

短 報

ヒト造血器腫瘍細胞株における新規 MEK1/2阻害薬 binimetinibの効果的投与方法の探索

榊原佳奈枝^{*1} 通山薫^{*2}

要 約

われわれは以前、ヒト造血器腫瘍細胞株における binimetinib の増殖抑制効果を確認したが、その際は培養初日の薬剤1回添加のみで検討していた。そこで今回、連日添加の効果を検討したところ、F36Pを除くすべての細胞株において増殖抑制効果の増強は認められなかった。したがって、binimetinib の添加は基本的に初日の1回添加で十分であり、それで増殖抑制効果の乏しい細胞には複数回の添加を行ってもほとんど効果はないと考えられる。ただし、将来臨床応用に向けて binimetinib の適正な投与方法を確立するためには、高濃度での連日添加などさらなる検討が必要である。

1. 緒言

1.1 はじめに

RAS 遺伝子の突然変異は、さまざまな種類の悪性腫瘍で広く認められる。造血器腫瘍においても NRAS 変異を高率に認めることがすでに判明しており、急性白血病の約15%、骨髄異形成症候群の約6%、骨髄増殖性疾患や多発性骨髄腫では、およそ30%もの患者が保有している¹⁾。これまで本研究室では、ヒト造血器腫瘍細胞株に対する binimetinib の増殖抑制効果を検討してきた。その結果、計10株のヒト造血器腫瘍細胞株を感受性4株 (HL-60, TF-1, MDS-L, F36P)、非感受性4株 (Jurkat, MOLM13, U937, MOLT4)、その他2株 (THP-1, K562) に分けることができた。binimetinib 感受性の4株では、培養初日に薬剤を1回投与するだけで一定の増殖抑制効果を認めたが、非感受性の4株では全く効果を認めなかった。そこで本研究では、薬剤の連日投与が binimetinib の増殖抑制効果に影響を及ぼすかどうかを調べるために検討を行った。

1.2 binimetinib の作用点

RAS 活性は GEF と GAP という2種類のシグナルタンパクにより調節されている。GEF は GDP/GTP 交換反応を促進し、RAS を活性化させる。

GAP は内在性 GTPase により、RAS-GTP から RAS-GDP に戻る反応を促進し、RAS を不活性化させる。RAS 遺伝子の突然変異によりアミノ酸置換が生じると、GTPase の機能が低下し、RAS は恒常的な活性化状態となって下流にシグナルを送り続ける。これにより MAPK (RAS/RAF/MEK/ERK) 回路が活性化する²⁾。binimetinib は MEK を阻害することで異常に活性化された MAPK 回路を止める役割がある。

2. 方法

2.1 細胞と培養条件

検討には急性骨髄性白血病細胞株 (HL-60, TF-1, THP-1, MOLM13, U937, F36P)、急性リンパ性白血病細胞株 (MOLT4, Jurkat)、慢性骨髄性白血病細胞株 (K562) および骨髄異形成症候群細胞株 (MDS-L) を使用した。各細胞株を RPMI1640 medium (ウシ胎児血清8% ペニシリン/ストレプトマイシン) で37°C、CO₂ 5% の条件下で培養した。

2.2 MTT assay³⁾

細胞の生存率を測定するために利用した。生細胞が多いほど呈色を有し、アポトーシスを含めた細胞死が起こるにつれて吸光度が低くなる。2.5×10⁴

*1 川崎医療福祉大学 医療技術学部 臨床検査学科

*2 川崎医科大学 検査診断学

(連絡先) 榊原佳奈枝 〒701-0193 倉敷市松島288 川崎医療福祉大学

E-mail: ksakakibara@jc.kawasaki-m.ac.jp

/mL の濃度に調整した各細胞に binimetinib (0, 10, 100, 1000 nM) を連日投与しながら1~4日間培養し, 96well マイクロプレートに100 μ L ずつ分注した. MTT 標識溶液を20 μ L ずつ加え, 6時間反応後, 可溶化溶液 (0.04 M HCl/ イソプロピルアルコール) を200 μ L ずつ分注した. その後, マイクロプレートリーダーで590nm における各サンプルの吸光度を測定した.

