

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：83904

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670449

研究課題名(和文)悪性リンパ腫における微小環境依存性と治療開発に関する研究

研究課題名(英文)Discovery of a drug targeting microenvironmental support for lymphoma cells by screening using patient-derived xenograft cells

研究代表者

直江 知樹 (NAOE, TOMOKI)

独立行政法人国立病院機構(名古屋医療センター臨床研究センター)・その他部局等・院長

研究者番号：50217634

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文):抗がん剤開発においては、細胞株と実際の腫瘍のギャップを埋めるスクリーニング系の開発が大きな課題となっている。本研究ではヒトプライマリリンパ腫細胞を免疫不全マウスに移植しPDXマウスを作成し、リンパ腫ニッチを探索した。PDXマウスから取り出したPDX細胞は細胞株に比べて、プライマリ腫瘍細胞の形質が高度に保存された細胞で、これの体外培養法を確立し、それをを用いたハイスループットな薬剤スクリーニング方法を確立した。スクリーニングで選別された薬剤を解析することで、リンパ腫細胞は間質細胞から還元型グルタチオンの供給を受け酸化ストレスから保護されているという新しい腫瘍生存機序が発見された。

研究成果の概要(英文): Cell lines have been used for drug discovery as useful models of cancers; however, they do not recapitulate cancers faithfully, especially in the points of rapid growth rate and microenvironment independency. Here, we developed a novel high throughput drug screening system using patient-derived xenograft (PDX) cells of lymphoma that maintained primary cancer cell phenotype more than cell lines. Pyruvinium pamoate showed the highest activity, and its strong anti-tumor effect was confirmed also in vivo. We extensively investigated its mechanism of action and found that it inhibited glutathione supply from stromal cells to lymphoma cells, implying the importance of the stromal protection from oxidative stress for lymphoma cell survival and a new therapeutic strategy for lymphoma. Our system introduces a primary cancer cell phenotype into cell-based phenotype screening and sheds new light on anti-cancer drug development.

研究分野: 血液内科学

キーワード: 薬剤スクリーニング 微小環境 悪性リンパ腫 PDX 酸化ストレス

### 1. 研究開始当初の背景

従来、抗がん剤のスクリーニング方法としては、既存のがん細胞株を培養し、その増殖を抑制する化合物を探索することが行われてきた。最近では、特定のがん活性化分子を標的とするスクリーニングが主流となり、細胞株、動物モデルでの Proof-of-Concept ならびに有効性を確認し、前臨床試験へと開発が進められる。しかし、一般的に「がん」には多数の変異が蓄積しており、「がん」のドライバー経路のみを阻害しても、エスケープ経路による耐性化が生じること、「がん」組織には枝分かれした多くのサブクローンが併存している上、治療抵抗性を示す微小環境依存性な「がん幹細胞」が存在することなどが観察されている。このため抗がん剤開発においては、細胞株 (Ex vivo) と患者組織 (In vivo) のギャップを埋めるスクリーニング系の開発が、大きな課題となっている。

研究代表者らはこれまでに、悪性リンパ腫 (多くは再発 DLBCL) 組織を免疫不全マウス (NOG) に異種移植し、少なくとも6つのラインを樹立した。このようなラインを Patient derived xenograft (PDX) マウスと呼ぶ。この DLBCL PDX マウスでは、腫瘍細胞の組織浸潤性や CD20 発現、染色体異常、発現プロファイルなどに関して、primary 腫瘍細胞の形質を保持しながら、数代以上にわたって継代移植することが可能である。このような PDX マウスは白血病、または乳がんなどの固形腫瘍で作成され、がん幹細胞の研究や、がん細胞ニッチの探索、あるいは細胞株で効果が証明されるなどある程度開発の進んだ新規抗がん剤候補化合物の薬効試験などに用いられている。リンパ腫の PDX マウスはこれまでも報告が少なく、これを用いたリンパ腫ニッチの探索の報告はない。また PDX マウスを薬剤開発のハイスループット一次スクリーニングに用いるというのは腫瘍の種類を問わずこれまでに例がない。

