

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10337

研究課題名(和文) スーパー抗体酵素による脳腫瘍幹細胞を標的とした革新的治療法の開発

研究課題名(英文) Development of novel therapy against glioma stem cells using super catalytic antibodies.

研究代表者

阿部 竜也 (Abe, Tatsuya)

佐賀大学・医学部・教授

研究者番号：40281216

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：悪性脳腫瘍は予後が極めて不良の疾患であり、治療抵抗性の原因の一つとして、脳腫瘍幹細胞が指摘されている。我々のグループは、抗原を認識し攻撃しながら、かつ分解(機能を破壊)できる画期的な分子である「スーパー抗体酵素」の研究に従事している。スーパー抗体酵素クローンの中から、いくつかの抗ガン作用を有するスーパー抗体酵素を見出した。なかでも、細胞のtight junctionに対する抗体酵素が、脳腫瘍幹細胞間のsphere形成を阻害することによって増殖抑制効果が見られる可能性を見出した。今後トランスレーショナルリサーチとして、新しい治療法の確立を目指したい。

研究成果の概要(英文)：Malignant brain tumor shows poor prognosis. MASUOKA any papers about glioblastoma (GBM) stem cells (GSCs) are reported to be an important factor. Our collaborative research produced super catalytic antibodies possessing serine protease-like characteristics. We performed screening with various super catalytic antibodies in human glioma cell lines and several GSCs. We found several clones showing anti-tumor effects against human glioma cell lines and GSCs in vitro. One clone against tight junction may suppress GSC's growth to inhibit sphere formation. However, further studies are required to confirm whether these clones could be new anticancer drug in vivo. We would like to develop novel anticancer agents in brain and other solid tumor through translational research in the future.

研究分野：脳腫瘍

キーワード：脳腫瘍 幹細胞 スーパー抗体酵素

1. 研究開始当初の背景

悪性脳腫瘍は予後が極めて不良の疾患であり、従来の方法ではこれ以上の生存が望めない。近年、脳腫瘍細胞の薬剤抵抗性、放射線抵抗性、再発時の腫瘍原性、全ての統一的な原因になっているものとして、脳腫瘍幹細胞の存在が指摘されている。この腫瘍幹細胞は自身がほとんど増殖することなく、大量の腫瘍細胞を供給することができる。脳腫瘍手術検体から採取・培養した腫瘍幹細胞免疫不全マウスの脳内に移植すると、患者と全く同様の形態学的、遺伝学的特徴を有することが知られている。また、既存の抗癌剤を腫瘍細胞集団に処理したとしても、脳腫瘍細胞は死滅するものの、腫瘍幹細胞は生存し続け、その癌幹細胞を基点として、再び癌細胞集団を形成し再発をきたす。我々のグループは、抗原を認識し攻撃しながら、かつ分解（機能を破壊）できる画期的な分子である「スーパー抗体酵素」の研究に従事している。宇田らは1998年に「スーパー抗体酵素」を発見すると共に、その基礎的および応用的研究に取り組んできており、これまでに数多くの論文発表や特許取得を行っている。本研究ではこれらの経験を踏まえ、特に、ヒト型「スーパー抗体酵素」が持つ抗ガン作用に着目し、画期的な抗ガン剤として実用化できるかについて検討する。多くの「スーパー抗体酵素」クローンの中から、いくつかの抗ガン作用を有する「スーパー抗体酵素」を見出しており、これらの知見を基に、本研究では、より効果の高いがん細胞を攻撃できる「スーパー抗体酵素」の作製に取り組む。同時に、標的分子や組織内の局在、また、作用メカニズムなどを解明し、画期的な抗ガン剤としての実用化を図るのが目的である。ヒト型「スーパー抗体酵素」の特長として、①抗体医薬のようにADCC活性に頼らずに自身でガン細胞に障害を与えること、②低分子抗ガン剤にはない特異性を有していること、さらには、予備試験で③毒性がほとんどないこと、などはこれまでの抗ガン剤を凌ぐ非常に高い性能を有していると言える。また、狙った分子を特異的に攻撃可能である事も、さらなる特長である。既に、脳腫瘍幹細胞の増殖抑制効果を有するクローンを分離している。今後は、その治療効果を生体内で確かめ、トランスレーショナルリサーチとして、脳腫瘍のみならず固形がん幹細胞をターゲットにした治療法の確立を図る。脳腫瘍患者における抗がん剤などの全身投与では、血液脳関門の存在や薬剤耐性によりその効果は限られたものになっている。そこで近年、新たな局所化学療法としてConvection-enhanced Delivery(CED)“対流強化型薬剤送達法”という概念が導入された。CEDは注入中の圧勾配を維持し、注入物質の拡散を強化する技術で、通常約100倍の局所濃度が得られる。本治療に関

