

平 28 年 度 委 託 研 究 開 発 成 果 報 告 書

## I. 基本情報

事業名：革新的がん医療実用化研究事業

Practical Research for Innovative Cancer Control

研究開発課題名：悪性リンパ腫の腫瘍細胞と微小環境構成細胞の比較解析と微小環境構成細胞による腫瘍支持機構を標的とする新規治療法の開発

Comparative analysis of malignant lymphoma cells and its microenvironment cells to develop novel treatment targeting microenvironmental support mechanism.

研究開発担当者 名古屋大学医学部附属病院 講師 島田和之

所属 役職 氏名：Nagoya University Hospital, Lecturer, SHIMADA Kazuyuki

実施期間：平成28年4月1日 ～ 平成29年3月31日

## II. 成果の概要（総括研究報告）

### 和文

悪性リンパ腫患者のリンパ節生検検体の初代培養系では、リンパ節の微小環境構成細胞である線維芽細胞とリンパ腫細胞が共存しながら増殖し、線維芽細胞により患者腫瘍細胞が支持されることが観察される。本研究では、悪性リンパ腫病変における腫瘍細胞と微小環境構成細胞の両者に着目し、遺伝子異常を含む生物学的特徴と微小環境依存性の臨床的意義の解明、微小環境依存性を標的とする新規治療法の開発を行うことにより、現在難治性とされる悪性リンパ腫病型に対する新規治療法を開発することを目的とした。

まず、微小環境依存性悪性リンパ腫細胞と線維芽細胞の生物学的特徴の解明に取り組んだ。リンパ節生検検体より単離された線維芽細胞の解析にて、線維芽細胞がcancer associated fibroblast (CAF)の形質と一致することを明らかにした。同一患者由来CAF及びリンパ腫細胞のペア検体における網羅的ゲノムコピー数解析では、腫瘍細胞には多彩なゲノムコピー数異常を認めたのに対し、CAFには有意なゲノムコピー数異常を認めなかった。

線維芽細胞依存性悪性リンパ腫異種移植モデルの作製においては、CAFとの共培養により生存が支持される一部のリンパ節由来腫瘍細胞において、NOGマウスに生着が得られることを確認した。しかし、生着が得られた腫瘍においても、安定した継代移植が困難であり、*in vivo*での評価系としては更なる改善が必要とされた。そこで、本研究においては、*in vivo*での評価系として、腫瘍細胞とCAFの皮下注モデルによる評価系を構築した。

悪性リンパ腫細胞の微小環境依存性の臨床的意義の解明については、15例を超える様々な病型のリンパ節生検検体よりCAFの単離に成功した。CAFによる腫瘍細胞への生存支持効果は様々であったが、一部のCAFによるリンパ腫細胞への生存支持効果は、マウスの線維芽細胞様細胞網細胞の生存支持効果を上回っていた。さらに、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫10例及び濾胞性リンパ腫患者13例、反応性病変5例の検体を用いて、CAFによる生存支持効果を評価したところ、生存支持効果は細胞毎に異なっていた。CAFにより生存が支持されるリンパ腫細胞について、臨床的な共通項としてLDH高値である傾向にあることを確認した。

CAFによる腫瘍細胞の支持機構の解明については、CAF存在下のconditioned mediumを用いることにより、CAFによる分泌産物が腫瘍細胞生存支持に関与していることを確認した。CAFによる代謝産物を、キャピラリー電気泳動・質量分析法にて網羅的解析を行い、CAFより有意に分泌される4種の代謝産物を同定した。

CAFによる腫瘍細胞支持機構を標的とする薬剤の探索については、CAFにより生存が支持される難治性患者由来MYC関連リンパ腫細胞に対して有効性を示す薬剤を、既存の薬剤ライブラリーよりスクリーニング技術を用いて探索した。腫瘍細胞特異的に有効性を示したエメチンを抽出し、別の複数の難治性MYC関連悪性リンパ腫細胞にてその有用性を確認した。エメチンは腫瘍細胞とCAFの両者に作用し、腫瘍細胞の糖代謝を阻害することにより腫瘍細胞に細胞死を誘導することを確認した。さらに、エメチンの*in vivo*モデルにおける治療効果を、難治性患者由来MYC関連リンパ腫細胞とCAFの皮下注モデルにて確認した。エメチンは、ヒトへの投与量換算でヒトにおける承認用量を下回る用量で、十分な治療効果を示すことを確認した。これらにより、悪性リンパ腫の節性病変においては、CAFが腫瘍細胞の生存支持に関与しており、新たな治療標的となる可能性を明らかにした。

## 英文

Primary lymphoma cells from human lymph node proliferate together with fibroblasts those are a component of lymphoma microenvironment *in vitro*; fibroblasts in nodal lymphoma microenvironment support survival of tumor cells. In this study, we focused on both the tumor cells and its microenvironment cells in nodal lymphoma to uncover the pathophysiological characteristics including genomic abnormalities and clinical significance of dependency of tumor cells on its microenvironment, which leads to develop novel treatment for intractable lymphoma targeting tumor and its microenvironment.

