

研究報告書  
平成29年度：B課題

令和元年5月7日

公益財団法人 がん研究振興財団

理事長 堀田知光 殿

研究施設 信州大学医学部附属病院

住 所 松本市旭 3-1-1

研究者氏名 松田 和之



(研究課題)

遺伝子変異特異的定量 PCR 法を用いた若年性骨髄単球性白血病に対する分子標的薬効果の検証

---

平成30年1月24日付助成金交付のあった標記B課題について研究が終了致しましたのでご報告いたします。

## 平成 29 年度がん研究助成金 研究報告書

---

研究課題：一般課題 B

研究課題名：遺伝子変異特異的定量 PCR 法を用いた若年性骨髄単球性白血病に対する分子標的薬効果の検証

研究施設：信州大学医学部附属病院臨床検査部

研究者：松田和之

---

### 1. 研究目的

若年性骨髄単球性白血病 (juvenile myelomonocytic leukemia; JMML) は乳幼児期に発症する希少がんである。化学療法では治癒に至らず、移植後再発率が高い難治性の疾患である。さらに、JMML 細胞は形態学的特徴に乏しく、特異的な染色体異常やキメラ遺伝子形成などが皆無のため、正確な治療効果の判定が困難であった。そこで、申請者は、JMML の診断基準に含まれている RAS/MAPK シグナル経路の遺伝子群の一塩基変異に注目し、その遺伝子変異を治療後の微小残存病変のマーカーとして利用するという発想で遺伝子変異特異的定量 PCR 法を構築した (Matsuda et al., Br J Haematology, 2010)。JMML では RAS/MAPK シグナル経路の遺伝子変異やエピジェネティック異常が知られており、MEK 阻害剤やメチル基転移酵素阻害剤などの分子標的薬が期待されている。しかし、JMML は希少がんのため臨床検体の使用は制限され、さらに細胞株が存在しないため、治療モデルが構築できていなかった。そこで、申請者は JMML 患者由来 iPS 細胞の樹立を行い、CD34 陽性細胞の分化誘導に成功し安定的な患者由来細胞の供給を可能にした (論文投稿中)。

本研究では、これまでの申請者らの成果を活かし、分子標的薬に対する JMML 細胞の効果について、JMML 患者由来 iPS 細胞から分化した CD34 陽性細胞を用いて、各種薬剤による抗腫瘍効果をメソカルトを用いたコロニー形成法及び遺伝子変異特異的定量 PCR 法によって評価することを目的とした。

### 2. 研究方法

#### (1) 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 遺伝子の変異 c.226G>A が陽性および陰性の 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 (MEF) を feeder 細胞とし、リプロステム (リプロセル社) を用いて維持培養した。血球分化誘導はマイトマイシン C 処理した AGM を feeder 細胞として用い、10%FBS が含まれる IMDM (ナカイテスク) を使用し、4 種類のサイトカイン (BMP4, SCF, TPO, VEGF) を同時添加し、2 日ごとに培養液を半量交換し、14 日間培養した。

## (2) 検討したシグナル経路阻害剤

検証した阻害剤として c-met 阻害剤であるクリゾチニブ(Selleckchem)、PI3K 阻害剤であるイデラリスチブ(Selleckchem)、Mek 阻害剤であるトラメチニブ(Selleckchem)を使用した。既報で効果が実証されているトラメチニブを陽性コントロールとした。また、陰性コントロールとして DMSO を使用した。クリゾチニブは 200 nM、イデラリスチブは 500 nM、トラメチニブは 100 nM 添加した。

## (3) メソカルトを用いたコロニー形成法

分化誘導した血球細胞から磁気分離により CD34 陽性細胞を回収した。PTPN11 遺伝子変異陽性 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。メソカルト(GM-CSF を含む)(STEMCELL TECHNOLOGIES)と回収した CD34 陽性細胞を混和した。(2)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×100 により計算した。

## (4) 遺伝子変異特異的定量 PCR 法

(3)に従い分離した PTPN11 変異陽性 CD34(+)細胞および PTPN11 変異陰性 CD34(+)細胞を等量混和し、(2)の各種薬剤を添加して 24 時間培養した。その後、ゲノム DNA を抽出し、PTPN11 c.226G>A に対する変異特異的定量 PCR 法を既報 (Matsuda et al., Br J Haematology, 2010) に従って行った。変異量はアルブミン遺伝子量で補正した。

## 3. 研究結果

### (1) GM-CSF の感受性

DMSO を添加し、14 日間培養し、コロニー数を検証した結果、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。

### (2) メソカルトを用いたコロニー形成法による抗腫瘍効果の評価

#### ① クリゾチニブの効果

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。c-met 阻害剤であるクリゾチニブを添加し、コロニー形成能を検証した結果、PTPN11 変異陰性 CD34(+)細胞で 25.6%、PTPN11 変異陽性 CD34(+)細胞で 10.7%であった。また、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 0 であった。

#### ② イデラリスチブの効果

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。PI3K 阻害剤であるイデラリスチブを添加し、コロニー形成能を検証した結果、PTPN11 変異陰性 CD34(+)細胞で 30.8%、PTPN11 変異陽性 CD34(+)細胞で 14.6%、トラメチニブで 0%の %コロニー形成能であった。また、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 0 であった。

### (3) 遺伝子変異特異的定量 PCR 法による抗腫瘍効果の評価

#### ① クリゾチニブの効果

DMSO での遺伝子変異量を 1 とした場合、クリゾチニブ添加時の遺伝子変異量は約 1/1000 であった。

#### ② イデラリシブの効果

DMSO での遺伝子変異量を 1 とした場合、イデラリシブ添加時の遺伝子変異量は約 1/800 であった。

## 4. 考察

本研究で用いた JMML 由来 iPS 細胞から分化誘導した CD34(+)血球細胞は、JMML 細胞の特徴を反映した。すなわち、PTPN11 変異陰性 iPS 細胞および陽性 iPS 細胞から誘導した CD34 陽性細胞を用いたコロニー数の比較から、PTPN11 変異陽性 CD34(+)細胞では、コロニー数が 2 倍以上となり、JMML の特徴である GM-CSF 高感受性を再現していた。

c-met 阻害剤であるクリゾチニブ、PI3K 阻害剤であるイデラリシブは、JMML に対する有効な抗腫瘍薬の候補になり得る。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イデラリシブとクリゾチニブは、コロニー形成法による評価の結果、PTPN11 変異陽性細胞に対してより高い抗腫瘍効果を示した。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濃度を決定したためとも考えられた。今後、細胞を恒常的に供給できる本実験系を用いて *in vitro* で PTPN11 変異陽性細胞に特異的かつ有効な至適濃度を選定する必要があると考えられた。

遺伝子変異特異的定量 PCR 法による遺伝子変異量を解析した。2 剤ともに、添加後に変異量が減少していることを明らかにすることができた。2 剤での変異量の違いは、コロニー形成法による変異陽性細胞での%コロニー形成能の違いと一致するものであり、本 PCR 法がコロニー形成法による評価と一致して変異陽性細胞の量を評価できる方法であると考えられた。しかし、コロニー形成法による解析から、変異陰性の正常細胞に対する非特異的な薬剤効果も認められていた。従って、薬剤による抗腫瘍効果の評価する際には、ゴールドスタンダードであるコロニー形成法と遺伝子変異特異的定量 PCR 法による評価を併せて行うことが必要であると考えられた。

## 5. 謝辞

本研究を遂行するに当たり、研究助成のご支援を賜りました公益財団 がん研究振興財団に深く感謝申し上げます。