

平成 2 6 年 6 月 1 1 日現在

機関番号 : 1 7 7 0 1

研究種目 : 若手研究(B)

研究期間 : 2012 ~ 2013

課題番号 : 2 4 7 9 0 6 0 2

研究課題名 (和文) M P O阻害剤によるベンゼン・放射線誘導骨髓障害、A M L 発がんの予防

研究課題名 (英文) Prevention of benzene (or radiation) induced acute myeloid leukemia (or bone marrow failure) by myeloperoxidase inhibitor

研究代表者

西川 拓朗 (Nishikawa, Takuro)

鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・助教

研究者番号 : 9 0 5 3 5 7 2 5

交付決定額 (研究期間全体) : (直接経費) 3,400,000 円、(間接経費) 1,020,000 円

研究成果の概要 (和文) : ベンゼンの骨髓毒性とミエロペルオキシダーゼ (M P O) の関係を明らかにするためにヒト骨髓細胞株にベンゼン代謝物の一つであるベンゼントリオール (B T) を曝露し、M P O阻害下、非阻害下における遺伝子の発現変動をマイクロアレイ法で網羅的に、アポトーシス誘導はフローサイトメトリー法で解析した。B T曝露でアポトーシスが生じ、1213遺伝子の発現が変動し、アポトーシス、抗アポトーシス、細胞増殖、炎症、細胞周期関連遺伝子の発現が上昇した。しかし、M P O阻害で、これら遺伝子の発現変動、アポトーシス誘導は劇的に抑制された。M P Oはベンゼン骨髓毒性のリスク評価や予防における分子マーカーとなり得る。

研究成果の概要 (英文) : While it is known that benzene induces myeloid leukemia in humans, the mechanism has as yet to be clarified. Previously, we suggested that myeloperoxidase (MPO) was the key enzyme because it promotes generation of powerful oxidant hypochlorous acid which reacting with DNA. In our study, using a whole-human-genome oligonucleotide microarray, we analyzed the genome-wide expression profiles of HL60 human promyelocytic cell lines exposed to 1,2,4-benzenetriol (BT) with or without MPO inhibition. The microarray analysis revealed that 4h exposure to BT changed the expression in HL60 cells of 1213 genes associated with transcription, RNA metabolic processes, immuneresponse, apoptosis, cell death, and biosynthetic processes, and that these changes were dramatically lessened by MPO-specific inhibition. Gene expression profiles along with GO and KEGG pathway annotation analysis suggest that there maybe a role for MPO as an examination marker or in prophylaxis for chemical carcinogenesis.

研究分野 : 医歯薬学

科研費の分科・細目 : 社会医学・衛生学

キーワード : ベンゼン 発がん ミエロペルオキシダーゼ 活性酸素 マイクロアレイ 急性骨髓性白血病

1. 研究開始当初の背景

急性骨髄性白血病 (AML; acute myeloid leukemia) は、治療成績が向上してきたとはいえ、依然 4 割以上の死亡率がある難治致死性の疾患のひとつである。また、治癒したとしても本人や家族の精神的・経済的負担・生活の質の低下などを考えると、発症をできるだけ予防することが理想である。化学物質では、詳細な機序はわかっていないがベンゼン曝露が、AML 発症と強い因果関係があることが古くから疫学的に明らかにされている。また、ベンゼンは発がん状態になる以前に、高率に骨髄機能の低下を起こすことが知られている。

好中球や単球など骨髄系細胞のみで合成・分泌されるヘム酵素の**ミエロペルオキシダーゼ (MPO)**は、活性酸素種 (ROS; Reactive oxygen species) 産生に重要な役割を担っている。**MPO は、過酸化水素 (H₂O₂) と塩素イオンから強力な活性を有する ROS の一つである次亜塩素酸 (HOCl) を産生する反応を触媒する。**HOCl は、宿主に侵入する病原微生物などに対する殺菌作用を有し、免疫機構の一端を果たす一方で、宿主組織の蛋白質、脂質、核酸などに対して損傷 (ハロゲン化) を起こす。そして、**ハロゲン化 DNA (ハロゲン化ストレス) は、ジェネティックにも、エピジェネティックにも変異をきたし、発がん強い関連があるとの報告が近年多数みられている。**

2. 研究の目的

我々はベンゼン代謝物の一つである 1, 2, 4-benzenetriol (BT) を曝露すると MPO が HOCl の産生を促進し、生じた HOCl が DNA やタンパク質をハロゲン化し発がんへと導く可能性があることを報告した¹⁾。ベンゼンの骨髄毒性と、MPO の関係を明らかにするためにヒト骨髄細胞株 (HL60) に BT を曝露し、MPO 阻害下、非阻害下における遺伝子の発現変動、アポトーシスの誘導を解析した。

