

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：16101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670282

研究課題名(和文) 巨核球系培養細胞を用いた薬剤評価法の確立

研究課題名(英文) Establishment of evaluation method of drugs using a megakaryocytic cultured cells.

## 研究代表者

細井 英司 (HOSOI, Eiji)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・教授

研究者番号：70229186

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：血小板の「機能亢進」や「活性化」が動脈閉塞性疾患の発症や再発に深く関与しており、各種抗血小板薬が疾患の治療や再発予防に用いられている。また、新規抗血小板薬の開発も行われ、各種薬剤の血小板に対する効果・作用を評価することが重要となってきた。本研究では、巨核球系に分化誘導したHEL細胞およびCMK細胞を「血小板モデル細胞」とし、各種薬剤(アスピリン、シロスタゾール、イブプロフェン、バルプロ酸ナトリウム)の血小板機能に及ぼす効果・作用を $[Ca^{2+}]_i$ 変動から評価可能とした。また、アスピリンの薬剤効果をCMK細胞膜上CD62P抗原変動から評価可能であることを明らかにし、本評価法の有用性を報告した。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we attempted to improve the evaluation of various drugs on the platelet functions using PMA-induced megakaryocytic HEL cells and CMK cells as an alternative cell of platelets. We selected aspirin and cilostazol as antiplatelet drugs and ibuprofen and sodium valproate as other drugs. In conclusion, PMA-induced megakaryocytic HEL cells and CMK cells are a useful model for this study of platelet functions, and the quantification of inhibition of thrombin-induced  $[Ca^{2+}]_i$  and thrombin-induced CD62P antigen were applicable to the evaluation of various drugs on platelets. Furthermore, this evaluation system using these platelet model cells may contribute to appropriate drug selection and doses in order to control of the platelet functions without using the platelet, and is expected future use in clinical field.

研究分野：輸血検査学，免疫検査学

キーワード：小板 巨核球系培養細胞  $Ca^{2+}$  PMA 分化誘導 HEL CMK 薬剤評価法

### 1. 研究開始当初の背景

血小板の粘着・凝集機能は止血作用に必要不可欠であり、それらの機能発現に  $Ca^{2+}$  が重要な役割を果たしている。一方、血小板の「機能亢進」や「活性化」は、動脈閉塞性疾患の発症や再発に深く関与しており、各種抗血小板薬が疾患の治療や再発予防に用いられている。また、新規治療薬の開発により、血小板に対する各種薬剤の効果や作用の評価が重要となってきている。近年我々は、ヒト血小板内  $Ca^{2+}$  濃度と血小板凝集強度との間に正の相関を認め、血小板の「凝集機能」や「活性化」あるいは各種薬剤の血小板機能に対する効果や作用を血小板内  $Ca^{2+}$  濃度から評価可能であること、血液培養細胞 HEL (赤白血病患者由来) を「血小板モデル細胞」として使用し、各種薬剤の血小板機能に対する効果や作用を細胞内  $Ca^{2+}$  濃度 ( $[Ca^{2+}]_i$ ) 変動から間接的に評価可能であること、さらに巨核球系に分化誘導した HEL 細胞を用いた予備実験により低濃度アスピリンの薬剤評価が可能であることを明らかにした。また、血小板膜蛋白抗原である活性化型 CD41 抗原 (activated GP b/a) や CD62P 抗原が血小板活性化マーカーとして注目されており、アスピリンやシロスタゾールが血小板に及ぼす効果をヒト血小板膜上の各抗原の変化量から評価可能であること、さらにそれらの抗原発現と  $[Ca^{2+}]_i$  との関係を報告した。

### 2. 研究目的

本研究では、血小板の代替細胞として血液培養細胞を「血小板モデル細胞」として用いることで「各種薬剤の血小板機能に対する効果や作用」を  $[Ca^{2+}]_i$  変動から解析する評価法、さらに血小板膜上の血小板活性化マーカーである CD41 抗原、活性化型 CD41 抗原および CD62P 抗原の発現解析による評価法を確立し、その有用性を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究方法