### 2. 研究の目的

本研究では、NOG マウスを用いてヒトびまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫 (DLBCL) におけるホーミングと治療後残存に関わる微小環境 (ニッチ) を探索する。また、既に成功した線維芽細胞様細胞 (FRC) 株との共培養による DLBCL PDX 細胞の体外培養系を用いて、ニッチ依存性における分子メカニズム解明とハイスループット薬剤スクリーニングシステムの開発を目指す。

### 3. 研究の方法

(1) 悪性リンパ腫検体を NOG マウスに移植し、PDX マウスを作成する。腫瘍細胞をマウスに移植後経時的にマウスを解剖し、ヒト CD45 抗体などによる免疫染色を行いリンパ腫細胞のホーミング部位を検索し、リンパ腫ニッチに関わる細胞候補を絞り込む。

(2) リンパ腫 PDX 細胞を FDC・FRC 細胞株と共培養し Ex vivo で持続可能にできる組み合わせを探索するとともにその評価を行う。

(3) (2) で確立した共培養系を用いて薬剤スクリーニングシステムを開発する。重要な点はリンパ腫細胞の生死と、共培養している間質細胞の生死を区別して評価することであるが、この問題を PI あるいは Hoechst 染色した細胞を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) を用いて解析することで、細胞の大きさにより両細胞区別してそれぞれの死細胞率を計測することで解決した。スクリーニングする薬剤ライブラリとして東京大学創薬オープンイノベーションセンター提供の、Off-patent の承認済み薬剤、薬理活性既知の物質からなる 2613 種類の化合物を用いた。

### 4. 研究成果

(1) 研究期間中に 7 例の新たなリンパ腫 PDX マウスを樹立した。累計で、DLBCL 6 例、血管内リンパ腫 3 例、マンツル細胞リンパ腫 1 例、末梢性 T 細胞リンパ腫 1 例となった。DLBCL の 1 例に関して腫瘍細胞移植後、3, 7, 14, 21, 28 日後にマウスを解剖し腫瘍細胞生着を観察したところ、14 日後に脾臓リンパ濾胞杯中心に相当する部位 (NOG マウスにはリンパ球がほとんど存在せずリンパ濾胞は明瞭ではない) に最初の生着が観察され、同部位がこのリンパ腫細胞のニッチである可能性が示唆された。

(2) リンパ濾胞におけるリンパ腫支持細胞として濾胞性樹状細胞 (FDC) や線維芽細胞様細胞 (FRC) あるいは濾胞性ヘルパー T 細胞 (FHT) が想定されたが、NOG マウスには T 細胞は存在しないことから、FDC、FRC の細胞株を用いて、各種 PDX 細胞の体外培養における生存支持能力を比較した。全ての PDX 細胞は単独では体外培養できなかったが、一部の DLBCL PDX 細胞は FRC 細胞株 BLS4 により死細胞率が低下し、1 例では 80% 近い高い生存率を維持して培養が可能であった (図 1A)。このシステムにおける腫瘍細胞の増殖は細胞株に比して遅く、ダブルリングタイム 9 日であった。(図 1B)。

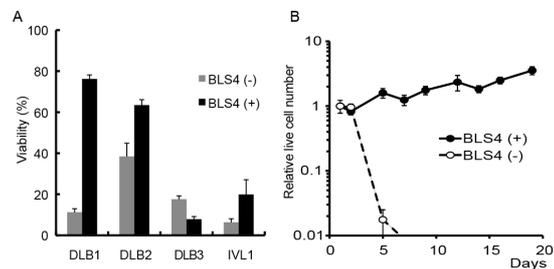


図1 BLS4 との共培養による DLBCL PDX 細胞の体外培養 (A) 生存率 (B) 増殖曲線

(3) 上記で良好な体外培養を行うことができた PDX 細胞と BLS4 を用いて図 2 に示した手順でスクリーニングを行った。1 匹の PDX マウスから約  $1 \times 10^8$  個の PDX 細胞が採取でき、

