

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：32624

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06881

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悪性脳腫瘍治療法の開発

研究課題名(英文) Development of novel malignant brain tumor therapy against tumor vascular mimicry derived from tumor cells

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) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：薬物による治療の有効性が乏しい悪性脳腫瘍における新規治療法の開発を目的に、がん細胞が構築する栄養供給路であるがん組織内の血管を注目した。すなわち、がん血管はがんの栄養供給路であることから、がん血管を破綻させることによって、がんを死滅させる方法である。その基礎検討として、がん細胞が血管様構造をマトリゲル上で構築することを見出した。またファージディスプレイ法を用いて、疑似血管に対する特異抗体の創製に取り組み、いくつかの候補クローンを得ることができた。

研究成果の概要(英文)：In order to develop a novel therapy for malignant brain tumor with poor efficacy of anti-cancer drugs, attention was paid to blood vessels in cancer tissues, which is a nutrient supply path constructed by cancer cells. That is, since cancer blood vessels are cancer nutrition supply paths, it is a novel method of killing cancer by collapsing cancer vessels. As a fundamental study, I found that cancer cells construct blood vessel like structures on Matrigel. Using the phage-display method, I tried to get the creation of specific antibodies against tumor blood vessels, and I obtained some candidate clones.

研究分野：がん免疫療法

キーワード：免疫療法 腫瘍血管 腫瘍擬似血管

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、直腸がんの治療薬として上市されている。しかしながら、脳腫瘍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る。そこで、新規作用機序に基づく悪性脳腫瘍の治療薬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“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(図1)。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。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。

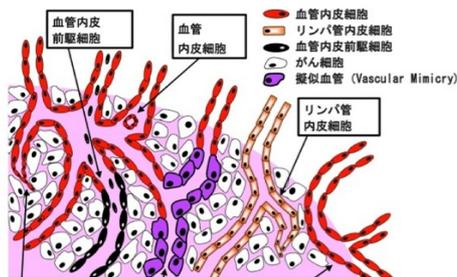


図1 がん組織における擬似血管
がん組織内血管の由来は①血管内皮細胞、②血管内皮前駆細胞、③がん細胞である

2. 研究の目的

化学療法による治療の選択肢に乏しい悪性脳腫瘍における新規治療法を開発を目的に、がん幹細胞より分化した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特異抗体の創製および本抗体を用いたがんターゲットング剤の開発を3年間で行う。

3. 研究の方法

(1) がん幹細胞から分化誘導した擬似血管 in vitro 培養法の確立

がん幹細胞から擬似血管への分化誘導およびその培養法の確立が行われていないことから、まず、擬似血管の in vitro 培養法の確立を行う。具体的には、マウスがん幹細胞を1) 腫瘍増殖作用を有する種々サイトカイン共存による培養、2) コラーゲン等細胞外マトリックス上での培養、3) 低酸素条件

下での培養、4) 血管内皮細胞との共培養、5) 低接着 dish 培養によるスフェロイド形成など、擬似血管誘導に關与しそうな種々条件で培養し、がん幹細胞からの擬似血管への分化誘導条件を検討する。

(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、得られた擬似血管細胞が、がん治療法の標的となるか否かを検討する。具体的には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。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用い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の開発を目的に、抗擬似血管抗体の創製を試みる。具体的には、まずマウスより得られた in vitro 系で再構築した擬似血管を抗原として、アジュバントとともに抗体価が上昇するまでマウスに免疫する。次に免疫マウスから脾臓を摘出し、脾細胞から cDNA を回収後、PCR 法を用いて抗体の VL、VH 領域を連結した1本鎖抗体をファージドベクターに組み込み、一本鎖抗体表面提示ファージライブラリを創製する(図2)。

