



## Iron-chelating agent, deferasirox, inhibits neutrophil activation and extracellular trap formation

Kono, Mari

---

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

2018-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第7137号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1007137>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(課程博士関係)

## 学位論文の内容要旨

Iron-chelating agent, deferasirox, inhibits neutrophil activation and extracellular trap formation

鉄キレート剤、デフェラシロックスは好中球の活性化と細胞外トラップ形成を抑制する

### (背景)

鉄キレート剤デフェラシロックス(DFS)は、鉄キレート能以外に、骨髓性白血病細胞株や固形腫瘍細胞株の増殖抑制、NF  $\kappa$  B の核内移行抑制、mTOR のシグナル抑制、活性酸素種(ROS)の産生抑制など多様な生物学的効果や薬理作用をもち、注目されている。本研究者は、代表的なROS産生細胞である好中球へのDFSの作用について着目した。

活性化好中球は、ROS産生により血管内皮細胞を傷害するため、急性肺障害(ALI)を始め様々な病態を惹起する。好中球に Phorbol Myristate Acetate (PMA)などのROS産生アゴニストを添加すると、食食に依存しないオートファゴソームが形成され、その後の空胞形成へつながることが知られている。好中球の空胞は、ROS依存的にオートファゴソームに2次顆粒やエンドソームが癒合して形成される。また、最近では好中球細胞外トラップ(NETs)が、ALI発症に関与している可能性が報告されているが、NETは好中球から放出される長いクロマチンの纖維であり病原体を補足し殺菌する作用をもち、NADPHオキシターゼによるROSの大量産生に依存して起こる。

以上の理由から、本研究ではDFSの持つ好中球からのROS産生を抑制する作用がALI発症の予防につながる可能性に注目し、DFSによる好中球のROS産生抑制が、好中球の空胞形成や食食能、さらには好中球のNETs形成に与える影響について、PMAやformylmethionylleucylphenylalanine (fMLP)を用いて検討した。

### (方法)

ヘパリン採血した健常者末梢血から比重遠心により多核球分画を得、鉄キレート剤としてDFS又はデフェロキサミン(DFO)を添加して10分後に、PMA又はfMLPを添加して電子顕微鏡で空胞化など形態の変化を観察した。食食能については、Zymosan粒子の取り込みをフローサイトメーターで測定した。NETsの誘導については、抗 Histone及び抗 Myeloperoxidase抗体を用いて免疫組織学的に顕微鏡で観察した上で、上清に放出される二本鎖DNAを定量キットで測定した。

### (結果)

好中球にPMA又はfMLPを添加し電子顕微鏡下で観察すると、好中球は細胞質に空胞を形成し、表面の隆線構造を変化させた。これらの形態変化は、予めDFSを加えておくことで抑制された。しかし同じ鉄キレート剤のデフェロキサミン(DFO)ではこのような抑制は認められなかった。食食能について、フローサイトメトリーによるZymosan粒子の蛍光強度の測定では、DFS、DFO共に、好中球の食食能抑制は認められなかった。NET形成について、PMAを添加した好中球は、NETsと見られる纖維状の構造を放出し、この構造は抗Histone-H3及び抗MPO抗体で染色されたが、予めDFSや抗酸化剤であるアボサイニン、ジフェニレンヨードニウムクロリド(DPI)を加えておくことで、この構造の形成が抑制された。一方、同じ鉄キレート剤のDFOではこのようなNETs形成の抑制効果は認められな

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻

臨床検査医学

(指導教員：西村 善博 教授 (特命教授))

河野 麻理

かった。さらに、好中球に PMA を添加して上清の dsDNA の濃度を測定したところ、PMA 添加で上清の dsDNA 濃度が有意に増加した。この系に DFO を予め加えておいても、dsDNA 濃度増加の抑制は起こらなかったのに対し、DFS 又はアポサイニン、DPI を予め添加しておくと、dsDNA 濃度の増加が抑制された。

