

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 7 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23501288

研究課題名(和文)腫瘍細胞が構築する擬似血管を標的とした新規がん免疫療法の開発

研究課題名(英文)Development of novel cancer immunotherapy targeting tumor vascular mimicry

研究代表者

宇都口 直樹(UTOGUCHI, NAOKI)

帝京大学・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) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：擬似血管単離方法の確立を行った。結果、固形腫瘍をコラゲナーゼにより分散し、Percoll密度勾配およびMACSを組み合わせた方法により、高純度に擬似血管を単離することに成功した。また、マトリゲル上でマウスメラノーマを培養することで、in vitroにおいて擬似血管の再構築に成功した。本細胞を抗原として、マウスに免疫し、抗体遺伝子を組み込んだ一本鎖抗体ファージディスプレイライブラリーの構築を行った。現在、擬似血管に特異的に結合する抗体の選別を行っている。

研究成果の概要(英文)：We established the isolation method of tumor vascular mimicry from solid tumor. As a result, after collagenase digestion, using the combination of MACS and Percoll density gradient, we succeeded to isolate of tumor vascular mimicry to a high purity. Further, by culturing the mouse melanoma on Matrigel, the tumor cells formed the tumor vascular mimicry in vitro. Tumor vascular mimicry cells were immunized mice were constructed of single-chain antibody phage display libraries incorporating the antibody gene. We are currently performing a selection of an antibody that specifically binds to the pseudo blood vessel.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍免疫学

キーワード：免疫療法 ワクチン療法

1. 研究開始当初の背景

応募者は腫瘍組織における微小環境の重要性に着目し、正常組織の血管と腫瘍組織の血管機能が異なることを明らかにした。本結果から、腫瘍組織の血管内皮細胞には正常組織とは異なる抗原蛋白質が発現しているという仮説のもと、腫瘍組織血管内皮細胞をパルスした樹状細胞免疫により抗腫瘍効果が得られることを明らかとしてきた。

しかしながら、腫瘍組織の血管のみを標的とした本療法および、抗 VEGF 抗体を用いた治療においても腫瘍の完治が認められないことから、腫瘍には血管内皮細胞から構成される血管とは異なり、新規な血管新生経路があることが予想される。その新規経路の新生血管が「擬似血管」であるという仮説をたて、擬似血管を標的とした治療法の開発を着想した。

がんの発症機構が明らかとなりつつある中で、腫瘍組織における血管新生の重要性は増すばかりである。このような背景から、腫瘍組織の新生血管をターゲットとした分子標的治療薬の開発がなされ、腫瘍組織の血管新生に關与する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

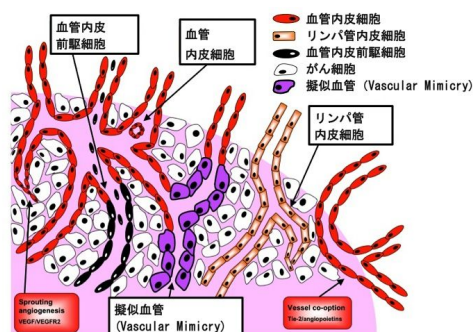


図1 がん組織における擬似血管  
がん組織内血管の由来は、血管内皮細胞、血管内皮前駆細胞およびがん細胞である

は、直腸がんの治療薬として上市されている。しかしながら、多くのがん種における転移がんなど、未だ現状の分子標的治療薬によっても奏功が認められないがんが存在し、新規作用機序に基づくがん治療法の開発は急務である。

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「擬似血管」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)。図1に示すように擬似血管は、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血管新生経路に加え、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。すなわち、がん組織側からの「擬似血管」と周囲の血管内皮細胞が構築する「血管」とが接合して腫瘍組織血管として機能している。そのため擬似血管は初期の

がん増殖に極めて重要な役割を担っており、擬似血管を標的とした治療法は、新規作用機序のがん治療法となることが期待される。そこで本応募課題は、擬似血管を標的とした樹状細胞ワクチン療法と、ファージディスプレイ法を駆使した抗擬似血管抗体の創製および本抗体を用いたがんターゲティング製剤の開発を3年間で行うものである。

2. 研究の目的

(1) 固形腫瘍からの擬似血管の単離法の確立

擬似血管の単離法は確立されておらず、まず腫瘍組織からの擬似血管単離法の開発を行う。

(2) 擬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の検討

腫瘍組織より単離した擬似血管は、がん治療標的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、擬似血管ターゲティング抗体の創製に先立って、擬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確認する。

