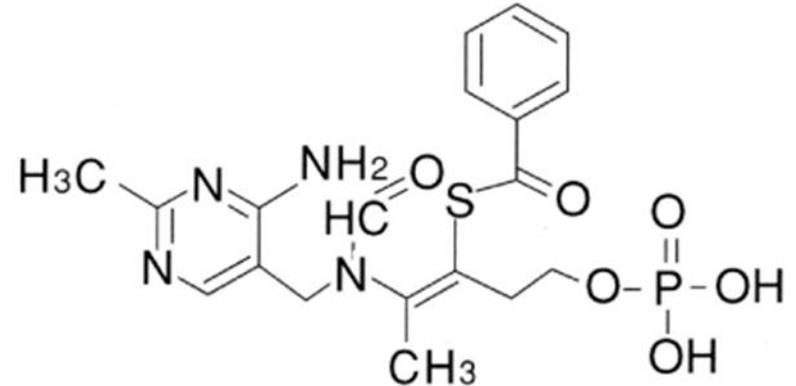


背景

ベンフォチアミンは脂溶性のビタミンB1誘導体で、生体内でのチアミンの利用率は水溶性ビタミンB1の約5倍と報告されている。糖尿病合併症(糖尿病性末梢神経障害、腎症、網膜症)の増悪を防ぐ効果および、抗炎症作用、抗酸化作用、神経保護作用といった多数の作用を持つと報告されている。しかし現在まで直接的な抗腫瘍作用についての報告はない。

今回、高齢で標準治療の適応のない急性骨髄性白血病患者にベンフォチアミン単剤を投与したところ一過性ではあるが著明な芽球減少が認められた。in vitro で芽球に対するベンフォチアミンの効果が確認できたため報告する。



一般名 : ベンフォチアミン (Benfotiamine)
化学名 : S-benzoylthiamine O-monophosphate

症例

[症例] 89歳男性。

[現病歴] 脳梗塞後遺症、狭心症、慢性腎不全にて当院胸部外科通院中であつた。2011年3月ころより貧血の進行を認め、当科紹介となつたが、骨髓検査の同意が得られず、輸血のみにて経過観察中、末梢血白血球数の著明な増加を認めた。末梢血液像上、前単球様芽球を80%以上認め、ペルオキシダーゼ染色陰性、ブチレート染色強陽性、細胞表面抗原マーカーCD4,CD56,CD13,CD33,HLA-DR陽性でありFAB分類AML(M5b)と診断された。高齢であり、軽度の認知症の合併もあり家族が化学療法は望まず、支持療法目的に当院入院となつた。

表1. 入院時検査所見

Blood count

WBC	133900/ μ l
Neu	0%
Lymph	3.7%
Mono	0%
Eo	0%
Baso	0%
Blast	96.3%
RBC	286×10^4 / μ l
Hb	9.4g/dl
Ht	27.1%
Plt	3.0×10^4 / μ l

Serological test

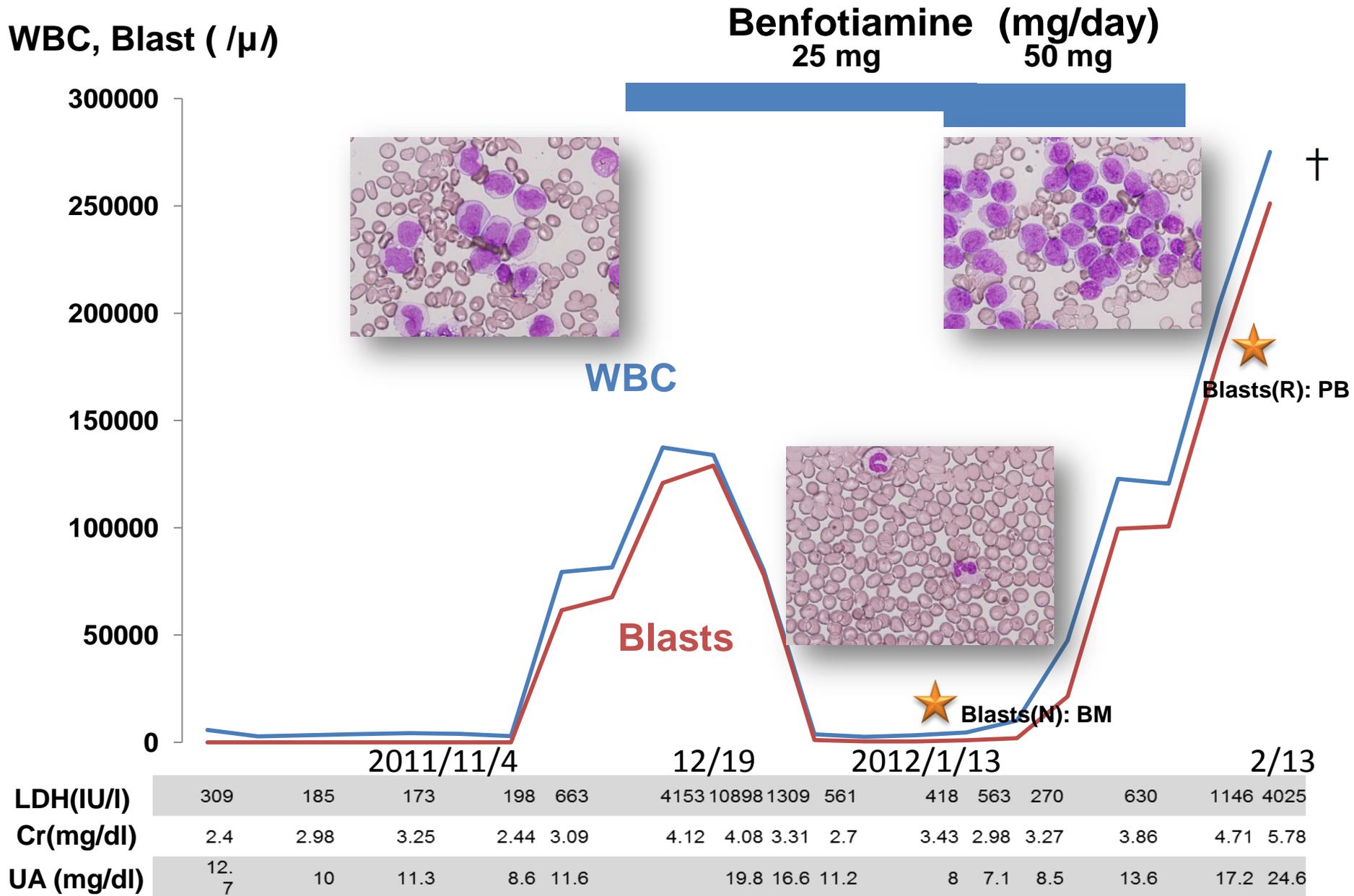
TP	7.1g/dl
Alb	2.9g/dl
T-Bil	0.9mg/dl
AST	71IU/l
ALT	27IU/l
ALP	143IU/l
γ -GTP	104IU/l
LDH	10898IU/l
BUN	67mg/dl
Cr	4.08mg/dl
UA	19.8mg/dl
Na	142.3mEq/l
K	4.04mEq/l
Cl	101.4mEq/l
Ca	6.6mg/dl
CRP	10.54mg/dl