(1) 対象: 「血小板モデル細胞」として HEL 細胞、CMK 細胞 (巨核芽球性白血病患者由来)、さらに巨核球系に分化誘導した HEL 細胞および CMK 細胞を用いた。

(2) 細胞継代: 10% 子牛血清を含む RPMI-1640 培地を用い、37℃、5%  $CO_2$  条件下で培養した。

(3) 巨核球系への分化誘導と細胞調整: HEL 細胞および CMK 細胞を  $2.0 \times 10^5$  個/mL に調整し、分化誘導剤 (100nM PMA) で処理を行った。4 日間培養後、培養ボトルの底に付着した細胞を回収した。回収法は、上清を取り除

き HEPES buffer または PBS で 2 回洗浄を行い、PBS (1mM EDTA・4Na 含) を加え 37℃ / 10 分間インキュベーション後、浮遊したすべての細胞を 260g/5 分間遠心した。上清を除き、HEPES buffer または PBS で 3 回洗浄後、1mL HEPES buffer あるいは PBS で浮遊させた。

(4) 細胞膜表面抗原の発現解析: HEL 細胞と PMA 処理 HEL 細胞膜上の CD41 抗原、活性化型 CD41 抗原あるいは CD62P 抗原の発現解析では、各細胞を  $1.0 \times 10^6$  個/mL PBS に調整した細胞浮遊液 100 $\mu$ L に抗 CD41 抗体、活性化型 CD41 抗原に対する抗体 (PAC-1) あるいは抗 CD62P 抗体 10 $\mu$ L (各陰性コントロール抗体を使用) を添加し、4℃ / 30 分間インキュベートした。反応後、PBS で 2 回洗浄後、500 $\mu$ L PBS で再浮遊してフローサイトメトリー解析を行った。

(5) 細胞内  $Ca^{2+}$  濃度測定: 回収・洗浄した付着処理細胞に 1mL HEPES  $Ca^{+}$  buffer を加え、その細胞浮遊液中に Fura2-AM (2 $\mu$ M/mL) を添加後、1 時間インキュベーションすることによって、Fura2-AM を細胞内に取り込ませ、膜不透過性の  $Ca^{2+}$  結合能を持つ Fura2 にした。その後、HEPES  $Ca^{+}$  buffer にて 3 回洗浄した。次に、得られた処理細胞を、HEPES  $Ca^{+}$  buffer に浮遊させ、細胞数を  $1.0 \times 10^6$  個/mL に調製後、 $[Ca^{2+}]_i$  測定に用いた。各細胞浮遊液 ( $1.0 \times 10^6$  個/mL) 480 $\mu$ L を石英セルに入れ、蛍光分光光度計内で 37℃ 加温後、スターラーで攪拌し、開始後 50 秒後に各薬剤用のコントロールあるいは各種薬剤をそれぞれ添加した。さらに、その 360 秒後にトロンピンを添加・刺激し、その後 Triton-X, EGTA の順に各試薬を添加した。細胞内に放出された  $Ca^{2+}$  と Fura2 の結合した複合体を 340nm と 380nm の 2 波長で励起し、発生した 510nm の蛍光強度を蛍光分光光度計 (日立 F-2500) で測定後、比例演算して  $[Ca^{2+}]_i$  を算出した。

### (6) 検討項目:

巨核球系への分化誘導: PMA 処理で HEL 細胞と CMK 細胞を巨核球系に分化誘導する。

巨核球系への細胞分化の確認と血小板モデル細胞としての評価:

a) 細胞の形態・状態変化: 細胞サイズの増大と多核化、さらに PAS 染色にて巨核球系細胞の特徴を確認する。

b) 細胞分化マーカーの解析: 細胞の分化・分化方向を解析するため、巨核球系/血小板系分化マーカーである CD41 抗原の発現量をフローサイトメトリー法により解析する。

c) 細胞内  $Ca^{2+}$  濃度解析:  $Ca^{2+}$  に特異的結合する Fura2 を用いて、トロンピン刺激による蛍光強度変化から刺激の強さと  $[Ca^{2+}]_i$  変化量との関係を明らかにする。

