

主論文の要旨

Emetine elicits apoptosis of intractable B-cell lymphoma cells with *MYC* rearrangement through inhibition of glycolytic metabolism

〔Emetine は MYC 遺伝子異常を伴う難治性悪性リンパ腫細胞に対し、糖代謝の抑制を介したアポトーシスを引き起こす〕

名古屋大学大学院医学系研究科 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)

青木 智広

【緒言】

びまん性大細胞型 B 細胞性リンパ腫 (Diffuse Large B-Cell Lymphoma: DLBCL) の治療成績は改善してきているが、*MYC* 遺伝子異常を持つ DLBCL など、既存の標準治療に抵抗性を示す予後不良のサブタイプがあることが知られている。

腫瘍細胞は、そのエネルギー産生を解糖系に依存しているが (Warburg 効果)、腫瘍細胞周囲の間質細胞が Warburg 効果を促進し、抗がん剤による治療抵抗性に影響を与えていることが報告されている。そのため、近年腫瘍細胞と周囲の微小環境との相互作用と予後との関連が注目されている。腫瘍細胞と微小環境との相互作用を標的とした治療法を確立することで、従来とは異なる視点に基づいた治療開発に繋がる可能性がある。

【対象および方法】

MYC 遺伝子異常をもつ難治性 DLBCL 患者由来の腫瘍細胞と、悪性リンパ腫患者のリンパ節検体から単離した腫瘍関連線維芽細胞 (CAF) との共培養系を用いて、3440 コンパウンドよりなる薬剤ライブラリーより腫瘍細胞特異的に治療効果を示す薬剤をスクリーニングし、*MYC* 遺伝子異常をもつ難治性 DLBCL に対する有望な薬剤を同定した。さらに、同薬剤のリンパ腫細胞や CAF に対する作用機序を生体内外で検証した。

【結果】

腫瘍細胞と CAF との共培養系の確立

初めに、悪性リンパ腫患者のリンパ節生検検体に由来する腫瘍細胞は、*ex vivo* における単独培養が困難であるため、*ex vivo* での評価を可能にする培養系の確立を試みた。悪性リンパ腫患者のリンパ節生検検体より CAF を単離し、2 例の難治性 DLBCL 患者由来腫瘍細胞との共培養を行った。Table 1 に 2 症例の患者背景を示す。両者は、治療開始後早期に標準治療に抵抗性を示し、ともに *MYC* 遺伝子異常を伴っていた (Figure 1A)。CAF との共培養により、これらの腫瘍細胞の生存が支持され (Figure 1B、1C)、腫瘍細胞の ATP 産生及び腫瘍細胞の主なエネルギー源である解糖系の主要酵素の蛋白発現が誘導されていた (Figure 1D、1E)。

薬剤スクリーニング

上述の共培養系を用いて、3440 コンパウンドよりなる薬剤ライブラリーより腫瘍細胞特異的に治療効果を示す薬剤を抽出した (Figure 2A)。各薬剤による腫瘍細胞の生存率が 50% 未満となるものを有効と定義し (Figure 2B)、抽出された候補薬剤から、体内で有効な血中濃度を維持できない薬剤、毒性の観点から臨床応用が期待できない薬剤を除外し、最終的に emetine を選択した (Figure 2C)。両患者由来腫瘍細胞 1 及び 2 に対する Emetine の IC_{50} は、それぞれ、312nM、506nM であった (Figure 2D)。

Emetine の CAF に対する作用

Emetine は、CAF の生存には影響を与えなかったが (Figure 3A)、共培養開始前に emetine を暴露させた CAF と腫瘍細胞との共培養下においては、腫瘍細胞の ATP 産生