入院経過

発熱性好中球減少症に対して前医より引き続き抗菌剤の投与を行い、入院時よりベンフォチアミン(ビオトワ®)(25mg)1T/日の経口投与を開始した。赤血球輸血(LR2単位×6回)、血小板輸血(PC10単位×2回)を適宜施行した。38度以上の発熱時サクシゾン®100mgの静脈注射を施行した(計6回)。

入院第29病日、白血球数3260/ μ l(好中球数40%)、LDHは418と著明に低下し、腎機能、尿酸値の改善を認めた(図1)。その際、本人、家族の了承を得て骨髄検査を施行した。骨髄穿刺所見では、正形成で巨核球やや減少、3系統に異形成はなく環状鉄芽球は認めなかった。細胞表面抗原マーカーではCD4,CD56,CD33,HLA-DR陽性の芽球を57%認め染色体は20細胞中13細胞に46,XY,add(1)(p32)、1細胞に47,idem,+8を認め正常核型は6細胞であった。その後、第35病日にLDH563と上昇し、末梢血の芽球増加を認めたためベンフォチアミンを2T/日に増量したところ、1週間後にLDH270と減少した。しかしその後ふたたび芽球上昇し、LDH上昇、発熱も再燃し入院第62病日に死亡された。

図1 臨床経過



目的

ベンフォチアミンが白血病細胞に対して抗増殖作用をもつかどうか、患者白血病細胞および既存の白血病細胞株にて検討する。

抗増殖作用を認めた場合、その作用機序について検討する。

またほかの抗がん剤との相互作用も検討する。

方法

細胞培養: THP-1, K562, HL-60, TF-1の細胞株は10%FBS入りのRPMI-1640で5%CO₂濃度の条件にて培養した。

患者白血病細胞培養: 患者と患者の家族の同意を得て、また金沢大学倫理委員会の承認を得て、入院第29病日に骨髓細胞採取(Blasts N)、入院第60病日に末梢血採取(Blast R)し、密度勾配遠心分離法を用いて90%以上の芽球を含む単核球分離を行い、凍結保存した。使用時、トリパンブルー染色にて90%以上の生存率を確認し、20%FBS入りのRPMI-1640にSCF(100ng/mL), GM-CSF(20ng/mL), 1%penicillinおよびstreptomycinを加え培養した。

ベンフォチアミン(Sigma)は1%carboxymethylcellulose(Sigma)に5mMの濃度で溶解保存され、細胞株および患者白血病細胞は、各濃度のベンフォチアミンを含む培養液とともに培養され-20°Cで保存された。コントロール細胞は1%carboxymethylcelluloseで希釈された。

細胞増殖はMTTアッセイを用いて測定し細胞傷害性が計算された。薬剤の相互作用を調べるためcombination index(CI)はCompuSym software programで計算された。

方法2

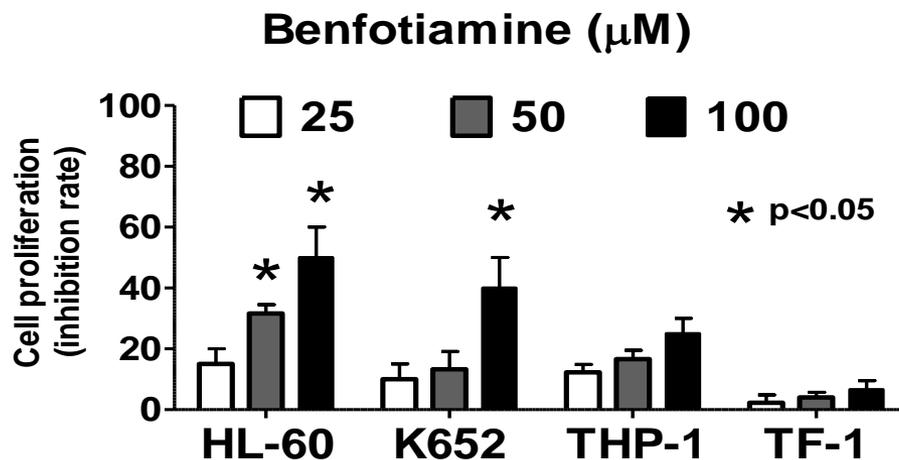
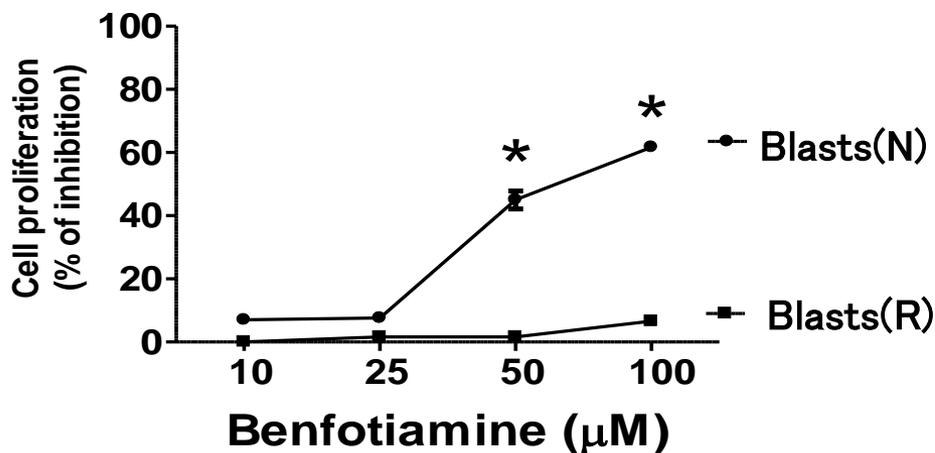
細胞周期解析とアポトーシス、細胞老化解析： 細胞周期解析はBecton Dickinson FACS flow cytometerにて測定、ベンフォチアミンの有無による培養によるアポトーシス細胞を7ADD/Annexin V染色し、細胞老化染色はベンフォチアミンとともに48時間培養後、 β -Galactosidase 染色キットを用いた。

