

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 18 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09472

研究課題名(和文)患者由来腫瘍細胞を用いたスクリーニングによるPh陽性ALL治療薬の探索

研究課題名(英文) Screening of therapeutic agent for Ph-positive ALL using patient-derived xenograft cells

研究代表者

早川 文彦 (Fumihiko, Hayakawa)

名古屋大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：30402580

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：Ph陽性ALLのpatient derived xenograft (PDX)モデルから得られる腫瘍細胞(PDX)を用いたハイスループットスクリーニングシステムを構築し、FDA承認薬を含む3440化合物のライブラリに対しスクリーニングを実施することで、PDX細胞に対し強い抗腫瘍効果を示す薬剤としてverteporfinを選別した。本剤は光感受性物質であるが、今回の抗腫瘍効果には光非依存性の活性酸素種の産生が重要であることを同定した。さらにこの薬剤がPh陽性ALLの標準的治療薬であるdasatinibと協調的に作用して抗腫瘍効果を示すことを発見し、その効果をマウスモデルでも確認した。

研究成果の概要(英文)：We developed a high-throughput drug screening system using PDX cells and performed drug screening using the PDX cells of Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia (Ph+ ALL). We performed a screening of 3440 compounds using leukemia cells from the PDX mice (PDX-cell screening). The profiles of drugs selected by PDX-cell screening were markedly different from those by screening using the Ph+ ALL cell line. We found that verteporfin, an FDA-approved drug, exhibited strong PDX cell-specific cytotoxicity. Although verteporfin is a photosensitizer activated by photoirradiation, its cytotoxic effects were mediated by the light-independent production of reactive oxygen species; therefore, its anti-leukemic effects were also exerted in vivo without photoirradiation. Furthermore, it exhibited synergistic effects with dasatinib, an ABL kinase inhibitor. These results indicated the potential of verteporfin as a new anti-leukemic reagent.

研究分野：血液内科

キーワード：PDX PDXスクリーニング ドラッグリポジショニング 白血病 悪性リンパ腫

1. 研究開始当初の背景

現在の抗癌剤開発の手法は、悪性腫瘍のモデルである細胞株を用いて、薬剤候補化合物の抗腫瘍効果をハイスループットスクリーニングシステムで評価し、候補化合物を絞り込んでいく手法が一般的である。この手法により多くの薬剤が開発され一定の成果を上げてきたが、抗癌剤への反応性の高いといわれる造血器腫瘍の分野においても、半数以上の症例はもたぬに化学療法のみでは治癒は得られず、十分な薬剤が開発されているとは言えない。こうした中、現行の薬剤開発システムの限界が、腫瘍のモデルとして使用している細胞株と実際の腫瘍細胞の差異に起因している可能性が指摘されている。細胞株はプライマリの腫瘍細胞に種々の工夫を加えて体外長期培養できるようにした特殊な腫瘍細胞で、微小環境非依存的増殖でプライマリ腫瘍細胞より増殖速度が著しく速いという特徴を持つ。これらの相違点が細胞株を用いたスクリーニングに与える影響は重大で、細胞株を用いてスクリーニングをする事は、微小環境の腫瘍生存サポートを治療標的とせず、腫瘍細胞の細胞周期が速い事のみを治療標的として評価する事につながってしまう。結果的に、現存する抗癌剤の中で、微小環境による腫瘍生存サポートを治療標的とする薬剤はなく、ほとんどの薬剤は DNA 合成阻害、DNA 複製/修復阻害、微小管形成阻害など細胞複製を阻害する作用機序を持ち、増殖の早い細胞に感受性の高い薬剤になっている。こうした作用を持つ物質は既にほとんど発見しつくされていると思われるが、こうした薬剤だけでは多くの癌に治癒をもたらす事はできない所に、細胞株スクリーニングの限界があり、異なったシステムを用いて細胞複製阻害以外の作用機序を持つ薬剤を開発していく事が画期的抗癌剤の開発に不可欠である。