しては、我々が開発した特殊カテーテルを用いて抗がん剤による治療を臨床で行っている。そこで、*in vitro* 試験で有効な「スーパー抗体酵素」については、脳腫瘍担がん動物を用いての治療実験は極めて重要となる。

2. 研究の目的

全体構想に述べたように、ヒト型スーパー抗体酵素は、これまでの低分子抗がん剤や分子標的薬の抗体医薬とは全く異なる機構で作用する次世代の革新的な抗がん剤となる可能性がある。

酵素は基質を他の化学物質に化学変換できるが、人類が利用できる酵素の数は限られる。一方、抗体は酵素のような化学変換能力を持たないものの、どのような抗原に対しても作成可能である。宇田らは酵素と抗体の特徴を合わせ持つ“夢のような分子

(スーパー抗体酵素)”の作出に世界で初めて成功した。これは、標的タンパクを目的の位置で分解する分子の存在と利用の可能性を示した点で画期的である。なぜならば、たとえばウイルス感染に必須となる特定の分子のみを破壊することができれば、副作用の少ない製剤となり得るからである。こうした考え方や手法はこれまでにない新

規なものであり、本研究の大きな特徴である。実際宇田らは、これまでマウスに標的タンパクを免疫する手法により、ピロリ菌や、インフルエンザウイルスに対して有効な「スーパー抗体酵素」を作成してきた。さらには完全にヒト型アミノ酸配列を持つ「スーパー抗体酵素」の創生にも成功し、最近では、がん細胞の増殖を抑制するヒト型「スーパー抗体酵素」の取得に成功した。その機能は酵素作用によるもので抗体医薬に比べて投与量を抑えることができ、副作用の軽減にも繋がることから次世代の革新的医薬品になり得る。抗体酵素研究は欧米でも行われているが、動物実験まで進めているのは我々のグループだけであり、その独創性は世界に先んじていると言っても過言ではない。本研究では、この技術を生かして今までにない抗がん剤の開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) 取得済みのスーパー抗体酵素を用いての各種がん細胞に対する *in vitro* 試験と抗がんスペクトル解析

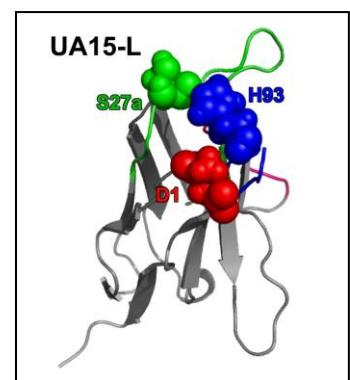


図1 ピロリ菌の除菌に効果を示した抗体酵素 UA15-L の分子モデリング

Asp1-Ser27a-His93 で触媒三つ組み残基を構成している

取得済のいくつかのスーパー抗体酵素クローンは、脳腫瘍培養細胞に対して細胞傷害性を有していることが分かった。さらにクローンを高濃度に濃縮させたものを作用させると、脳腫瘍細胞の増殖を抑制する能力を有していた。そこでこのようなクローンを、さまざまな部位に発生したがん細胞株に対する効果を調べ、どのようながんに有効であるかスペクトルデータを採取する。