Western blot解析： 全細胞溶解液に対するwestern blot 解析が施行され、Phospho cdk2, total cdk2, cdk3, phospho CDC2, total CDC2, phospho-ERK1/2, Phospho JNK1/2, phospho AKT, cdk4, total p38, total ERK1/2, total JNK1/2, phospho-p38, total p38, α -tubulinを検出した。

統計解析： 全てのデータは平均値±標準誤差で示されている。2群間の比較にはt-testを用い、多群間比較には一元配置分散分析を用いた。 $P \leq 0.05$ のとき統計学的に有意とした。すべての統計分析にはGraphPad Prism software packageを使用した。

結果1. ベンフォチアミンは患者白血病細胞とHL-60, K562の増殖を妨げた。

MTTアッセイによりベンフォチアミンは、用量依存的に骨髓採取された患者の白血病細胞の増殖を妨げた。しかし終末期の白血病細胞に対してはその効果はなかった。これらの細胞毒性はK562, HL-60においても認められたが、TF-1やTHP-1細胞株では見られなかった。



結果2. アポトーシスおよび細胞老化、分化に対する効果

患者の骨髄白血病細胞、K562, HL-60をベンフォチアミンとともに96時間まで培養したが、アポトーシス細胞の増加はみられなかった(図2A)。また細胞老化細胞の増加も見られなかった。HL-60を72時間培養したところプレートに接着したり、細胞増大など分化傾向を示す形態学変化は見られず、CD14,CD11cの発現も見られなかった(図2B)。しかし患者の骨髄白血病細胞をベンフォチアミンとともに72時間培養したところ、形態学的に多数の小空胞が出現しており(図2C)Autophagic vacuolesの可能性があり、現在western blot法にてLC3抗体を検査中である。

図2A HL60, 72hr

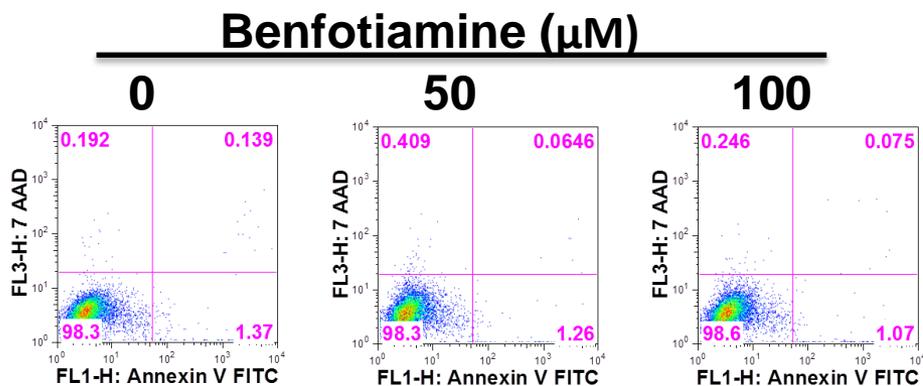


図2B

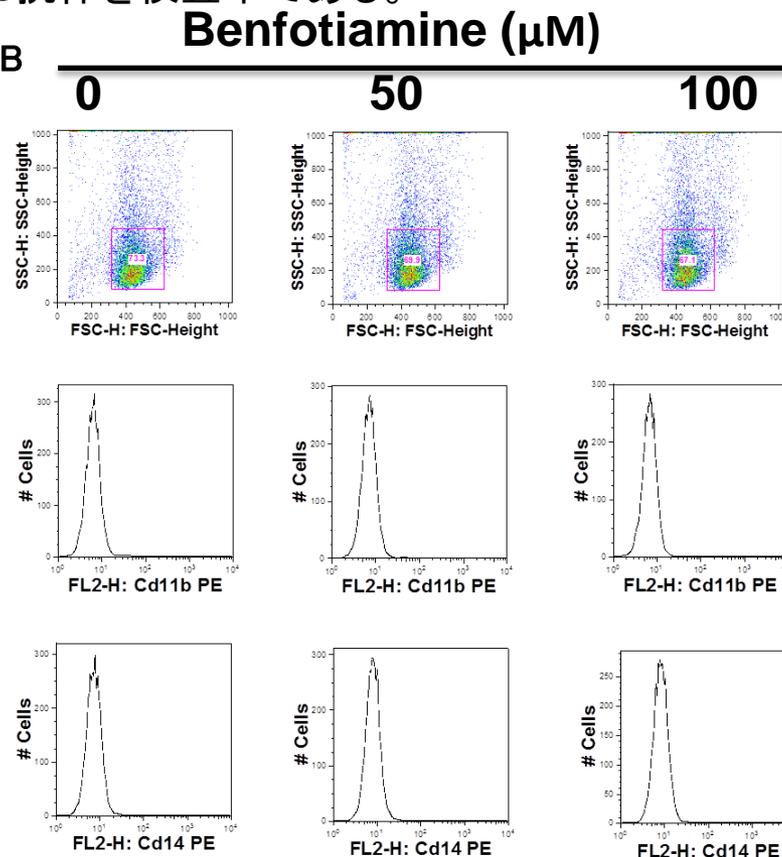
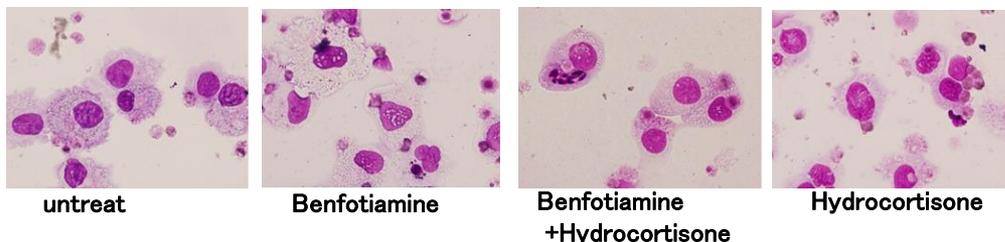


