

【要約】

Anagrelide suppresses cell cycle progression and
maturation of megakaryocyte progenitor cell lines
from human iPS cells

(iPS 細胞由来巨核球系前駆細胞株を用いたアナ
グレリドによる血小板産生抑制機構の解明)

千葉大学大学院医学薬学府

先端医学薬学専攻

(主任：横手 幸太郎 教授)

高石 浩司

【背景】 アナグレリドは本態性血小板血症の治療薬として、1997年に米国、2004年にEU、2014年9月に本邦での承認を得た薬剤である。アナグレリドは心筋や血小板に局在するPDE3の阻害作用を有し、そのPDE3阻害作用が血小板凝集抑制効果をもたらすことから、1970年代当初より薬剤開発が進められてきた。しかし、健常被験者への投与で血小板減少を認めたため、現在ではその血小板減少効果を期待して臨床応用されている。アナグレリドは巨核球系細胞に特異的に作用することが知られており、他の細胞減少療法薬に比して白血球系や赤血球系への影響が少ないとされるが、その血小板減少の機序はPDE3阻害作用では十分に説明できず、未だ解明されていない。その背景として、巨核球の増殖や分化、血小板の産生を検証する実験系が確立されていないことが一因として挙げられる。人工的な血小板の臨床応用を目的として京都大学iPS細胞研究所にて開発されたヒトiPS細胞由来の巨核球系前駆細胞株(imMKCLs)は、レンチウイルスベクターを介して導入された*c-MYC*、*BMI1*、*BCL-XL*遺伝子の過剰発現により未分化な状態を維持したまま自己複製する。この細胞株の培養条件からドキシサイクリンを除くことで、細胞分化が開始し、機能的な血小板を産生する。

【目的】 本研究では、このimMKCLsを用いた実験系が巨核球や血小板に関する実験系の一つの有用なモデルであることを実証し、さらに、この実験系でアナグレリドの血小板産生抑制機構を解明することを目的とした。

【方法】 未分化群および分化群のimMKCLsにアナグレリドを作用させ、核や細胞質など細胞の形態変化を鏡検し、MTSアッセイやBrdU ELISAの手法を用いて分化および増殖能への影響を確認し、さらにフローサイトメトリーを用いた血小板解析でアナグレリド投与による血小板産生の変化を確認した。また、アナグレリドの作用機序をRNAシーケンス等の手法を用いて検証した。

【結果】 imMKCLsの培養条件にアナグレリドを加えることによって、細胞の

多核化や細胞質の成熟が抑制され、また、巨核球の分化関連遺伝子である *ITGA2B*(CD41) および *ITGB3*(CD61) の発現が有意に低下した ($P < 0.01$, $P < 0.001$)。さらに、未分化な imMKCLs の培養液に $1\mu\text{M}$ および $10\mu\text{M}$ のアナグレリドを加えることで、96 時間後の細胞数が有意に低下し ($P < 0.01$, $P < 0.001$)、分化した imMKCL の培養液に $1\mu\text{M}$ 、 $10\mu\text{M}$ のアナグレリドを加えることで 48 時間後の DNA 合成が有意に抑制された ($P < 0.001$, $P < 0.001$)。また、血小板解析において、アナグレリド投与によって CD41 および CD42b 陽性の成熟血小板の産生を有意に低下した ($P < 0.001$)。

続いて、アナグレリド投与による各遺伝子の発現の変化を、RNA シークエンسを用いて網羅的に解析した。アナグレリド投与によって発現が 2 倍以上に上昇あるいは半分以下に低下した遺伝子を抽出した結果、解析対象となった約 24000 の遺伝子のうち、未分化群において 191 の遺伝子の発現が上昇しており、102 の遺伝子の発現が低下していた。また、分化群において 417 の遺伝子の発現が上昇しており、377 の遺伝子の発現が低下していた。さらに未分化群および分化群の両群に共通して 160 の遺伝子の発現が上昇し、87 の遺伝子の発現が低下していた。発現が変化した遺伝子の Gene Ontology 解析を行った結果、cAMP に対する反応に関わる遺伝子群が両群で共通に上昇していたほか、特に分化群においてアポトーシスを抑制する遺伝子群が有意に上昇していた。また、両群に共通して血小板の活性化や脱顆粒に関わる遺伝子群が有意に低下していた。さらに、Gene set enrichment analysis を行ったところ、巨核球の分化および成熟過程における有糸分裂や DNA 合成などの細胞周期に関わる遺伝子群や血小板に特異的とされる遺伝子群の発現が、両群に共通して有意に低下していた。また、アナグレリド投与によって、巨核球の分化や血小板の活性化に関わるとされる既知の遺伝子 *TRIB3* の発現が上昇、*PF4* の発現が低下し、それぞれ巨核球の分化や血小板の活性化を抑制する方向に変化することをリアルタ

イム定量 PCR にて確認した。

続いて、imMKCLs に $1\mu\text{M}$ および $10\mu\text{M}$ のアナグレリドを作用させ、48 時間後にフローサイトメトリーを用いた細胞周期解析を行ったところ、アナグレリド投与群においては G1 期から S 期へ進展する細胞数が減少している、つまり G1 期停止をきたしていることが示された。この結果は、アナグレリドが巨核球分化における細胞周期に関わる遺伝子群を抑制するという RNA シークエンスの結果を支持した。さらに、imMKCLs に $1\mu\text{M}$ および $10\mu\text{M}$ のアナグレリドを作用させ、2 日後および 7 日後にアポトーシス解析を行ったところ、アナグレリド投与によって未分化群および分化群ともにアポトーシスが誘導されていなかった。

【考察・結論】 これらの実験結果から、アナグレリドは巨核球系細胞において、アポトーシスを誘導せず、細胞周期を抑制する、特に G1 期停止をきたすことで巨核球の分化や増殖を抑制し、引き続いて起こる血小板産生を抑制する効果をもたらしている可能性が示唆された。同時に、本研究は imMKCLs が巨核球や血小板産生に関する実験に有用なモデルであることを実証した。