1 化合物の解析は  $1 \times 10^4$  個の PDX 細胞で行った。もっとも時間を要するのはイメージアナライザーでの解析で、1 プレート 96 検体の解析に約 20 分を要した。2613 種類のライブラリの解析に要した時間は約 10 時間で、ハイスループットな解析が可能であった。

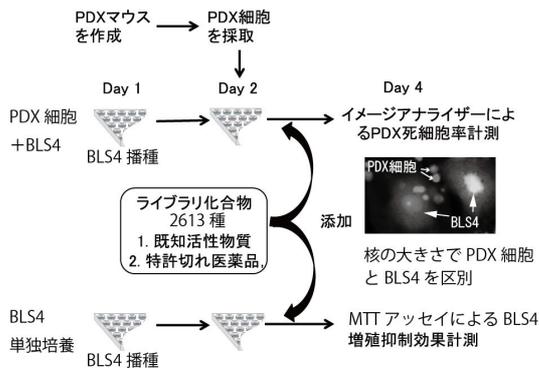


図2 PDX スクリーニング方法

各化合物を添加後の PDX 細胞の死細胞率を Y 軸に、BLS4 単独培養に対する増殖抑制効果を X 軸にプロットしたのが図 3 である。既存の抗がん剤に比して著明な殺細胞効果をリンパ腫細胞に対しては示しながら、BLS4 細胞の増殖抑制は軽度であった化合物としてパモ酸ピルビニウム (PP: 承認済み抗蟻虫薬) が選択された。PP の効果は体外培養系で再確認され ( $GI_{50}=137$  nM)、マウスモデルでも腫瘍の退縮効果が認められた。

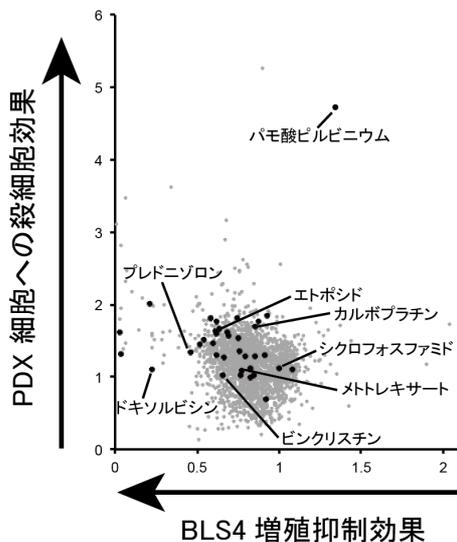


図3 PDX スクリーニング結果例

本スクリーニング系では既存抗癌剤は高い活性を示さない。既存のリンパ腫治療薬より高活性を示す化合物が多数存在

(4) PP の作用機序を明らかにするために各種解析を行い以下の結果を得た。

PDX との共培養を開始する前に BLS4 を PP で処理すると、その後は PP を取り除いても、処理後の BLS4 は PDX 細胞の生存を支持できなくなっていた。

PP への曝露で BLS4 内部には活性酸素 (ROS)

が産生され、還元型グルタチオン (GSH) が減少していた。

PDX 細胞内部の GSH は BLS4 と共培養することで著明に上昇するが、PP 処理後の BLS4 との共培養では上昇しなかった。

培養液中に GSH を添加すると PDX 細胞は BLS4 が存在しなくても生存を維持できた。以上のことから、リンパ腫細胞と FRC の間には FRC が GSH を産生し、リンパ腫細胞に供給することでこれを酸化ストレスから保護するという関係があることが推測された。さらに、PP は FRC 内部で ROS を産生させ、FRC の GSH 消費を亢進させることで、リンパ腫細胞への GSH の供給を障害し、抗リンパ腫効果を示していると考えられた。

