

平成 21 年 3 月 18 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19590160

研究課題名（和文）脳腫瘍血管を標的とした新規悪性脳腫瘍免疫療法の開発

研究課題名（英文）Development of novel brain tumor immunotherapy against brain tumor vessel

研究代表者 宇都口 直樹 (UTOGUCHI NAOKI)

帝京大学・薬学部・准教授

研究者番号：80276633

研究成果の概要：本課題は、がん組織部位の血管内皮細胞をターゲットとするがん免疫療法である。腫瘍組織部位の血管内皮細胞に対する免疫が誘導され、腫瘍組織の血管が破綻し、腫瘍はその栄養供給のパイプを絶たれるためがんの退縮が期待される。検討により、抗原となる腫瘍組織の血管内皮細胞単離法の確立を行った。結果、腫瘍組織をコラゲナーゼで処理後、密度勾配法により血管内皮細胞を多く含むフラクションの単離に成功した。さらにこれを抗原として、担がんマウスに免疫したところ、顕著な抗腫瘍効果が観察された。今後、脳腫瘍での詳細な検討を行う予定である。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,080,000	4,580,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：がん免疫療法

1. 研究開始当初の背景

がんは本邦において死因の1/3を占める疾患であり、その治療法の開発は急務である。現在のがん治療の戦略は外科療法、放射線療法、化学療法に大別でき、マイクロサージェリーの技術の向上、ドラッグデリバリーシステムの向上などにより、多くのがん種で治療成績を上げている。しかし、脳腫瘍に関しては、ここ20年来、生存期間の向上が認められず、最も治療の困難ながん種である。

脳腫瘍における外科治療は、病巣が中枢神経系と密接していることから切除困難なケ

ースが多い。また放射線療法も同様に隣接する中枢神経への作用を考慮して、十分に行うことができない。化学療法は、脳における血管が血液脳関門 (blood brain barrier) を形成しているため、血中に存在する抗がん剤の脳移行性が極めて低く、さらに脳腫瘍本体も他の臓器のがんと比較して、薬剤耐性が高く、有効な治療法となっていない。

そこで近年、第4の方法として、免疫を利用したがん治療が注目されている。その中でも樹状細胞は、極めて効率よく抗原提示する細胞として生体内で機能しており、樹状細胞

が抗原提示し、細胞性免疫や液性免疫により、がんを排除するという戦略の樹状細胞免疫療法が最も効果的であると考えられている。本戦略は、実験レベルでは顕著な抗腫瘍効果も報告され、いくつかの臨床例においても抗腫瘍効果が報告されているが、未だ方法論、治療法としては不十分な点が多い。その原因の1つとしてがん関連抗原の特異性の低さ、がん細胞の主要組織適合抗原の発現低下などが挙げられる。したがって、がん免疫療法においては本問題点の解決が必須である。

2. 研究の目的

申請者は、上記問題点を解決する新規の悪性脳腫瘍免疫療法を考案した。それは従来から行われているがん細胞をターゲットとする方法ではなく、がん組織部位の血管内皮細胞をターゲットとするがん免疫療法である。*In vitro* 条件下でがん組織部位の血管内皮細胞を樹状細胞にパルスし、それを *in vivo* に戻すものである。これにより樹状細胞にがん血管内皮細胞特異的抗原を提示させ、免疫系を惹起させるという戦略である（参考文献：宇都口直樹、丸山一雄、腫瘍組織血管内皮細胞を抗原としてパルスした樹状細胞によるがん免疫療法、臨床免疫、45、491-496、2006）。この方法により、腫瘍組織部位の血管内皮細胞に対する免疫が誘導され、腫瘍組織の血管が破綻し、腫瘍はその栄養供給のパイプを絶たれるため、いわゆる「兵糧責め」によるがんの退縮が期待される。

さらに、がん細胞そのものではなく、腫瘍部位の血管内皮細胞を標的とすることで、脳腫瘍においては以下に示す5つの決定的利点を得ることができる。

- 1) がん関連抗原の多様性を回避できる・・・がん細胞は、がん化しているため、不均一な細胞集団であるが、がん組織の血管内皮細胞は正常細胞であり、均一な細胞集団である。したがって、その特異抗原も腫瘍部位においては、全ての血管内皮細胞に発現していると考えられ、極めて効率の良いターゲット細胞となる。
- 2) 効率の良さ・・・がん組織を構成する細胞は主に、が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つの血管内皮細胞が100～1000のがん細胞を支えていることを意味し、1つの内皮細胞の死は100～1000個のがん細胞の死を意味している。したがって、極めて効率が高い。
- 3) 抗原性の高さ・・・がん細胞の多くは主要組織適合抗原の発現が低下、または消失している場合が多く、抗原となりにくい。がん組織部位の血管内皮細胞は正常細胞であり、主要組織適合抗原の発現が正常であり、抗原性が高いと考えられる。

