

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24780304

研究課題名(和文) イヌ組織球増殖性疾患に対する抗マラリア薬アルテミシニン誘導体の評価

研究課題名(英文) Evaluation of antineoplastic activity of antimalarial drug artemisinin against canine histiocytic proliferative complex.

## 研究代表者

細谷 謙次 (Hosoya, Kenji)

北海道大学・(連合)獣医学研究科・准教授

研究者番号：50566156

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：悪性組織球症は、人においてみられるまれな組織球増殖性疾患であり有効な治療法が確立されていない。一方、犬においては同様の病態である組織球性肉腫が比較的好発し、優れた自然発生モデルと考えられる。犬組織球性肉腫および人悪性組織球症では、高フェリチン血症の発生が知られており、腫瘍細胞による鉄の取り込み促進が腫瘍の増殖に関与しているとされる。マラリア治療薬として知られるアルテミシニンは、鉄と反応してフリーラジカルを発生する薬剤である。本研究では、各種犬腫瘍細胞株においてアルテミシニンが抗腫瘍効果を示すことを確認し、各腫瘍細胞株のアルテミシニン感受性と鉄代謝タンパクの発現量との関係を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Malignant histiocytosis is a rare disease in humans, where neoplastic histiocytes proliferate uncontrollably. There is currently no known effective treatment option. On the other hand, a similar disease, known as histiocytic sarcoma, is commonly diagnosed in dogs, indicating a ideal naturally occurring tumor model for human's counterpart. Both diseases are known to cause hyperferritinemia, suggesting that these tumor cells exploit cellular systems to uptake iron molecules, which is essential for cells to proliferate. Antimalarial drug artemisinin generate cytotoxic free radicals by reacting with iron molecules. This study demonstrated that artemisinin effectively inhibited tumor cell proliferation in several canine cell lines, and explored the relationship between artemisinin-sensitivity of each cell lines and the expression level of proteins related to iron metabolism and uptake.

研究分野：腫瘍

キーワード：腫瘍 組織球性肉腫 アルテミシニン 犬

1. 研究開始当初の背景

腫瘍細胞の多くがトランスフェリン受容体を過剰発現し、細胞内に多くの鉄分子を有することは広く知られている。申請者らは、2004年より、細胞内の鉄分子と反応してフリーラジカルを生成するアルテミシニン誘導体の抗腫瘍効果に注目し、研究を続けてきた。また、申請者らは、ヒト悪性腫瘍疾患の動物モデルとして、イヌにおける自然発生腫瘍の利用価値を高く評価してきた。イヌにおける自然発生腫瘍は、免疫能欠如マウスにおける移植腫瘍モデルに比べ、よりヒト自然発生腫瘍に類似した病態を示し、動物モデルとしては極めて優れている。アルテミシニン誘導体は、その独特の細胞障害メカニズムから、他の抗腫瘍物質にはない、高い腫瘍特異性を示す。これまでの研究により、骨肉腫 (Hosoya, et al., *Am J Vet Res* 2008)、膀胱癌 (Hosoya, 未発表データ)、アポクリン腺癌 (Hosoya, 未発表データ)、前立腺癌 (Hosoya, 未発表データ) など、複数のイヌ腫瘍細胞株において、高い細胞障害効果が認められている。申請者らが2008年に実施した担癌イヌを用いた *In vivo* 試験においては、膀胱癌症例における腫瘍縮小効果を認めている (Hosoya, et al., 米国獣医内科学会招待口演, 2008)。また、申請者らは、イヌにおける頭蓋骨腫瘍やリンパ腫においても、臨床的效果を確認しており (未発表)、本化合物の臨床応用へ向けた更なる研究に期待が持たれる。

ヒトにおける悪性組織球症 (Malignant histiocytosis) は、体内の複数の臓器における組織球の異常な増殖を特徴とする悪性疾患であるが、現在用いられている化学療法では予後不良であり、新規の治療法が望まれている疾患である。しかしながら、ヒトにおける本疾患の発生は極めて稀であり、その病態および治療法に関する研究の進行は遅い。一方、イヌにおいてはパーニーズ・マウンテン・ドッグなど、遺伝的素因を持つ特定の犬種において本疾患が多くみられ、自然発生動物モデルとして研究対象となると申請者らは考える。申請者らのグループでは、これまでイヌに自然発生した悪性組織球症を用いて、培養細胞株の樹立、細胞表面抗原の分析、mRNA 発現パターンの分析などの基礎研究を行ってきた (Yamazaki et al., 第150回日本獣医学会, 2010)。

