

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790144

研究課題名(和文) iPS細胞を用いたリアルタイム培養細胞解析装置による分子標的薬の血小板減少解析

研究課題名(英文) Analysis of thrombocytopenia of molecular target drug by realtime culture cells analysis device with iPS cells

研究代表者

坂下 真大 (Hashita, Tadahiro)

群馬大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：20613384

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)：本研究では分子標的治療薬の中でも血小板減少を高頻度で起こす薬剤について、その血小板減少の作用機序をヒトiPS細胞から作製した巨核球を用いて解明することを目的とした。本研究過程において、VEGFの添加によりCD33陽性細胞が減少することを発見した。また、分化培地の違いによって巨核球への分化能力が異なることも発見した。現在、得られた巨核球を用いて引き続き研究を継続している。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to elucidate the mechanism of thrombocytopenia by molecular target drug. In this study, we found the decrease of CD33 positive cells by VEGF. Therefore, we found the differentiation to megakaryocyte differed by the differentiative medium. At present, we continue to study with megakaryocytes.

研究分野：臨床薬学

科研費の分科・細目：6806

キーワード：血小板減少 iPS細胞 分子標的治療薬 巨核球

1. 研究開始当初の背景

近年抗がん剤治療は、腫瘍細胞の増殖因子に関与するシグナルを阻害することで抗腫瘍効果を示す分子標的治療薬を用いた治療が主流になりつつある。これら分子標的治療薬は血小板由来成長因子受容体(PDGFR)などの様々なチロシンキナーゼを阻害する。分子標的治療薬が市場に出始めた頃、副作用の少ない薬として販売されていたが、多くの患者に投与されるにつれて従来の抗がん剤とは異なる副作用が出現し、また、重篤化しやすい副作用も出現することが分かってきた。特に、PDGFR阻害剤であるスニチニブ、ソラフェニブ、イマチニブなどは、血小板減少が高頻度で出現することが判明しており、重篤化しやすい。申請者も、スニチニブを用いた患者において、血小板数が1万個/mLを下回る重篤な血小板減少症例を経験したが、分子標的治療薬は効果と副作用を考慮した投与量を設定することが非常に難しい薬剤であることを痛感した。現在我々は、分子標的治療薬の血中濃度を測定することで、血小板減少を引き起こす血中濃度を模索しているが、分子標的治療薬が血小板減少を引き起こす作用機序は解明されておらず、また、どの程度の濃度が血小板減少を引き起こすかは未だ解明されていない。そのため、血小板減少の割合から投与量を調節する治療法は、未だ確立されていない。さらに血小板は、骨髄中の1個の巨核球細胞から数千個生成されるが、個々の患者から治療目的外で骨髄穿刺し細胞を採取することは、倫理上問題があり、患者自身の巨核球細胞を用いた解明には困難を有しているのが現状である。しかし、最近、ヒトiPS細胞から巨核球細胞を作成することが可能であることが報告され、その倫理的問題を解決する方法が見つっている。

2. 研究の目的

そこで、このiPS細胞から巨核球を作製する技術を利用して分子標的治療薬を投与されている患者の皮膚線維芽細胞から巨核球細胞を作成し、上記に示した分子標的治療薬を添加、巨核球細胞が減少する濃度(血小板減少が起こる濃度)を同定し、投与量調節に反映することを目的とした。

3. 研究の方法

理化学研究所等で販売されている京都大学で作製されたiPS細胞を用いて、巨核球への分化を行った。

(1) 細胞

iPS細胞は理化学研究所バイオリソースセンターより購入した120-4f1株を使用した。フィーダー細胞には、iPS細胞継代時ならびに維持時にはマウス胎児線維芽細胞(MEF)を、分化時にはマウスストロマ細胞OP9細胞、マウス間葉系細胞C3H10T1/2細胞を使用した。