(3) 擬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

擬似血管抗体の創製にあたっては、ファージディスプレイ法を駆使して作製したファージ抗体ライブラリの中から抗体の創製を目指す。擬似血管をマウスに免疫して作製する免疫ファージ抗体ライブラリは、擬似血管中に含まれるありとあらゆる抗原に対する多種多様な抗体を網羅したライブラリである。そこで作製した擬似血管免疫ファージ抗体ライブラリの中から、擬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) 抗擬似血管抗体を用いたがんターゲティング製剤の創製およびその抗腫瘍効果

得られた抗擬似血管抗体を用い、がんターゲティング製剤を創製する。ターゲティング製剤として、( ) 抗体に抗がん作用のある薬物が直接結合したもの、( ) 抗がん剤を封入した抗体表面修飾リポソームの2種を創製する。

また本研究の特徴を以下に記す。

応募者は腫瘍組織における微小環境の重要性に着目し、正常組織の血管と腫瘍組織の血管機能が異なることを明らかにした。本結果から、腫瘍組織の血管内皮細胞には正常組織とは異なる抗原蛋白質が発現しているという仮説のもと、腫瘍組織血管内皮細胞をパルスした樹状細胞免疫により抗腫瘍効果が得られることを明らかとしてきた。腫瘍細胞そのものではなく、腫瘍部位の血管を標的とすることで、以下に示す2つの決定的利点を得ることができる。

1) 透過障壁の回避：がん細胞を標的とするため、免疫細胞や抗体が血管内皮細胞層を透過する必要があり、これが障壁となるが、血

管を標的とした場合、透過障壁が全くない。  
2) 効率の良さ: がん組織を構成する細胞は、主にごん細胞と血管内皮細胞であるが、その細胞数比は 100~1000:1 である。すなわち、1 つの血管内皮細胞の死は多数のごん細胞死を誘導するため、極めて効率が良い。

しかしながら、腫瘍組織の血管のみを標的とした本療法および、抗 VEGF 抗体を用いた治療においても腫瘍の完治が認められないことから、腫瘍には血管内皮細胞から構成される血管とは異なり、新規な血管新生経路があることが予想される。その新規経路の新生血管が「擬似血管」であるという仮説をたて、擬似血管を標的とした治療法の開発を着想した。

### 3. 研究の方法

#### (1) がん移植 GFP マウスからの擬似血管単離

まず抗原となる擬似血管を腫瘍組織の中から単離する必要がある。しかし擬似血管に関しては、未だ明確な形成・構築機構が明らかとなっていないだけでなく、特異的なマーカー分子すら同定されていない。そこで応募者は、擬似血管単離法の開発をまず行う。具体的には、蛍光蛋白質 GFP を恒常発現しているマウス (GFP マウス) に対してマウス黒色腫 B16 細胞を移植し、形成した腫瘍組織よりセルソーターを用いて擬似血管の単離を試みる。

固形腫瘍組織内の細胞を大別すると「がん細胞」、「血管内皮細胞」、「擬似血管 (がん細胞由来)」および「間質細胞 (繊維芽細胞など)」である。したがって、腫瘍組織の細胞分散液をセルソーターで解析すると、マウス個体由来細胞は GFP 陽性細胞であり、これは「血管内皮細胞」と「間質細胞」である。一方、外から接種した「がん細胞」と「擬似血管」は GFP 陰性である。擬似血管は腫瘍組織内で血管として機能していることから、血管内皮細胞マーカー分子に陽性であることが予想されることから、この GFP 陰性群中から血管内皮細胞マーカー (CD31 や CD34 など) 陽性細胞群をソーティングすると「擬似血管」が単離されると考えられる。

#### (2) 擬似血管を抗原としてパルスした樹状細胞ワクチンによる腫瘍増殖抑制効果

本検討では、単離した擬似血管を抗原としてパルスした樹状細胞 (Dendritic cell: DC) を用いて、ワクチン投与による抗腫瘍効果を検討する。具体的には、擬似血管をパルスしたマウス骨髄由来の DC を免疫した群が、B16 細胞そのものを抗原としてパルスした DC 免疫群、および腫瘍組織血管内皮細胞をパルスした DC 免疫群と比較して、有意な腫瘍肺転移抑制効果を示すことを明らかにする。すなわち、がん免疫療法の標的として「がん細胞」、「腫瘍組織の血管内皮細胞」、「擬似血管」のどれが最も有効かを比較検討し、擬似血管を標的としたがん治療の有効性を明らかにす

