療法. 日本先天代謝異常学会編. 引ける先天性代謝異常症. 遠藤文夫, 井田博幸, 山口清次, 高柳正樹, 深尾敏幸編. 東京: 診断と治療社; 2014. pp152-153.
2. 小船雅義, 加藤淳二. トランスフェリン飽和度. 日本先天代謝異常学会編. 引ける先天性代謝異常症. 遠藤文夫, 井田博幸, 山口清次, 高柳正樹, 深尾敏幸編. 東京: 診断と治療社; 2014. pp119-120.
3. 加藤淳二, 小船雅義, 山田正二. 鉄と造血ビタミンの代謝. 小川聡総編集. 内科学書 改正第8版 血液・造血器疾患神経疾患. 東京: 中山書店; 2013. pp21-27.
4. 小船雅義, 加藤淳二. 特発性鉄芽球性貧血. 日本臨床 別冊 新領域別症候群シリーズ 2013;21:159-162.
5. 小船雅義. 特集 知っておきたい鉄代謝と関連疾患-2鉄代謝のバイオマーカーを整理する. *メディカル・テクノロジー* 2013;41:941-947.
6. 小船雅義, 加藤淳二. 血液疾患アプローチのための解剖生理. 梅田千津子, 池田宇一, 大越教夫編. 病気と薬パーフェクト BOOK2012. 東京: 南山堂; 2012, pp664-667.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小船 雅義 (KOBUNE MASAYOSHI)
札幌医科大学・医学部・准教授
研究者番号 : 90336389

(2) 研究分担者

菊地 尚平 (KIKUCHI SHOHEI)
札幌医科大学・医学部・助教
研究者番号 : 80515792

(3) 研究分担者

井山 諭 (IYAMA SATOSHI)
札幌医科大学・医学部・助教
研究者番号 : 50398319

(4) 研究分担者

加藤 淳二 (KATO JUNJI)
札幌医科大学・医学部・教授
研究者番号 : 20244345