

令和 3 年 5 月 18 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08350

研究課題名(和文) 若年性骨髄単球性白血病に対する改変T細胞と分子標的薬による複合治療法の開発

研究課題名(英文) Development of in-vitro assay for combination therapy using molecular targeted drug and chimeric antigen receptor T-cells for juvenile myelomonocytic leukemia

研究代表者

松田 和之 (Matsuda, Kazuyuki)

信州大学・学術研究院保健学系・教授

研究者番号：00647084

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：若年性骨髄単球性白血病(JMML)に対する分子標的薬とキメラ抗原受容体発現T細胞(GMR-CAR-T細胞)を合わせた複合治療の効果を評価するため、JMML由来iPS細胞から分化誘導したCD34陽性細胞を用いてin-vitroアッセイの構築を行った。イデラリスブとクリゾチニブは、PTPN11変異陽性CD34陽性細胞に対してより高い抗腫瘍効果を示した。GMR-CAR-T細胞と各分子標的薬を合わせた混合実験では、分化細胞が非常に少なく、正確な抗腫瘍効果の検証が出来なかった。今後、多量な分化細胞を回収するため、サイトカインの漸増的添加と細胞剥離・分離の効率化を追加検討し、安定したモデルを確立したい。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞株がないJMMLでは、新規治療(薬)の抗腫瘍効果をin-vitroで検証することが困難であった。私たちは、樹立したJMML由来iPS細胞からCD34陽性細胞を分化誘導し、それらの細胞を用いることで、Met阻害剤やPI3K阻害剤がPTPN11変異陽性細胞に、より高い抗腫瘍効果を示すことを明らかにした。GMR-CAR-T細胞と分子標的薬を合わせた複合治療の評価には、多量の分化細胞が必要であることも示した。今後、効率的にiPS細胞から分化細胞を得る工夫を行えば、in-vitroモデルとして新規治療(薬)を評価できる有用なツールになり、難治性のJMMLの治療成績向上に寄与できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to develop in-vitro assay using JMML-iPS cells for combination therapy using molecular targeted drug and GMR-CAR-T-cells for JMML. We demonstrated that idelalisib and crizotinib provided cytotoxic effect for PTPN11 gene mutation-positive CD34+ cells derived from JMML-iPS cells. Large amount of CD34+GMR+ cells were shown to be required for development of in-vitro assay for the combination therapy. Therefore, to obtain more the differentiated cells, we need to introduce a gradual increase of cytokines for differentiation and efficient separation of CD34+GMR+ cells.

研究分野：血液疾患における遺伝子、染色体解析；遺伝子解析技術の改良・開発

キーワード：若年性骨髄単球性白血病 iPS細胞 分子標的薬 GMR-CAR-T細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

若年性骨髄単球性白血病 (JMML) は乳幼児期に発症する幹細胞性白血病である。化学療法では治癒に至らず造血幹細胞移植が選択されるが、再発率が高い。JMML 患者の 80%以上で RAS/MAPK 経路の遺伝子変異やエピゲノム異常が検出されるため、MEK 阻害薬やエピゲノム薬などの分子標的薬の導入が期待されているが、単独での使用は薬剤耐性変異をもたらす。申請者は、JMML 細胞の GM-CSF 受容体 (GMR) に対するキメラ抗原受容体 (CAR) を発現させた遺伝子改変 T 細胞の優れた抗腫瘍効果を発表した。GMR-CAR-T 細胞と分子標的薬の併用は相加・相乗的な抗腫瘍効果をもたらす可能性がある。しかし、希少がん細胞株が存在しない JMML での治療モデルの構築はこれまで困難であった。私たちは JMML 患者由来 iPS 細胞の樹立に成功しており、JMML 由来 iPS 細胞から分化細胞を得ることができたため、分子標的薬ならびに GMR-CAR-T 細胞と分子標的薬の併用による抗腫瘍効果について in vitro での基礎検討を行いたいと考えた。