ヒトおよびイヌの悪性組織球症症例においては、鉄保存蛋白であるフェリチンの増加が認められる。これは、もともと細網内皮系由来の本腫瘍細胞が、血球貪食などを通じて細胞内に鉄分子を多く貯蔵する性質を残しているためと考えられている。このため、細胞内鉄分含有量に比例した細胞障害性を呈するアルテミシニン誘導体は、ヒト悪性組織

球症の新規治療薬となりうる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究では、アルテミシニン誘導体の悪性組織球症治療薬としての可能性を探る基礎研究として、イヌ悪性組織球症例における鉄代謝系の分析、本腫瘍細胞におけるトランスフェリン受容体・フェリチン・細胞内総鉄含有量の分析および培養細胞および担癌自然発生腫瘍イヌモデルにおける本化合物の抗腫瘍効果の分析等を目的とした。

3. 研究の方法

(1) **イヌ組織球性肉腫組織内の鉄含有量の評価**: 自然発生した組織球性肉腫のイヌ7例および組織急性肉腫以外の腫瘍9例を実験に用いた。組織内鉄含有量の測定法として、ベルリン・ブルー染色法および誘導結合プラズマ質量分析法 (ICP-MS) を用いた (図1)。

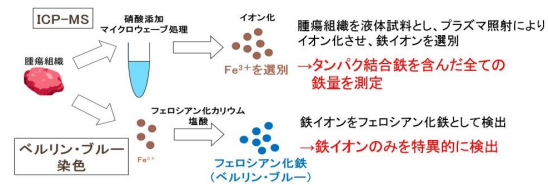


図1. 腫瘍組織内鉄含有量測定法。

(2) **イヌ組織球性肉腫に対する細胞障害性の評価**: 自然発生したイヌ悪性組織球性肉腫組織より分離培養した腫瘍細胞株 (CHS-4) およびイヌ悪性組織球増殖症マクロファージ由来細胞 (DH82) を用い、3-(4,5-ジメチル-2-チアゾリル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムプロミド (MTT) 測定法にて次ヒドロアルテミシニンの細胞障害性を評価した。また、アポトーシス誘導効果を、蛍光顕微鏡を用いた FITC 標識アネキシン V 染色にて行った。

(3) **アルテミシニンの細胞障害性効果と細胞内鉄量の相関性の評価**: 細胞内に直接取り込まれる鉄分 (クエン酸第三鉄アンモニウム) およびトランスフェリン受容体を介して取り込まれる鉄分 (ホロトランスフェリン) を添加、または培養液中の鉄をキレートすることによるアルテミシニンの細胞障害性の変化を MTT 測定法で評価した。

(4) **アルテミシニン感受性と鉄代謝因子発現量の関係の評価**: *In vitro* でのアルテミシニン感受性の違いを推測する一手段として、フェリチン、トランスフェリン受容体といった鉄代謝、取り込みに関連するタンパクの発現量を、mRNA 量をリアルタイム PCR 法にて判定量することで評価した。

(5) **担癌マウスモデルの作成と *In vivo* でのアルテミシニンの抗腫瘍効果の評価**: 培養腫瘍細胞をヌードマウス皮下に移植し、腫瘍が生着した個体に対しアルテミシニンを24時間ごとに腹腔内投与し、腫瘍のサイズを継続的に測定した。

(6) **正常イヌにおけるアルテミシニン製剤の経口投与後の血中濃度の測定**: 現在、アルテミシニン製剤は薬品としての認可を得な

いま小動物臨床において経口投与用の剤形で販売されている。申請者は、過去の予備的研究からアルテミシニンが腸から吸収される率は極めて低いと考えており、これを証明するために再度確認試験を行った。正常犬6頭に対し、3頭ずつそれぞれ異なる用量のアルテミシニンを経口投与し、その後の血中濃度の推移を HPLC-MS/MS 法を用いて24時間にわたり測定した。