(7) 抗血小板薬（アスピリンおよびシロスタゾール）の効果を評価：巨核球系に分化誘導した HEL 細胞および CMK 細胞と無処理の CMK 細胞を血小板モデル細胞として、以下の評価指標の解析から薬剤効果を評価する。

細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度解析：Ca<sup>2+</sup>に特異的結合するFura2を用いて、トロンビン刺激[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>変動から薬剤効果を評価する。

細胞膜表面抗原の発現解析：各細胞膜上のCD41抗原、活性型CD41抗原およびCD62P抗原量から薬剤効果を評価する。

(8) 最適な「血小板モデル細胞」を用いた各種薬剤評価：

各種薬剤評価：抗血小板薬、その他の薬剤としてアスピリンとの相互作用が注目されている非ステロイド系消炎鎮痛剤（イブプロフェン）、さらに血小板凝集能低下による血小板への影響が報告されている抗てんかん（バルプロ酸ナトリウム）の効果・作用を評価する。

薬剤同時併用による評価：アスピリンとイブプロフェンあるいはバルプロ酸ナトリウムとの薬剤同時併用での薬剤効果・作用を評価する。

#### 4. 研究成果

##### (1) 巨核球系への分化誘導

HEL 細胞は高い核/細胞質比率を示す小型浮遊細胞であるが、PMA で4日間処理することにより、浮遊細胞のほとんどが培養ボトルの底に付着し、さらに細胞はほとんどすべてが大型の巨核球系細胞に分化・多核化傾向を示し、PAS 染色で陽性となった(図1A, B)。また、PMA 処理 HEL 細胞は無処理細胞に比べてフローサイトメトリー解析で FS および SS がともに高く、細胞の大型化、内部構造の複雑化が確認できた。さらに、PMA 処理によって血小板マーカーである CD41 抗原発現が HEL 細胞に比べ高くなった（HEL 細胞での陽性率 59 ± 19% が、PMA 処理によって 84 ± 11% と有意に上昇した）。

なお、CMK 細胞においても HEL 細胞と同様に PMA 処理により細胞の大型化と粘着能の増強が認められた。

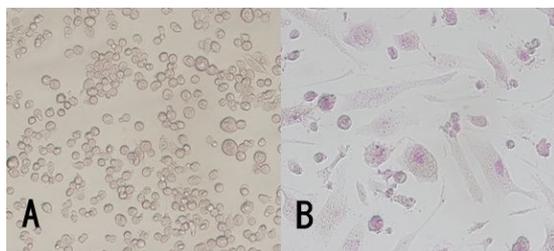


図1 PMA 処理 HEL 細胞の形態的变化  
(付着細胞の代表例を比較)

(2) HEL 細胞と PMA 処理 HEL 細胞および CMK 細胞と PMA 処理 CMK 細胞を用いたトロンビン刺激[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>に対する抗血小板薬の効果・作用

HEL 細胞と PMA 処理 HEL 細胞のトロンビン刺激での Ca<sup>2+</sup>放出における抗血小板薬（アスピリンとシロスタゾール）の効果・作用は、アスピリン（5.6 - 560μM）では、両細胞でトロンビン刺激[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>を薬剤濃度依存的に抑制した。特に、PMA 処理 HEL 細胞では全ての濃度で[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>を有意に抑制した。一方、シロスタゾール（1.0 - 10μM）でも、アスピリン同様に両細胞でトロンビン刺激[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>を薬剤濃度依存的に抑制し、PMA 処理 HEL 細胞では 5, 10μM 濃度で[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>を有意に抑制した。

また、CMK 細胞においても PMA 処理 HEL 細胞を用いた時とほぼ同程度に抗血小板薬（アスピリンとシロスタゾール）の効果を認めた。一方、PMA 処理によって CMK 細胞は分化傾向が認められたが、トロンビン刺激に対する反応性の低下が確認され、血小板モデル細胞として不適であった。したがって、以下の検討では HEL 細胞、PMA 処理 HEL 細胞および CMK 細胞を用いて解析を行った。