4) 副作用の低さ・・・血管新生が盛んに行われている部位は、正常組織においては創傷治癒部位などに限定されるため、副作用が極めて低いと推察される。

5) 血液脳関門障壁の回避・・・脳は免疫監視機構から隔離された組織（immunological privileged site）であるため、脳腫瘍細胞を標的とした場合、免疫細胞が脳腫瘍に到達できないという問題点を回避できる。

これらの大きな5つの長所から、本研究はこれまでのがん免疫療法の問題点を全て解決する、極めて効率の良い、独創的な新規脳腫瘍戦略であると自負する。

また、本研究の国内外において関連する研究として、血管新生に関与する血管内皮細胞上のレセプターである VEGF レセプターを標的としてもものがある。その研究は VEGF レセプターの部分配列ペプチドを樹状細胞にパルスし免疫するものである。しかし、VEGF レセプターは定常的に血管内皮細胞に発現されており、また腫瘍誘導の血管内皮細胞に特異的なものではないので、特異的な標的としては十分なものではないと考える。しかし、本申請は、新生血管の中でも腫瘍誘導の血管のみを標的としていることが特徴的である。加えて、単独の抗原のみを標的としているのではなく、複数の抗原を同時にターゲットとしているため、適応範囲が広くかつ相乗的効果も期待できる点で、従来に方法と比較して決定的に有利な方法である。

期間内に脳腫瘍における、本免疫療法の有効性、安全性を動物実験レベルで明らかにする。本課題の遂行により、期待される結果を得ることができれば、これまで治療が極めて困難であった脳腫瘍の新規療法を開拓することを意味し、学術的な進歩に留まらず、医学の大きな進歩であり、極めて社会的意義の大きなものとなることを自負する。

3. 研究の方法

当初の計画

(1) 脳腫瘍評価系の確立

現在の脳腫瘍評価系は、脳内に脳腫瘍を移植してからの生存日数で評価している。生存日数は抗脳腫瘍効果の判定法の1つであるが、リアルタイムかつ脳に局在する脳腫瘍の増殖を定量的に評価できないという欠点を有している。そこで、脳内での脳腫瘍細胞数の定量的解析、および局在の解析を目的に、ルシフェラーゼ発現マウス脳腫瘍細胞を作製する。すなわち、発光イメージング装置（IVIS）を用いることによって、がん細胞数および脳内分布を非侵襲的かつリアルタイムに解析することができる。まずはマウス脳腫瘍細胞株（203G, GL261）にこれら遺伝子を導入し、安定発現株の樹立を行い、脳内

の定量的解析が可能かを検討する。

(2) 腫瘍組織部位血管内皮細胞の調製

腫瘍組織の血管内皮細胞は他の臓器の血管内皮細胞と比較して、特徴的な性質を有している。したがって、腫瘍部位の血管内皮細胞機能を十分に発現している細胞を抗原として用いることが望ましいと考えられる。腫瘍組織の血管内皮細胞の調製は、申請者の過去の方法を応用して行う (Utoguchi, N. et al, *Jpn. J. Cancer Res.*, 86, 193-201, 1995)。具体的には、腫瘍部位を摘出し、コラゲナーゼによる腫瘍組織を分散させ、Percoll などの密度勾配により血管内皮細胞高含有画分を回収し、CD34 抗体の結合したマグネティックビーズを用いて、血管内皮細胞をより高純度に回収する。または FACS により CD34 陽性細胞をソーティングする。

(3) 抗腫瘍効果

先の方法で調製した腫瘍部位の血管内皮細胞より膜抗原を抽出し、樹状細胞にパルスし、抗腫瘍効果を検討する。抗腫瘍効果、延命効果のみならず、先に確立した発光イメージング装置を用いて、腫瘍サイズの定量的解析を行う。さらに、本系は全身いかなる転移巣を可視化することができる利点を有していることから、転移についても合わせ検討する。