## 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. Hayakawa E, Sugimoto K, Harada Y, Hashimoto N, Ohi N, Kurahashi S, Naoe T. A novel STAT inhibitor, OPB-31121, has a significant antitumor effect on leukemia with STAT-addictive oncokineses. **Blood Cancer J**. 査読有. 2013; 3:e166. doi: 10.1038/bcj.2013.63.
2. Niimi K, Kiyoi H, Ishikawa Y, Hayakawa E, Kurahashi S, Kihara R, Tomita A, Naoe T. GATA2 zinc finger 2 mutation found in acute myeloid leukemia impairs myeloid differentiation. **Leuk Res Rep**. 査読有. 2013;2(1):21-5. doi: 10.1016/j.lrr.2013.02.002.
3. Noguchi S, Iwasaki J, Kumazaki M, Mori T, Maruo K, Sakai H, Yamada N, Shimada K, Naoe T, Kitade Y, Akao Y. Chemically Modified Synthetic microRNA-205 Inhibits the Growth of Melanoma Cells In Vitro and In Vivo. **Mol Ther**. 査読有. 2013;21(6):1204-11. doi: 10.1038/mt.2013.70.
4. Tokunaga T, Tomita A, Sugimoto K, Shimada K, Iriyama C, Hirose T, Shirahata-Adachi M, Suzuki Y, Mizuno H, Kiyoi H, Asano N, Nakamura S, Kinoshita T, Naoe T. De novo DLBCL with a CD20 IHC(+) and FCM(-) phenotype: molecular mechanisms and correlation with rituximab sensitivity. **Cancer Sci**. 査読有. 2014;105(1):35-43. doi: 10.1111/cas.12307.
5. Tomita A, Kiyoi H, Naoe T. Mechanisms of action and resistance to all-trans retinoic acid (ATRA) and arsenic trioxide (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) in acute promyelocytic leukemia. **Int J Hematol**. 査読有. 2013;97(6):717-25. doi: 10.1007/s12185-013-1354-4.

