

令和 4 年 5 月 17 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07897

研究課題名（和文）難治性血液腫瘍の中樞神経浸潤に対する新たな低侵襲性治療法の開発

研究課題名（英文）Development of less invasive treatment for central nervous system invasion of refractory hematologic malignancies.

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） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）： 中枢神経系（CNS）に浸潤した悪性リンパ腫に対し、高濃度ビタミンC（VitC）が新たな治療戦略になり得るか検討した。

まず、*in vitro*において、腫瘍細胞周囲の鉄濃度が高いとVitCの抗腫瘍効果が抑制されてしまう一方で、低鉄濃度環境ではVitCの効果が増強されることを確認した。*In vivo*では、脳内の鉄濃度を下げたため、低鉄飼料をマウスに与え、さらに鉄キレート剤を投与してVitCの効果が最大限に発揮される条件を検討した。

その結果、マウス脳内へ悪性リンパ腫細胞を移植したCNS浸潤モデルにおいて、低鉄条件下でのVitCがCNS浸潤悪性リンパ腫の増殖を効果的に抑制できる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

中枢神経系（CNS）へ浸潤した白血病やリンパ腫は、血液脳関門を移行できる薬剤が限られていることもあり、予後不良である。今回の研究結果からは、難治性血液悪性腫瘍のCNS病変に対し、脳内を低鉄環境にしたうえでVitC投与が、将来的に低侵襲性の新たな治療戦略になりうる可能性が示された。

研究成果の概要（英文）： We investigated whether high concentrations of vitamin C (VitC) could be a new therapeutic strategy for malignant lymphoma infiltrating the central nervous system (CNS). *In vitro*, we confirmed that high iron concentration around tumor cells suppresses the antitumor effect of VitC, while the effect of VitC is enhanced in a low iron concentration environment. Next, *in vivo*, mice were fed a low-iron diet to reduce iron concentrations in the brain and were also administered an iron chelator to examine the conditions under which the effects of VitC are maximized. Our results using a mouse model suggest that VitC under low iron conditions may effectively inhibit the growth of CNS lymphoma.

研究分野：血液腫瘍内科

キーワード：高濃度ビタミンC 抗腫瘍効果 中枢神経悪性リンパ腫 鉄キレート

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 二次性に CNS 浸潤をきたした血液悪性腫瘍に対する治療薬は限られている

CNS に原発・浸潤した血液腫瘍の治療には、多くの化学療法薬が BBB を通過できないため、大量に投与すれば BBB を通過して効果を示しうるシタラピン(Ara-C)とメソトレキセートの大量療法が広く用いられているが、高齢者は有害事象が発現しやすく適応困難なことが多い。

CNS 原発の悪性リンパ腫(PCNSL)は、腫瘍細胞の生存と増殖亢進に関わる B 細胞受容体(BCR)のシグナルが持続的に活性化しているため、BCR シグナル伝達に関わる Bruton 型チロシンキナーゼを阻害するイブルチニブや、programmed cell death protein 1 (PD-1)リガンドを高発現しているため、抗 PD-1 抗体のニボルマブなどの新薬の適応が、現在、期待されている。

CNS へ二次性に浸潤した血液腫瘍に対する有望な新治療戦略は、いっぽうで未だない。NF- κ B の恒常的活性化が認められる非胚中心型(non-GCB)リンパ腫や濾過性白血球染色体陽性の急性リンパ性白血病などは CNS 浸潤が多く予後不良であり、新たな治療法の開発が期待されている。

(2) H-VC の抗腫瘍効果は基礎研究結果と臨床報告の間に乖離がある

一度、H-VC の抗腫瘍効果は否定された。1970 年代に、VC を末期の担癌患者に 10g/日で 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、有意な延命効果が認められたと報告され、注目された(Cameron & Pauling. *PNAS* 1976 & 1978)。だが、経口投与のみによる追試でその効果が否定され (Creagan. *N Engl J Med* 1979, Moertel. *N Engl J Med* 1985)、以後しばらくは、H-VC が癌治療において顧みられることはほとんどなかった。

しかし、2000 年代に H-VC の抗癌効果が再評価された。それは、VC は点滴静注(小動物実験では腹腔内投与)においてのみ十分な血中濃度上昇が得られることがわかったためである (Padayatty. *Ann Intern Med* 2004, Chen. *PNAS* 2005)。さらに、H-VC が過酸化水素 (H_2O_2) を発生させて様々な腫瘍細胞に対し選択的に殺細胞効果を示すことがわかり(Chen. *PNAS* 2005)、H-VC は臨床的にも世界で広く行われるようになった(Padayatty. *PLoS One* 2010)。

だが、H-VC の臨床使用は依然として controversial である。それは、様々な腫瘍を対象とした前向き臨床試験で H-VC の安全性は確認されるも、有意な抗腫瘍効果を示す報告が少ないためだ (Hoffer. *Ann Oncol* 2008, Schoenfeld. *Cancer Cell* 2017)。そのような中、前立腺癌細胞株を用いた *in vitro* の検討で、培養液中の鉄濃度が高くなるにつれて VC の抗癌効果が低下・消失することが見出され(「2 本研究の着想に至った経緯など」において詳述)。この現象が生理的レベルの鉄濃度から認められたため、H-VC の基礎研究結果と臨床効果との間の乖離は、*in vitro* と *in vivo* の鉄濃度の差異による可能性が示唆された(Mojić. *Sci Rep* 2014)。