(2) 新規スーパー抗体酵素ライブラリーの作成と発現

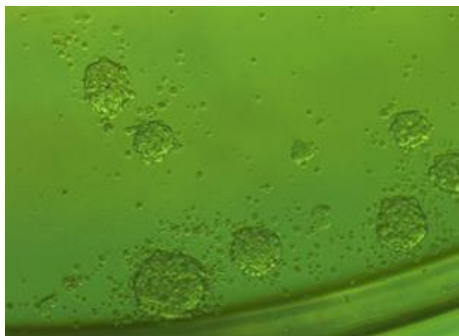
健常人から抽出した既存のスーパー抗体酵素に加えて、がん患者、特にがん免疫療法を受けている患者由来のBリンパ球を用いて新規のスーパー抗体酵素遺伝子を単離し、脳腫瘍患者関連のスーパー抗体酵素遺伝子ライブラリーを作成する。約100種類のスーパー抗体酵素バンクを作成するのが目標で、これらスーパー抗体酵素遺伝子を大腸菌で発現・精製し、各種のがん細胞を用いて、上記と同様の *in vitro* 試験を行う。当院で施行した自家腫瘍ワクチン接種患者の中で、長期に生存している患者のBリンパ球から候補となるスーパー抗体酵素遺伝子を既に採取する。

(3) 脳腫瘍幹細胞に対するスーパー抗体酵素の *in vitro* での効果

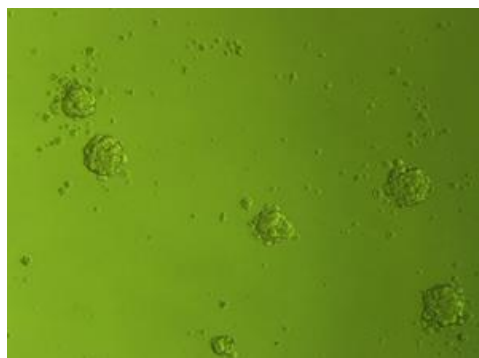
脳腫瘍幹細胞をヒト脳腫瘍手術検体から、単離・培養を我々の研究室では行っている。特殊な培養条件の下培養を行い、さまざまなスーパー抗体酵素を作用させる。現在、既に脳腫瘍幹細胞の増殖抑制効果を有するスーパー抗体酵素をいくつか見つけているが、上記手法で得られたスーパー抗体酵素の中から幹細胞を特異的に阻害するクローンをさらに見出し、その作用機序を解明する。

4. 研究成果

我々は脳腫瘍細胞株 U87, U251, U373, T98G MGG4, MGG8, MGG119, MGG152, SAGA027 の細胞株を用いて抗体酵素のスクリーニングを行った。その結果、非常に有望なクローン SU19 が得られた。