が減少し (Figure 3B)、CAF による腫瘍細胞への生存支持効果が低下していた (Figure 3C)。また、腫瘍細胞の糖のトランスポーターである GLUT1 発現が低下し、解糖系の側副路であるペントースリン酸回路 (PPP) の代謝産物であるグルタチオン (GSH) 濃度も低下していた (Figure 3D、3E)。これらより emetine は CAF を介した腫瘍細胞の糖代謝の亢進を抑制していることが示唆された。また emetine の CAF に対する作用は、共培養中の培地に GSH を添加することにより相殺された (Figure 3F)。

Emetine の腫瘍細胞に対する効果

次に emetine により腫瘍細胞にアポトーシスが生じることを確認し (Figure 4A)、その機序について検討を加えた。腫瘍細胞の糖代謝を制御する HIF-1 α の発現および解糖系の主要な酵素の発現が抑制されていることが確認され (Figure 4B、4C)、その結果として腫瘍細胞の ATP 産生が低下していた (Figure 4D)。さらに、GLUT1 発現が抑制され (Figure 4D)、ミトコンドリア膜電位の低下、PPP の代謝産物である GSH、NADPH が減少し、細胞内の ROS 産生が増加していた (Figure 4E、4F、4G)。これらにより Emetine は、腫瘍細胞及び腫瘍細胞を支持する CAF の両者に作用し、糖代謝を介するエネルギー産生を阻害し、腫瘍細胞内の ROS を増加させることで、腫瘍細胞にアポトーシスをもたらしことが示唆された (Figure 4H)。

Emetine の in vivo モデルにおける抗腫瘍効果

次に、emetine の抗腫瘍効果を動物モデルを用いて検討した。患者 1 の腫瘍細胞を CAF と混合し、NOD/SCID マウスに皮下注射し、腫瘍の形成を確認した後に、emetine (10mg/kg) を腹腔内投与にて 7 日間投与した (Figure 5A)。治療群 (N=7) は、コントロール群 (N=7) と比べて有意に腫瘍の増殖が抑制された ($P < 0.05$) (Figure 5B、5C)。Emetine 治療下の腫瘍組織では、著明な腫瘍細胞の変性像が確認された (Figure 5D)。さらに、emetine は、他の MYC 遺伝子異常を伴う患者由来初代腫瘍細胞に対しても高い治療効果を示すことが確認された (Figure 5E)。

【考察】

今回我々は、薬剤スクリーニングにより MYC 遺伝子異常をもつ難治性悪性リンパ腫細胞の糖代謝を標的とする薬剤、emetine を同定した。MYC と HIF-1 α は協調して腫瘍細胞の糖代謝を亢進し、腫瘍細胞の増殖、生存において重要な役割を果たしていると報告されており、腫瘍細胞の糖代謝は有望な治療標的の一つと考えられる。

また、我々は、emetine が腫瘍の微小環境を構成する CAF に対しても作用し、抗腫瘍効果をもたらすことを示した。間質細胞が腫瘍細胞の Warburg 効果を促進していることは以前から報告されており、また PPP の活性化も化学療法抵抗性に関与しているとされている。Emetine は、腫瘍を支持する CAF にも作用することで、強い抗腫瘍効果をもたらしていると考えられる。

Emetine は、抗寄生虫薬として既承認の薬剤であることから、ヒトへの投与経験がない薬剤を開発するよりも低コスト、かつ、迅速に臨床応用することができる可能性がある。今回の動物実験にて治療効果を示した投与量は、過去の報告に基づくと、ヒト

への投与量に換算した場合に、毒性を最小限に保ちながら抗腫瘍効果が期待できる用量である。

【結論】

難治性悪性リンパ腫患者のリンパ節生検検体由来腫瘍細胞を薬剤スクリーニングに応用し、腫瘍細胞及び腫瘍微小環境を構成する CAF に作用し、腫瘍細胞の糖代謝を抑制してアポトーシスを誘導する薬剤 emetine を同定した。Emetine は、従来の古典的な抗がん剤とは異なる作用機序で抗腫瘍効果を発揮し、既存の治療に抵抗性を示す病態に有効な可能性がある。今後は、臨床試験を含む継続した薬剤開発が求められる。