4. 研究成果

(1) イヌ組織球性肉腫組織内の鉄含有量の評価

ICP-MS 法で測定した全鉄含有量では、組織球性肉腫組織とその他の腫瘍組織との測定値に有意差は認められなかった (図2, p=0.21)。これは、赤血球中のヘモグロビンなど、細胞外の鉄含有成分の影響が大きいと考えられた。一方、細胞内での利用が可能なイオン化状態の鉄のみを染色するベルリンブルー染色では、組織球性肉腫以外の腫瘍では1例を除いて陰性を示したのに対し、組織急性肉腫 (n=7) ではすべてのサンプルにおいて陽性を示した (図3)。

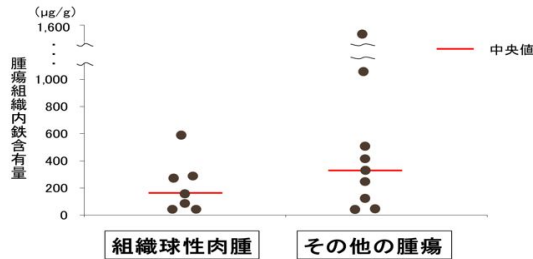


図2 .ICP-MS 法による組織内鉄量の測定値。

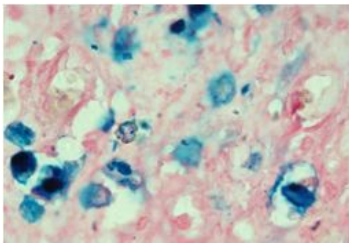


図3. 組織球性肉腫細胞で認められたベルリンブルー陽性反応 (青色が腫瘍細胞)。

(2) イヌ組織球性肉腫に対する細胞障害性の評価

CHS-4、DH82 両細胞株ともに同様の反応性を示し、濃度依存性に細胞生存率の低下が認められた (図4)。

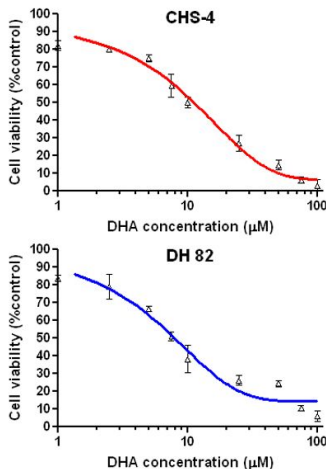


図4. イヌ組織球性肉腫細胞2株での細胞生存率の濃度依存性の低下。

また、組織球性肉腫以外の腫瘍細胞株も含めた追加実験において、イヌ骨肉腫、イヌ組織球性肉腫、イヌ移行上皮癌、イヌ血管肉腫の順にアルテミシニン感受性が高く、イヌ悪性黒色腫、マウス扁平上皮癌細胞ではアルテミシニンの直接暴露では細胞障害性は認められなかった (図5)。

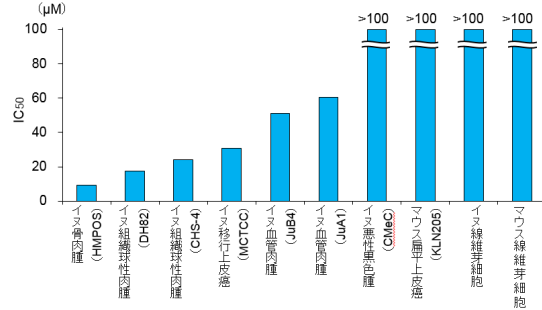


図5. 各腫瘍細胞株および正常線維芽細胞でのアルテミシニン感受性の比較。

また、イヌおよびマウスの正常線維芽細胞では細胞障害性は認められなかった。アネキシンV染色法では、濃度依存性に陽性細胞の割合が高くなり、アポトーシスの誘導が確認された (図6)。