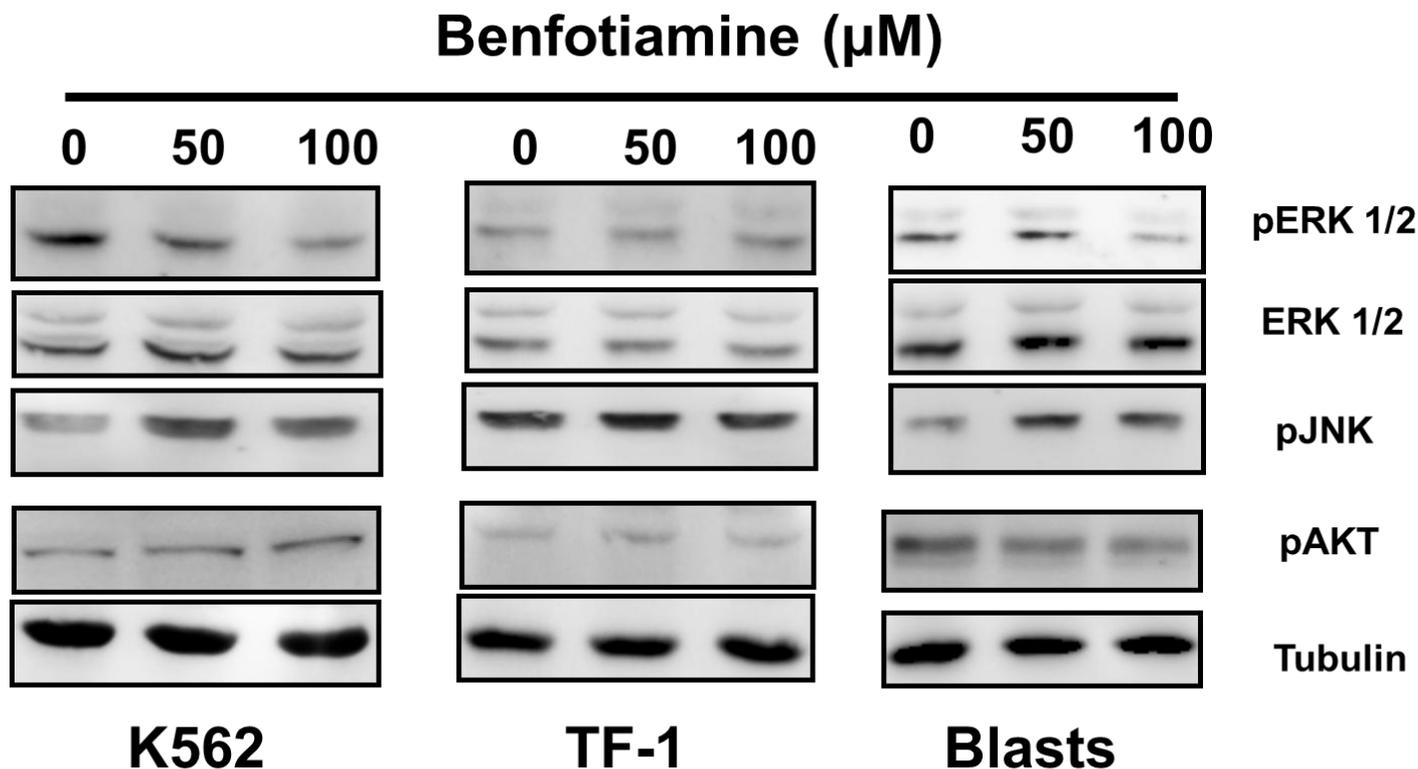
図2C Blast (N), 72hr, Giemsa染色, 60X



結果3. MAPKの活性化に対する効果

患者の白血病細胞、K562、TF-1においてERK1/2, JNK1/2, MAPKp38, AKTの発現を調べたが、MAPKp38は患者の白血病細胞にて認められず。ERK1/2, JNK1/2, AKTは発現が認められた。ベンフォチアミンは患者の白血病細胞、K562において用量依存的にERK1/2活性を阻害し、JNK1/2活性を増加させた。しかしTF-1では変化はなかった。またAKTはベンフォチアミンの影響を受けなかった。HL-60では、ERK1/2活性はベンフォチアミンの影響を受けなかったが、JNK1/2活性が著明に増加した。