(4) 作用機序の解析

本療法をより有効かつ安全なものにするためには、その詳細な作用機序を解析することは必須である。そこで、作用機序の解析を行う。

①細胞性免疫、体液性免疫の寄与

樹状細胞に抗原をパルスした場合、MHC class I を介した経路と MHC class II を介した経路があり、前者は CD8⁺T 細胞を活性化し、本細胞が細胞傷害性 T 細胞として、直接、標的細胞を傷害する細胞性免疫が惹起される。後者は CD4⁺T 細胞が活性化され、本細胞から産生されるサイトカインなどにより B 細胞やマクロファージなどが活性化され、主に抗体を介した体液性免疫が惹起される。そこで、本療法の抗腫瘍効果が細胞性免疫によるものか、体液性免疫によるものか検討する。具体的には、抗 CD8 抗体または抗 CD4 抗体を投与し、生体内の CD8⁺T 細胞、または CD4⁺T 細胞を枯渇させ、抗腫瘍効果が減弱するか否かを指標に検討する。

②細胞傷害性 T 細胞の活性測定

細胞傷害性 T 細胞がいずれの細胞を標的として、抗腫瘍効果を示しているのかを検討する。具体的には腫瘍血管内皮細胞をパルスした樹状細胞を免疫したマウスの脾細胞を単離し、エフェクター細胞とする。標的細胞と

して、脳腫瘍細胞または脳腫瘍組織血管内皮を ⁵¹Cr でラベルしたものを用い、エフェクター細胞がいずれの細胞を傷害して、細胞内より ⁵¹Cr がリリースするかによって評価する。

③腫瘍誘導血管新生阻害の評価

作用点のがん細胞ではなく、腫瘍誘導の血管内皮細胞であることを *in vivo* の系で検討するため、腫瘍誘導血管新生の有無を検討する。具体的には Dorsal air sac チャンバー法によって評価する。すなわち、腫瘍細胞をチャンバー内に封入し、マウス背部皮下に本チャンバーを包埋する。1週間後、背部皮下を切開すれば、チャンバー内の腫瘍細胞が産生した液性因子によって、皮下に腫瘍誘導の血管が新生される。よって、本療法によって、腫瘍誘導の血管が新生されるか否か検討する。

④病理組織

腫瘍治癒部位の血管構造を観察し、血管の破綻、および免疫細胞の浸潤が認められるか否かを検討する。

(5) 副作用の評価

本療法の最も重要な点は、正常な血管内皮細胞には傷害を与えず、腫瘍部位の血管内皮細胞にのみ、特異的に傷害を与えられるか否かである。血管新生は、腫瘍部位のみならず創傷治癒、胎児形成、胎盤形成時にも観察されることから、腫瘍誘導の血管新生以外の血管新生に本療法が影響を与えるか否かを検討する。具体的には、創傷治癒日数の遅延が起きないか、出生数が低下しないかである。さらに、全身組織の病理、特に正常血管への影響を観察する。

4. 研究成果

(1) 脳腫瘍評価系の確立

ルシフェラーゼ遺伝子導入脳腫瘍細胞の作製に成功した。しかし、マウス脳内に移植すると、脳内に生着後、頭蓋骨を越え、頭蓋骨と表皮の間（皮下）で腫瘍が増大し、脳内で増殖する脳腫瘍の評価をすることができなかった。文献的に脳内移植の脳腫瘍評価のほとんどがヌードマウスを用いたヒト脳腫瘍の系である。しかし、ヌードマウスは免疫異常動物であり、免疫機構を利用した本課題の遂行はできないものであり、脳腫瘍評価系の開発は今後の課題であると考えられた。

そこで、基礎検討として、皮下腫瘍より分離した腫瘍組織血管内皮細胞 (Tumor Endothelial Cell: TEC) を抗原とし、皮下腫瘍における抗腫瘍を検討することとした。皮下腫瘍での効果が認められた後、改良した脳腫瘍評価系での検討を行うこととした。

基礎検討後の実験方法

(2) TEC の分離：マウス結腸がん細胞 (Colon26) をマウス後背部に移植し、固形腫瘍を作製した。この固形腫瘍を切除し、コラゲナーゼ溶液により腫瘍組織を分散した。次に、腫瘍分散液を Percoll 溶液の密度勾配遠心により各フラクションに分離した。アンギオテンシン変換酵素 (ACE) が血管内皮細胞特異的な酵素であることから、タンパク量あたりの ACE 活性 (ACE 比活性) が高い値を示すフラクションを回収した。そして、回収したフラクションに TEC が高い割合で含まれているか否か、血管内皮細胞の細胞膜特異的表面マーカーである CD34 を指標に FACS による解析を行った。