2. 研究の目的

Patient-derived xenograft (PDX)とは患者より採取したプライマリ腫瘍細胞を、NOGマウスなどの高度免疫不全マウスに移植したモデルの事で、PDXより採取したPDX細胞はその生存が微小環境依存性であるなどプライマリ腫瘍細胞の形質を高度に保持している。我々はPDX細胞を、その微小環境を再現したシステムで培養し、これを用いて薬剤をスクリーニングする独自のシステムを開発した。本研究では、このシステムを用いて既知活性化化合物と off patent 医薬品のライブラリをスクリーニングする事により、細胞株を用いた従来型のスクリーニングでは見いだす事のできなかつた新たな抗腫瘍活性を持つ既存薬剤を発見する事を目的とする。発見した薬剤の作用機序を解明する事で、腫瘍細胞の生存に関わる新たな機序の解明を目指すと共に、最終的には発見した既存薬を用いた医師主導治験により発見薬剤の有効

性の証明を目指す。対象疾患はフィラデルフィア染色体 (Ph) 陽性急性リンパ性白血病 (ALL)とする。

3. 研究の方法

東京大学創薬オープンイノベーションセンターより既知活性化化合物と off patent 医薬品からなる化合物ライブラリ (約 4000 化合物) の提供を受け、これを用いて PDX スクリーニングを実施する。実施の手順は以下の通りである。

Day1: 96 穴プレートに S17 を播種する (1 回約 20 プレート)。Day2: PDX マウスを屠殺し PDX 細胞を採取し Day1 で播種した S17 の上に播種する (PDX 細胞+S17)。

Day4: 48 時間後に細胞を Hoechst 染色 (全細胞) と PI 染色 (死細胞) で 2 重染色し、イメージアナライザー (ArrayScan VTI HCS reader: サーマサイエンティフィック社) で読み取りを行う。細胞の核の大きさによって S17 と PDX 細胞を区別し、S17 の全細胞数と S17 の死細胞数をカウントし死細胞率を計測する事が可能である。

S17 に対する化合物の作用をみるために、単独培養した S17 にもライブラリ化合物を添加し、48 時間後に MTT アッセイにより S17 に対する増殖抑制能を評価する。それぞれの解析の結果を元に、各化合物における PDX 細胞死細胞率を Y 軸、S17 単独培養 MTT 値を X 軸にプロットして化合物の効果を判定する。選別した化合物に関しては抗腫瘍効果を PDX 細胞、細胞株でより詳細に確認し、候補薬剤をさらに絞り込む。

最終的に選別した薬剤に関してはマウスモデルでの薬効を確認するとともに薬剤作用機序についても詳細に検討する。

4. 研究成果

フィラデルフィア染色体 (Ph) 陽性急性リンパ性白血病 (ALL) の patient derived xenograft (PDX) モデルを 5 症例作成した。PDX から得られた腫瘍細胞 (PDX 細胞) を体外で培養する方法を検討し、骨髄間質細胞 S17 との共培養で長期培養可能なことを発見し、この培養系を用いて、PDX 細胞に殺細胞効果のある薬剤を選別するハイスループットスクリーニングシステムを構築した (PDX スクリーニング) このシステムを用いて、東京大学創薬機構提供の、既知活性化化合物と off patent 医薬品のライブラリ (3440 コンパウンド) を用いてスクリーニングを行った。その結果細胞株では弱い殺細胞効果しか示さないが、PDX 細胞に対し強い抗腫瘍効果を示す薬剤として verteporfin を選別した。本剤は加齢性黄斑変性症に対する承認薬である。

Verteporfin に関してスクリーニングに用いたものも含めて複数の PDX 細胞 (2 種類) および細胞株 (3 種類) に対する薬効の用量依存性を調べ、比較した。PDX 細胞に対する

G150 は 228 nM、395 nM で、細胞株における G150 は 3.93 μ M、2.11 μ M、5.68 μ M と細胞株に比べて PDX 細胞に対する強い殺細胞効果が確認された (図 1)。

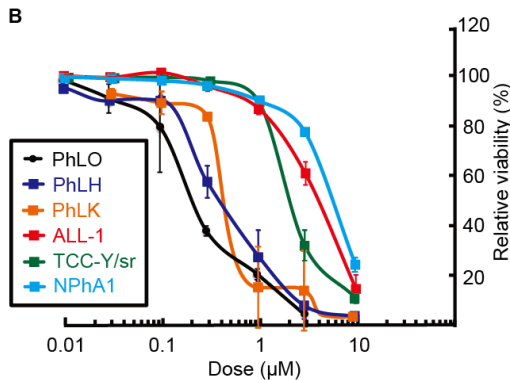


図 1 Verteporfin 用量依存的殺細胞効果の PDX 細胞と細胞株における比較

PhLO, PhLH, PhLK は PDX 細胞。ALL-1, TCCY/sr, NPhA1 は細胞株。PDX 細胞において低容量で殺細胞効果を示している。

また、本剤の作用機序を詳細に検討し、reactive oxygen species (ROS) 産生による酸化ストレスが本剤の殺細胞効果の機序であることを明らかにした (図 2)。