2. 研究の目的

JMML 由来 iPS 細胞から分化した CD34(+)細胞を用いて、分子標的薬ならびに GMR-CAR-T 細胞と分子標的薬による複合治療モデルを構築し、抗腫瘍効果を明らかにすることであった。

3. 研究の方法

(1) シグナル経路阻害剤の抗腫瘍効果の検証

JMML 由来 iPS 細胞からの血球分化誘導

今回使用した JMML 由来 iPS 細胞は、PTPN11 変異陽性および陰性の 2 種類の iPS 細胞を用いた。血球分化誘導前の各 iPS 細胞は、マウス胎児線維芽細胞である MEF をフィーダー細胞とし、reprostem (リプロセル社) を培養液として維持培養した。血球分化はマイトマイシン C (100 μ g/ μ L) 処理したストローマ細胞 (AGM-S3 細胞) をフィーダー細胞とし、10%FBS 添加 IMDM (ナカイテスク) を培養液として分化培養した。分化誘導には BMP4 (40ng/mL)、SCF (50ng/mL)、TPO (10ng/mL)、VEGF (10ng/mL) (各 Miltenyi Biotec) を同時に添加し、2 日ごとに培養液を半量交換し、14 日間培養した (文献 1)。

GM-SCF 含有メソカルトを用いたコロニー形成

iPS 細胞から分化誘導した血球細胞を PBS に浮遊させ、FcR Blocking reagent (Miltenyi Biotec) と CD34 Microbeans Kit Ultra pure (Miltenyi Biotec) を 100 μ L ずつ混和し 4、30 分間反応させた。磁気分離により CD34 陽性細胞を回収した。PTPN11 変異陽性 iPS 細胞および陰性 iPS 細胞からの細胞を PTPN11 変異陽性 CD34(+)細胞および PTPN11 変異陰性 CD34(+)細胞とした。GM-SCF 含有メソカルト (STEMCELL TECHNOLOGIES) と回収した CD34(+)細胞を下記の細胞数で混和した。PTPN11 変異陽性細胞は 8.5×10^3 /well、PTPN11 変異陰性細胞は 8.0×10^3 /well を混和した。その際に以下のシグナル経路阻害剤を添加した。14 日間培養し、位相差顕微鏡下でコロニー計数した。%コロニー形成能は、阻害剤/DMSO $\times 100$ により計算した。シグナル経路阻害剤は、c-Met 阻害剤であるクリゾチニブ (200nM) (Sei Ieckchem)、PI3K 阻害剤であるイデラリスブ (500nM) (Sei Ieckchem)、Mek 阻害剤であるトラメチニブ (100nM) (Sei Ieckchem) を使用した。また、陰性コントロールとして DMSO を使用した。

(2) JMML-iPS 細胞由来分化細胞の CD34 および GMR の発現解析

JMML 由来 iPS 細胞からの血球分化誘導

上記 (1) に使用した 2 種類の iPS 細胞の他に、PTPN11 変異陽性 iPS 細胞を ZFN によりゲノム改変し、PTPN11 変異を修復した iPS 細胞 (変異修復 iPS 細胞) を用いた。分化誘導は、(1) と同様に行った。

フローサイトメトリー法による CD34 および GMR (CD116) の発現解析

各 iPS 細胞から分化させた細胞を回収し、CD34-APC, human (Miltenyi Biotec)、PE Mouse Anti-Human CD116 (GMR) (BD Biosciences) を反応させ CD34 および GMR の発現解析を行った。アイソタイプコントロールとして、Mouse IgG2a-APC (Miltenyi Biotec)、PE Mouse IgG1, k Isotype Control (BD Biosciences) を用いた。

(3) GMR-CAR-T 細胞・シグナル経路阻害剤との混合培養実験

GMR-CAR-T 細胞の調整

Nakazawa らの方法 (文献 2) に従い、トランスポゾンベクター pIRII-CAR.GMR と piggyBac ベクターを用いて PBMC へ遺伝子導入した。コントロールは、ベクター未導入の PBMC を mock T 細胞として使用した。

混合実験における CD34(+) および GMR(+) 細胞の割合変化

(2) により分化した3種類の分化細胞を、AGMを播種した24wellプレートに細胞数が 3×10^5 /wellになるように播種し、GMR-CAR-T細胞を 3×10^5 /wellになるように播種して混合培養を行った。mock T細胞を 3×10^5 /wellで添加しコントロールとした。また、各混合培養液にクリゾチニブ、イデラリシブ、トラメチニブを添加した混合培養も行った。混合培養は1週間行い、培養液はサイトカイン Human SCF (130-093-991, Miltenyi Biotec) (10ng/mL)、Human TPO (130-094-011, Miltenyi Biotec) (10ng/mL)を添加したRPMI1640 (30264-56, ナカライテスク)を用いた。1週間後、フローサイトメトリー法によるCD34およびGMRの発現解析を行った。

4. 研究成果

(1) GM-CSF 反応性

PTPN11 変異陽性 CD34(+)細胞および PTPN11 変異陰性 CD34(+)細胞を GM-CSF 含有メソカルトと混和し 14日間培養した場合のコロニー数は、PTPN11 変異陽性 CD34(+)細胞では 178 個、PTPN11 変異陰性 CD34(+)細胞では 78 個であった(図1)。PTPN11 変異陽性 CD34(+)細胞では、コロニー数が変異陰性 CD34(+)の2倍以上となり、JMML の特徴である GM-CSF 高感受性を再現することができた。

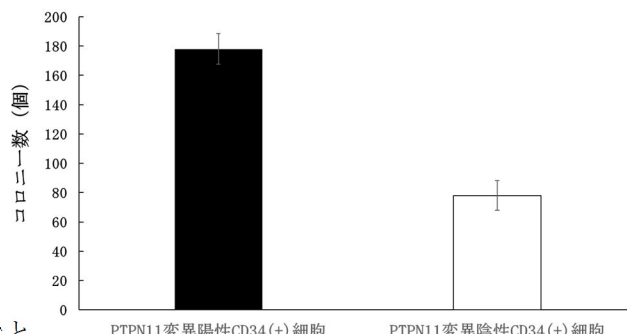


図1 GM-CSFの感受性
GM-CSF含有メソカルトを用いたコロニーアッセイ。14日間培養した後、コロニー数を算定した。

(2) シグナル経路阻害剤の効果(クリゾチニブ、イデラリシブ、トラメチニブ)

これまで、JMML において詳細な抗腫瘍効果の評価が行われていなかったシグナル経路阻害剤であるクリゾチニブとイデラリシブを用いてその抗腫瘍効果を解析した。なお、これまでの報告から抗腫瘍効果が明らかなトラメチニブを陽性コントロールとした。DMSOを100%にした際のコロニー数と各シグナル経路阻害剤添加後のコロニー数との割合である%コロニー形成能を指標とした。クリゾチニブを添加した場合、PTPN11 変異陽性 CD34(+)細胞で 10.7%、PTPN11 変異陰性 CD34(+)細胞で 25.6%であった(図2A)。イデラリシブを添加した場合、PTPN11 変異陽性 CD34(+)細胞で 14.6%、PTPN11 変異陰性 CD34(+)細胞で 30.8%であった(図2B)。陽性コントロールとして用いたトラメチニブでは%コロニー形成能はPTPN11 変異陽性 CD34(+)細胞で 0.1%、PTPN11 変異陰性 CD34(+)細胞で 14.4%であった(図2A, B)。イデラリシブとクリゾチニブは、PTPN11 変異陽性細胞に対してより高い抗腫瘍効果を示した。正常細胞ではRAS経路やJAK/STAT経路などシグナル経路を万遍なく利用し、生存・増殖するのに対し、腫瘍細胞ではPTPN11変異があるためにシグナル経路の利用能に偏りがあると考えられる。シグナル経路の利用能に偏りがあるためにクリゾチニブ、イデラリシブでc-met、PI3Kといったシグナル経路を阻害することで正常細胞よりも抗腫瘍効果が得られると考えられた。しかし、PTPN11 変異陽性細胞だけではなくPTPN11 変異陰性細胞でも、クリゾチニブおよびイデラリシブの投与で%コロニー形成能の減少がみられた。これは、JMML 細胞に対するクリゾチニブやイデラリシブの至適濃度は未だ明らかになっておらず、今回の研究では、他の腫瘍での報告を参考にして至適濃度を設定したためであると考えられた。今後、分化細胞を効率よく、かつ大量に供給できる分化誘導条件を再検討し、JMML 細胞における各阻害剤のin vitroでの至適濃度を選定していくのに有効であると考えている。