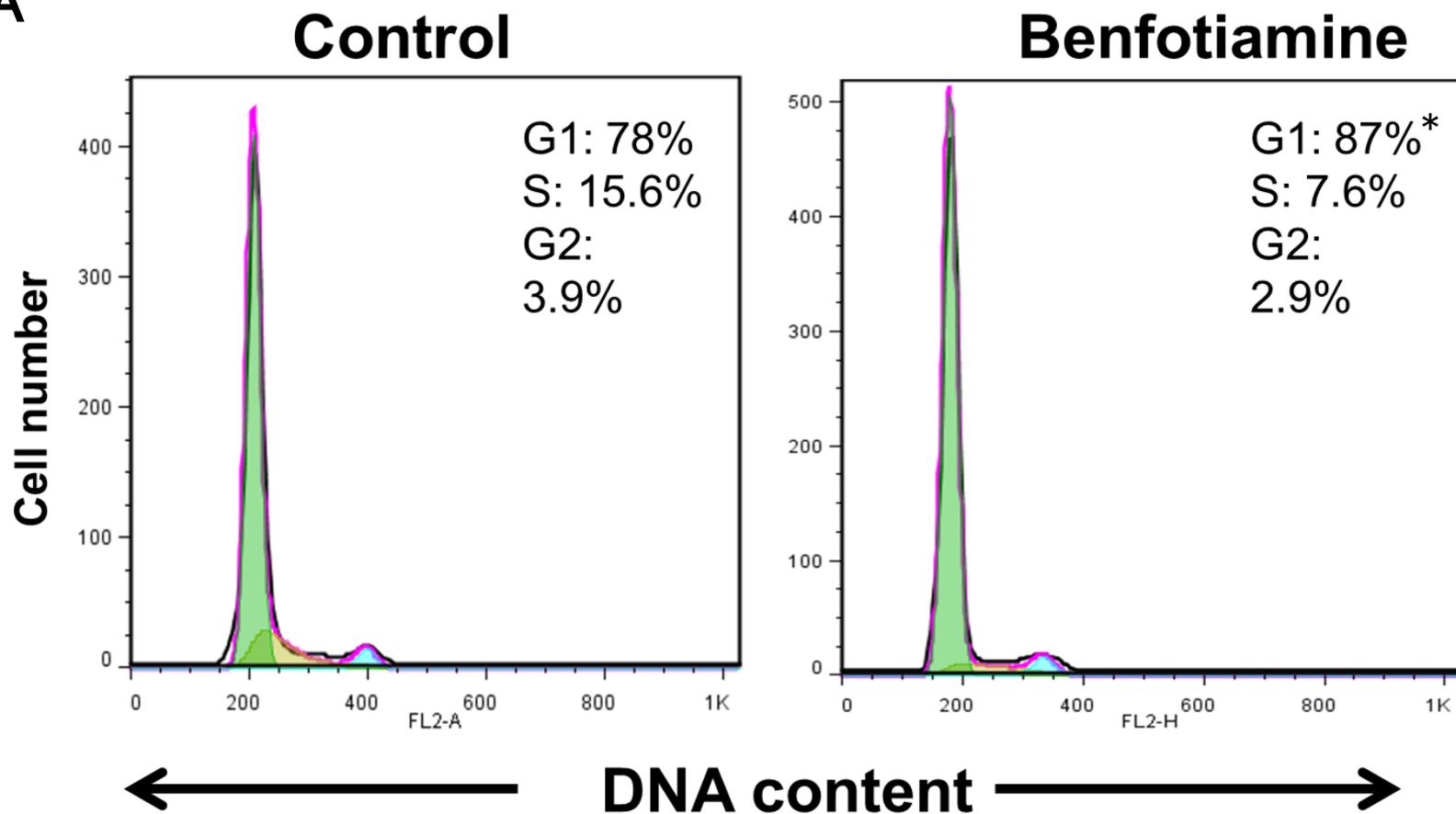
図3



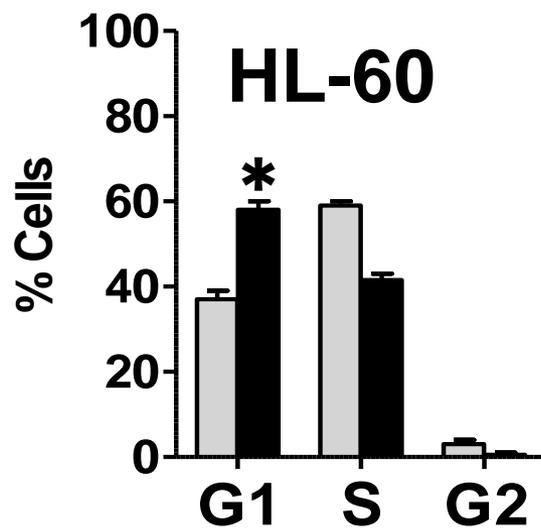
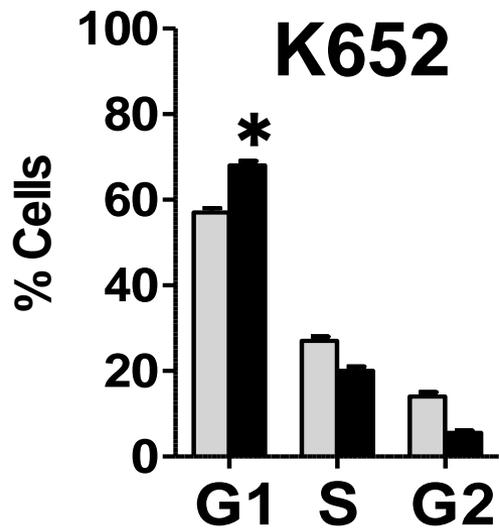
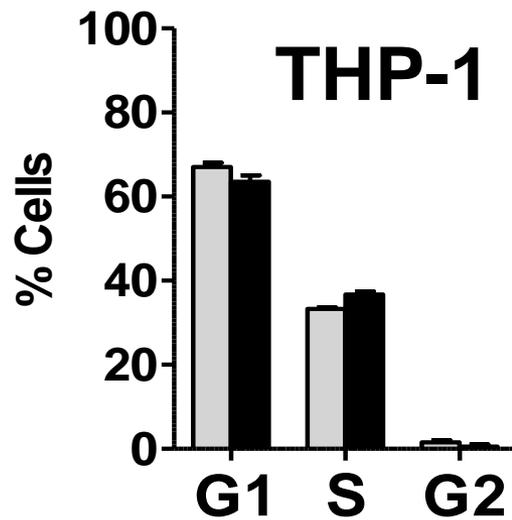
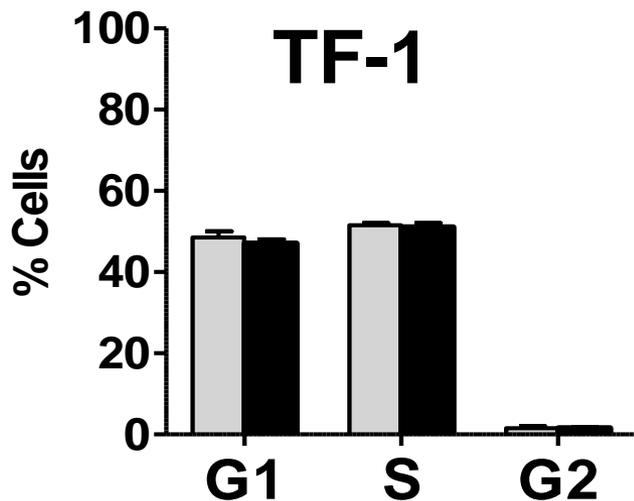
結果4. 細胞周期停止への誘導の効果