First, we attempted to uncover the pathophysiological characteristics of lymphoma cells whose survival is dependent on its microenvironment and fibroblasts isolated from lymphomatous lesions. Surface phenotype of fibroblasts coincided with that of cancer-associated fibroblasts (CAFs), namely  $\alpha$ -SMA positive and CD31 negative. Comparative genomic copy number analyses of both the lymphoma cells and CAFs originated from identical lymphomatous lesion revealed that lymphoma cells had a plenty of genomic copy number alterations, while significant copy number alterations were not observed in CAFs.

Next we attempted to develop xenograft models derived from CAF dependent primary lymphoma cells. Although we had a couple of successful engraftments in NOG mice, stable serial passages of tumor cells were not possible. Further refinement regarding procedures should be required. To evaluate a drug efficacy, we thus developed subcutaneous tumor models in this study.

Regarding clinical significance of microenvironmental dependency on lymphoma cells, we had successful isolations of more than 15 CAFs from lymph node biopsy samples. CAFs demonstrated various support effects on tumor cells, and a part of CAFs demonstrated better survival support effect on tumor cells compared with mouse fibroblastic reticular cells. Using clinical samples of 10 diffuse large B-cell lymphoma, 13 follicular lymphoma, and 5 reactive lymph nodes, the survival of tumor cells on CAFs was also various. Patients whose lymphoma cells were dependent on CAFs tended to accompany high LDH value implying an aggressive clinical course.

To uncover the underlying mechanisms of survival support to tumor cells from CAFs we evaluated secretions from CAFs in those conditioned medium. Metabolomic analysis applied to capillary electrophoresis and mass spectrometry identified 4 metabolites significantly secreted by CAFs.

Finally, we explored drugs targeting support effects on tumor cells by CAFs. We performed a screening analysis using known 3440 compounds to pick out effective drugs against intractable MYC related lymphoma

cells whose survival was dependent on CAFs. We picked out emetine demonstrating inhibition of tumor cells survival but not that of CAFs. We also confirmed an efficacy for other intractable *MYC* related lymphoma cells. Subsequent analyses revealed that emetine affected both the tumor cells and CAFs. Emetine elicits apoptosis of lymphoma cells through inhibition of glycolytic mechanisms. Moreover we evaluated *in vivo* effect of emetine using subcutaneous tumor models derived from *MYC* related lymphoma cells. We confirmed that emetine demonstrated an inhibition of growth of *MYC* related lymphoma cells in *in vivo* at a dose of 10mg/kg in mice equivalent to a lower dose than approved dose in human. All together our data indicate that CAFs support survival of tumor cells in nodal lymphomas and could be a potential therapeutic target for intractable lymphomas.

### III. 成果の外部への発表

#### (1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0 件、国際誌 5 件）

1. 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.* 120:242-51. 2017 doi: 10.1016/j.phrs.2017.04.006. [Epub ahead of print]
2. Aoki T, Shimada K, Sakamoto A, Sugimoto K, Morishita T, Kojima Y, Shimada S, Kato S, Iriymaya 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.* 8:13085-98. 2017
3. 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.* 107:1270-80. 2016
4. Suzuki Y, Tomita A, Nakamura F, Iriyama C, Shirahata-Adachi M, Shimada K, Akashi A, Ishikawa Y, Kaneda N, Kiyoi H. Peripheral blood cell-free DNA is an alternative tumor DNA source reflecting disease status in myelodysplastic syndromes. *Cancer Sci.* 107:1329-37. 2016
5. 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.* 30:1568-79. 2016

#### (2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 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. Emetin Elicits Apoptosis of Intractable B-Cell Lymphoma Cells with *MYC* Rearrangement through Inhibition of Glycolytic Metabolism. 第 58 回米国血液学会、2016 年 12 月 3 日～2016 年 12 月 6 日、サンディエゴ（米国）
2. 島田和之、異種移植マウスモデルを用いた血管内大細胞型 B 細胞リンパ腫の病態解析、第 54 回日本癌治療学会学術集会（シンポジウム；招待講演）、2016 年 10 月 20 日～2016 年 10 月 22 日、パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）
3. Aoki T, Shimada K, Sakamoto A, Morishita T, Harada Y, Iriyama C, Hayakawa F, Tomita A, Kiyoi H. Discovering the novel drug targeting tumor-microenvironment for intractable lymphoma. 第 78 回日本血液学会学術集会、2016 年 10 月 13 日～2016 年 10 月 15 日、パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）

4. 青木智広、島田和之、坂本明彦、森下喬允、早川文彦、富田章裕、清井仁、糖代謝の抑制が myc 陽性 DLBCL 腫瘍のアポトーシスを誘導する、第 75 回日本癌学会学術総会、2016 年 10 月 6 日～2016 年 10 月 8 日、パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み  
該当なし

(4) 特許出願  
該当なし