

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 22 日現在

機関番号：32643

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790050

研究課題名(和文) 脳腫瘍擬似血管を標的とした新規 DDS 治療薬の開発と治療への応用

研究課題名(英文) Development of novel DDS drugs targeting for glioma tumor vasculogenic mimicry

研究代表者

野村 鉄也 (Tetsuya, Nomura)

帝京大学・薬学部・助教

研究者番号：40582854

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000 円、(間接経費) 1,020,000 円

研究成果の概要(和文)：本研究では、脳腫瘍グリオーマに対する新規 DDS 治療法の開発を目指した研究を行ってきた。中でも近年脳腫瘍組織中に存在し、腫瘍増殖や転移に関与することが明らかとなってきた擬似血管構造に着目し、標的とした特異抗体の創製を試みた。

まず、in vitro において脳腫瘍細胞が管腔形成することによって構築された擬似血管モデル細胞を再現することに成功した。次に、この細胞たんぱく質をマウスに免疫することによって、脳腫瘍擬似血管免疫抗体ライブラリを創出した。さらにこの抗体と抗原たんぱく質の結合親和性を利用したパンニングと呼ばれる手法を用いることで、擬似血管に対する高親和性抗体を増幅させることに成功した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we had an attempt to develop a novel drug delivery therapy for glioma. In particular, we had tried to create specific antibody for tumor vasculogenic mimicry (VM), which was reported that it was associated with tumor growth and metastasis.

In vitro, I had constructed glioma VM model cell forming de novo vascular networks. Next, the glioma VM antibody library had been developed by the immunization of glioma VM cell proteins. In addition, the number of high affinity antibodies for VM had been enhanced by affinity panning for VM proteins.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：脳腫瘍 擬似血管 抗体 ファージ表面提示法 DDS 免疫療法

1. 研究開始当初の背景

脳腫瘍は、頭蓋骨に包まれた箇所に形成される腫瘍であり、中でも脳実質内のグリア細胞ががん化して発生するグリオーマは、生命予後の極めて不良な疾患である。現在の治療法には、外科的手術・化学療法・放射線療法が存在するものの、高度な執刀技術が求められること、腫瘍組織以外の正常組織への影響を伴うなどの問題点が存在する。また近年、薬物療法も試みられてはいるものの、脳は血液脳関門(Blood-Brain-Barrier;BBB)に覆われていることから薬物移行性に乏しい。したがって、これら問題点を克服しうる新たな治療法の開発が待望されている。申請者はこれまでに、目的組織・細胞・分子に対するターゲティング技術の開発と医薬品応用を目指した研究を推進してきた。具体的には、1)効率よい細胞内への薬物送達を可能とする細胞膜透過ペプチドの開発、2)ターゲティング能を有する機能性人工たんぱく質(抗体・サイトカイン)の創出、3)がんやインフルエンザ感染症の克服を目指した新規ワクチンアジュバント(樹状細胞・サイトカイン)・キャリア(リポソーム)の開発である。そこで本申請課題では、これら DDS 技術を適用して難治性腫瘍である脳腫瘍に対する有効性・安全性に優れた治療法の開発を目指す。

2. 研究の目的

近年のライフサイエンス研究の進展に伴い、がん発症機構における血管新生の重要性が明らかとなり、腫瘍血管を標的とした血管新生阻害薬の開発が強力に推進されてきた。腫瘍そのものでなく新生血管を標的として治療することは、1つの血管内皮細胞に対して100~1000個の腫瘍細胞が依存して存在していることから、効率のよい効果が期待できる。しかし、脳腫瘍への適用は逆に他臓器への転移を促進させるとの報告もあり、現状臨床適用には課題が存在する。一方で近年、がん組織の発達・転移に、擬似血管(Vasculogenic Mimicry;VM)と呼ばれるがん細胞群が極めて重要な働きをすると報告されてきた。図1に示すように、VMは、新生血管とは異なる組織ながら、腫瘍形成の段階でがん細胞が血管様の構造・機能を示すものである。したがって、VMを標的とした治療法は、がん細胞を直接傷害する治療法とは異なり、BBBによる障壁を考慮する必要のない点で圧倒的に有利な方法である。そのため、VMを標的とした治療薬を創出できれば、治療困難な脳腫瘍に対する新たな作用点の医薬品になると強く期待される。そこで本課題は、脳腫瘍のVMに着目し、独自に開発した生物学的DDS技術とも呼べるDCがん免疫療法や機能性たんぱく質創出技術(ファージ表面提示法)を駆使して、VM標的治療薬の創製を2年間で行う。

3. 研究の方法

(1)マウスグリオーマ細胞を用いた腫瘍擬似血管(VM)モデルの構築

マウスグリオーマ細胞である203G細胞をモデル細胞として用いて、invitroにおけるVMモデルの構築を行った。具体的には、203G細胞を予めマトリゲルをコーティングしたシャーレ上に播種し、18hr、CO₂インキュベーター内にて培養した。培養後の管腔形成を位相差顕微鏡により観察した。

(2)マウスグリオーマ細胞により構築したVM

モデル細胞の回収およびたんぱく質抽出
マトリゲル上で培養した細胞を回収するために、マトリゲルを低温条件下にて溶解し、細胞を回収した。回収した細胞を洗浄後、凍結融解を繰り返すことによってたんぱく質の抽出を行った。