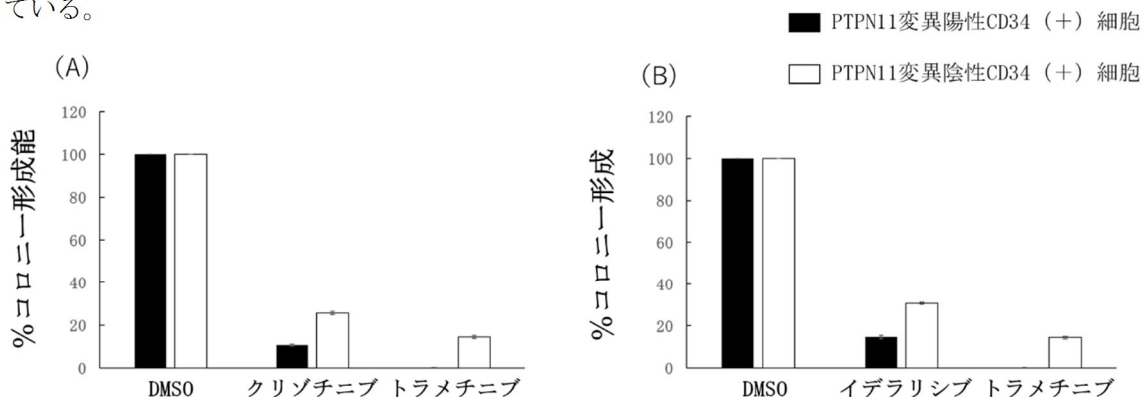


図2 シグナル経路阻害剤の効果(クリゾチニブ、イデラリシブ、トラメチニブ)

縦軸はDMSOを100%にした際のコロニー数とクリゾチニブ添加後のコロニー数との割合である%コロニー形成能を指標とした。クリゾチニブ 200nM、イデラリシブ 500nM、トラメチニブ 100nMを添加し、14日間培養した。その後、コロニー数を算定し、%コロニー形成能を算出した。

(3) JMML- iPS 細胞由来分化細胞における CD34 および GMR 陽性細胞の割合

PTPN11 変異陽性 iPS 細胞、変異修復 iPS 細胞、変異陰性 iPS 細胞から分化誘導した細胞を用いてフローサイトメトリー法による CD34 と GMR 発現解析の結果、CD34(+)GMR(+)細胞の割合は、PTPN11 変異陽性 iPS 細胞では 6.6%、変異修復 iPS 細胞では 2.1%、変異陰性 iPS 細胞では 1.9%、であった(図 3)。PTPN11 変異陽性 iPS 細胞から分化誘導した細胞において、CD34(+)GMR(+)細胞の割合が最も多かったことについては、PTPN11 変異陽性の JMML 患者由来の腫瘍細胞において GMR の発現が増加している点と一致している。JMML 治療において GMR 適切な標的(腫瘍マーカー)であることを裏付けるデータであると考えられる。