3. 研究の方法

MPO 特異的な阻害剤 4-aminobenzoic acid hydrazine (ABAH) を処理、非処理の HL-60 に 50 μ M の BT を曝露し 1 時間、4 時間後の遺伝子発現をマイクロアレイ法で網羅的に解析した。その結果をもとに Database for annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) を使い、Gene Ontology (GO) 及び Pathway 解析を行った。統計学的解析は Fisher's exact test により $p < 0.05$ を有意とみなした。さらにマイクロアレイの結果を検証するために KEGG pathway 解析で最も発現上昇が見られた上位 20 遺伝子の発現を Real time PCR で確認した。

HL60 細胞の MPO を ABAH あるいは siRNA で阻害後、BT に 8 時間曝露し、アポトーシスの誘導を Annexin V 及び propidium iodide の二重染色によりフローサイトメトリーで測定した。MPO を発現していないヒトリンパ

球細胞株 (U937) においても同様にアポトーシスの誘導を評価した。統計学的解析は non-parametric Wilcoxon test を行い $p < 0.05$ を有意とみなした。

4. 研究成果

50,599 遺伝子の発現変動データを基に解析を行った。BT 曝露 1 時間で 1214、4 時間曝露では 1213 遺伝子もの発現変動が確認された (1 時間及び 4 時間後の発現促進遺伝子数はそれぞれ 751、817、また発現抑制遺伝子数はそれぞれ 463、396、Z-score > 2.0) (表 1)。

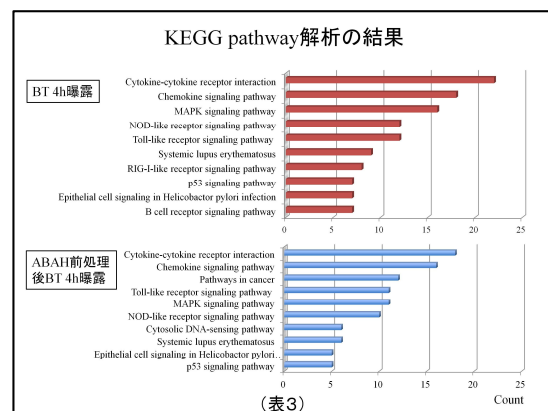
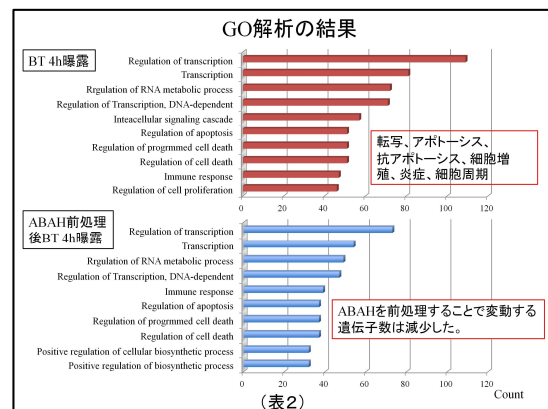
50,599 遺伝子の発現変動を測定できた。

	BT		ABAH+BT	
	1 h	4 h	1 h	4 h
Up-regulation	751	817	175	406
Down-regulation	463	396	50	110
Total	1214	1213	225	516

MPO、ただ一つを阻害しただけで、発現が変動した遺伝子の数は劇的に減少した。

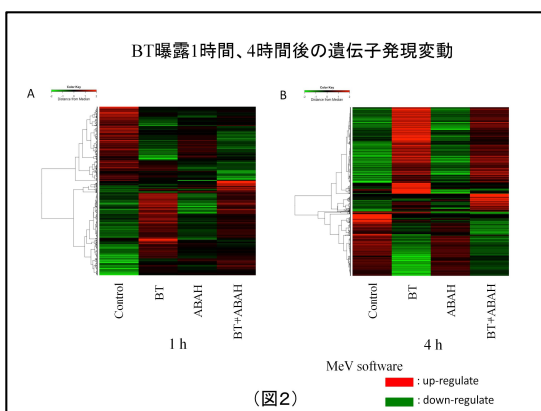
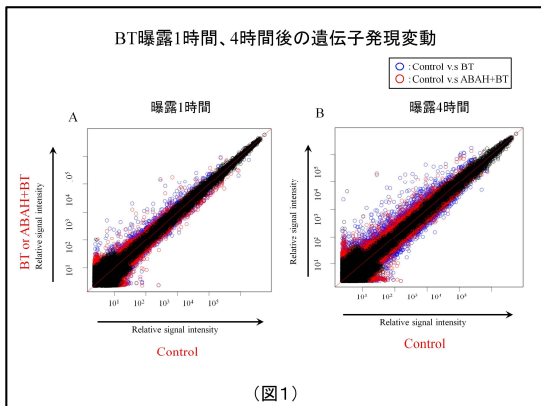
(表 1)