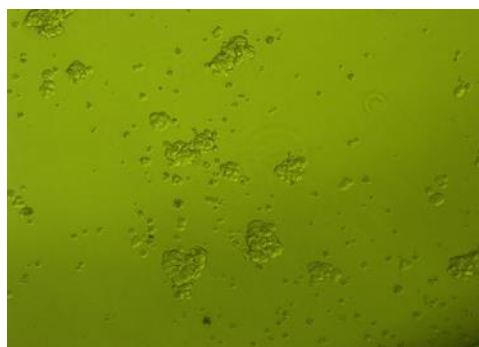


コントロール MGG152 細胞

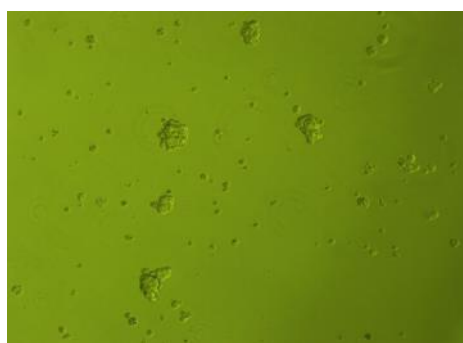


MGG152 細胞+SU5

SU5 は MGG152 細胞の sphere 形成を抑制し、増殖を 45%に阻害した。

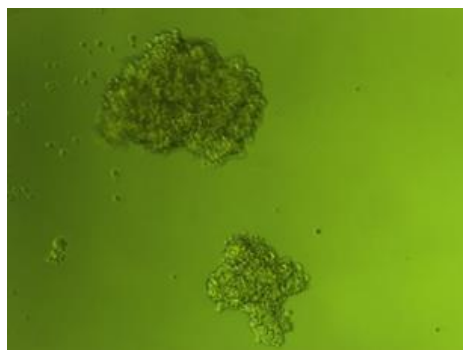


コントロール MGG152 細胞

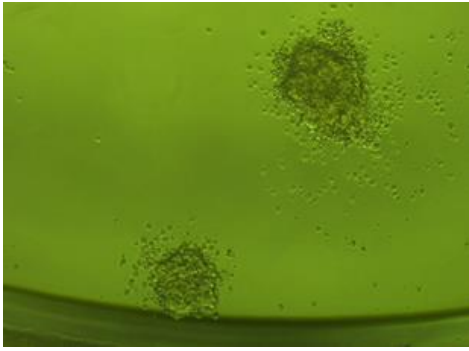


MGG152 細胞+SU19

SU19 は MGG152 細胞の sphere 形成を阻害し、増殖を 47%に阻害した。



コントロール MGG8 細胞



MGG8 細胞+SU19

SU19 は MGG8 細胞の sphere 形成を阻害し、増殖を 14% に阻害した。

これ以外の脳腫瘍幹細胞においても SU5 や SU19 は sphere 形成を阻害し、有意に増殖を抑制することが分かった。

SU5 は細胞の tight junction に対する抗体酵素であることが分かっており、脳腫瘍幹細胞間の sphere 形成における接着を阻害することによって増殖抑制効果が見られる可能性が示唆された。

また脳腫瘍患者からスーパー抗体酵素を単離生成し、有望なクローンのスクリーニングを行っている。

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 17 件)

1. Aoki K, Nakamura H, Suzuki H, Matsuo K, Kataoka K, Shimamura T, Motomura K, Ohka F, Shiina S, Yamamoto T, Nagata Y, Yoshizato T, Mizoguchi M, Abe T, Momii Y, 他 Prognostic relevance of genetic alterations in diffuse lower-grade gliomas *Neuro-Oncology*, 20(1):66-77.2018
2. Yoshioka F, Shimokawa S, Kouguchi M, Ito H, Ogata A, Inoue K, Takase Y, Tanaka T, Nakahara Y, Masuoka J, Abe T Curved planar reformation for the evaluation of hydromyelia in patients with scoliosis associated with spinal dysraphism. *Spine (Phila Pa 1976)*. 43(3):E177-E184, 2018
3. Ogata A, Ebashi R, Suzuyama K, Okamoto H, Takase Y, Masuoka J, Nakahara Y, Inoue K, Abe T Transbrachial angioplasty and stenting without crossing the aortic arch for right carotid artery stenosis patients with complex aortic plaques. *Journal of Neuroendovascular Therapy (JNET)* in press, 2018
4. Yoshioka F, Shimokawa S, Masuoka J, Nakahara Y, Izaki T, Shono T, Kawashima M, Sakata S, Abe T Extensive infant spinal

epidural immature teratoma: Case report and literature review *Journal of Neurosurgery Pediatrics*, in press, 2018

5. Tanaka T, Ogata A, Masuoka J, Mizokami T, Wakamiya T, Nakahara Y, Inoue K, Shimokawa S, Yoshioka F, Momozaki N, Sakata S, Abe T Possible involvement of pericytes in intra-plaque hemorrhage of carotid stenosis. *Journal of Neurosurgery* (in press) 2018

