

主論文の要旨

**The photosensitizer verteporfin has
light-independent anti-leukemic activity for
Ph-positive acute lymphoblastic leukemia and
synergistically works with dasatinib**

VerteporfinはPh染色体陽性急性リンパ芽球性白血病に対して
光線非依存的に抗白血病効果を示しDasatinibとの相乗効果を示した

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)

森下 喬允

【緒言】

新規抗腫瘍薬の開発は疾患モデルに対して薬剤スクリーニングを行うことから始まる。疾患モデルとしては細胞株を用いるのが一般的で、有力な疾患モデルとして、その役割を担ってきた。しかし、細胞株はモノクローナルで細胞増殖速度が早く、特に微小環境に非依存的であるという点からプライマリ腫瘍細胞の性質を正確には再現できておらず、前臨床研究で細胞株に対して強い抗腫瘍活性を示した薬剤が、臨床試験において十分な効果を示すこと無く試験終了となる薬剤が多いことの原因ではないかと考えられる。我々は以前、細胞株に比較してプライマリ腫瘍細胞の性質を強く維持した **Patient-derived xenograft (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ハイスループットスクリーニングする独自のシステムを開発した(**PDX スクリーニング**)。本研究では、この **PDX スクリーニング**システムを用いる事により、細胞株を用いた従来型のスクリーニング(細胞株スクリーニング)では見いだす事のできなかっ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した。対象疾患はフィラデルフィア染色体陽性急性リンパ芽球性白血病 (**Ph+ALL**)とした。**Ph+ALL** は **BCR-ABL** 融合遺伝子であるフィラデルフィア染色体を有する **ALL** で、**ABL** キナーゼ阻害剤および化学療法の使用により 90%以上の患者において寛解が得られるようになった。しかし、寛解状態を維持することは困難で、ほぼ全例で再発を認める。**Ph+ALL** の根治のためには造血幹細胞移植療法(**HSCT**)を施行することが必要であるが、**HSCT** の治療関連死亡率は高く、**Ph+ALL** の好発年齢である高齢者には **HSCT** の施行は困難であり、新規抗腫瘍薬の開発が期待される。

【方法】

Ph+ALL 患者のプライマリ腫瘍細胞を免疫不全マウスに移植することで **PDX**マウスを樹立した。この **PDX** マウスより得られた **PDX** 細胞に対して薬理活性既知化合物と特許切れ医薬品から構成された 3440 種類の薬剤ライブラリを用いて、**PDX** スクリーニングを施行した。同じ薬剤ライブラリを用いて、**Ph+ALL** 細胞株に対してもスクリーニングを行い、両スクリーニングから同定される薬剤プロファイルの相違を評価した。**PDX** スクリーニング時の死細胞の検出には **Hoechst 33342**、**DAPI** による二重染色の後にイメージアナライザーを使用した。細胞株スクリーニング時の細胞障害活性の検出には **MTT** アッセイを用いた。アポトーシス細胞の検出にはミトコンドリア膜電位低下細胞数の評価および **DAPI**、**Annexin-V** による二重染色の後にフローサイトメトリーを用いて評価した。活性酸素(**ROS**)の産生評価には **CellROX Green Oxidative Stress Reagents™**による染色後にフローサイトメトリーを用いて評価した。*Ex vivo* の薬効評価には、**DAPI** 染色に染まる細胞数をフローサイトメトリーにてカウントし、**dose response curve** を描く事で評価した。二剤併用時の評価には同様の方法でカウントし、**normalized isobologram** を描く事で評価した。*In vivo* の薬効評価のために、**PDX** 細胞を 12 匹の免疫不全マウスに静注した後、3 匹ずつ、4 群(**vehicle** 群、スクリーニング同定薬単剤群、既存標準治療薬(**ダサチニブ**)単剤群、二剤併用群)に分類し、

それぞれ 22 日目から 28 日目まで投薬した。静注後 28 日目に全マウスを sacrifice し、マウスの脾臓および骨髄の腫瘍細胞キメリズム割合をフローサイトメトリーにてカウントして評価した。

【結果・考察】

Ph+ALL 患者、4 症例のプライマリ腫瘍細胞を免疫不全マウスに移植することで、4 症例全てにおいて PDX マウスを樹立、PDX 細胞を得ることに成功した(Figure 1)。PDX スクリーニングの結果より得られた薬剤プロファイルは Ph+ALL 細胞株に対して施行したスクリーニングの結果と大きく異なっていた。その中から FDA 承認薬のベルテポルフィンが Ph+ALL に対する有力な新規治療薬として同定された(Figure 2)。3 種類の PDX 細胞に対するベルテポルフィンの有効性を検証するために行った *ex vivo* 試験において、その GI₅₀ はそれぞれ 228 nM、395 nM、538 nM であった。一方、3 種類の細胞株に対するベルテポルフィンの GI₅₀ はそれぞれ 3.93 μM、2.11 μM、5.61 μM であった。ベルテポルフィンには PDX 細胞には有効である一方、細胞株には抵抗性を示した。ベルテポルフィンは PDX スクリーニングを用いることのみによって同定可能であった。ベルテポルフィンの作用機序は光線照射非依存性の ROS 産生による、腫瘍細胞傷害性であった(Figure 3)。 *Ex vivo* およびマウスを用いた *in vivo* 試験において、ベルテポルフィンは単剤で有意に抗白血病効果を示し、さらに Ph+ALL の標準治療で用いられるダサチニブとの併用下において相乗効果を示した(Figure 4、5)。

【結語】

抗癌剤開発の新しい方法である PDX 細胞スクリーニングを行い、Ph+ALL 細胞に対してベルテポルフィンが抗腫瘍効果を持つことを発見した。ベルテポルフィンはダサチニブとの相乗効果を示し、今後の臨床応用が期待される薬剤と考えられた。