6. Hayakawa F, Tomita A, Naoe T. Development of acute pure red cell aplasia after deferasirox administration in two cases of myelodysplastic syndrome. **Rinsho Ketsueki**. 査読有.2014;55(4):445-9. <http://doi.org/10.11406/rinketsu.55.445>
7. Shimada K, Tomita A, Saito S, Kiyoi H. Efficacy of ofatumumab against rituximab-resistant B-CLL/SLL cells with low CD20 protein expression. **Br J Haematol**. 査読有. 2014;166(3):455-7. doi:10.1111/bjh.12857.
8. Hayakawa F, Sakura T, Yujiri T, Kondo E, Fujimaki K, Sasaki O, Miyatake J, Handa H, Ueda Y, Aoyama Y, Takada S, Tanaka Y, Usui N, Miyawaki S, Suenobu S, Horibe K, Kiyoi H, Ohnishi K, Miyazaki Y, Ohtake S, Kobayashi Y, Matsuo K, Naoe T; Japan Adult Leukemia Study Group (JALSG). Markedly improved outcomes and acceptable toxicity in adolescents and young adults with acute lymphoblastic leukemia following treatment with a pediatric protocol: a phase II study by the Japan Adult Leukemia Study Group. **Blood Cancer J**. 査読有.2014;4:e252.doi: 10.1038/bcj
9. Aoki T, Izutsu K, Suzuki R, Nakaseko C, Arima H, Shimada K, Tomita A, Sasaki M, Takizawa J, Mitani K, Igarashi T, Maeda Y, Fukuhara N, Ishida F, Niitsu N, Ohmachi K, Takasaki H, Nakamura N, Kinoshita T, Nakamura S, Ogura M. Prognostic significance of pleural or pericardial effusion and the implication of optimal treatment in primary mediastinal large B-cell lymphoma: a multicenter retrospective study in Japan. **Haematologica**. 査読有.2014;99(12):1817-25.doi: 10.3324/haematol.2014.111203.
10. Watanabe K, Terakura S, Martens AC, van Meerten T, Uchiyama S, Imai M, Sakemura R, Goto T, Hanajiri R, Imahashi N, Shimada K, Tomita A, Kiyoi H, Nishida T, Naoe T, Murata M. Target Antigen Density Governs the Efficacy of Anti-CD20-CD28-CD3  $\zeta$  Chimeric Antigen Receptor-Modified Effector CD8+ T Cells. **J Immunol**. 査読有. 2015;194(3):911-20. doi: 10.1049/jimmunol.1402346.
11. Tomita A. Progress in molecularly targeted therapies for acute myeloid leukemia. **Rinsho Ketsueki**. 査読有. 2015; 56(2):130-8. doi:10.11406/rinketsu.56.130.
12. Izumi M, Tsunemine H, Suzuki Y, Tomita A, Kusumoto T, Kodaka T, Itoh K, Takahashi T. Successful treatment of refractory cold hemagglutininemia in MYD88 L265P mutation-negative Waldenström's macroglobulinemia with bortezomib. **Int J Hematol**. 査読有 .2015;[Epub ahead of print]. doi: 10.1007/s 12185-015-1775-3
- 〔学会発表〕(計 20 件)
- 高木雄介、島田和之、齊藤繁紀、徳山清信、安田貴彦、島田聡子、佐藤啓、中村栄男、冨田章裕、直江知樹。びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫における TdT 陽転化に関する検討 日本血液学会東海地方会 2013.4 名古屋
  - 杉本慶樹、早川文彦、直江 知樹。リンパ腫細胞環境をターゲットする薬剤開発 日本癌学会 2013.10 横浜
  - 高木雄介、島田和之、冨田章裕、島田聡子、白幡瑞穂、鈴木康裕、山本絵里奈、野口俊助、中村栄男、清井仁、直江知樹 DLBCL における予後因子としての転写因子 SPIB の可能性 日本血液学会 2013.10 札幌
  - 冨田章裕 DLBCL における CD20 発現異常と薬剤感受性 日本血液学会 2013.10 札幌
  - 井本直人、倉橋信悟、早川文彦、安田貴彦、清井 仁・・・他 PAX5-PML Induces Pro B Acute Lymphoblastic Leukemia In Mice. 第 5 回日本血液学会 (JSH) 国際シンポジウム 2014.5 アクトシティ浜松 (静岡県浜松市)
  - Hayakawa Fumihiko, Toru Sakura, Toshiaki Yujiri, Eisei Kondo, Katsumichi Fujimaki, Shuichi Miyawaki, So-ichi Suenobu, Shigeki Ohtake, Yukio Kobayashi, keitaro Matsuo, and Tomoki Naoe. Markedly Improved Outcome and Acceptable Toxicity in Adolescents and Young Adults with Acute Lymphoblastic Leukemia by Treatment with a Pediatric Protocol: a Phase Study by the Japan Adult Leukemia Study Group. 第 5 回日本血液学会 (JSH) 国際シンポジウム 2014.5 アクトシティ浜松 (静岡県浜松市)
  - 冨田章裕。リツキシマブ併用化学療法に抵抗性を示す DLBCL 症例を予測するパイオマーカと治療層別化の可能性。第 54 回日本網内系学会総会 2014.6 山形国際ホテル (山形県山形市)
  - 鈴木康裕、冨田章裕、入山智沙子、島田和之、山本絵里奈、金田典雄、清井仁。骨髄スミア標本とパイロシーケンス法を用いた B 細胞性腫瘍における MYD88 L265P 変異解析。第 12 回日本臨床腫瘍学会総会 2014.7 福岡国際会議場 (福岡県福岡市)
  - Yasuhiro Suzuki, Akihiro Tomita, Chisako Iriyama, Kazuyuki Shimada, Hitoshi Kiyoi. Utilization of Peripheral

