



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

Title	Therapeutic potential of CPI-613 for targeting tumorous mitochondrial energy metabolism and inhibiting autophagy in clear cell sarcoma(内容と審査の要旨(Summary))
Author(s)	江河, 勇樹
Report No.(Doctoral Degree)	博士(医学) 乙第1497号
Issue Date	2019-06-19
Type	博士論文
Version	none
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/78511

この資料の著作権は、各資料の著者・学協会・出版社等に帰属します。

氏名（本籍）	江 河 勇 樹	（静岡県）
学位の種類	博士（医学）	
学位授与番号	乙第 1497 号	
学位授与日付	令和元年 6 月 19 日	
学位授与要件	学位規則第 4 条第 2 項該当	
学位論文題目	Therapeutic potential of CPI-613 for targeting tumorous mitochondrial energy metabolism and inhibiting autophagy in clear cell sarcoma	
審査委員	（主査）教授	秋山 治彦
	（副査）教授	原 明
		教授 中島 茂

論文内容の要旨

【緒言】

淡明細胞肉腫は若年成人に発症する高悪性度肉腫である。根治療法としては、手術切除が選択されるが、局所再発率が高く、リンパ行性転移も多いため、予後不良である。放射線治療や化学療法には耐性がある場合が多く、さらなる治療方法の開発が待たれている。

しかし稀な肉腫であり、治療方法の開発のためには、転移を含むヒト淡明細胞肉腫の病態を反映したモデル動物系が必要であるが、リンパ節転移、遠隔臓器転移を引き起こすモデル動物系は確立されていなかった。

本研究で、われわれは国内外に先駆けて、リンパ行性転移・遠隔転移をきたす淡明細胞肉腫マウスモデル系を確立した。さらに、治療方法の開発の端緒として α -lipoic acid coenzyme analog と chloroquine の併用効果を検討した。

【対象と方法】

1: *in vitro* で、ヒト淡明細胞肉腫の代表的な細胞株である HS-MM 細胞に CPI-613 (α -lipoic acid coenzyme analog) のもたらす変化を観察し、可視光下観察で、細胞質内小胞形成像がみられたため、オートライソゾームの有無を、DALGreen 法で検討した。また、CPI-613 と chloroquine 併用がもたらす影響、細胞死の性状については Annexin V と propidium iodide 法を用いて評価した。

2: HS-MM 細胞 2.5×10^7 個を CB17.Cg-PrkdcscidLystbg-J/Cr1Cr1j (SCID-beige) マウスのヒト淡明細胞肉腫の最好発部位である下腿筋腱膜近傍に移植した。

3: 週 2 回観察し、移植細胞が $\frac{4}{3} \pi \times [a/2] \times [b/2]^2$ (a は長径, b は短径) の計算式で、 2 mm^3 に達した時点で、ランダムに 2 群に分け、1 群は、CPI-613 (25 mg/kg) と chloroquine (50 mg/kg) を腹腔内に投与した。もう 1 群は非投与とし、腫瘍増殖を比較した。

別実験では 4 群に分け CPI-613 (25 mg/kg) 単独, chloroquine (50 mg/kg) 単独投与群, 併用群, 非投与群の腫瘍増殖も比較検討した。

4: 非投与群の腫瘍体積が 200 mm^3 に達した時点で、転移の有無を含む腫瘍の進行状態を比較した。さらに、移植部および転移部の腫瘍は病理組織学および免疫組織化学染色で検討した。EWS-ATF1 融合遺伝子の発現は RT-PCR 法で解析した。

【結果】

1: *in vitro* で CPI-613 は, HS-MM 細胞にオートライソゾーム形成をもたらすことが明らかになった。Chloroquine との併用では HS-MM の著明な細胞死がみられ, その細胞死はネクローシスであることが明らかになった。

2-4: HS-MM 細胞の SCID-beige マウス移植系で, リンパ節転移, 遠隔臓器転移がみられた。病理組織学的に移植部および転移部の腫瘍は, 淡明な細胞質をもつ腫瘍細胞が, 腫瘍血管を伴い, シート状に増殖しておりヒト淡明細胞肉腫の形態学的特徴に一致した組織像を呈していた。免疫組織学的検討ではヒト淡明肉腫の特徴的なタンパク質 S-100, Microphthalmia Transcription Factor, HMB-45 の発現が, 移植部および転移部でみられた。さらに, 移植部および転移部のいずれでも淡明肉腫にみられる *EWS-ATF1* キメラ遺伝子産物が, RT-PCR 法で検出された。CPI-613 単独, chloroquine 単独投与群では腫瘍進行・転移抑制はみられなかったが, CPI-613 と chloroquine 併用群では, 移植部腫瘍増殖, 転移のいずれも著明に抑制された。

【考察】

CPI-613 は, α -lipoic acid coenzyme analog であり, 現在, 進行膵臓癌で, Phase II trial が開始されている (2019, Jan, 09th)。本研究で申請者は, CPI-613 がヒト淡明肉腫細胞でオートファジーを引き起こし, オートライソゾームを形成すことを見出した。CPI-613 のこの作用は, mitochondrial enzymes pyruvate dehydrogenase (PDH) および α -ketoglutarate dehydrogenase 活性阻害によるものと考えられる。さらにリソソーム阻害剤である chloroquine との併用により, CPI-613 で引き起こされるオートファゴゾーム形成が chloroquine で障害され, 淡明肉腫細胞にネクローシスが生じると示唆される。CPI-613 および chloroquine は忍容性が担保されている薬剤であり, 両者の併用がヒト淡明肉腫の治療に結びつく可能性があると考えられる。

【結論】

ヒト淡明肉腫細胞株 HS-MM を用いて, リンパ行性転移を含むヒト淡明肉腫の生物学的特徴を備えたマウスモデルを開発した。CPI-613 は HS-MM 細胞にオートライソゾーム形成を引き起こすことを明らかにした。さらに CPI-613 と chloroquine の併用により, HS-MM 細胞にネクローシスが生じること, また, *in vivo* モデルにおいて, 移植部の腫瘍増殖のみならず転移が抑制されることを明らかにした。

論文審査の結果の要旨

申請者 江河勇樹は, 淡明細胞肉腫細胞株に CPI-613 を投与することによりオートライソゾームが形成されることを見出し, さらに chloroquine を併用することでネクローシスを惹起することを明らかにした。さらに, 淡明細胞肉腫細胞株を用いたマウスモデル実験において, CPI-613 と chloroquine の併用投与により, 移植部腫瘍増殖・転移のいずれも著明に抑制されることを明らかにした。本研究成果は, 淡明細胞肉腫における新規化学療法の可能性を示唆し, 今後の肉腫研究および治療の発展に少なからず寄与すると認められる。

[主論文公表誌]

EGAWA YUKI, CHIEMI SAIGO, YUSUKE KITO, TOSHIAKI MORIKI, TAMOTSU TAKEUCHI
Therapeutic potential of CPI-613 for targeting tumorous mitochondrial energy metabolism and inhibiting autophagy in clear cell sarcoma. PLoS One. 2018 Jun 7;13(6):e0198940. doi: 10.1371/journal.pone.0198940