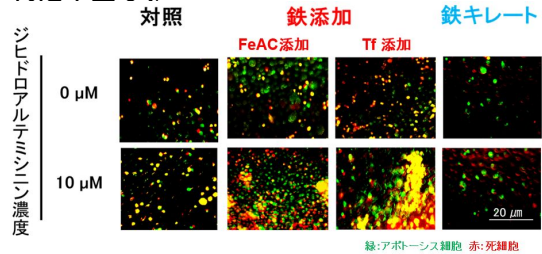


図6. アネキシンV染色法によるアポトーシス細胞の検出。

(3) アルテミシニンの細胞障害性効果と細胞内鉄量の相関性の評価

鉄キレート状態では、アルテミシニンはすべての細胞株において一切の細胞障害性を示さず、本物質の細胞障害性が鉄との反応を介していることが確認された (図7)。

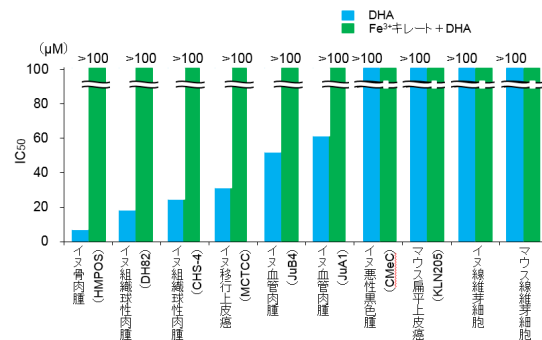


図7. 鉄キレート条件における各細胞株のアルテミシニン感受性の変化。非キレート条件 (青) に対し、キレート条件 (緑) ではすべての細胞でアルテミシニンは効果を失っている。

一方、鉄添加系では、添加する鉄の形状 (第三鉄イオンとして、またはトランスフェリン結合型として) によってアルテミシニンの効果の増強度合が異なり、細胞株により結果が

異なった (図 8)。

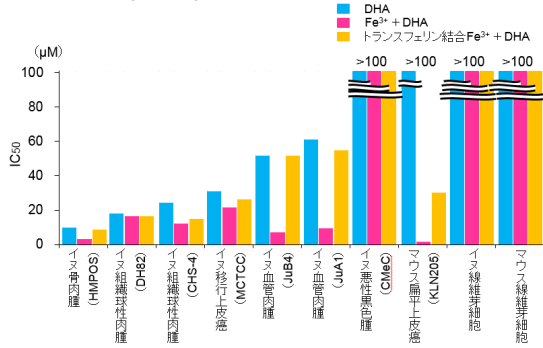


図 8 . 各種鉄添加実験におけるアルテミシニン感受性の変化。

(4) **アルテミシニン感受性と鉄代謝因子発現量の関係の評価**：トランスフェリン受容体 mRNA 発現量を、正常線維芽細胞での発現量を基準として相対測定したところ、マウス扁平上皮癌細胞株で優位な発現 (正常の約 9 倍) を認めた (図 9)。また、イヌ組織球性肉腫 2 株およびイヌ血管肉腫 2 株ではフェリチン H 鎖または L 鎖 mRNA 発現量の高値を認めた (図 10)。これら腫瘍は臨床例において高フェリチン血症が認められている腫瘍であり、鉄代謝因子が腫瘍の鉄の取り込みおよび増殖に関与していると示唆されている腫瘍である。

トランスフェリン受容体 mRNA 相対発現量

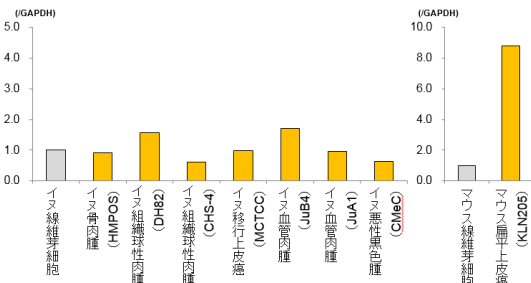


図 9 . 各細胞株におけるトランスフェリン受容体 mRNA の相対発現量。

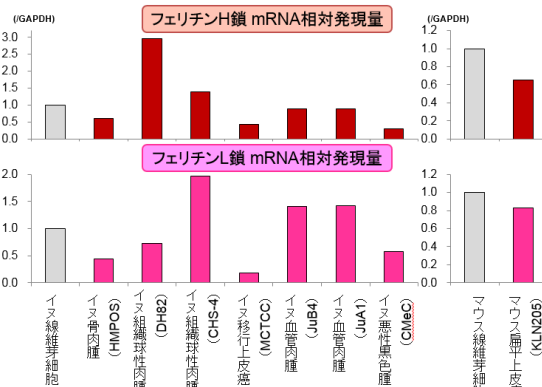


図 10 . 各細胞株におけるフェリチン H 鎖および L 鎖 mRNA の相対発現量。

(5) **担癌マウスモデルの作成と In vivo でのアルテミシニンの抗腫瘍効果の評価**：担癌マウスモデルの作成が可能であった、イヌ組織球性肉腫細胞 (CHS-4) およびマウス扁平上皮癌細胞について、実験を実施した。両腫瘍