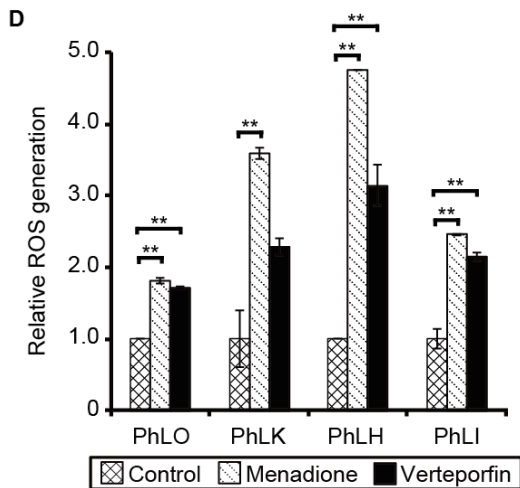


図 2 Verteporfin による ROS 酸性
Menadione は ROS 酸性を誘導することで知られる薬剤。Verteporfin はいずれの PDX 細胞に対しても ROS の酸性を誘導している。

さらに同じ患者細胞から樹立された PDX 細胞と細胞株を用いて同様の薬剤スクリーニングを行い、PDX 細胞優位に殺細胞効果を示す薬剤と細胞株優位に殺細胞効果を示す薬剤を選別し、それぞれの薬剤の ROS 産生能を比較すると PDX 細胞に殺細胞効果が高い薬剤では ROS 産生能が著明に高かった。これらの結果は、PDX 細胞には細胞株では失われた酸化ストレス感受性が維持されており、酸化ストレスによる殺細胞効果を持つ薬剤をスクリーニングするのに有用であることを示していた (図 3)。

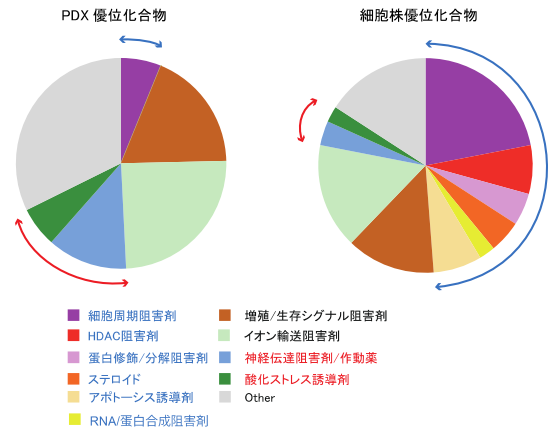


図 3 PDX 優位化合物と細胞株優位化合物の薬剤作用機序の比較
PDX 優位化合物では酸化ストレスを酸性する薬剤の割合が多かった。

さらに本薬剤が Ph 陽性 ALL の標準的治療薬である dasatinib と協調的に作用して抗腫瘍効果を示すことを発見し、その効果をマウスモデルでも確認した (図 4)。

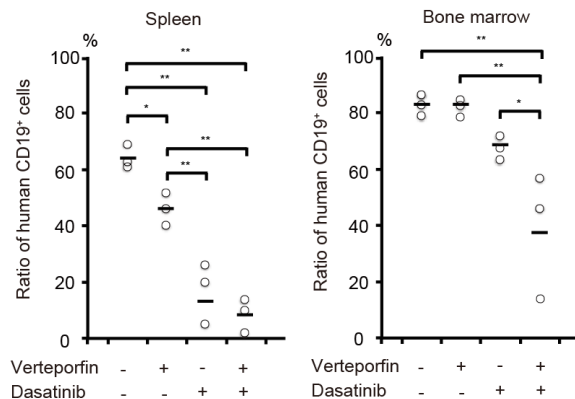


図 4 マウスモデルにおける Verteporfin と Dasatinib の協調的な抗腫瘍効果
PhLO を NOG マウスに播種し、3 週間後から Verteporfin の持続皮下投与 (7 日間) および Dasatinib 腹腔内投与 (6 日間) を行った後、脾臓 (左図)、骨髄 (右図) における白血病細胞の割合を評価した。脾臓においては単剤での抗腫瘍効果を、骨髄においては Dasatinib との協調的な抗腫瘍効果が確認できている。