(3) H-VC は血液腫瘍細胞の NF- κ B を選択的に抑制して apoptosis へ誘導する

申請者らは、血液悪性腫瘍に対する H-VC について、これまでに以下の 3 つの知見を報告した。

Kawada. *PLoS One* 2013 : H-VC は、ヒト正常造血細胞の生存・増殖には影響を与えない濃度レベルで、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した。この H-VC の効果は、 H_2O_2 の産生とともに、腫瘍細胞の NF- κ B 活性化抑制を介する HIF-1 α 発現抑制が大きく関与していた。

Kawada. *Tokai J Exp Clin Med* 2014 : 再発リンパ腫症例を対象にした H-VC の第 I 相臨床試験において、安全性に問題無く非投与時に比して 250 倍以上の VC の血中濃度上昇が得られた。

Tsuma-Kaneko & Kawada. *Sci Rep*, 2018 : さらに、基礎実験と臨床との H-VC の効果の乖離を埋めるべく行った研究で、血液腫瘍に対する効果は、周囲に鉄が多いと減弱・消失するが、逆に鉄

を減じることで増強できることを *in vitro* ならびに *in vivo* において確認した。

2．研究の目的

前述したように、中枢神経系(CNS)へ浸潤した白血病やリンパ腫は、血液脳関門 (BBB) を移行できる薬剤が限られていることもあり、予後不良である。BBB は、GLUT-1 を介して vitamin C (VC)を CNS 内に取り込み、高濃度に保持する機構が備わっている (Agus. *J Clin Invest* 1997)。申請者は、様々な血液腫瘍細胞を用いて、高濃度の VC (H-VC) が、過酸化水素の発生と NF- κ B 抑制による腫瘍選択的な apoptosis 誘導と増殖抑制効果を発揮することを明らかにした(Kawada. *PLoS One* 2013)。さらに、これらの H-VC の血液腫瘍に対する効果は、周囲に鉄が多いと減弱・消失するが、逆に鉄を減じると増強することを確認した (*Scientific Reports*, 2018)。以上を踏まえ、本研究では NF- κ B が病態に関与している難治性腫瘍の CNS 病変に対し、脳内を低鉄環境にしたうえでの H-VC 投与が低侵襲の新たな治療戦略になりうるか検討した。

3．研究の方法

(1) まず、*in vitro* において、低鉄条件下において H-VC のヒト造血器悪性腫瘍細胞株の生存・増殖に対する抑制効果を確認した。さらに、そのメカニズムも検討した。

(2) ついで、腫瘍細胞株を免疫不全マウスの脳内に移植し、CNS 浸潤モデルを作成するとともに、鉄キレート剤の投与により脳内を低鉄環境とする条件検討を行った。

(3) 最後に、CNS 浸潤モデルマウスにおいて、低鉄環境下での H-VC の CNS 浸潤抑制効果を検討した。

4．研究成果

(1) H-VC は *in vitro* においてヒト白血病細胞株、悪性リンパ腫細胞株の生存・増殖に対して顕著な抑制効果を示すことを確認した。メカニズムとして、既知の過酸化水素発生によるものだけでなく、腫瘍細胞 NF- κ B の活性化抑制によって腫瘍選択的な殺細胞効果を発揮することを確認した。さらに、やはり鉄濃度が高いと H-VC の抗腫瘍効果がキャンセルされてしまうことを確認した。いっぽうで、低鉄濃度環境にすることにより、鉄によりキャンセルされていた H-VC の抗腫瘍効果が認められるようになることも確認した。

(2) ついで行った *in vivo* における検討では、脳内を低鉄環境とするために鉄キレート剤とともに鉄含有量を低くした飼料も用いて高濃度 H-VC の効果を最大限に発揮できる条件を工夫した。鉄キレート剤には、BBB を通過可能な deferiprone を選択した。

(3) マウス脳内へ造血器悪性腫瘍細胞を移植して CNS 浸潤モデルを作成し、低鉄条件下で検討した結果、H-VC が CNS 浸潤を来した造血器悪性腫瘍細胞の増殖を効果的に抑制できる可能性が今回の研究から示唆された。今後、研究成果を論文として報告する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hara Ryujiro, Onizuka Makoto, Kikkawa Eri, Shiraiwa Sawako, Harada Kaito, Aoyama Yasuyuki, Ogiya Daisuke, Toyosaki Masako, Suzuki Rikio, Machida Sinichiro, Ohmachi Ken, Ogawa Yoshiaki, Kawada Hiroshi, Matsushita Hiromichi, Ando Kiyoshi	4. 巻 100
2. 論文標題 Association between measurable residual disease kinetics and outcomes of Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Annals of Hematology	6. 最初と最後の頁 2479 ~ 2486
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00277-021-04587-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kawakami Shohei, Tsuma-Kaneko Mitsuyo, Sawanobori Masakazu, Uno Tomoko, Nakamura Yoshihiko, Matsuzawa Hideyuki, Suzuki Rikio, Onizuka Makoto, Yahata Takashi, Naka Kazuhito, Ando Kiyoshi, Kawada Hiroshi	4. 巻 12
2. 論文標題 Pterostilbene downregulates BCR/ABL and induces apoptosis of T315I-mutated BCR/ABL-positive leukemic cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 704
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-04654-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔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	安藤 潔 (ANDO KIYOSHI) (70176014)	東海大学・医学部・教授 (32644)	
研究分担者	鈴木 利貴央 (SUZUKI RIKIO) (70514371)	東海大学・医学部・講師 (32644)	

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
---------	---------