細胞株ともに、アルテミシニン投与群で有意な腫瘍組織の成長遅延が認められた (図 11 および図 12)。特に、*in vitro* 試験ではほとんどアルテミシニンに対する感受性を認めなかったマウス扁平上皮癌細胞において抗腫瘍効果を認めたことは注目すべき点である。同細胞株では、トランスフェリン受容体の著しい高発現を認めており、かつアルテミシニン単独での細胞毒性は認めなかったものの、第 3 鉄イオンおよびトランスフェリン結合型鉄を添加した場合に著しい細胞障害性の増強を認めており、*in vivo* においてはホスト由来のトランスフェリン等が存在する環境のため、*in vitro* での感受性スクリーニング結果との相違につながったものと考えられる。

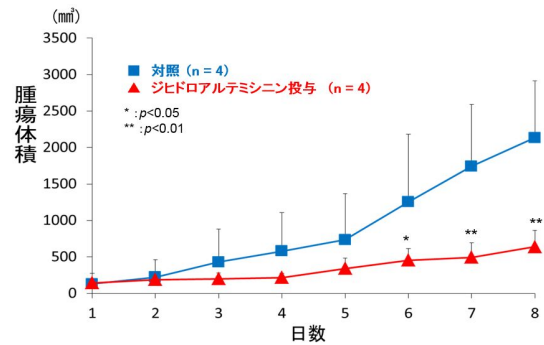


図 11 . イヌ組織球性肉腫 (CHS-4) 移植モデルにおけるアルテミシニンの腫瘍増殖抑制効果。

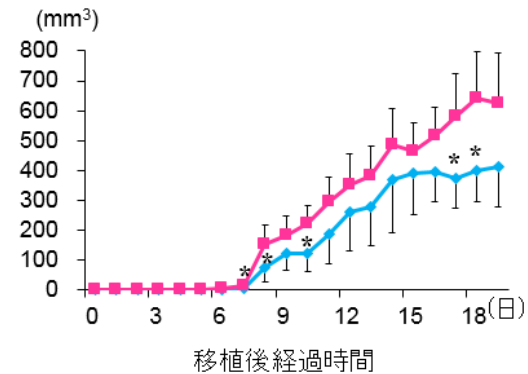


図 12 . マウス扁平上皮癌細胞移植モデルにおけるアルテミシニンの腫瘍増殖抑制効果。

(6) **正常イヌにおけるアルテミシニン製剤の経口投与後の血中濃度の測定**：正常犬においてアルテミシニン経口投与後の血中濃度を測定したところ、投与直後を含むすべてのタイムポイントにおいて、アルテミシニンおよびその代謝産物候補物質は血中からは検出されなかった (<1nM)。これは、本研究の以前に申請者らが実施した予備研究の結果を異なる測定法で裏付けたものであり、現在使用されているアルテミシニンの剤形・投与経路が不適切であることを示すものである。

## 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 1 件)

Hosoya K, Couto CG, London CA, Kisseberth WC, Phelps MA, Dalton JT.

Comparison of high-dose intermittent and low-dose continuous oral artemisinin in dogs with naturally occurring tumors. Journal of American Animal Hospital Association. 第 50 巻、2014 年、390-395 頁、査読あり

〔学会発表〕(計 1 件)

永田理沙、細谷謙次、高木哲、奥村正裕  
イヌ組織球性肉腫の細胞内鉄量および鉄反応性薬剤次ヒドロアルテミシニンの細胞障害効果の検討

第 155 回日本獣医学会学術集会(東京)、東京大学駒場キャンパス、平成 25 年 3 月 28 日～30 日

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

細谷 謙次 (HOSOYA, Kenji)

北海道大学・大学院獣医学研究

科・准教授

研究者番号：50566156