これらの研究に加え、予後不良の悪性リンパ腫である primary effusion lymphoma (PEL) の PDX を作成し、PEL PDX 細胞を用いた PDX スクリーニングを行った。その結果、survivin 阻害薬として開発中の YM155 が PEL 細胞に対し強い抗腫瘍効果を示すことを発見した。YM155 の作用機序を分子生物学的に検討し、survivin の阻害ではなく、抗アポトーシスタンパクである MCL のリン酸化とデグラデーションを誘導することが作用機序であることを明らかにした。これらの結果を論文にまとめ、海外雑誌に発表した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計12件)

- 1: Yamaura T, Nakatani T, Uda K, Ogura H, Shin W, Kurokawa N, Saito K, Fujikawa N, Date T, Takasaki M, Terada D, Hirai A, Akashi A, Chen F, Adachi Y, Ishikawa Y, Hayakawa F, Hagiwara S, Naoe T, Kiyoi H. A novel irreversible FLT3 inhibitor, FF-10101, shows excellent efficacy against AML cells with FLT3 mutations. *Blood*. 2018 Jan 25;131(4):426-438. 査読あり
- 2: Sakura T, Hayakawa F, Sugiura I, Murayama T, Imai K, Usui N, Fujisawa S, Yamauchi T, Yujiri T, Kakihana K, Ito Y, Kanamori H, Ueda Y, Miyata Y, Kurokawa M, Asou N, Ohnishi K, Ohtake S, Kobayashi Y, Matsuo K, Kiyoi H, Miyazaki Y, Naoe T. High-dose methotrexate therapy significantly improved survival of adult acute lymphoblastic leukemia: a phase III study by JALSG. *Leukemia*. 2018 Mar;32(3):626-632. 査読あり
- 3: Kojima Y, Hayakawa F, Morishita T, Sugimoto K, Minamikawa Y, Iwase M, Yamamoto H, Hirano D, Imoto N, Shimada K, Okada S, Kiyoi H. YM155 induces apoptosis through proteasome-dependent degradation of MCL-1 in primary effusion lymphoma. *Pharmacol Res*. 2017 Apr 8;120:242-251. 査読あり
- 4: Aoki T, Shimada K, Sakamoto A, Sugimoto K, Morishita T, Kojima Y, Shimada S, Kato S, Iriyama C, Kuno S, Harada Y, Tomita A, Hayakawa F, Kiyoi H. Emetine elicits apoptosis of intractable B-cell lymphoma cells with MYC rearrangement through inhibition of glycolytic metabolism. *Oncotarget*. 2017 Feb 21;8(8):13085-13098. 査読あり
- 5: Fukushima N, Minami Y, Kakiuchi S, Kuwatsuka Y, Hayakawa F, Jamieson C, Kiyoi H, Naoe T. Small-molecule Hedgehog inhibitor attenuates the leukemia-initiation potential of acute myeloid leukemia cells. *Cancer Sci*. 2016 Oct;107(10):1422-1429. 査読あり
- 6: Morishita T, Hayakawa F, Sugimoto K, Iwase M, Yamamoto H, Hirano D, Kojima Y, Imoto N, Naoe T, Kiyoi H. The photosensitizer verteporfin has light-independent anti-leukemic activity for Ph-positive acute lymphoblastic leukemia and synergistically works with dasatinib. *Oncotarget*. 2016 Aug30;7(35):56241-56252. 査読あり