6. Kayama T, Sato S, Sakurada K, Mizusawa J, Nishikawa R, Narita Y, Sumi M, Miyakita Y, Kumabe T, Sonoda Y, Arakawa Y, Miyamoto S, Beppu T, Sugiyama K, Nakamura H, Nagane M, Nakasu Y, Hashimoto N, Terasaki M, Matsumura A, Ishikawa E, Wakabayashi T, Iwadata Y, Ohue S, Kobayashi H, Kinoshita M, Asano K, Mukasa A, Tanaka K, Asai A, Nakamura H, Abe T, 他 Effects of surgery with salvage stereotactic radiosurgery vs. surgery with whole brain radiation therapy in patients with 1–4 brain metastases (JCOG0504): A phase 3, non-inferiority, randomised controlled trial. *Journal of Clinical Oncology*, in press, 2018

7. Ogata A, Kawashima M, Wakamiya T, Nishihara M, Masuoka J, Nakahara Y, Ebashi R, Inoue K, Takase K, Irie H, Abe T Carotid artery stenosis with a high-intensity signal plaque on time-of-flight magnetic resonance angiography and association with evidence of intraplaque hypoxia. *Journal of Neurosurgery* 126:1873-1878, 2017

8. Masuoka J, Matsushima T, Nakahara Y, Inoue K, Yoshioka F, Kawashima M, Abe T Outcome of microvascular decompression for hemifacial spasm associated with the vertebral artery. *Neurosurg Rev* 40: 267-273, 2017

9. Ito H, Nakahara Y, Kawashima M, Masuoka J, Abe T, 他 Typical symptoms of normal-pressure hydrocephalus caused by choroid plexus papilloma in the cerebellopontine angle: a case report *World Neurosurgery* 98:875.e13-875.e17, 2017

10. Ebashi R, Ogata A, Inoue K, Takase Y, Masuoka J, Nakahara Y, Shimokawa S, Kawashima M, Abe T Posterior cerebral artery aneurysms with common carotid artery occlusion. *Journal of Neuroendovascular Therapy* 11:371-375, 2017

11. Liu X, Masuoka J, Ebashi R, Kouguchi M, Inoue K, Ogata A, Takase Y, Nakahara Y, Shimokawa S, Kawashima M, Yoshihara M, Abe T Brain metastasis of primary peritoneal carcinoma: Case report and literature review.

Journal of Clinical Neuroscience, 40:120-122, 2017

12. Liu X, Ogata A, Masuoka J, Inoue K, Nakahara Y, Shimokawa S, Takase Y, Yakushiji Y, Hara H, Abe T Dural arteriovenous fistula manifesting as pontine hemorrhage at the craniocervical junction. *Acta Neurochirurgica*, 159:831-834, 2017

13. Ogata A, Sakata S, Okamoto H, Abe T Ruptured dissecting aneurysm of the recurrent artery of Heubner, consideration of the pathological findings *Neurology India*, 65:623-625, 2017

14. Takamatsu Y, Higashimoto K, Maeda T, Kawashima M, Matsuo M, Abe T, 他 Differences in the genotype frequency of the RNF213 variant in familial moyamoya disease patients in Kyushu, Japan, *Neurologia medico-chirurgica*, Nov 15;57(11):607-611.2017

15. Furuse M, Nonoguchi N, Kuroiwa T, Miyamoto S, Arakawa Y, Shinoda J, Miwa K, Iuchi T, Tsuboi K, Houkin K, Terasaka S, Tabei Y, Nakamura H, Nagane M, Sugiyama K, Terasaki M, Abe T, 他 A prospective multicenter single-arm clinical trial of bevacizumab for patients with surgically untreatable symptomatic brain radiation necrosis. *Neuro-Oncology Practice*. 3 :272-280, 2016;

16. Fudaba H, Abe T, 他 Dedifferentiated chordoid meningioma with rhabdomyosarcomatous differentiation on the middle cranial fossa. *Neuropathology* 36:579-583, 2016.