ベンフォチアミンとともに24時間培養後、患者の白血病細胞のG1期の割合が有意に増加(図4A)。K562, HL-60においても認められたが、同時にS期とG2-M期の割合の低下を伴っていた(図4B)。一方TF-1やTHP-1細胞株でG1期やS期の割合の変化は見られなかった(図4B)。

図4A

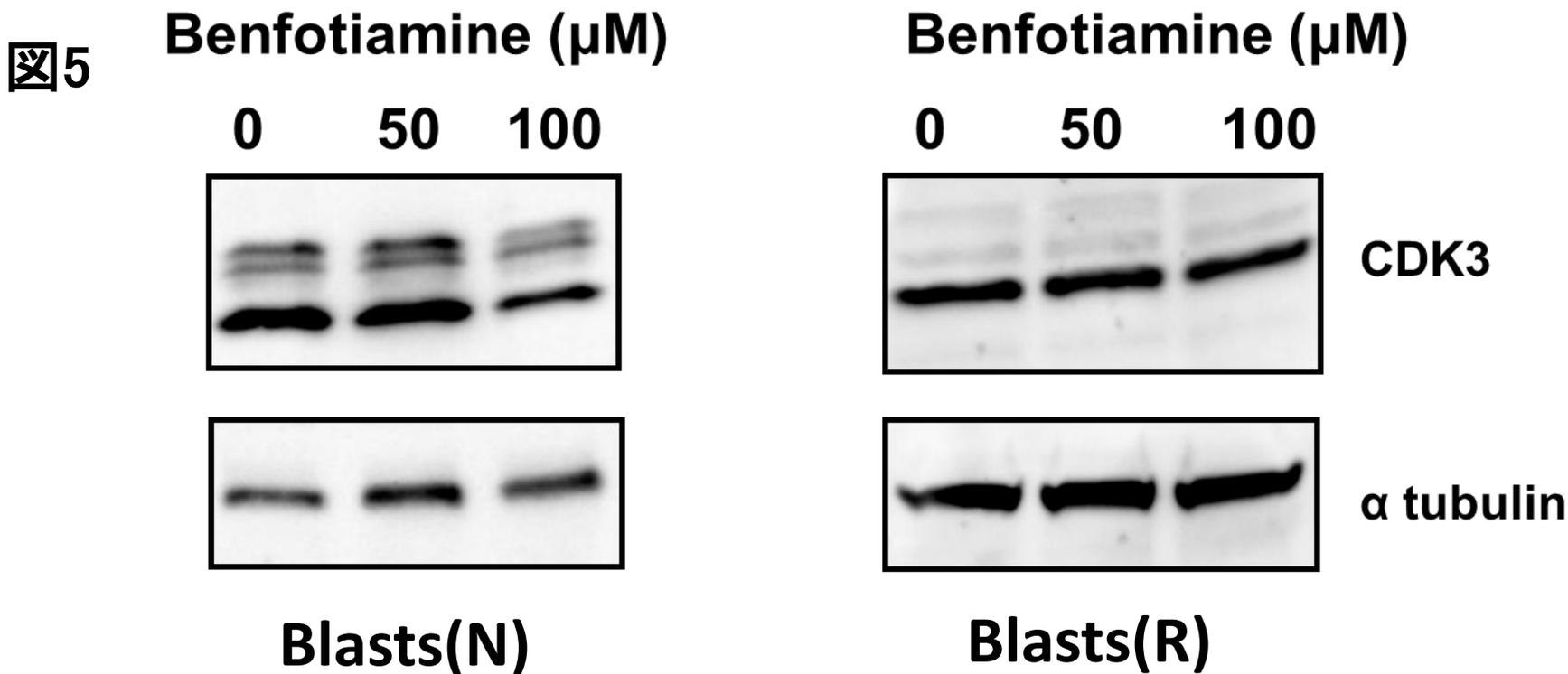


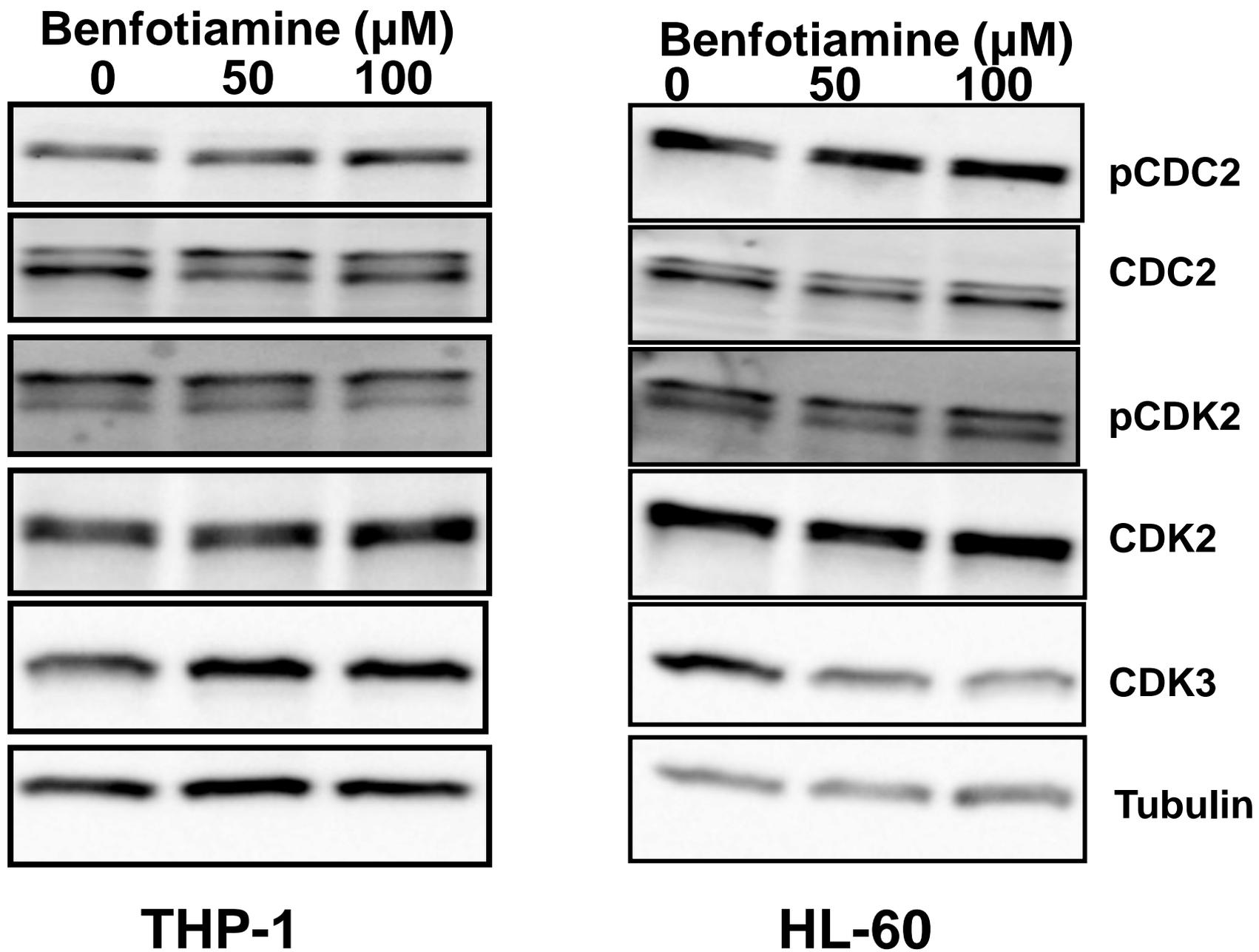
Control Benfotiamine



結果5. ベンフォチアミンによる細胞周期とアポトーシス関連タンパクの変化。