GO 及び KEGG Pathway 解析の結果、アポトーシス、抗アポトーシス、細胞増殖、炎症、細胞周期関連遺伝子の発現が BT 曝露により有意に上昇していた (表 2、3)。

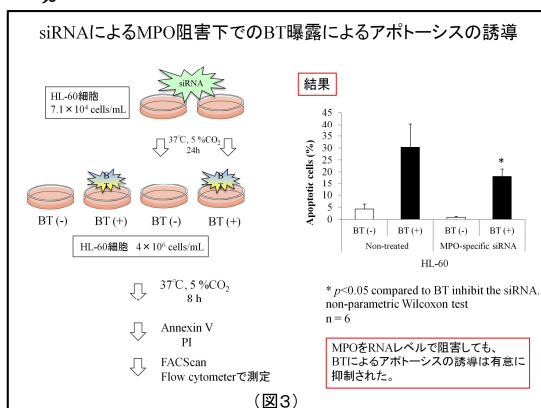


しかし、MPO を ABAH で阻害しただけで、これら遺伝子の発現増多は劇的に抑制された

(表2、3)(図1はドットグラフで、図2はヒートマップを用いてBT曝露1時間、4時間後の遺伝子発現変動をMPO阻害の有無を含めて図示した。)



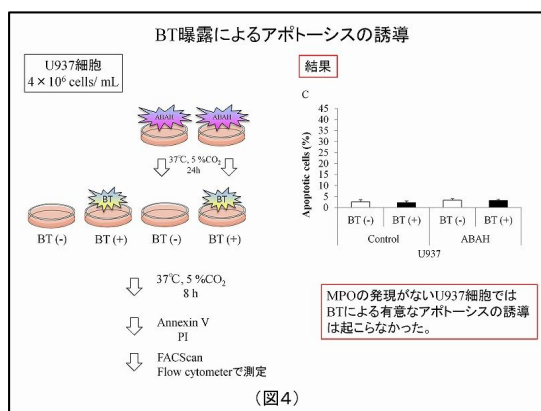
MPO を ABAH により蛋白レベルで阻害した HL60 細胞、siRNA により RNA レベルで阻害した HL60 細胞、両者ともに、BT 曝露によるアポトーシスの誘導は有意に抑制された(図3)



MPO 未発現の U937 細胞においては、BT 曝露によるアポトーシスの有意な誘導は全く生じなかった(図4)

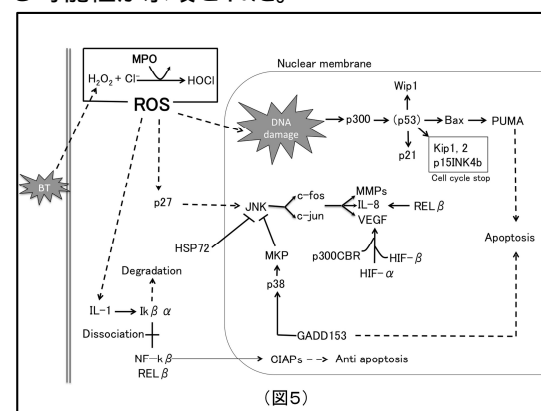
【考察】

BT 曝露により転写、アポトーシス、抗アポトーシス、細胞増殖、炎症、細胞周期関連遺伝子の発現が上昇していた。シグナル伝達経路を描いてみると(図5) BT 曝露により大きく2つの経路、アポトーシスに向かう経



路と抗アポトーシスに向かう経路が促進されていることが判明した。アポトーシスに向かう経路はベンゼン曝露による骨髄抑制(再生不良性貧血)、抗アポトーシスに向かう経路は発がん(白血病)につながると考えられた。そして、ABAHでMPOという低分子酵素を阻害するだけで、上記の発現変化は劇的に抑えられた。また、HL60細胞はp53の発現がないにもかかわらず、今回の研究では、その下流の遺伝子に有意な発現変動がみられた。これはp53シグナル以外の経路を介してアポトーシスを導いていると考えられた。

MPOはベンゼン発がんにおいて重要な分子であり、化学発がんのリスク評価や予防における生物学的な分子マーカーとして使用できる可能性が示唆された。



参考文献

1) Nishikawa T, et al. Environ Health Perspect. 120(1):62-67, 2012.

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6件)

- Miyahara E, Nishikawa T, Takeuchi T, Yasuda K, Okamoto Y, Kawano Y, Horiuchi M. Effect of myeloperoxidase inhibition on gene expression profiles in HL-60 cells exposed to 1, 2, 4, -benzenetriol. Toxicology. 査読有り, 20;317:50-57, 2014. DOI:10.1016/j.tox.2014.01.007.