#### (考察)

DFS には鉄キレート以外の効果として mTOR シグナルを抑制するとの報告がある。また、我々の過去の報告では、DFS は PMA や fMLP による ROS 産生を抑制した。PMA は PKC アゴニストであり、PKC が NADPH オキシダーゼを活性化することで ROS 産生を引き起こし、ROS 産生に依存してオートファゴソームが形成されることが知られている。一方 fMLP も、細胞表面のレセプターを刺激してから関節的に PKC を刺激するほか、別の経路で mTOR を活性化させる。mTOR の活性化はオートファジー形成を抑制するとされているため、DFS が mTOR を抑制すればオートファジー形成はむしろ促進されると予想されたが、今回 DFS は PMA、fMLP どちらの刺激による空胞形成も抑制した。このことから、今回の系で空胞形成の抑制を引き起こしたのは、DFS の mTOR 抑制による効果ではなく、DFS の ROS 産生抑制効果によると考えられた。

次に、オートファジーに関連する空胞形成は、貪飢能に依存しないことが報告されている。我々は DFS が PMA や fMLP 刺激による好中球貪飢能を抑制せずに空胞形成を抑制することを明らかにした。ROS 産生やオートファジーは生体防御機構であり、抑制されると自然免疫の低下が起こることが懸念されるが、DFS は貪飢機能を低下させないため、自然免疫への影響が少ない可能性がある。実際に、輸血依存による鉄過剰に対して長期に DFS を投与した患者について、感染症を起こしやすいなどの副作用は報告されていない。また、別の鉄キレート剤である DFO は、ROS 産生や NET 形成の抑制効果がなかった。我々の結果は DFS が鉄キレートとは別の機序で好中球活性化の抑制効果を示すことを示唆した。

mTOR 経路とオートファジーや NETs 形成との関係については、mTOR 経路を抑制するとオートファジーや NETs 形成が低下するという報告と、逆に mTOR 経路を抑制するとオートファジーや NETs 形成が亢進するという報告がある。本研究では DFS は空胞形成や NETs 形成を抑制したので、前者とは整合性があるが、後者とは矛盾する。mTOR には他にも多彩な機能があるため単純に解釈できない。少なくとも NETs 形成にはオートファジーと ROS 産生が必要であるため、今回の DFS による NETs 形成の抑制には、先だって起こる ROS 産生やオートファジーの抑制が関与したと考えられた。

#### (結論)

本研究から、DFS は好中球の貪飢能を抑制せずに、空胞形成などの形態変化を抑制し、また NET 形成を抑制し、これは鉄キレートとは異なる DFS に特徴的な効果であると推察され

た。このことから DFS は好中球活性化により惹起される NET 形成の抑制効果を通じて ALI などの様々な病態の治療に貢献できる可能性がある。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 2760 号	氏名	河野 麻理
論文題目 Title of Dissertation	<p>Iron-chelating agent, deferasirox, inhibits neutrophil activation and extracellular trap formation 鉄キレート剤、デフェラシロックスは好中球の活性化と細胞外トラップ形成を抑制する</p>		
審査委員 Examiner	主査 Chief Examiner	古屋 敦子	古屋 敦子
	副査 Vice-examiner	鈴木 信	鈴木 信
	副査 Vice-examiner	横井 元	横井 元

(要旨は1,000字~2,000字程度)

### 背景

鉄キレート剤デフェラシロックス (DFS) は、骨髓性白血病細胞株や固形腫瘍細胞株の増殖抑制、NF<sub>κ</sub>B の核内移行抑制、mTOR のシグナル抑制、活性酸素種 (ROS) の产生抑制など、鉄キレート能以外の多様な生物学的效果や薬理作用をもつことが注目されている。本研究者は、DFS の ROS 产生抑制に着目し、好中球への DFS の作用について研究した。好中球の空胞は、ROS 依存的にオートファゴソームに 2 次顆粒やエンドソームが融合して形成されるが、好中球に PMA などの ROS 产生アゴニストを添加すると、食食能に依存しないオートファゴソームが形成され、その後の空胞形成へつながる。活性化好中球は、ROS 产生により接着した血管内皮細胞を傷害するため、急性肺障害 (ALI) を始め様々な病態を惹起する。最近、好中球細胞外トラップ (NETs) が、ALI 発症に関与している可能性が報告されている。NETs とは、好中球から放出されるクロマチンの纖維であり、血中や組織中の病原体を捕捉し殺菌するとされる。NETs は NADPH オキシターゼによる ROS の大量产生に依存して起こると報告されている。以上の理由から、DFS の持つ好中球からの ROS 产生を抑制する薬理作用が、ALI 発症の予防につながる可能性がある。本研究では DFS による好中球の ROS 产生抑制が、好中球の空胞形成や食食能、さらには好中球の NETs 形成に与える影響について、PMA や fMLP を用いて検討した。