患者の骨髄白血病細胞で細胞周期関連タンパクのCDK3の発現がベンフォチアミンにより低下したが、終末期の患者の白血病細胞では低下は認められなかった。(図5)ベンフォチアミンによるCDK3の発現の低下はHL-60でも認められたが、THP-1では認められなかった。そのほかのPhospho cdk2, total cdk2, phospho CDC2, total CDC2などはベンフォチアミンにより発現は変わらなかった。(図6)

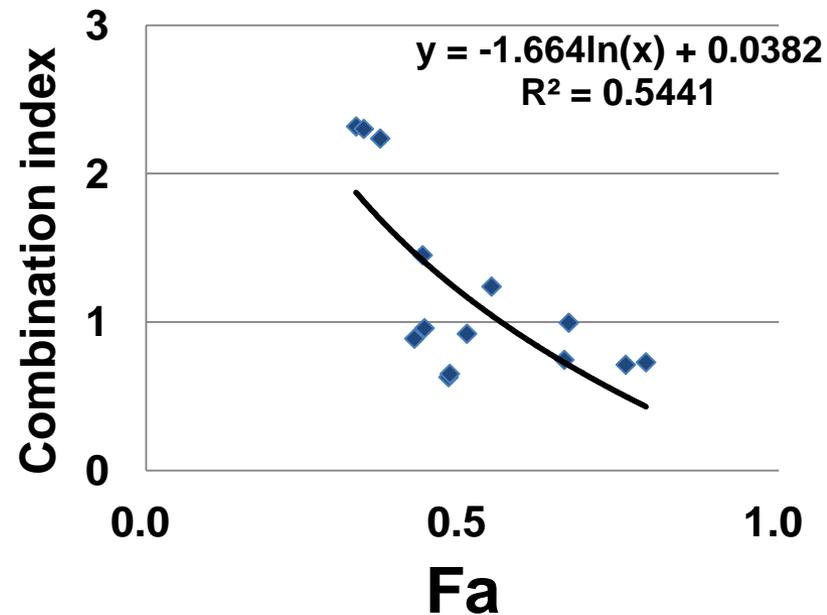
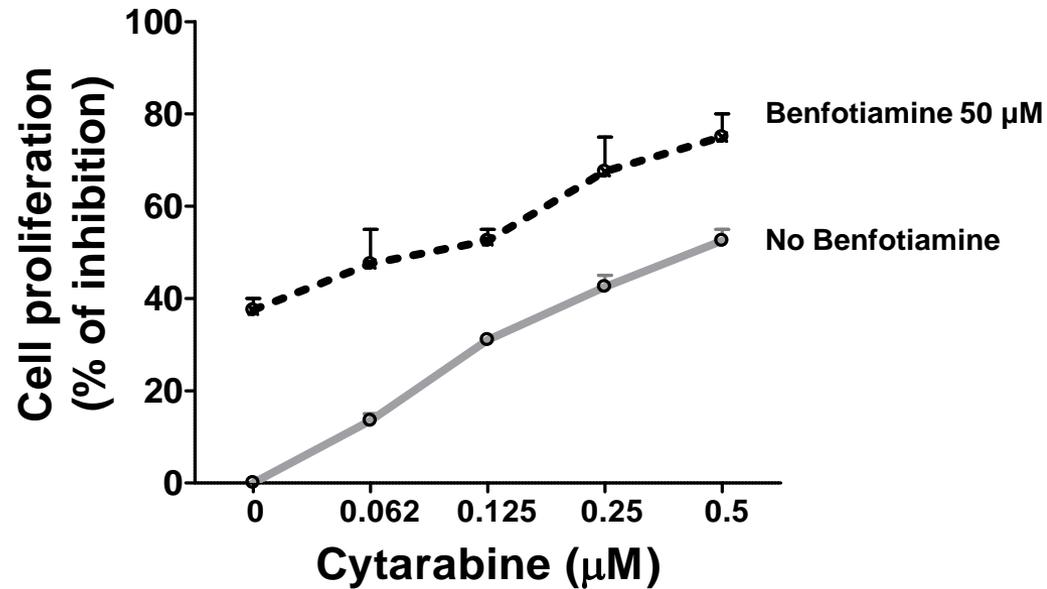