(3) HEL 細胞、PMA 処理 HEL 細胞および CMK 細胞を用いたトロンビン刺激[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>に対するその他の薬剤作用の評価

HEL 細胞と PMA 処理 HEL 細胞におけるトロンビン刺激による Ca<sup>2+</sup>放出に対するイブプロフェンとバルプロ酸ナトリウムの解析では、イブプロフェン（0.8 - 200μM）において両細胞でトロンビン刺激[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>を薬剤濃度依存的に抑制した。特に、PMA 処理 HEL 細胞では 8 - 200μM 濃度で有意に抑制した。一方、バルプロ酸ナトリウム（50 - 1000μg/ml）においても、同様に両細胞でトロンビン刺激[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>を薬剤濃度依存的に抑制し、PMA 処理 HEL 細胞では全ての濃度で有意に抑制した。これらの結果から、PMA 処理 HEL 細胞が「血小板モデル細胞」として適していることが示唆された。

また、CMK 細胞でも PMA 処理 HEL 細胞を用いた時とほぼ同程度の薬剤効果・作用を評価できたことから「血小板モデル細胞」として使用可能であると考えられた（表1）。

表1 HEL細胞、PMA処理HEL細胞およびCMK細胞における各種薬剤のトロンビン刺激[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>に及ぼす効果・作用(抑制率)の比較

薬剤	使用細胞	HEL	PMA処理HEL	CMK
アスピリン (5.6 μM)		2±2%	12±2%	12±7%
アスピリン (56 μM)		17±2%	23±6%	29±9%
シロスタゾール (2 μM)		7±2%	12±5%	16±8%
イブプロフェン (80 μM)		18±3%	38±9%	45±16%
バルプロ酸ナトリウム (100 μg/ml)		15±4%	26±4%	16±9%

(n=5~6, mean±SD)

(4) PMA 処理 HEL 細胞を用いたトロンピン刺激  $[Ca^{2+}]_i$  に対する薬剤同時併用の評価

アスピリン (56  $\mu$ M) とイブプロフェン (0.8 と 8  $\mu$ M) およびアスピリン (5.6  $\mu$ M) とバルプロ酸ナトリウム (50 と 100  $\mu$ g/ml) との薬剤同時併用での薬剤効果・作用を評価した。

アスピリンのトロンピン刺激  $[Ca^{2+}]_i$  抑制効果が同時併用したイブプロフェン (0.8 と 8  $\mu$ M) と同等かあるいは高い場合、アスピリンの薬剤効果が有意に減弱された。しかし、イブプロフェン (80 および 200  $\mu$ M) がアスピリンの抑制効果より高い場合には、イブプロフェンの薬剤作用が減弱された。一方、バルプロ酸ナトリウム (50 と 100  $\mu$ g/ml) との同時併用ではバルプロ酸ナトリウムの抑制作用の強弱にかかわらず、 $[Ca^{2+}]_i$  抑制作用が相乗的に増強された (表 2)。

表2 薬剤同時併用におけるトロンピン刺激  $[Ca^{2+}]_i$  に及ぼす効果・作用

薬剤1	薬剤2	$[Ca^{2+}]_i$ 抑制効果・作用
アスピリン (56 $\mu$ M)	+ イブプロフェン (0.8, 8 $\mu$ M)	アスピリン抑制効果が有意に減弱 ↓
アスピリン (56 $\mu$ M)	+ イブプロフェン (8, 200 $\mu$ M)	イブプロフェン抑制作用が有意に減弱 ↓
アスピリン (5.6 $\mu$ M)	+ バルプロ酸ナトリウム (50, 100 $\mu$ g/ml)	相乗的に増強 ↑