- Blood Cell-free DNA for Genetic Analyses in MDS. 第 35 回国際血液学会議 2014.9 北京(中国)
10. 鈴木康裕、富田章裕、吉田健一、島田和之、入山智沙子、真田昌、白石友一、千葉健一、田中洋子、宮野悟、小川誠司、清井仁。末梢血 cell-free DNA を用いた B 細胞リンパ腫における遺伝子変異解析。第 73 回日本癌学会学術総会 2014.9 パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
  11. 富田章裕。B 細胞性腫瘍における抗 CD20 抗体治療薬に対する薬剤耐性 第 73 回日本癌学会学術総会 2014.9 パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
  12. 鈴木康裕、富田章裕、入山智沙子、島田和之、清井仁・・・他。末梢血遊離 DNA を用いた B 細胞リンパ腫における遺伝子変異解析 第 76 回日本血液学会学術集会 2014.10 大阪国際会議場(大阪府大阪市)
  13. 島田和之。Intravascular large B-cell lymphoma-from bench to bedside。第 76 回日本血液学会学術集会 2014.10 大阪国際会議場(大阪府大阪市)
  14. 島田和之、島田聡子、杉本慶樹、早川文彦、片山幸、平川晃弘、中村栄男、瀬戸加大、直江知樹、富田章裕、清井仁。Biological and genetic analyses of intravascular large B-cell lymphoma using xenograft mouse model. 第 76 回日本血液学会学術集会 2014.10 大阪国際会議場(大阪府大阪市)
  15. 稲垣裕一郎、早川文彦、清井仁。B 細胞受容体シグナル経路によるリン酸化を介した PAX5 の機能調節。第 76 回日本血液学会学術集会 2014.10 大阪国際会議場(大阪府大阪市)
  16. 井本直人、倉橋信悟、早川文彦、安田貴彦、清井仁。マウスモデルでの PAX5-PML による急性リンパ性白血病の解析。第 76 回日本血液学会学術集会 2014.10 大阪国際会議場(大阪府大阪市)
  17. 早川文彦。AYA ALL に対する小児プロトコールの有効性と認容の検討: JALSG ALL202-U 研究より。第 56 回日本小児血液・がん学会学術集会シンポジウム 2014.11 岡山コンベンションセンター(岡山県岡山市)
  18. 稲垣裕一郎、早川文彦、井本直人、森下喬允、直江知樹、清井仁。PAX5 Tyrosine Phosphorylation By Syk Co-Operatively Works with Its Serine Phosphorylation By ERK1/2 and Cancels PAX5-Dependent Repression of BLIMP1: A Mechanism of Antigen-Triggering Plasma Cell Differentiation through B Cell Receptor Signal. 第 56 回米国血液学会 2014.12 San Francisco(USA)
  19. Yasuhiro Suzuki、Akihiro Tomita、Kenichi Yoshida、Kazuyuki Shimada、Chisako Iriyama、Masashi Sanada、Yuichi Shiraishi、Kenichi Chiba、Hiroko Tanaka、Satoru Miyano、Seishi Ogawa、Hitoshi Kiyoi。Clinical and Molecular Significance of Peripheral Blood Cell-Free DNA in B-Cell Lymphomas for Detection of Genetic Mutations and Correlation with Disease Status。第 56 回米国血液学会 2014.12 San Francisco(USA)
  20. Kazuyuki Shimada、Satoko Shimada、Keiki Sugimoto、Fumihiko Hayakawa、Miyuki Katayama、Akihiro Hirakawa、Yusuke Takagi、Shigeo Nakamura、Masao Seto、Tomoki Naoe、Akihiro Tomita、Hitoshi Kiyoi。Development and Analysis of Novel Intravascular Large B-Cell Lymphoma NOD/Shi-Scid IL2R  $\gamma$  null Mouse Xenograft Model. 第 56 回米国血液学会 2014.12 San Francisco(USA)
- 〔図書〕(計 0 件)
- 〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)
- 取得状況(計 0 件)
- 〔その他〕  
ホームページ等  
JALSG(日本成人白血病治療共同研究グループ)<http://www.jalsg.jp/>
6. 研究組織
- (1) 研究代表者  
直江 知樹(Naoe Tomoki)  
独立行政法人国立病院機構(名古屋医療センター臨床研究センター)・院長  
研究者番号: 50217634
- (2) 研究分担者  
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
- 島田 和之(Shimada Kazuyuki)  
名古屋大学・学内共同利用施設等・講師  
研究者番号: 50631503
- 富田 章裕(Tomita Akihiro)  
名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授  
研究者番号: 80378215