17. Suzuki H, Aoki K, Chiba K, Motomura K, Yamamoto T, Ohka F, Tanahashi K, Ranjit M, Wakabayashi T, Sato Y, Shiozawa Y, Sanada M, Kondo Y, Shiraiishi Y, Niida A, Tanaka H, Nakamura H, Mizoguchi M, Abe T, 他 Mutational landscape and clonal architecture in grade-II/III gliomas. *Nature Genetics* 47:458-468, 2015

[学会発表] (計 18 件)

1. Abe T, Wakamiya T, Kouguchi M, Ito H, Nakahara Y : CBIO-27 Increase of mRNA expression of both fatty acid synthase (FASN) and carnitine palmitoyltransferase 1C (CPT1C) in starved human glioma cell line . 22ND ANNUAL SCIENTIFIC MEETING OF NEURO-ONCOLOGY. November 16-19, 2017, San Francisco,

2. Muragaki Y, Maruyama T, Ishikawa E,

Nitta M, Ikuta S, Tsuboi K, Matsumura A, Nakamura H, Abe T, 他 Multicenter randomized placebo-controlled trial of autologous formalin-fixed tumor vaccine for newly-diagnosed LTBK-03 glioblastomas. 22ND ANNUAL SCIENTIFIC MEETING OF NEURO-ONCOLOGY. November 16-19, 2017, San Francisco

3. 伊藤寛, 渡公佑, 村上 雄一, 柴田智博, 桑野信彦, 阿部 竜也, 小野真弓 : NDRG1/GSK3 β /AKT/S6 シグナルによる Glioblastoma 生存・増殖の新しい制御機構. 第 21 回日本がん分子標的治療学会学術集会. 2017 年 6 月 14-16 日. 福岡

4. 高口素史, 中原由紀子, 伊藤寛, 若宮富浩, 増岡淳, 阿部 竜也 : 当院における神経膠腫の分子生物学的解析の現状. 第 35 回日本脳腫瘍病理学会. 2017 年 5 月 19-20 日. 栃木

5. 高口素史, 中原由紀子, 伊藤寛, 井上浩平, 緒方敦之, 高瀬幸徳, 下川尚子, 増岡淳, 阿部 竜也 : glioma における蛍光染色を用いた TET タンパクの細胞内局在の検討. 第 18 回日本分子脳神経外科学会. 2017 年 8 月 25-26 日. 甲府

6. 中原由紀子, 若宮富浩, 高口素史, 山崎真希子, 相島慎一, 中野嘉子, 北原麻衣, 市村幸一, 阿部 竜也 : 典型的な diffuse midline glioma だが、H3 K27M 遺伝子変異を検出しなかった一例. 第 35 回日本脳腫瘍病理学会. 2017 年 5 月 19-20 日. 栃木

7. 中原由紀子, 高口素史, 伊藤寛, 増岡淳, 脇本浩明, 阿部 竜也 膠芽腫腫瘍幹細胞に対する STAT3 阻害剤の感受性についての検討. 第 35 回日本脳腫瘍学会. 2017 年 11 月 26 日 -28 日. 高松

8. Wakamiya T, Nakahara Y, Koguchi M, Ito H, Abe T: Increase of mRNA levels of fatty acid synthase and carnitine palmitoyltransferase 1C in starved human glioma cell lines..第 76 回日本癌学会. 2017 年 9 月 28-30 日. 東京

9. Abe T: Coexpression of Fatty Acid Synthase (FASN) and Carnitine Palmitoyltransferase 1C (CPT1C) in Human Gliomas and Glioma Stem Cell Xenografts. 21st International Conference on Brain Tumor Research and Therapy. April. 10-13. 2016. Okinawa