(5) HEL 細胞および CMK 細胞における活性化 CD41 抗原および CD62P 抗原の発現量変化に対するアスピリンの薬剤評価

トロンピン刺激による CD41 抗原の活性化型 CD41 抗原への変化は、HEL 細胞および CMK 細胞の両細胞では認めることができなかった。一方、CD62P 抗原については CMK 細胞のみに変化が認められた。したがって、「血小板モデル細胞」として CMK 細胞を用いた。CMK 細胞は、すでに細胞膜上に少量の CD62P 抗原を発現していたが、その発現量はトロンピン刺激によって濃度依存的に上昇した。また、トロンピン刺激によって増加する CD62P 抗原発現は、アスピリン 100 および 1000  $\mu$ g/ml で有意に減少し、その陽性率はアスピリン濃度依存的に抑制された (図 2)。以上のことから、CMK 細胞を「血小板モデル細胞」として使用し、CD62P 抗原発現量の変化からアスピリンの薬剤評価が可能であった。なお今後、さらに条件検討や各種薬剤についての詳細な検討を行う予定である。

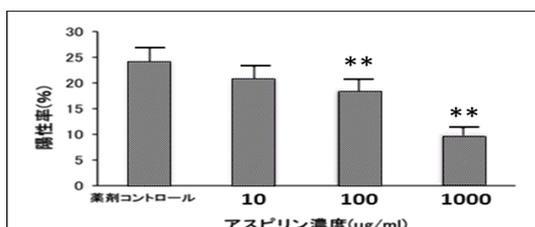


図 2 アスピリンによる CD62P 抗原の陽性率の変化 (n=5, mean  $\pm$  SD, \*\*:P<0.01)

[結果]

PMA 処理によって HEL 細胞を巨核球系に分化させた PMA 処理 HEL 細胞および CMK 細胞を「血小板モデル細胞」として用いた本評価法は、アスピリン、シロスタゾール、イブプロフェンおよびバルプロ酸ナトリウムの薬剤効果・作用を  $[Ca^{2+}]_i$  変動から評価可能であった。また、アスピリンとイブプロフェンやアスピリンとバルプロ酸ナトリウムにおける薬剤同時併用での薬剤効果・作用を評価可能であった。さらに詳細な検討が必要であるが、CMK 細胞を「血小板モデル細胞」として用いることで、血小板活性化マーカーの一つである CD62P 抗原の発現量の変化からアスピリンの薬剤効果が評価することが可能であった。

[結語]

巨核球系に分化誘導した HEL 細胞または CMK 細胞を「血小板モデル細胞」として使用する本評価法は、血小板を使用せず、血小板に対する適切な薬剤効果・作用、さらに薬剤の選択や投与量の検討ができる可能性があり、各種薬剤効果・作用を評価する上で有用であり、今後臨床への貢献度も高いと考えられる。

## 5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 4 件)

酒井 美由希, 小林 沙綾, 多田 智紀, 大星 航, 植木 春香, 川添 和義, 安藝 健作, 細井 英司: 血小板モデル細胞を用いた各種薬剤併用における薬剤効果・作用の評価, 第 39 回 徳島県医学検査学会, (2015 年 12 月 13 日, 徳島大学, 徳島県徳島市)

多田 智紀, 安藝 健作, 大星 航, 川添 和義, 植木 春香, 川添 和義, 細井 英司: 血小板モデル細胞を用いた各種薬剤評価の検討, 第 10 回 日本臨床検査学教育学会学術大会, (2015 年 8 月 20 日, 信州大学, 長野県松本市)

原田 啓, 後藤 里香, 多田 智紀, 大星 航, 植木 春香, 川添 和義, 安藝 健作, 細井 英司: 巨核球系培養細胞 CMK を用いた抗血小板薬の薬剤評価法の検討, 第 38 回 徳島県医学検査学会, (2014 年 12 月 14 日 徳島大学, 徳島県徳島市)

多田 智紀, 大星 航, 安藝 健作, 細井 英司: 巨核球系培養細胞を用いた血小板機能におよぼす薬剤評価法の検討, 2014 感染・免疫クラスター・ミニリポート [徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部], (2014 年 10 月 31 日, ルネッサンスリポートナルト会議室, 徳島県鳴門市)

## 6 . 研究組織

### (1) 研究代表者

細井 英司 (HOSOI, Eiji )

徳島大学・大学院医歯薬学部研究部・教授

研究者番号：70229186

### (2) 研究分担者

安藝 健作 (AKI, Kensaku)

徳島大学・大学院医歯薬学部研究部・助教

研究者番号：70646398