2.3 AnnexinV/PI 染色⁴⁾

初期および後期アポトーシスを測定するために利

用した. アポトーシス初期の細胞は AnnexinV のみ陽性, アポトーシス後期の細胞は AnnexinV/PI 陽性となる. 2.5×10^4 /mL の濃度に調整した F36P に binimetinib 1000 nM を連日投与しながら1~4日間培養し, Annexin V Binding Buffer 50 μ L, Annexin V-FITC 1 μ L, PI 1 μ L を加え, 室温・遮光で15分間反応させた. その後, フローサイトメーターで各サンプルの蛍光強度を測定した.

2.4 PI 染色⁵⁾

細胞周期各相における細胞割合を測定するため

表 1 PI 染色時の F36P 濃度 (個/10mL)

	day1	day2	day3	day4
control	8.0×10^4	5.0×10^4	4.0×10^4	3.0×10^4
binimetinib 1000nM	10.0×10^4	20.0×10^4	30.0×10^4	40.0×10^4

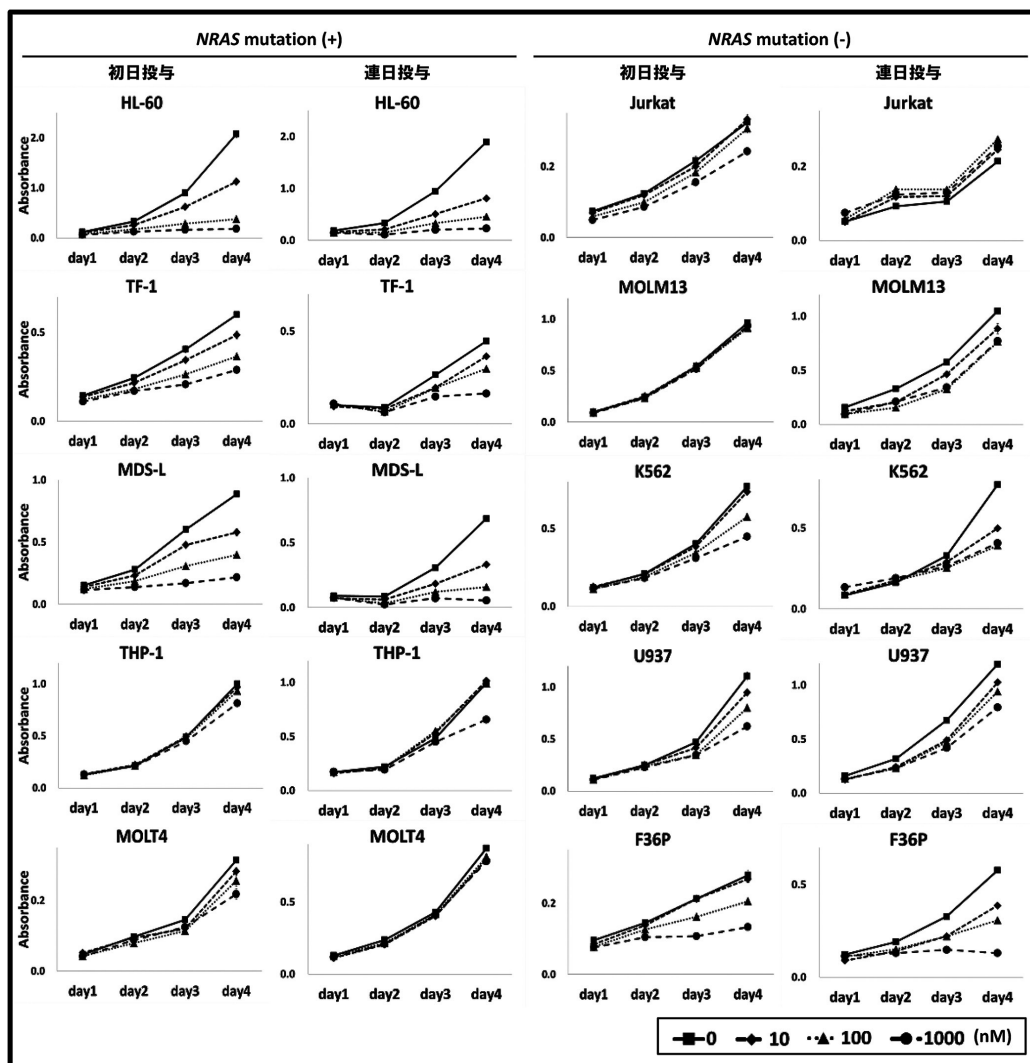


図 1 各細胞株における MTT assay の結果