(2) iPS細胞の維持ならびに継代

iPS細胞は3~4日毎に継代を行った。継代時にはY-27632とbFGFを併用して培養を行い、維持時にはbFGFのみを添加した。分化に用いたiPS細胞は継代数20回以下の細胞のみを使用した。ただし、継代数10回以下に関しては、iPS細胞の安定化を考慮し使用していない。

(3) iPS-sacの作製

ゼラチンコートした6穴プレートに 4×10^5 cells/mL程度となるように、OP9細胞またはC3H10T1/2細胞を播種した。24時間培養後、iPS細胞を 5×10^4 cells/mLの濃度で播種し、分化培地にて培養した。3日毎に培地交換を行い、14日間培養しiPS-sacを作製した。

(4) iPS-sac 内細胞の回収

iPS-sac をセルスクレーパーにて回収し、15 mL チューブに回収後、1,000 rpm で 5 分間遠心し沈殿させた。その後、この沈殿物をピペティングにより破壊し、70 μm のセルストレーナーにて iPS-sac 内の細胞を回収した。

(5) 巨核球への分化

iPS-sac をピペティングにより破壊した後、 5×10^4 cells/mL の濃度で再度 C3H10T1/2 細胞上に播種し直した。その後、SCF 50 ng/mL、TPO 100 ng/mL、ヘパリン 25U/mL となるように添加し 3 日毎に培地交換を行い 14 日程度培養した。

(6) フローサイトメトリーによる測定

iPS-sac 内細胞または巨核球への分化時に得られた浮遊細胞ならびに接着細胞を回収し、CD34、CD33、CD38、CD133、CD41a、CD61 に各蛍光色素 FITC、PE、APC、PE-vio770 が結合した抗体を使用して、フローサイトメーターにより解析を行った。死細胞の検出には life technology 社の SYTOX[®] AADvanced dead cell stain kit を測定直前に添加し検出した。

4 . 研究成果

(1) iPS-sac の作製

フィーダー細胞、分化培地によって iPS-sac 数ならびにその大きさが変化した。OP9 細胞上に iPS 細胞を播種した場合には、iPS-sac 数が減少した。一方、C3H10T1/2 細胞においては iPS-sac 数に大きな差は見られなかった。また、以前に報告されている巨核球への分化方法で使用されている分化培地では iPS-sac の大きさが小さかったのに対して、今回使用した分化培地ではいずれの iPS-sac に

おいても大きかった。

(2) iPS-sac 内の造血系細胞

iPS-sac 内の細胞をフローサイトメーターによって測定した。その結果、VEGF を添加して培養した場合には、VEGF を添加していない場合と比較して iPS-sac に大きな違いは見られなかったが、CD33 陽性細胞数が大きく減少した。一方、CD38 陽性細胞数においては大きな差は見られなかった。このことから、VEGF の添加によって造血系細胞への分化が低下している可能性が考えられた。

(3) 巨核球への分化

iPS-sac 内の細胞を新しく播種した C3H10T1/2 細胞上に播種し、さらに 14 日間培養した。分化時には 2 種類の分化培地を用いた。その結果、培地の種類に関わらず多数の浮遊細胞が得られた。これらをフローサイトメーターにて解析したところ、分化培地の種類によって CD41 陽性細胞、CD41/CD61 陽性細胞の比率が異なることが判明した。以前の報告にある巨核球への分化に使用されている分化培地では、今回の実験では分化誘導させることが出来なかったが、別の分化培地にて分化を誘導することが出来ていた。このことから、iPS 細胞株によって巨核球への分化に対して必要な培地や因子が異なることが推測された。また、CD34 陽性細胞においても分化培地の違いによって大きく異なっていることが示された。このことから造血幹細胞への分化誘導自体が培地によって異なることが考えられた。

以上の結果から、iPS 細胞から巨核球を作製することが可能になった。現在、この巨核球を用いて実験を継続している。

6 . 研究組織

(1)研究代表者

坂下 真大 (HASHITA, Tadahiro)

群馬大学大学院医学系研究科 助教

研究者番号 : 20613384