結果6. ベンフォチアミンはシタラビンの殺細胞効果を増加させる。

患者の骨髄白血病細胞、HL-60をベンフォチアミンとシタラビンとともに培養したところ、シタラビンの増殖抑制効果が増加した(図7)。アイソボログラムを使いCombination Indexを計算したところ、ベンフォチアミンは患者白血病細胞において相加的効果(図7A)、HL-60においては相乗効果を示した。(図7B)

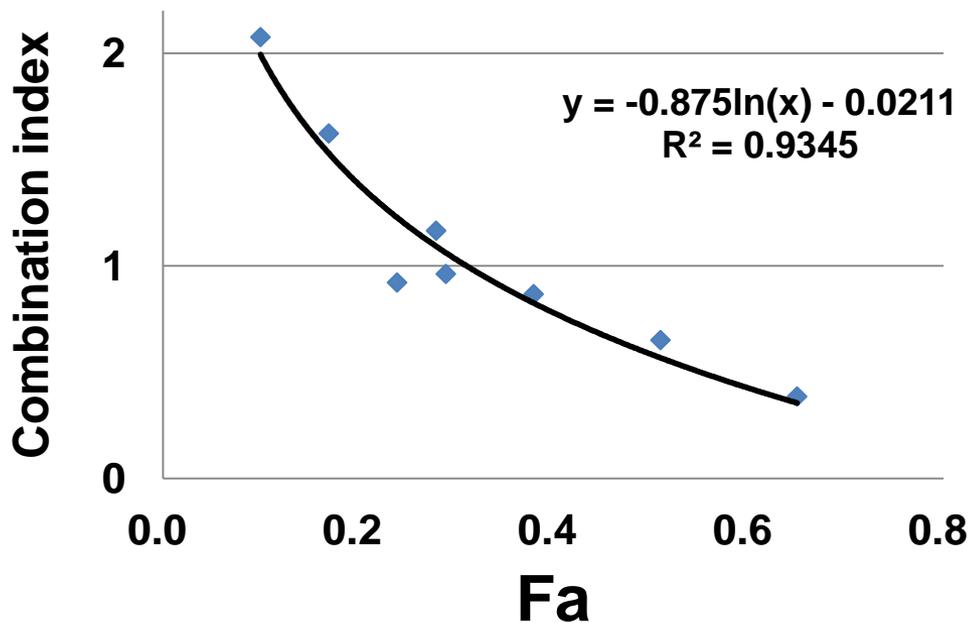
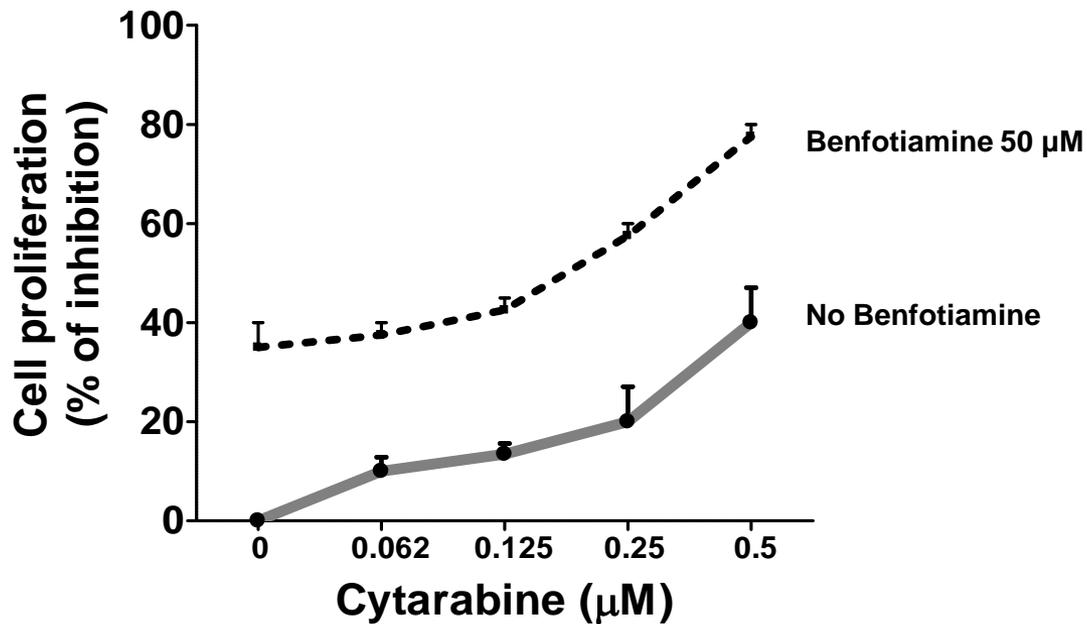
Patient's blasts



CI at ED50 = 1.11, additive effect

7B

HL-60 cells



CI at ED50 = 0.59, positive for synergism

総括

ベンフォチアミンは、

1. MTTアッセイにより患者白血病細胞とK562, HL-60の増殖を妨げた。
2. 患者の白血病細胞、K562において用量依存的にERK1/2活性を阻害し、JNK1/2活性を増加させた。HL-60では、ERK1/2活性は影響を受けなかったが、JNK1/2活性が著明に増加した。
3. 細胞周期解析で患者 白血病細胞およびK562, HL-60においてG1期の割合を有意に増加させ、同時に細胞周期関連タンパクのCDK3の発現の低下を認めた。
4. シタラビンの殺細胞効果を増加させた。患者白血病細胞において相加的効果、HL-60においては相乗効果を示した。

総括2

5. ベンフォチアミンと培養したところ、アポトーシス細胞の増加はみられず、細胞老化細胞の増加もみられず。HL-60では分化傾向もみられず。

形態学的変化よりオートファジー性細胞死が示唆された。Western Blot法にてLC3抗体の発現を確認中である。

以上よりベンフォチアミンは、白血病細胞にオートファジーを誘導し、副作用がなく安価な抗ガン剤である可能性がある。今後、臨床経験を重ねて効果を確認する必要がある。

細胞老化、Autophagyに対するご指導、抗体等の供与を賜りました金沢大学 大学院
医薬保健総合研究科 形態機能学 佐々木素子准教授に深謝いたします。

**筆頭発表者： 演題発表に関連し、開示すべきCOI 関係に
ある 企業などはありません。**