- 7: Takagi Y, Shimada K, Shimada S, Sakamoto A, Naoe T, Nakamura S, Hayakawa F, Tomita A, Kiyoi H. SPIB is a novel prognostic factor in diffuse large B-cell lymphoma that mediates apoptosis via the PI3K-AKT pathway. *Cancer Sci*. 2016 Sep;107(9):1270-80. 査読あり
- 8: Inagaki Y, Hayakawa F, Hirano D, Kojima Y, Morishita T, Yasuda T, Naoe T, Kiyoi H. PAX5 tyrosine phosphorylation by SYK co-operatively functions with its serine phosphorylation to cancel the PAX5-dependent repression of BLIMP1: A mechanism for antigen-triggered plasma cell differentiation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016 Jun 24;475(2):176-81. 査読あり
- 9: Yasuda T, Tsuzuki S, Kawazu M, Hayakawa F, Kojima S, Ueno T, Imoto N, Kohsaka S, Kunita A, Doi K, Sakura T, Yujiri T, Kondo E, Fujimaki K, Ueda Y, Aoyama Y, Ohtake S, Takita J, Sai E, Taniwaki M, Kurokawa M, Morishita S, Fukayama M, Kiyoi H, Miyazaki Y, Naoe T, Mano H. Recurrent DUX4 fusions in B cell acute lymphoblastic leukemia of adolescents and young adults. *Nat Genet*. 2016 May;48(5):569-74. 査読あり
- 10: Shimada K, Shimada S, Sugimoto K, Nakatochi M, Suguro M, Hirakawa A, Hocking TD, Takeuchi I, Tokunaga T, Takagi Y, Sakamoto A, Aoki T, Naoe T, Nakamura S, Hayakawa F, Seto M, Tomita A, Kiyoi H. Development and analysis of patient-derived xenograft mouse models in intravascular large B-cell lymphoma. *Leukemia*. 2016 Jul;30(7):1568-79. 査読あり
- 11: Imoto N, Hayakawa F, Kurahashi S, Morishita T, Kojima Y, Yasuda T, Sugimoto K, Tsuzuki S, Naoe T, Kiyoi H. B Cell Linker Protein (BLNK) Is a Selective Target of Repression by PAX5-PML Protein in the Differentiation Block That Leads to the Development of Acute Lymphoblastic Leukemia. *J Biol Chem*. 2016 Feb 26;291(9):4723-31. 査読あり
- 12: Sugimoto K, Hayakawa F, Shimada S, Morishita T, Shimada K, Katakai T, Tomita A, Kiyoi H, Naoe T. Discovery of a drug targeting microenvironmental support for lymphoma cells by screening using patient-derived xenograft cells. *Sci Rep*. 2015 Aug 17;5:13054. 査読あり

[学会発表](計5件)

1. Daiki Hirano, Fumihiko Hayakawa, Takahiko Yasuda, naoyuki Tange, Hideyuki Yamamoto, Yuki Kojima, Takanobu Morishita, Naoto Imoto, Shinobu Tsuzuki, Hiroyuki Mano, Tomoki Naoe, Hitoshi Kiyoi, 59th

annual meeting of american society of hematology (米国アトランタ), 2017年12月
2. YM155 Induces Apoptosis through Proteasome-Dependent Degradation of MCL-1 in Primary Effusion Lymphoma. Kojima, Y., Hayakawa, F., Morishita, T., Sugimoto, K., Iwase, M., Yamamoto, H., Hirano, D., Imoto, N., Okada, S., Kiyoi, H. 58th ASH annual meeting and exposition (米国サンディエゴ) 2016年12月

3. Emetine Elicits Apoptosis of Intractable B-Cell Lymphoma Cells with MYC Rearrangement through Inhibition of Glycolytic Metabolism. Aoki, T., Shimada, K., Sakamoto, A., Sugimoto, K., Morishita, T., Kojima, Y., Shimada, S., Kato, S., Iriyama, C., Kuno, S., Harada, Y., Nakamura, S., Tomita, A., Hayakawa, F., Kiyoi, H. 58th ASH annual meeting and exposition (米国サンディエゴ) 2016年12月

4. Comparisons of drug sensitivity profiles between patient-derived xenograft cells and the cell lines. 岩瀬瑞穂, 早川文彦, 森下喬充, 山本秀行, 平野大希, 小島勇貴, 杉本慶樹, 岡田誠治, 直江知樹, 金田典雄, 清井仁 第78回日本血液学会学術集会(横浜市) 2016年10月

5. A Photosensitizer Verteporfin has Light-independent Anti-leukemic Activity for Ph-positive Acute Lymphoblastic Leukemia and Synergistically Works with Dasatinib in Vivo. (ポスター) Morishita T, Hayakawa F, Sugimoto K, Hirano D, Kojima Y, Imoto N, Inagaki Y, Naoe T, Kiyoi H 57th ASH annual meeting and exposition (米国フロリダ) 2015年12月

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：

取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
なし

6. 研究組織
(1) 研究代表者 早川 文彦 (HAYAKAWA FUMIHIKO)
名古屋大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：30402580

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし

(4) 研究協力者 なし