2. Inagaki J, Fukano R, **Nishikawa T**, Nakashima K, Sawa D, Ito N, Okamura J. Outcomes of immunological interventions for mixed chimerism following allogeneic stem cell transplantation in children with juvenile myelomonocytic leukemia. *Pediatr Blood Cancer*. 査読あり 60;1:116-120, 2013. DOI:10.1002/pbc.24259.
3. Kodama Y, Okamoto Y, Nishi J, Hashiguchi S, Yamaki Y, Kurauchi K, Tanabe T, Shinkoda Y, **Nishikawa T**, Suda Y, Kawano Y. Ramsay Hunt Syndrome in a Girl With Acute Lymphoblastic Leukemia During Maintenance Therapy. *J Pediatr Hematol Oncol*. 査読あり 35(5):e224-225, 2013. DOI: 10.1097/MPH.0b013e3182830d30.
4. Sawa D, **Nishikawa T**, Nakashima K, Morita H, Ito N, Fukano R, Okamura J, Inagaki J. Recurrent pulmonary edema after umbilical cord blood transplantation in a patient with infant acute lymphoblastic leukemia *Rinsho Ketsueki*. 査読あり 54(3):273-278, 2013. https://www.jstage.jst.go.jp/article/rinketsu/54/3/54_273/_article
5. **Nishikawa T**, Inagaki J, Nagatoshi Y, Fukano R, Nakashima K, Ito N, Sawa D, Kawano Y, Okamura J. The second therapeutic trial for children with hematological malignancies who relapsed after their first allogeneic SCT: long-term outcomes. *Pediatr Transplant*. 査読あり 16;7: 722-728, 2012. DOI:10.1111/j.1399-3046.2012.01737.x.
6. **Nishikawa T**, Nakashima K, Fukano R, Okamura J, Inagaki J. Successful treatment with plasma exchange for disseminated cidofovir-resistant adenovirus disease in a pediatric SCT recipient. *Bone Marrow Transplant*. 査読あり 47;8:1138-1139, 2012. DOI:10.1038/bmt.2011.227.

〔学会発表〕(計6件)

1. **西川拓朗**、宮原恵弥子、出雲公子、堀内正久、岡本康裕、河合慶親、河野嘉文、竹内亨、ベンゼン発がんの機構解析、第84回日本衛生学会、2014,5.25-27 発表予定(演題受理済み) 岡山
2. **Nishikawa T**, Okamoto Y, Tanabe T, Kurauchi K, Nakagawa S, Abematsu T, Kodama Y, Shinkoda Y, Kawano Y. Validation of a test dose strategy for administering intravenous busulfan in

the setting of pediatric myeloablative stem cell transplantation: Clinical and pharmacokinetic results. 40th Annual Meeting of the European Group for Blood and Marrow Transplantation, 2014, 3.30-4.2, Milan, Italy

3. **西川拓朗**、岡本康裕、倉内宏一郎、田邊貴幸、精松貴成、中川俊輔、児玉祐一、新小田雄一、河野嘉文. 静注ブスルファン(ivBu)試験投与を用いた小児 ivBu 移植前処置の安全性の確立. 第36回日本造血細胞移植学会総会 2014.3.7-3.9、沖縄
4. **西川拓朗**、岡本康裕、八牧愉二、倉内宏一郎、田邊貴幸、中川俊輔、児玉祐一、新小田雄一、河野嘉文. ブスルファンを前処置として使用した造血細胞移植の検討 血中濃度と移植成績・合併症の関係、経口製剤との比較 第55回日本小児血液・がん学会学術集会、2013.11.29-12.01、福岡
5. **西川拓朗**、岡本康裕、古賀友紀、住江愛子、松崎彰信、大園秀一、上田耕一郎、稲田浩子、稲垣二郎、永利義久、新小田雄一、川上 清、野村優子、柳井文男、下之段秀美、盛武 浩、中山秀樹、日高靖文、堀田紀子、岡村 純、河野嘉文. ALL に対する寛解導入療法中の敗血症発症のリスク因子解析: KYCCSG ALL96, ALL02 研究. 第54回日本小児血液・がん学会学術集会、2012.11.30-12.02、横浜
6. **Nishikawa T**, Kato K, Ito N, Sawa D, Nakashima K, Fukano R, Tsuchida M, Okamura J, Inagaki J. Stem cell transplantation for acute leukemia with t(10;11)(p12;q14). 第74回日本血液学会学術集会、2012.10.19-21、京都

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

西川 拓朗 (NISHIKAWA, Takuro)

鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・助教
研究者番号: 90535725