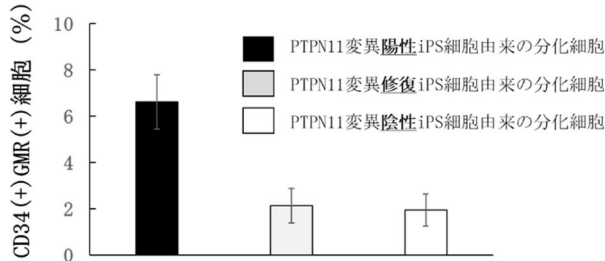


図3 iPS細胞由来分化細胞のCD34およびGMR陽性細胞の割合
APC標識抗CD34抗体及びPE標識抗CD116 (GMR) 抗体を用いてフローサイトメトリー法により各iPS細胞より分化した細胞を解析した。

(4) GMR-CAR-T 細胞・シグナル経路阻害剤との混合培養による抗腫瘍効果の解析

分化細胞と GMR-CAR-T 細胞の混合培養、ならびに分化細胞と GMR-CAR-T 細胞・シグナル経路阻害剤の混合培養を行った。混合培養を 1 週間行った後、フローサイトメトリー法により CD34(+)GMR(+)細胞の割合の変化を解析した。シグナル経路阻害剤を添加しない条件で、分化細胞と mock T 細胞を混合培養した場合で、既に CD34(+)GMR(+)細胞の割合が PTPN11 変異陽性 iPS 細胞では 0.4%、変異修復 iPS 細胞では 0.1%、変異陰性 iPS 細胞では 0.1%と著しく低く(表 1)、分化細胞と GMR-CAR-T 細胞の混合培養についても、CD34(+)GMR(+)細胞の割合は、それぞれ 1.0%、0.7%、0%であった。この解析は繰り返し実施したが、CD34(+)GMR(+)細胞の割合自体が低い状態を改善することが出来なかった。さらに、シグナル経路阻害剤 3 種類を添加した mock T 細胞、GMR-CAR-T 細胞との混合培養実験も行ったが、いずれもシグナル経路阻害剤を添加することで生細胞がほとんど得られず、CD34(+)GMR(+)細胞の割合変化を解析することが不可能であった。私たちは JMML- iPS 細胞から CD34(+)細胞 (GMR(+)細胞も含む) を分化誘導するサイトカインの組み合わせは見出している(文献 1)。しかし、混合培養やシグナル経路阻害剤などの分子標的薬を合わせた混合培養など in vitro でのモデル確立には、さらに多量な分化細胞を回収し使用する必要性が明らかになった。今後、分化に用いているサイトカインの漸増的添加など濃度勾配を付けた刺激や分化後の細胞剥離・分離の効率化を追加検討し、安定した in vitro モデルを確立したい。

表 1 混合培養後のCD34(+)GMR(+)細胞の割合 (%)

	PTPN11変異陽性iPS細胞由来の分化細胞	PTPN11変異修復iPS細胞由来の分化細胞	PTPN11変異陰性iPS細胞由来の分化細胞
mock T細胞	0.4	0.1	0.1
GMR-CAR-T細胞	1.0	0.7	0.0

< 引用文献 >

- 1 . Shigemura T, Matsuda K, Kurata T, Sakashita K, Okuno Y, Muramatsu H, Yue F, Ebihara Y, Tsuji K, Sasaki K, Nakahata T, Nakazawa Y, Koike K. Essential role of PTPN11 mutation in enhanced haematopoietic differentiation potential of induced pluripotent stem cells of juvenile myelomonocytic leukaemia. Br J Haematol. 2019 Oct;187(2):163-173.
- 2 . Nakazawa Y, Matsuda K, Kurata T, Sueki A, Tanaka M, Sakashita K, Imai C, Wilson MH, Koike K. Anti-proliferative effects of T cells expressing a ligand-based chimeric antigen receptor against CD116 on CD34(+) cells of juvenile myelomonocytic leukemia. J Hematol Oncol. 2016 Mar 16;9:27.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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	中沢 洋三 (Nakazawa Yozo) (60397312)	信州大学・学術研究院医学系・教授 (13601)	

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