

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：32624

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07187

研究課題名(和文) 腫瘍細胞により構築される腫瘍疑似血管を標的とした新規悪性脳腫瘍治療法の開発

研究課題名(英文) Development of novel immunotherapy for malignant brain tumors targeting tumor vascular mimicry

研究代表者

宇都口 直樹 (UTOGUCHI, Naoki)

昭和薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：80276633

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)：疑似血管のin vitro培養法の確立を試み、マトリゲル、スフェロイド培養法により、疑似血管様構造を構築可能なことを明らかとした。疑似血管の大量培養の方法や、最適な疑似血管構築条件の検討を行い、抗原としてin vivoへの免疫に十分な量を得ることに成功した。本手法により、抗疑似血管抗体を作成する目的で、マウスに疑似血管を免疫し、抗疑似血管抗体ファージライブラリの創成に成功した。また、ライブラリより通常培養のがん細胞には結合せず、疑似血管に選択的に結合するファージ抗体を数種類得ることに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腫瘍組織血管を標的とした研究は、国内外を問わず行われているが、その戦略の基本は「血管新生の阻害」であり、「腫瘍組織の新生血管」という組織特性を考慮していない。その中で、腫瘍組織に選択性を有することと、腫瘍疑似血管を標的とした本応募課題は、国内外を問わず、全く新規の戦略である。また、腫瘍疑似血管が報告されてから10年が経つが、このフィールドの研究者も少なく、さらにその報告も多くは無い。その中で、今回、腫瘍疑似血管のin vitro培養法を確立し、さらに腫瘍疑似血管特異ファージ抗体を得ることに成功した。本研究が足がかりとなり、新規がんターゲティング療法開発に繋がると考える。

研究成果の概要(英文)：We attempted to establish an in vitro culture method for tumor vascular-mimicry, and found that tumor vascular-mimicry-like structures can be constructed by Matrigel and spheroid culture methods. We investigated methods for mass culture of tumor vascular-mimicry and optimal conditions for tumor vascular-mimicry construction and succeeded in obtaining sufficient quantities of tumor vascular-mimicry as antigens for in vivo immunization. Using this method, we immunized mice with tumor vascular-mimicry to generate anti-tumor vascular-mimicry antibodies and succeeded in creating an anti-tumor vascular-mimicry antibody phage library. From the library, we succeeded in obtaining several phage antibodies that selectively bind to tumor vascular-mimicry, but not to cancer cells in normal culture.

研究分野：薬剤学

キーワード：がんターゲティング がん免疫 がん血管

## 1. 研究開始当初の背景

腫瘍組織の増大に血管新生は必須であることから、腫瘍組織の新生血管を標的とした分子標的治療薬の開発がなされ、血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) を標的とした抗 VEGF モノクローナル抗体は、結腸・直腸がんの治療薬として上市されている。しかしながら、脳には血液脳関門が存在するため、多くの抗悪性腫瘍薬に著効が示されず、また適用となっている分子標的治療薬も皆無であり、脳腫瘍は治療が極めて困難ながんである。そこで、新規作用機序に基づく悪性脳腫瘍治療法開発は急務な課題である。

一方、近年、腫瘍細胞の発生や転移先での腫瘍組織の増大といった初期の腫瘍組織増大時、血管内皮細胞から構成される新生血管とは異なる“腫瘍疑似血管”と呼ばれるがん細胞群が極めて重要な働きをすることが報告されてきた (Sun B. et al., *Oncol Rep.* 16, 693-698, 2006)。腫瘍疑似血管は、従来から知られている血管内皮細胞や血管内皮前駆細胞が構築する新生血管に加え、腫瘍増殖の初期段階でがん細胞自身が血管様の構造を形成し、血管として機能しているものである。この腫瘍疑似血管は、腫瘍組織の極めて初期の増殖に重要な役割を担っていると考えられていることから、腫瘍疑似血管は腫瘍増殖初期の新規作用標的となることが期待される。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、脳腫瘍の克服を目的に、腫瘍疑似血管を標的とした脳腫瘍免疫療法、およびターゲティング療法製剤の開発を行うことである。

具体的には、免疫療法として、樹状細胞ワクチン療法により脳腫瘍における腫瘍疑似血管に対する免疫を惹起するものである。ターゲティング療法製剤として腫瘍疑似血管特異的な抗体を創製し、本抗体を用いた腫瘍疑似血管ターゲティング製剤による新規脳腫瘍治療薬の開発を行う。

