

## 主論文の要旨

### **Discovery of a drug targeting microenvironmental support for lymphoma cells by screening using patient-derived xenograft cells**

Patient-derived xenograftモデルを用いた  
リンパ腫微小環境を標的とした薬剤の発見

名古屋大学大学院医学系研究科 分子総合医学専攻  
病態内科学講座 血液・腫瘍内科学分野

(指導：清井 仁 教授)

杉本 慶樹

## 【緒言】

抗癌剤は主として **Target Based Screening** もしくは **Phenotype Based Screening** によって薬剤が選ばれ、薬効は樹立された癌細胞株や担癌マウスモデルを用いて評価される。しかしながら、癌領域においては基礎研究で良好な結果が得られているにも関わらず、臨床での新規薬剤の上市率は年々減少している。このような基礎と臨床の乖離は、従来の評価モデルでは正しく臨床効果を予測できないことが原因の一つであり、より臨床病態を反映した薬効評価モデルの構築は喫緊の課題である。最近、臨床病態を反映したモデルとして **Patient Derived Xenograft (PDX) Model** が注目されている。PDX モデルではプライマリ腫瘍細胞の遺伝子発現様式、ゲノム変異の多様性及び薬剤感受性などが保持されており、現在の薬剤開発では臨床試験前に PDX モデルを用いた感受性癌の推定やバイオマーカーの探索に利用されている。しかし、これらは薬剤スクリーニングの最終的な薬効評価として行われるもので、PDX モデルの特性を利用した初期スクリーニングモデルはこれまで存在しなかった。我々は、リンパ腫 PDX マウスの樹立と、PDX マウスから採取した腫瘍細胞 (PDX 細胞) の *In Vitro* 培養系の構築することによって、ハイスループットスクリーニング対応可能な新規薬剤スクリーニング系を構築した。

## 【方法と結果】

我々はびまん性大細胞型リンパ腫の臨床検体を **NOG** マウスに腹腔内移植することによって、継代可能な4つのリンパ腫 PDX モデル(DLB1、DLB2、DLB3、IVL1) を樹立した (Table 1. 2)。しかしながら、PDX モデルから採取されるリンパ腫細胞は一般的な臨床検体と同様に *In vitro* では培養することができない。我々は微小環境を再現することを目的として、リンパ腫微小環境の構成細胞である **Fibroblast Reticular Cell (FRC)** に着目し、FRC の細胞株である **BLS4** と PDX 細胞を共培養による PDX 細胞培養系を構築した (Figure 1.A)。BLS4 との共培養で PDX 細胞の増殖速度は倍加時間が **9.85** 日と細胞株より遅く、よりプライマリ細胞に近いものであった (Figure 1.B)。通常の倍加時間を示すリンパ腫細胞株の **SU-DHL4** や **U-2932** と比較し、**Slow cycling cell** の表現系を示す PDX 細胞は、一般的な抗癌剤である **5-fluorouracil** や **etoposide** に対して低感受性であった(Figure 1.C.D.)。

そこで、PDX 細胞に対して既知活性物質ライブラリ(2,630 化合物)を用いてスクリーニングを実施した(Figure 2.A)。本スクリーニングによって PDX 細胞に特異的に殺細胞効果を示す **Pyruvinium Pamoate (PP)** を同定した(Figure 2.B)。また、本スクリーニング系では一般的な抗癌剤は PDX 細胞に対して強い抗腫瘍作用を示さなかった (Figure 2.C)。

PDX 細胞スクリーニングによって見出されてきた **PP** の構造式を Figure 3.A に示す。PP (1  $\mu\text{M}$ ) で処理した PDX-FRC 共培養系において生細胞(Calsein-AM、Green)と死細胞(PI、Red)の染色を行い PP が腫瘍細胞に対して選択的に殺細胞効果を示すことを確認した(Figure 3.B)。PP の DLB1 に対する  $\text{GI}_{50}$  は **0.137  $\mu\text{M}$**  であった (Figure 3.C)。

PP は In Vivo でも DLB1 に対し、腫瘍の明らかな退縮を誘導した (Figure 3.D)。また、PP は他の PDX モデル(DLB2)に対しても強力な抗腫瘍効果を示した(Figure 3.E)。

次に PP の抗腫瘍メカニズムの探索を行った。PP で前処理した BLS4 と PDX 細胞の共培養を行った結果、PP で前処理した BLS4 では PDX 細胞支持能力が消失しており、PP の作用は BLS4 の PDX 細胞支持能力を消失させることによる間接的な作用であることが示唆された(Figure 4.A)。報告のある PP のミトコンドリア阻害作用を酸素消費速度(OCR)と細胞外酸性化速度(EACR)を指標として調べた。PP は BLS4 に対して OCR の減少(Figure 4.B)と EACAR の上昇(Figure 4.C)を誘導していた。また、PP 処理 BLS4 では ROS が誘導されていた (Figure 4.C) 。加えて、還元型 GSH と酸化型 GSH 比も減少(Figure 4.D)していることから、PP が BLS4 に対してミトコンドリア阻害によって酸化ストレスを誘導していることが明らかになった。

一方ストローマ細胞がシステインを腫瘍細胞に供給することで抗酸化ストレスに働く還元型 GSH の生成を助けるというモデルが慢性リンパ性白血病において報告されている。そこで、BLS4 から腫瘍細胞への GSH 産生関連物質の供給が PP により阻害されている可能性を調べるために、単独培養、BLS4 共培養、PP 前処理 BLS4 共培養した DLB1 の細胞内 GSH を調べた。その結果、BLS4 共培養によって DLB1 細胞内 GSH は上昇していたが、PP によって前処理 BLS4 との共培養では細胞内 GSH 量は DLB1 単独培養と同等レベルにあった(Figure 5.A)。GSH 合成の先駆体であるシステイン量の変化は認められなかった(Figure 5.B)。DLB1 単独培養に対して GSH を添加することで DLB1 細胞は培養可能となり、PP の殺細胞効果は GSH を添加することによりキャンセルされた (Figure 5.C, D)。以上の結果から、PP は BLS4 に対して酸化ストレスを誘導し、リンパ腫細胞に対する GSH 供給を阻害することによりリンパ腫細胞に対して特異的に抗腫瘍作用を示すことを明らかにした(Figure 5.E)。

### 【考察】

従来の細胞株は In Vitro への環境へ適応するために、本来癌に備わっている微小環境への依存性やゆっくりとした増殖速度などの表現型が失われている。その結果細胞株によるスクリーニングでは細胞周期が早い細胞を標的とする薬剤が選ばれる傾向があり、そのような抗がん剤は、細胞株で期待したほどにはプライマリ細胞に効果がない可能性がある。実際、今回のスクリーニングに用いたライブラリの中には 36 個の抗癌剤が含まれていたが、DLB1 に対して強い殺細胞効果を示す薬剤は無かった(Figure 2.C)。このような事は、抗がん剤開発においては、前臨床試験で期待したような効果が臨床治験では得られずに開発が失敗に終わる可能性が他の薬剤に比べて高いことの一因となっているかもしれない。臨床病態に近い PDX 細胞を初期スクリーニングに使用することにより、今後は臨床上活性のある薬剤をより選択的に選別できる可能性がある。

**【結語】**

我々は臨床病態を反映した薬剤評価系を確立するために、リンパ腫 PDX モデルの樹立とリンパ腫微小環境の構成細胞の一つである FRC との共培養による In Vitro 培養系を構築した。本スクリーニング系を用いた薬剤スクリーニングにより PP の新たな抗癌作用を見出した。