(3)マウスグリオーマ細胞によるVMモデルを抗原として用いた免疫抗体ライブラリの創製

VMモデル細胞より抽出したたんぱく質をアジュバントと混合してエマルジョンを作成後、マウスに対して1週間おきに2回の免疫を行った。最終免疫1週間後のマウスより血清を回収し、ELISA法により血清中のVMモデルたんぱく質に対するIgG抗体の産生を評価した。抗体産生を確認後、脾臓を摘出し、Total RNAを抽出、mRNAを精製後にcDNAを合成した。さらに、cDNAより抗体遺伝子の抗原認識部位である可変領域の軽鎖(VL)、重鎖(VH)をクローニング後、両者を連結させることにより一本鎖抗体遺伝子ライブラリを創出した。この遺伝子ライブラリをファージゲノム上に組み込むことによって免疫ファージ抗体ライブラリを作成した。

(4)ファージ抗体ライブラリからのパンニング操作を用いたVM結合親和性に優れた抗体クローンの創出

得られたファージ抗体ライブラリを抗原として用いたVMモデル細胞に添加し、結合させた。このファージを洗浄することによって、VM細胞に結合しないファージを除去し、結合する抗体ファージのみを回収した。この操作を繰り返し行い、VM細胞高親和性抗体ファージの増幅を行った。

(5)脳腫瘍モデルマウスの作製を目指したルシフェラーゼ遺伝子発現脳腫瘍細胞の構築

203G細胞を培養プレートに播種し、G418耐性遺伝子を保持するルシフェラーゼ遺伝子搭載プラスミドDNAとリポフェクションを混和した溶液を作用し、5hr、CO₂インキュベーター内にて培養した。培養後、培地を交換しG418を含む培養液にて遺伝子を導入できた細胞の選別を行った。コロニーを形成後、細胞を限界希釈法によりモノクローン化し、さ

らにコロニー形成するまで培養した。遺伝子導入細胞の構築を確認するために、細胞を溶解し、ルシフェリンを作用させることによる発光を指標に評価した。

4. 研究成果

私は本研究にて、脳腫瘍グリオーマにおける VM 構造を標的とした新たな治療法の開発を目指して研究を行った。具体的には、まずファージ表面提示法を駆使し、グリオーマ細胞における VM モデル細胞を用いて VM に対する特異抗体の創製を試みた。

最初に、マウスグリオーマ細胞である 203G 細胞をマトリゲル上にて培養を行ったところ、マトリゲル非存在下で培養した細胞と比較して、血管様の管腔構造を形成することを明らかとした。次に得られた VM モデル細胞よりたんぱく質を抽出しマウスに免疫を行った後に、血清を用いて抗体産生を測定したところ、203G 細胞抽出たんぱく質に対する抗体産生も確認されたものの、それに加えて 203G 細胞が構築する VM 細胞抽出たんぱく質に対するさらなる抗体産生を確認することができた。このマウス脾臓より RNA を回収し、抗体遺伝子のクローニングを行ったところ、380bp、および 400bp の VL 遺伝子、VH 遺伝子をそれぞれ得ることに成功した。さらに、VL 遺伝子および VH 遺伝子を連結した約 720bp の一本鎖抗体ライブラリを創出することができた。このライブラリの中から VM に対する特異抗体を単離するために、ファージ抗体ライブラリを精製し、抗原として用いた VM モデル細胞に対する結合親和性を利用したパンニング操作を繰り返し行った。その結果、パンニングを繰り返し行うことによって、VM 細胞に結合する抗体ファージの割合が増加することが明らかとなった。現在は、1 つ 1 つの抗体ファージにおける VM への結合力ならびに結合特異性を指標に VM 特異抗体の単離に向けた検討を行っている。

また今後脳腫瘍グリオーマモデルを用いて治療効果の検討を行うにあたって、効果を簡便に判定しうるルシフェラーゼ遺伝子搭載型グリオーマ細胞の創出にも着手した。その結果、ルシフェラーゼ遺伝子を導入していない細胞と比較してルシフェラーゼ活性の上昇した遺伝子導入細胞を樹立することに成功した。

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 5 件)

野村鉄也、宇都口直樹、がん組織における疑似血管新生を標的とした免疫療法に

関する基盤的研究、日本薬学会第 134 年会、2014 年 3 月 29 日、熊本大学黒髪キャンパス(熊本)

藤吉勇二、野村鉄也、島忠光、徳力紀子、平田圭一、長野一也、堤康央、角田慎一、宇都口直樹、腫瘍疑似血管を標的とした免疫抗体ライブラリの作製、第 57 回日本薬学会関東支部大会、2013 年 10 月 26 日、帝京大学板橋キャンパス(東京)

野村香織、野村鉄也、山下琢矢、長野一也、堤康央、角田慎一、宇都口直樹、ファージ表面提示法を用いた腫瘍血管特異抗体の創製、第 57 回日本薬学会関東支部大会、2013 年 10 月 26 日、帝京大学板橋キャンパス(東京)

Tetsuya Nomura、Keiichi Hirata、Kazuya Nagano、Yasuo Tsutsumi、Shin-ichi Tsunoda、Naoki Utoguchi、Creation of immune antibody library for tumor vasculogenic mimicry with phage display technique、第 72 回日本がん学会学術集会、2013 年 10 月 3 日、パシフィコ横浜(神奈川)

野村鉄也、島忠光、徳力紀子、平田圭一、長野一也、堤康央、角田慎一、宇都口直樹、がん組織における腫瘍疑似血管に対する免疫抗体ライブラリの作製、日本薬剤学会第 28 年会、2013 年 5 月 23 日、愛知産業労働センター ウィンクあいち(愛知)

〔図書〕(計 0 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

特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野村 鉄也 (NOMURA TETSUYA)

帝京大学・薬学部・助教

研究者番号：40582854

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし