

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09476

研究課題名(和文) 悪性神経膠腫に対して腫瘍特異的ポドプランインを標的とした術中療法の開発

研究課題名(英文) Intraoperative treatment targeting tumor-specific podoplanin for malignant gliomas

研究代表者

粟田 学 (Natsumeda, Manabu)

新潟大学・脳研究所・助教

研究者番号：00515728

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：我々は予後不良である脳腫瘍の膠芽腫における術中抗体療法(近赤外線光線免疫療法)を確立した。まず、9割以上の膠芽腫の細胞表面にポドプランインが発現していることを確認した。次に、ポドプランイン陽性/陰性の膠芽腫培養細胞株を用いて、フローサイトメトリーにて、ポドプランイン陽性細胞株では抗原抗体反応が起きる事を確認した。さらにポドプランインとIR700複合体を作成する事でin vitroおよびin vivoで近赤外線光線免疫療法に成功した。今後、臨床応用を目指す。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近赤外線光線免疫療法はEGFR増幅頭頸部癌やHER2陽性乳癌で臨床応用されつつあるが、膠芽腫への臨床応用は未だされていない。今回、我々の研究により膠芽腫に特異的な表面マーカーで正常脳には殆ど発現していないポドプランインを同定し、それを標的とした近赤外線光線免疫療法に成功した。膠芽腫は極めて予後不良な脳腫瘍であり、その新規治療法の確立は急務である。臨床応用まで実現すれば、膠芽腫の予後が飛躍的に向上する可能性があり、社会的意義は高い。

研究成果の概要(英文)：We established an intraoperative antibody treatment (near-infrared photoimmunotherapy) for glioblastomas, a very malignant brain tumor, by targeting the surface antigen podoplanin. First, we assessed podoplanin expression in glioblastomas and found that podoplanin is expressed in over 90% of all glioblastomas. Next, we used 3 podoplanin-positive and 3 podoplanin-negative glioblastoma cell lines and found that the podoplanin antigen was expressed at the surface of podoplanin-positive cells. Lastly, we successfully performed in vitro and in vivo experiments by administering podoplanin-IR700 complex to podoplanin positive cells and xenograft mice and treating with infrared laser. Next, we seek clinical application of this method.

研究分野：脳神経外科

キーワード：NIR-PIT Podoplanin Glioma

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

悪性神経膠腫は手術で全摘出することは難しく、摘出腔周囲の脳組織に浸潤した腫瘍細胞から再発する。そこで残存腫瘍に対し放射線治療とテモゾロミド (TMZ) を用いた化学療法の併用が標準治療とされているが、ほぼ全例で再発を来す。このような理由で悪性神経膠腫に対する新規治療戦略が急務である。

NIR-PIT は米国 NIH 小林久隆先生のグループにより開発され、表面抗原を標識する抗体に IR700 を複合させるように設計された。抗原抗体反応を利用して標的腫瘍の細胞表面に結合した IR700 は、近赤外線照射により生じた熱エネルギーにより腫瘍細胞の細胞膜を破壊する。生じた細胞膜小孔から親水性の高い IR700 が細胞外液と共に細胞内へ大量流入し、腫瘍細胞が膨張・破裂する。腫瘍細胞の細胞障害性が強く、選択的で、正常細胞には害がなく、様々な抗体を利用することで幅広い癌種に対して応用できる等の利点がある。また、NIR-PIT により破裂し、流出した腫瘍細胞内容物がさらなる腫瘍免疫を惹起するというデータもあり、遠隔効果も期待される。既に米国で EGFR 増幅頭頸部癌や HER2 陽性乳癌に対して、NIR-PIT を用いた臨床研究が行われている。一方、我々は、悪性神経膠腫の病理学的検索でポドプラニン陽性の症例が多い事を証明した(未発表データ；IDH 野生型悪性神経膠腫の 90.7%がポドプラニン陽性)。ポドプラニンは悪性神経膠腫を含む様々な癌細胞に発現するムチン様シアロ糖膜貫通型蛋白である。ポドプラニンは生理学的にリンパ管内皮などにも発現している事が知られているが、脳内には殆ど発現していないことが知られている。

2. 研究の目的

本研究の目的はポドプラニン抗体を用いた NIR-PIT 療法が悪性神経膠腫に対して有効かどうかを検証することである。

3. 研究の方法

グリオーマ細胞株におけるポドプラニン(PDPN)の発現を Western blot 法、フローサイトメトリーを用いて評価した。次に抗 PDPN-IR700 複合体を作成し、新潟大学工学部鈴木孝昌教授と共同開発した実験用近赤外線レーザー(図 1)を用いて、ポドプラニン陽性グリオーマ細胞株、ポドプラニン陰性グリオーマ細胞株を用いて NIR-PIT を行った。さらにマウス皮下移植モデルを作成し、in vivo にて NIR-PIT の有効性を検証した。



図 1 共同開発したレーザー

4. 研究成果

グリオーマ細胞株におけるポドプラニン蛋白発現を計 4 種類のポドプラニン抗体(NZ-1.2, LpMab-2, LpMab-7, LpMab-23)を用いて Western blot を行って評価した所、NGT-41 及び LN319 細胞株においてポドプラニンの発現が確認できた(図 2)。

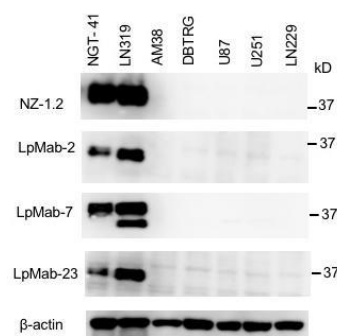


図 2 各細胞株のポドプラニン発現

次に、フローサイトメトリーを用いて LN319 および NGT-41 細胞株に対するポドプラニン抗体 4 種類の結合性を評価した。図 3 のように、ピークの右方へのシフトを認め、何れの抗体も陽性率が極めて高いことが示された。

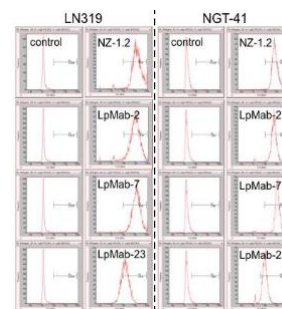


図 3 フローサイトメトリー結果

さらに NZ-1.2-IR700 複合体を作成し、まずは *in vitro* の NIR-PIT の実験を行った。ポドプラニン陽性細胞株では近赤外線照射数分後より腫瘍細胞が円形に変形し、bleb を形成することが確認された(図 4)。また、PDPN 陽性細胞株である

NGT-41 及び LN319 は NZ1.2-IR700 による NIR-PIT に対する感受性は高かったが(図 5 上段)、PDPN 陰性である T98G, U87MG 細胞株に対しては NIR-PIT は無効であった(図 5 下段)。

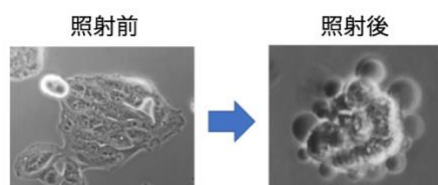


図 4 NIR-PIT 後の形態変化

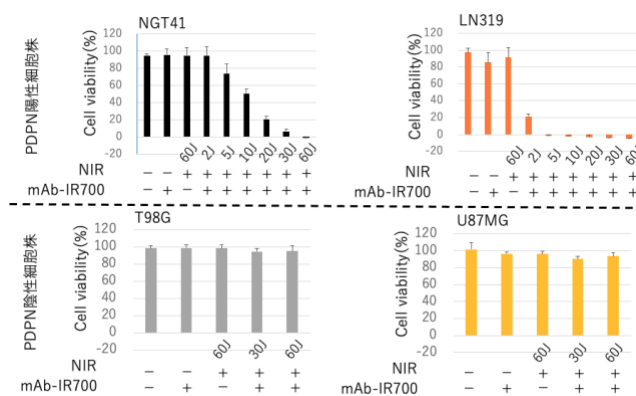


図 5 PDPN 陽性株(上段)と陰性株(下段)の NIR-PIT

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 9件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Abe Hideaki, Natsumeda Manabu, Okada Masayasu, Watanabe Jun, Tsukamoto Yoshihiro, Kanemaru Yu, Yoshimura Junichi, Oishi Makoto, Hashizume Rintaro, Kakita Akiyoshi, Fujii Yukihiko	4. 巻 9
2. 論文標題 MGMT Expression Contributes to Temozolomide Resistance in H3K27M-Mutant Diffuse Midline Gliomas	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Oncology	6. 最初と最後の頁 Open access
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fonc.2019.01568	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Tateishi K, Miyake Y, Kawazu M, Sasaki N, Nakamura T, Sasame J, Yoshii Y, Ueno T, Miyake A, Watanabe J, Matsushita Y, Shiba N, Udaka N, Ohki K, Fink AL, Tummala S, Natsumeda M, et al.	4. 巻 80
2. 論文標題 A Hyperactive ReIa/p65-Hexokinase 2 Signaling Axis Drives Primary Central Nervous System Lymphoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Research	6. 最初と最後の頁 5330 ~ 5343
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/0008-5472.CAN-20-2425	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Natsumeda M, Miyahara H, Yoshimura J, Nakata S, Nozawa T, Ito J, Kanemaru Y, Watanabe J, Tsukamoto Y, Okada M, Oishi M, Hirato J, Wataya T, Ahsan S, Tateishi K, Yamamoto T, Rodriguez FJ, Takahashi H, Hovestadt V, Suva ML, Taylor MD, Eberhart CG, Fujii Y, Kakita A	4. 巻 80
2. 論文標題 GLI3 Is Associated With Neuronal Differentiation in SHH-Activated and WNT-Activated Medulloblastoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Neuropathology & Experimental Neurology	6. 最初と最後の頁 129 ~ 136
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jnen/nlaa141	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 On Jotaro, Natsumeda Manabu, Watanabe Jun, Saito Shoji, Kanemaru Yu, Abe Hideaki, Tsukamoto Yoshihiro, Okada Masayasu, Oishi Makoto, Yoshimura Junichi, Kakita Akiyoshi, Fujii Yukihiko	4. 巻 11
2. 論文標題 Low Detection Rate of H3K27M Mutations in Cerebrospinal Fluid Obtained from Lumbar Puncture in Newly Diagnosed Diffuse Midline Gliomas	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Diagnostics	6. 最初と最後の頁 681 ~ 681
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/diagnostics11040681	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Watanabe J, Natsumeda M, Okada M, Kanemaru Y, Tsukamoto Y, Oishi M, Kakita A, Fujii Y	4. 巻 128
2. 論文標題 Podoplanin expression and IDH-wildtype status predict venous thromboembolism in patients with high-grade gliomas in the early postoperative period	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 World Neurosurgery	6. 最初と最後の頁 e982-e988
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.wneu.2019.05.049	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Watanabe Jun, Natsumeda Manabu, Kanemaru Yu, Okada Masayasu, Oishi Makoto, Kakita Akiyoshi, Fujii Yukihiko	4. 巻 60
2. 論文標題 Comparison of circulating tumor DNA between body fluids in patients with primary central nervous system lymphoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Leukemia & Lymphoma	6. 最初と最後の頁 3587 ~ 3589
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/10428194.2019.1639169	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Kanemaru Yu, Natsumeda Manabu, Okada Masayasu, Saito Rie, Kobayashi Daiki, Eda Takeyoshi, Watanabe Jun, Saito Shoji, Tsukamoto Yoshihiro, Oishi Makoto, Saito Hirotake, Nagahashi Masayuki, Sasaki Takahiro, Hashizume Rintaro, Aoyama Hidefumi, Wakai Toshifumi, Kakita Akiyoshi, Fujii Yukihiko	4. 巻 7
2. 論文標題 Dramatic response of BRAF V600E-mutant epithelioid glioblastoma to combination therapy with BRAF and MEK inhibitor: establishment and xenograft of a cell line to predict clinical efficacy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Acta Neuropathologica Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s40478-019-0774-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 NOZAWA Takanori, OKADA Masayasu, NATSUMEDA Manabu, EDA Takeyoshi, ABE Hideaki, TSUKAMOTO Yoshihiro, OKAMOTO Kouichirou, OISHI Makoto, TAKAHASHI Hitoshi, FUJII Yukihiko, KAKITA Akiyoshi	4. 巻 59
2. 論文標題 EGFRvIII Is Expressed in Cellular Areas of Tumor in a Subset of Glioblastoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neurologia medico-chirurgica	6. 最初と最後の頁 89 ~ 97
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2176/nmc.oa.2018-0078	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Watanabe Jun, Natsumeda Manabu, Okada Masayasu, Kobayashi Daiki, Kanemaru Yu, Tsukamoto Yoshihiro, Oishi Makoto, Kakita Akiyoshi, Fujii Yukihiro	4. 巻 -
2. 論文標題 High Detection Rate of MYD88 Mutations in Cerebrospinal Fluid From Patients With CNS Lymphomas	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 JCO Precision Oncology	6. 最初と最後の頁 1~13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1200/P0.18.00308	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 梶田 学
2. 発表標題 Less invasive diagnosis and precision medicine in malignant brain tumors
3. 学会等名 第41回日本脳神経外科コンgres学术総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 梶田 学
2. 発表標題 Establishment of cell lines and xenografts for the realization of precision medicine in brain tumor patients
3. 学会等名 第10回生理研-霊長研-脳研国際シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 梶田 学
2. 発表標題 悪性神経膠腫における術後静脈血栓塞栓症危険因子の検討 -ポドプラニンとIDH変異の関係-
3. 学会等名 第37回日本脳腫瘍病理学会学术集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 栗田 学
2. 発表標題 当科における光線力学療法の経験および次世代への挑戦
3. 学会等名 LASER WEEK IN TOKYO II
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	鈴木 孝昌 (SUZUKI Takamasa)	新潟大学・工学部・教授 (13101)	
研究協力者	竹澤 晴香 (TAKEZAWA Haruka)	日本歯科大学新潟短期大学・歯学部生化学講座・講師 (43107)	
研究協力者	温 城太郎 (ON Jotaro)	新潟大学・脳神経外科・大学院生 (13101)	
研究協力者	渡邊 潤 (WATANABE Jun)	新潟大学・脳神経外科・大学院生 (13101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------