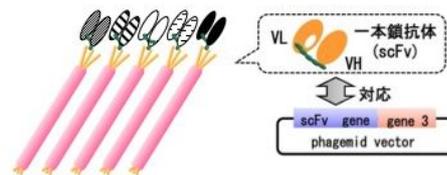


図2 一本鎖抗体ファージ表面提示法

多種多様な抗体を、簡便かつ短期間に創製する技術

(4) パンニングによる抗擬似血管特異的抗体の選別と集積性評価

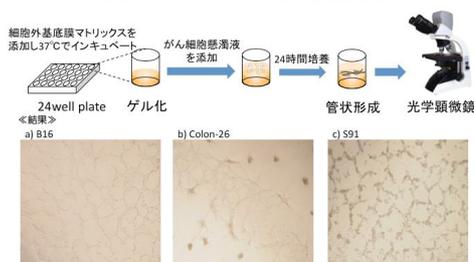
本検討では、先に作製した免疫抗体ライブラリを用いて、擬似血管の細胞表面上に存在する擬似血管特異的な抗原蛋白質を認識する抗体の創出を目指す。具体的には、作製した抗体ライブラリを用いて、擬似血管に発現する分子との結合親和性を利用したセルパンニング操作を行う。さらに、実際のマウスや腫瘍組織切片における擬似血管への特異的結合性を評価する。

4. 研究成果

(1) 腫瘍擬似血管の in vitro 系の構築を試み、腫瘍細胞外マトリックス成分抽出物であるマトリゲル上で培養することにより、in vitro 擬似血管の構築に成功した(図3)。ま

た低吸着 dish 上でのスフェロイド培養法によっても、擬似血管構造の構築に成功した(図4)。これらを *in vitro* 擬似血管モデルとして、以下の検討の試料とした。

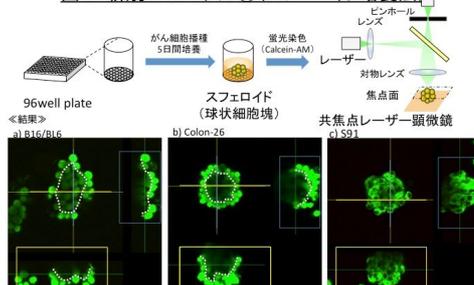
図3 *in vitro* TVMモデル作製方法



問題点

- ① *in vivo* のTVM形成能との相関がない
 - ② 管状構造も部分的、かつ細胞の形態変化が不十分
- ⇒ TVM特異的分子マーカーの同定には至っていない

図4 新規TVMモデル②(スフェロイド培養法)



- ① 内腔構造を示すものは *in vivo* との相関が見られた
- ⇒ 細胞塊中で内腔を形成する細胞は、生体組織中のがん組織内部のTVM構成細胞に近い細胞であると考えられる

(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を検討した。結果、抗腫瘍効果を示す傾向が観察されたが、十分な例数や最適な条件検討ができておらず、今後、より詳細な検討を行う。

(3) ファージディスプレイ法を用いた擬似血管特異的免疫抗体ライブラリの構築を行い、極めて多数のライブラリの構築に成功した。

(4) パンニングによる抗擬似血管特異的抗体の選別を行った。(3)より得られたクローンの中で、*in vitro* や組織切片で、擬似血管に特異性の高いクローンを複数得ることに成功した。現在、その詳細な機能、特異性などを評価している。

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 1 件)

Nomura T, Hirata K, Shimaoka T, Yamakawa M, Koizumi N, Suzuki R, Maruyama K, Utoguchi N, Cancer Vaccine

Therapy Using Tumor Endothelial Cells as Antigens Suppresses Solid Tumor Growth and Metastasis. Biol Pharm Bull., 40, 2017, 1661-1668.
DOI: 10.1248/bpb.b17-00145.

[学会発表](計 4 件)

野村鉄也、山川真希枝、小泉直也、宇都口直樹：がん血管を標的とした樹状細胞免疫療法の開発、第33回日本DDS学会(京都)平成29年7月

野村鉄也、宇都口直樹：がん血管を抗原として利用したがん免疫療法はがん増殖や転移を効果的に抑制する、第11回医療薬科学若手シンポジウム(京都)平成29年10月

野村鉄也、山川真希枝、平井孝昌、小泉直也、宇都口直樹：In vitro がん血管モデルを用いた免疫療法の新生血管に対する影響の評価、日本薬学会138年会(金沢)平成30年3月

山川真希枝、野村鉄也、平井孝昌、小泉直也、宇都口直樹：腫瘍血管内皮細胞を標的とした樹状細胞ワクチン療法による抗腫瘍効果と抗原特異的免疫誘導能の解析、日本薬学会138年会(金沢)平成30年3月

[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

6. 研究組織

(1) 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：8 0 2 7 6 6 3 3

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()