に利用した。PI色素はDNA二重鎖への高い親和性を有し、DNA染色量は細胞中のDNA含量に比例する。F36Pの濃度を表1のように調整し、binimetinib 1000nMを連日投与しながら1~4日間培養した。70%メタノールで室温30分間固定後、RNase溶液(RNase:1%アルブミン含有PBS=1:4)を500μL分注し、37°C30分間反応させた。PI溶液(PI 1mg/mL:1%アルブミン含有PBS=1:19)を500μL分注し、室温・遮光で20分間反応後、フローサイトメーターで各サンプルの蛍光強度を測定した。

3. 結果

全ての細胞において、binimetinibの培養初日1回投与と連日投与の増殖曲線に大きな変化は認められ

なかった。ただし、F36Pでは1000nMにおいてのみ、明らかな増殖抑制効果を認めた(図1)。また、F36Pに対してbinimetinibの連日投与を行うと、薬剤投与回数に伴いアポトーシスの増加とセルサイクルの停止を認めた(図2, 3)。

4. 考察

今回、binimetinibのヒト造血器腫瘍細胞株に対する増殖抑制効果が薬剤投与方法によって違いがあるかどうかを培養初日の薬剤1回投与と連日投与で比較した。検討に使用した10株のうち、薬剤1回投与で非感受性であった4株(Jurkat, MOLM13, U937, MOLT4)においては連日投与による若干の増殖抑制効果を、感受性であった4株(HL-60,

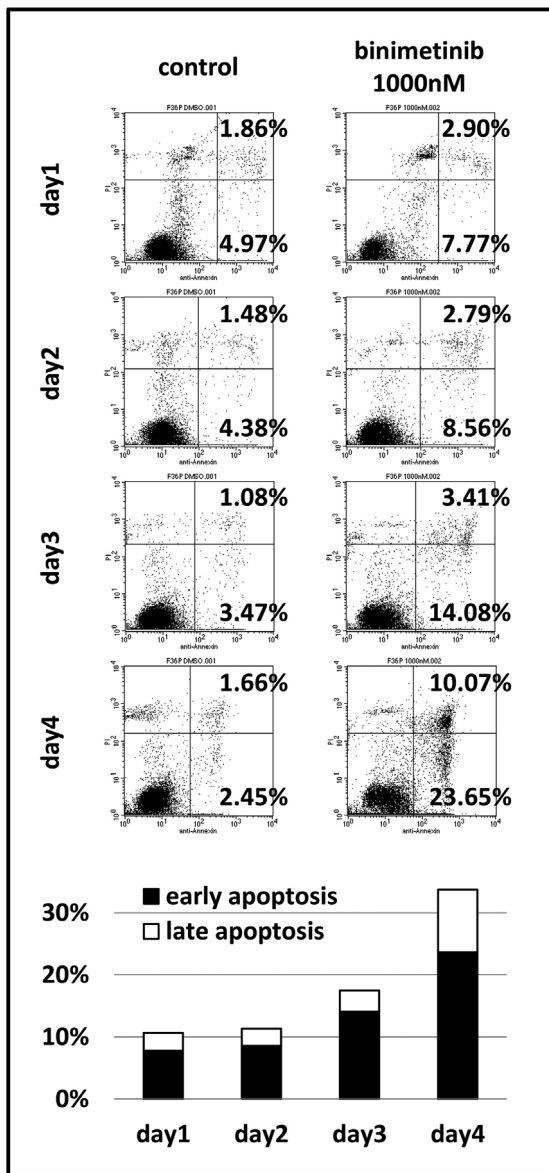


図2 F36Pのアポトーシス結果

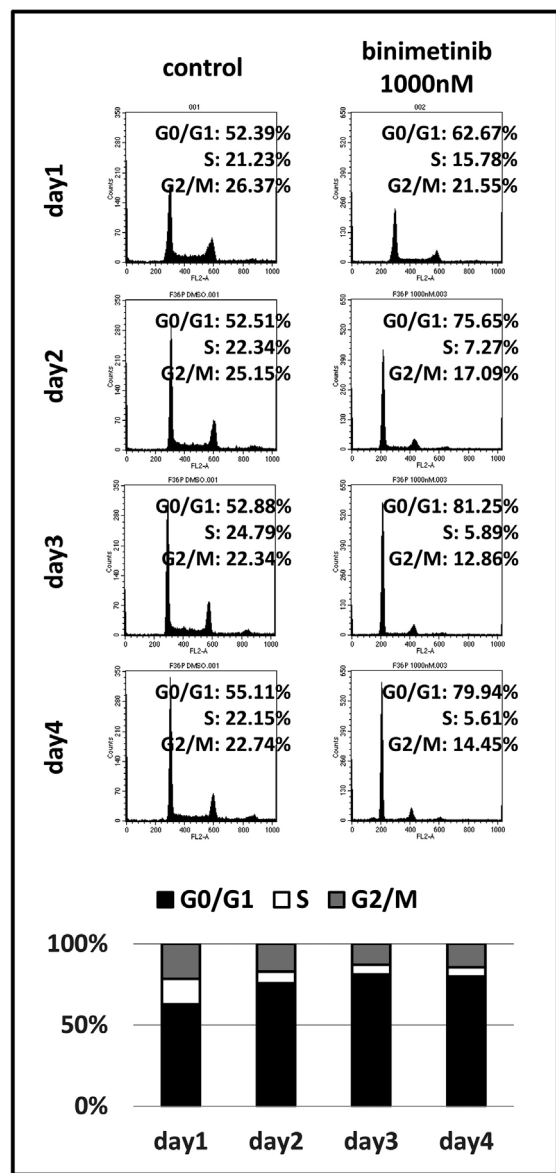


図3 F36Pのセルサイクル結果

TF-1, MDS-L, F36P) においては連日投与による更なる効果を期待していたが, F36P を除く全ての細胞において明らかな増殖抑制効果の増強は認められなかった. したがって, binimetinib の投与は基本的に初日のみの1回投与で十分であり, この投与で増殖抑制効果の乏しい細胞には複数回の投与を行ってもほとんど効果は望めないと考えられる. 唯一, 連日投与で効果を認めた F36P においても 100 nM 以下の低濃度域では増殖抑制効果の増強は認められず, 1000 nM 以上という比較的高濃度での連日投与が必須であることが示唆された. しかし, binimetinib の安全血中濃度がおよそ 1000 nM であることより⁶⁾, これ以上の高濃度域で連日投与することは実際には不可能であると考えられる. また今回, binimetinib 1000 nM 連日投与による F36P の増殖抑制効果がどのメカニズムで起こるのかを確認するために, フローサイトを用いて経時的なアポトーシス細胞の増減とセルサイクル解析を行った.

どちらも薬剤投与回数が増える毎に細胞増殖が抑制されるという結果を支持するものであったが, アポトーシス細胞の増加は3回以上の連日投与から顕著であった. 一方, セルサイクルの停止は2回の連日投与で効果が頭打ちとなり, その後, いくら薬剤投与回数を増やしてもほとんど変化は認められなかった. 4回以上の binimetinib 連日投与でアポトーシス細胞がどれほど増加するかは不明だが, セルサイクル同様, 増殖抑制効果が頭打ちする可能性は否定できない. 今後は血中半減期を考慮した培養上清の wash out なども行いながら, binimetinib の適正な投与方法のための実験を継続する必要がある.

5. まとめ

binimetinib 連日投与による増殖抑制効果の増強は一部の細胞を除いて認められなかった. binimetinib の効果的な投与方法については, 今後の詳細な検討が必要である.

利益相反

本研究は申告すべき利益相反はありません.

謝 辞

本研究は川崎医療福祉大学の医療福祉研究費 (2019年度) の助成を受け実施したものです.

文 献

- 1) Ward AF, Braun BS and Shannon KM : Targeting oncogenic Ras signaling in hematologic malignancies. *Blood*, 120, 3397-3406, 2012.
- 2) 東北大学 : The RAS/MAPK Syndromes Homepage. http://www.medgen.med.tohoku.ac.jp/rasmapk_j/pathway/, 2012. (2023.2.6確認)
- 3) 西方敬人, 川上純司, 藤井敏司, 長濱宏治, 川内敬子 : 細胞毒性試験 (MTT アッセイ). 中村友子編, ゼロからはじめるバイオ実験マスターコース3, 学研メディカル秀潤社, 東京, 117-120, 2015.
- 4) 沖田康孝, 中山敬一 : 形態学的・生化学的变化を用いたアポトーシスの解析. 清田純編, 直伝! フローサイトメトリー 面白いほど使いこなせる!—実践編 アナリシス (個々の細胞の状態を調べる)—, 羊土社, 東京, 72-83, 2014.
- 5) 武石昭一郎, 中山敬一 : DNA 量の変化などを利用した細胞周期の解析. 清田純編, 直伝! フローサイトメトリー 面白いほど使いこなせる!—実践編 アナリシス (個々の細胞の状態を調べる)—, 羊土社, 東京, 46-57, 2014.
- 6) Watanabe K, Otsu S, Hirashima Y, Morinaga R, Nishikawa K, Hisamatsu Y, Shimokata T, Inada-Inoue M, Shibata T, ...Ando Y : A phase I study of binimetinib (MEK162) in Japanese patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 77, 1157-1164, 2016.

(2023年4月17日受理)

Investigation of Effective *in vitro* Addition of a Novel MEK1/2 Inhibitor Binimetinib in Human Hematopoietic Tumor Cell Lines

Kanae SAKAKIBARA and Kaoru TOHYAMA

(Accepted Apr. 17, 2023)

Key words : binimetinib, cell line, MTT assay, flow cytometry

Abstract

We previously confirmed the growth inhibitory effect of binimetinib in human hematopoietic tumor cell lines *in vitro*, but only a single addition of the drug on the first day of culture was investigated. In this study, we examined the effect of daily addition of binimetinib and found no increase in growth inhibition in all cell lines except F36P. This result suggests that a single addition of binimetinib on the first day is basically sufficient, and multiple additions to the cells showing resistance to the drug have little effect. Further *in vitro* studies are needed for aiming at future clinical use.

Correspondence to : Kanae SAKAKIBARA

Department of Medical Technology

Faculty of Health Science and Technology

Kawasaki University of Medical Welfare

288 Matsushima, Kurashiki, 701-0193, Japan

E-mail : ksakakibara@jc.kawasaki-m.ac.jp

(Kawasaki Medical Welfare Journal Vol.33, No.1, 2023 69–73)