### 方法

ヘパリン採血した健常者末梢血から比重遠心により多核球分画を得、鉄キレート剤として DFS 又はデフェロキサミン (DFO) を添加して 10 分後に、PMA 又は fMLP を添加して電子顕微鏡で空胞化など形態の変化を観察した。食食能については、Zymosan 粒子の取り込みをフローサイトメーターで測定した。NETs の誘導については、抗 Histone 及び抗 Myeloperoxidase 抗体を用いて免疫組織学的に顕微鏡で観察した上で、上清に放出される二本鎖 DNA を測定した。

### 結果

好中球に PMA 又は fMLP を添加し電子顕微鏡下で観察すると、好中球は細胞質に空胞を形成し、表面の隆線構造を変化させた。これらの形態変化は、DFS の前投与で抑制された。しかし同じ鉄キレート剤のデフェロキサミン (DFO) ではこのような抑制は認めなかった。食食能について、フローサイトメーターによる Zymosan 粒子の蛍光強度の測定では、DFS、DFO 共に、好中球の食食能抑制は認めなかった。NETs 形成について、PMA を添加した好中球は、NETs と見られる纖維状の構造を放出し、この構造は抗 Histone-H3 及び抗 MPO 抗体で染色されたが、DFS や抗酸化剤であるアポサイニン、ジフェニレンヨードニウムクロリド (DPI) の前投与で、この構造の形成が抑制された。一方、同じ鉄キレート剤の DFO ではこのような NETs 形成の抑制効果は認めなかった。さらに、好中球に PMA を添加して上清の dsDNA の濃度を測定したところ、PMA 添加で上清の dsDNA 濃度が有意に増加した。この系に DFO を予め加えておいても、dsDNA 濃度増加の抑制は起こらなかったのに対し、DFS 又はアポサイニン、DPI を予め添加しておくと、dsDNA 濃度の増加が抑制された。また、DFS 添加による dsDNA 濃度の抑制は 10-100  $\mu$ M で同程度に起こり、濃度に依存しなかった。

## 考 察

DFS は PMA、fMLP の両方の刺激による好中球空胞形成も抑制した。このことから、今回の系で好中球の空胞形成の抑制を惹起したのは、DFS の mTOR 抑制効果ではなく、ROS 産生抑制効果によると考えられた。また、研究者らは DFS が PMA や fMLP 刺激による貪食を抑制せずに空胞形成だけを抑制することを明らかにした。ROS 産生やオートファジーは生体防御機構であり、抑制されると自然免疫の低下が起こることが懸念されるが、DFS は貪食機能を低下させないため、深刻な状況を引き起こすことはないと考えられる。実際に、輸血依存で長期に DFS を投与されている患者について、感染症を起こしやすかったなどの悪影響は報告されていない。

さらに、同じ鉄キレート剤である DFO は ROS 産生や NETs 形成に効果がなかった。また、過剰なクエン酸鉄を添加してキレート効果を抑制しても、ROS 産生や NETs 形成の抑制効果は無くならなかった。DFS の抗腫瘍効果や抗菌効果は細胞増殖に必要な鉄がキレートされることが一因とも報告されているが、今回の研究者らの結果は DFS が鉄キレートとは別の機構で好中球活性化抑制効果を示すことを明らかにした。少なくとも NETs 形成には ROS 産生やそれに伴う空胞形成が必要であるため、今回の NET 形成抑制は先だって起こる活性酸素種産生やオートファジーの抑制を介して起こったと考えられた。加えて、本研究では、10-100  $\mu$ M の DFS が NETs 形成を濃度依存なく抑制することを示した。

## 結 論

DFS は好中球の貪食を抑制せずに ROS 産生だけでなく、空胞形成や NETs 形成などの形態変化を抑制し、これは鉄キレートとは異なる効果であると推察された。このことから DFS は好中球活性化に関連している ALI などの様々な病態の予防に貢献できる可能性がある。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。