10. Abe T, Nakahara Y, Koguchi M, Ito H, Wakamiya T, Morisaki I, Momii Y, Fudaba H, Fujiki M : Expression of drug resistance genes associated with hypoxia. 21ST ANNUAL

SCIENTIFIC MEETING OF THE NEURO-ONCOLOGY. November 17 - 20, 2016 - Scottsdale, AZ, USA

11. 中原由紀子,高口素史,伊藤 寛,若宮富浩,森崎 郁子, 靱井泰朋, 札場博貴,藤木稔,阿部竜也 : 低酸素状態における薬剤耐性遺伝子発現の検討. 第17回日本分子脳神経外科学会. 2016年8月26日-27日. 東京

12. 中原由紀子,若宮富浩,伊藤寛,高口素史,下川尚子, 増岡淳, 河島雅到, 阿部竜也 : 悪性神経膠腫に対するベバシズマブ療法の効果と増悪所見についての検討. 第21回日本脳腫瘍の外科学会. 2016年9月9-10日東京

13. 中原由紀子,高口素史,伊藤寛,若宮富浩,森崎郁子, 靱井泰朋, 札場博貴,藤木稔, 阿部竜也 : 低酸素状態における薬剤耐性遺伝子発現の検討. 第75回日本癌学会学術総会. 2016年10月6日-8日. 横浜

14. 夏目敦至,鈴木啓道,青木恒介,塩澤裕介,吉里哲一,片岡圭亮,若林俊彦,中村英夫,村垣善浩,溝口昌浩,靱井泰朋, 阿部竜也,小川誠司 低悪性神経膠腫の時間・空間的な遺伝子クローン不均一性. 第75回日本癌学会学術総会. 2016年10月6日-8日. 横浜

15. Abe T, Wakamiya T, Nakahara Y, Suzuki S, Honda H, Mizoguchi M, Yoshimoto K, Iwaki T : Coexpression of fatty acid synthase (FASN) and carnitine palmitoyltransferase 1C (CPT1C) in human gliomas. 20th Annual Scientific Meeting of Neuro-Oncology. San Antonio, Nov. 19-22,2015

16. 若宮富浩,鈴木 諭,本田裕之,溝口昌弘,吉本幸司,飯原弘二,中原由紀子,河島雅到,阿部竜也,岩城 徹 : Medulloblastoma における CPT1C と FASN の発現について. 第33回日本脳腫瘍病理学会 2015年5月29-30日. 高松

17. 若宮富浩,鈴木諭,本田裕之,岩城徹,溝口昌弘,吉本幸司,阿部竜也 : Coexpression of fatty acid synthase (FASN) and carnitine palmitoyltransferase 1C (CPT1C) in human gliomas. 第74回日本癌学会学術総会. 2015年10月10日. 名古屋

18. 若宮富浩 : CPT1c と FASN の細胞内局在に関する免疫組織化学的検討. 第33回日本脳腫瘍学会. 2015年12月7日. 京都

〔図書〕(計 1件)

阿部竜也 Hypothalamic neuronal hamartoma 脳腫瘍臨床病理カラーアトラス 第4版 医学書院 2017年

〔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

阿部 竜也 (ABE Tatsuya)
佐賀大学・医学部・教授
研究者番号 : 40281216

(2)研究分担者

宇田 泰三 (UDA Taizo)
公益財団法人九州先端科学技術研究所・
ナノテク研究室・特別研究員
研究者番号 : 20232837

靱井 泰朋 (MOMII Yasutomo)
大分大学・医学部・助教
研究者番号 : 20534192

河島 雅到 (KAWASHIMA Masatoh)
佐賀大学・医学部・准教授
研究者番号 : 20383563

増岡 淳 (MASUOKA Jun)
佐賀大学・医学部・准教授
研究者番号 : 50359949

中原 由紀子 (NAKAHARA Yukiko)
佐賀大学・医学部・講師
研究者番号 : 50380770

(3)連携研究者

(4)研究協力者