る。

#### (3) ファージディスプレイ法を駆使した擬似血管特異的免疫抗体ライブラリの構築

本検討では、擬似血管特異的な分子標的治療薬を開発するにあたって、抗擬似血管抗体の創製を試みる。従来のハイブリドーマ法と比較して、画期的な抗体作製法であるファージディスプレイ法 (Fig. 2) を用いて、単離した擬似血管に含まれると予想される腫瘍関連蛋白質に対する免疫抗体ライブラリを構築する。具体的には、まずマウスに対して単離した擬似血管を抗原として抗体価が上昇するまで免疫する。次に免疫マウスから脾臓を摘出し cDNA を回収後、PCR 法を用いて抗体の VL、VH 領域を連結した 1 本鎖抗体ライブラリを創製する。

#### (4) パンニングによる抗擬似血管特異的抗体の選別

本検討では、先に作製した免疫抗体ライブラリを用いて、擬似血管の細胞表面上に存在する擬似血管特異的な抗原蛋白質を認識する抗体の創出を目指す。具体的には作製した抗体ライブラリを用いて擬似血管に発現する分子との結合親和性を利用したセルパンニング操作を行う前に、がん細胞、血管内皮細胞と結合させて非特異的に結合するファージを除くサブトラクションセルパンニングを行うことで、擬似血管特異的抗体の選別を図る。さらに、マウス腫瘍組織切片における擬似血管への特異的結合、in vivo における本抗体の腫瘍組織集積性を評価し、特異性が高くかつ、腫瘍組織への集積性が高い抗体を選別する。さらにヒトへの臨床応用の基礎検討として、ヒト病理組織切片での結合性を評価する。

#### (5) 抗擬似血管抗体をキャリアー分子として用いたがんターゲティング製剤の創製

得られた抗擬似血管抗体を用い、がんターゲティング製剤を創製する。ターゲティング製剤として、( ) 抗がん作用のある薬物が抗体に直接結合したもの、( ) 抗がん剤を封入したデバイスのキャリアーとしたもの、2 種を創製する。( ) 抗体結合抗がん剤としてはタキソール、マイトマイシン C、メソトレキサート、毒素としてはネオカルチノスタチン、ジフテリア毒素フラグメント A を予定している。( ) 抗体表面修飾抗がん剤封入リポソームは、応募者がこれまでに研究を行ってきたものであり、抗擬似血管抗体を用いリポソーム表面を修飾する。このリポソームは表面をポリエチレングリコール修飾することにより、細網内皮系への取り込み回避と EPR 効果による腫瘍組織へのパッシブターゲティングを行い、リポソーム表面を抗体修飾することにより腫瘍組織へのアクティブターゲティング能を有したものである。

#### (6) 擬似血管ターゲティング製剤の in vivo 抗腫瘍効果の検討

先に創製したがんターゲティング製剤の担

がんマウスにおける抗腫瘍効果（腫瘍体積、延命効果）を評価する。具体的には、まずマウス黒色腫 B16 の肺転移モデルで検討し、次の種々のがん種への応用が可能かをマウス結腸がん colon26 の皮下固形腫瘍、マウス脳腫瘍 203G の脳移植モデルでの検討を行う。

#### 4．研究成果

擬似血管単離方法の確立を行った。結果、固形腫瘍をコラゲナーゼにより分散し、Percoll 密度勾配および MACS を組み合わせた方法により、高純度に擬似血管を単離することに成功した。また、マトリゲル上でマウスメラノーマを培養することで、invitro において擬似血管の再構築に成功した。本細胞を抗原として、マウスに免疫し、抗体遺伝子を組み込んだ一本鎖抗体ファージディスプレイライブラリーの構築を行った。現在、擬似血管に特異的に結合する抗体の選別を行っている。

#### 5．主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

がん組織における擬似血管新生を標的とした免疫療法の開発、日本薬学会第 134 年会(2014 年 3 月 27-30 日、熊本)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

#### 6．研究組織

#### (1)研究代表者

宇都口 直樹 (UTOGUCHI Naoki)

帝京大学・薬学部・教授

研究者番号：80276633

#### (2)研究分担者

なし

#### (3)連携研究者

なし