(3) 腫瘍組織より分離した TEC を抗原とした免疫による抗腫瘍効果：Percoll 密度勾配遠心によって Colon26 由来固形腫瘍より分離した TEC を凍結融解により、抗原として調製した。この抗原を抗原導入試薬を用いて樹状細胞 (Dendritic Cell: DC) にパルスした (以下、本 DC を TEC / DC と示す)。この TEC / DC を 1 週間おきに 2 回、マウスの後背部皮内に接種した。最終免疫から 1 週間後、マウス後背部皮下に Colon26 (1×10^6 cells / mouse) を移植し、Colon26 担がんマウスを作製した。そして、Colon26 担がんマウスの腫瘍径を経日的に測定した。腫瘍組織の体積は $0.5 \times (\text{長径} \times \text{短径}^2)$ より求め、その変化を経日的に測定することで、本免疫療法による抗腫瘍効果を検討した。

(4) Dorsal Air Sac Chamber 法による新生血管の観察：TEC / DC を 1 週間おきに 2 回免疫し、最終免疫から 1 週間後、マウス後背部に Colon26 を封入したチャンバーを包埋した。包埋から 5 日後、実体顕微鏡により、チャンバー内の Colon26 によって誘導された新生血管を観察した。

(5) 副作用の検討：TEC / DC を 1 週間おきに 2 回免疫し、最終免疫から 1 週間後、マウス後背部 5 ヶ所に 5 mm 程度の創傷を作製し、完治に至るまでの日数を計測した。

【基礎検討の結果】

(6) TEC の分離：種々の Percoll 溶液濃度で検討を行ったところ、28 % Percoll 溶液濃度で分離を行った場合、血管内皮細胞の指標である ACE 比活性が高い値を示すフラクションを得ることができた。このフラクション中の細胞を FACS により解析したところ、CD34 陽性細胞が多数含まれていた。このことから、Percoll 密度勾配遠心法により腫瘍細胞と TEC が分離できることが示された。

(7) 腫瘍組織より分離した TEC を抗原とした免疫による抗腫瘍効果：培養した Colon26 細胞、および Colon26 固形腫瘍をコラゲナーゼ溶液により分散した腫瘍分散液中の細胞を凍結融解することで抗原を調製した。これらの抗原をパルスした DC を免疫したところ、どちらの群も Colon26 担がんマウスにおいて、弱い抗腫瘍効果が観察された。一方、TEC / DC を免疫した群では顕著な抗腫瘍効果が観察された。この結果、腫瘍細胞そのものを標的とするよりも、腫瘍組織血管を標的とすることで、高い抗腫瘍効果を得ることができ、腫瘍組織より分離した TEC を抗原とした免疫の有効性が示された。

(8) Dorsal Air Sac Chamber 法による新生血管の観察：無処置のコントロール群では、チャンバー内の Colon26 細胞によって誘導された多くの新生血管を観察することができた。一方、TEC / DC を免疫した群では、新生血管がほとんど認められなかった。このことから、腫瘍組織より分離した TEC を抗原とした DC を免疫することにより、腫瘍誘導の血管新生を抑制することが示された。

(9) 副作用の検討：マウス正常組織血管内皮細胞モデルである、マウス肝臓洞脈管細胞 (HSE) を抗原として免疫した群は、無処置のコントロール群に対し、完治に至るまでの日数の遅延が観察された。これは、正常組織における血管新生を抑制したためと考えられた。一方、TEC / DC を免疫した群では、このような完治の遅延が観察されなかったことから、腫瘍組織より分離した TEC を抗原とした免疫は、正常組織における血管新生を抑制しないことが示唆された。

(10) 考察：腫瘍組織から分離した TEC を抗原とした DC を免疫することで観察された高い抗腫瘍効果は、血管新生の抑制に起因したものであり、この時抑制される血管は腫瘍組織血管特異的なものであることが示唆された。以上のことから、本免疫療法は、正常組織への影響のない、有効ながん治療法になりうることが示唆された。

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)

[学会発表] (計 4 件)

1. 嶋岡卓人、宇都口直樹、鈴木亮、丸山一雄、腫瘍組織より分離した血管内皮細胞を抗原としたがん免疫療法、日本薬剤学会第 23 年会、2008 年 5 月 20-22 日、北海道

2. 宇都口直樹、鈴木亮、丸山一雄、腫瘍組織より単離した血管内皮細胞を標的としたがん免疫療法の開発、第 67 回日本癌学会学術総会、2008 年 10 月 28-30 日、名古屋

3. 嶋岡卓人、宇都口直樹、鈴木亮、丸山一雄、腫瘍組織血管内皮細胞を抗原としたがん免疫療法の開発、ファーマ・バイオフィォーラム 2008、2008 年 11 月 29-30 日、東京

4. 嶋岡卓人、宇都口直樹、鈴木亮、丸山一雄、腫瘍組織より分離した血管内皮細胞を抗原とした樹状細胞によるがん免疫療法、日本薬学会第 129 年会、2009 年 3 月 26-28 日、京都

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・准教授

研究者番号：80276633