## 3. 研究の方法

### 腫瘍疑似血管の *in vitro* 培養法の確立

免疫療法の抗原となる脳腫瘍組織の腫瘍疑似血管を単離培養する必要がある。しかしながら、腫瘍組織の腫瘍疑似血管の *in vitro* 培養法は確立されていない。そこで、まずマウス脳腫瘍細胞株 (GL261、203G など) を用い、他のがん種において腫瘍疑似血管構造の誘導作用が認められている (応募者の予備検討) マトリゲルやスフェロイドを用いた *in vitro* 腫瘍疑似血管培養法の確立を行う。

### 腫瘍疑似血管を抗原としてパルスした樹状細胞免疫療法による抗腫瘍効果

*In vitro* 腫瘍疑似血管は、本療法のターゲットとなる抗原蛋白質を含むと予想される。そこで、腫瘍疑似血管ターゲティング抗体の創製に先立って、腫瘍疑似血管を抗原としてパルスした樹状細胞を用いたがん免疫療法を検討し、*in vivo* における抗腫瘍効果を有するかを検討する。すなわち、「腫瘍疑似血管を標的とした脳腫瘍免疫療法は有効か否か？」を明らかにする。

### 腫瘍疑似血管を抗原とした免疫ファージ抗体ライブラリの作製および特異抗体の創製

腫瘍疑似血管抗体の創製にあたっては、汎用されるハイブリドーマ法ではなく、ファージディスプレイ法により行う。一本鎖抗体を提示したファージ抗体ライブラリの中から特異抗体の創製を目指す。免疫ファージ抗体ライブラリは、多種多様な抗体を短時間に網羅することが可能な画期的ライブラリである。作製した腫瘍疑似血管免疫ファージ抗体ライブラリの中から、腫瘍疑似血管に特異的な分子に対する結合親和性を利用して、抗体の選択を行う。

## 4. 研究成果

がん細胞より分化した腫瘍疑似血管を標的とした樹状細胞ワクチン療法の開発と、ファージディスプレイ法を駆使した疑似血管特異抗体の創製および本抗体を用いたがんターゲティング療法の開発を目的とした研究である。まず、腫瘍疑似血管の *in vitro* 培養法が確立されていないことから、初年度に疑似血管の *in vitro* 培養法の確立を試みた。その結果、マトリゲル、スフェロイド培養法により、疑似血管様構造を構築可能なことを明らかとした。初年度、いくつかの生化学的疑似血管マーカによる確認を行った。2 年目は、さらに血管内皮細胞との比較および、様々ながん種で疑似血管の構築が起こるか否かを検討した。結果、おなじがん種であっても、疑似血管を構築しないがん種も存在することが判明した。疑似血管を構築する、構築しないかの違いが細胞のどのような性質と関連しているのかは、検討中である。また、抗原となる腫瘍疑似血管が大量に必要なことから、大量培養の方法や、最適な疑似血管構築条件の検討を行った。結果、抗原として *in vivo* への免疫に十分な量を得ることに成功した。本手法により、抗疑似血管抗体を作成する目的で、マウスに疑似血管を免疫し、抗体価が上がったことを確認後、脾細胞

を採取し、そこから抗疑似血管抗体ファージライブラリの創成に成功した。また、ライブラリより通常培養のがん細胞には結合せず、疑似血管に選択的に結合するファージ抗体を数種類得ることに成功した。現在、それら抗体の認識する抗原の解析および、完全抗体への改変を行っている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 野村 鉄也, 平田 圭一, 小泉 直也, 宇都口 直樹
2. 発表標題 メラノーマによるがん擬似血管構造を再現しうる <i>in vitro</i> 再構築モデルの開発と特性解析
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高野 涼、國友 瑞穂、野村 鉄也、小泉 直也、宇都口 直樹
2. 発表標題 がん擬似血管を抗原として利用した樹状細胞免疫療法の開発に向けた基礎的検討
3. 学会等名 第36回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 がん擬似血管を標的とした治療法開発を目指した管腔形成モデルの開発と特性評価
2. 発表標題 白木百合香、野村 鉄也、小泉 直也、宇都口 直樹
3. 学会等名 第36回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 野村 鉄也, 井上 隼輔, 多田 遥子, 井上 雅己, 鎌田 春彦, 角田 慎一, 宇都口 直樹
2. 発表標題 がん微小環境における免疫抑制機構の制御を可能にする受容体指向性サイトカインアンタゴニストの創製
3. 学会等名 日本薬剤学会第35年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 野村 鉄也, 宮崎 賢太郎, 酒井 慶伍, 仁井田 怜子, 國友 瑞穂, 小泉 直也, 宇都口 直樹
2. 発表標題 がん擬似血管再構築モデルの開発と管腔形成メカニズムの解明に関する基礎的検討
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2020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

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