

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008 ～ 2009

課題番号：20790377

研究課題名（和文）：腫瘍関連マクロファージを標的とした抗葉酸受容体 β イムノトキシンの開発と前臨床試験

研究課題名（英文）：Therapeutic targeting of folate receptor-beta expressing tumor-associated macrophages.

研究代表者

永井 拓 (NAGAI TAKU)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：90363647

研究成果の概要（和文）：

がん増殖を促進するマクロファージ（腫瘍関連マクロファージ、TAMs）の葉酸受容体 β FR β の発現をがん組織にて検討し、このマクロファージを標的とした抗FR β マウスモノクローナル抗体ベースの低分子高機能型抗体（遺伝子改変型緑膿菌毒素PE38ベースのイムノトキシシン）を作製すると共に、動物モデルにてその効果を検討した。①ヒトがん組織におけるTAMsのFR β 発現を免疫組織化学染色にて行ったところ、FR β 発現TAMsは脳腫瘍、肺がん、膵臓がんの腫瘍と間質の境界に集簇を形成して局在した。さらに、FR β 発現TAMsの高局在性は、がんの悪性度と相関を示した（正常組織では低局在もしくは存在しない）。②次に、ラットC6グリオーマ・ヌードマウス皮下移植モデルおよびマウス肺がんモデルにてFR β 発現TAMsの局在を検討したところ、ヒトがん組織と同様に集簇を形成してがん間質や血管新生領域に局在する事が確認された。③FR β 陽性マクロファージの選択的除去を目的とした低分子高機能型抗体（イムノトキシシン）を作製し、②のモデルに投与したところ、腫瘍血管新生の抑制を伴ったがん増殖の抑制が確認された。④イムノトキシシンはFR β 陽性マクロファージが分泌するVEGFやNO産生を抑制した。以上のことから、FR β を発現する腫瘍関連マクロファージは、がんの増殖に促進的に関与し、その選択的除去ががん治療に有効であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Recently, clinical and experimental evidence suggested that inflammatory macrophages, such as tumor-associated macrophages (TAMs) play important role in malignant tumors. We have shown that synovial macrophages in rheumatoid arthritis express folate receptor β (FR β) while tissue resident macrophages in normal tissues and peripheral blood monocytes express no or low levels of FR β . We tested whether TAMs express FR β in human malignant tumors and nude mice xenograft model and if so, whether selectively elimination of FR β -expressing TAMs could suppress tumor growth in nude mice model.

Our results showed the following novel features of FR β -expressing TAMs: (a) immunohistochemical analysis revealed that FR β -expressing TAMs were present in glioblastoma, lung cancer, and pancreatic cancer; (b) also, FR β -expressing TAMs were present in nude mice implanted with rat C6 glioma model; (c) injection of the anti-FR β immunotoxin (consisting of heavy and light chain Fv portions and Pseudomonas exotoxin A) into C6 glioma xenografts in

nude mice significantly depleted TAMs and reduced tumor growth and CD31-positive vascular area; (d) immunotoxin inhibited NO and VEGF production by FR β -expressing macrophages in vitro.

Our study indicated that FR β -expressing TAMs may promote tumor growth in glioblastoma, and suggested that targeting FR β -expressing macrophages could be an effective anti-cancer therapy method.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度			
2006年度			
2007年度			
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：(1)マクロファージ (2)がん (3)葉酸受容体 β (4)炎症(5)抗体医薬 (6)低分子高機能型抗体(7)イムノトキシン

1. 研究開始当初の背景

がんの増殖・転移にはがんと間質の相互作用—炎症反応が関与する事が知られている。この間質を構成するマクロファージは腫瘍関連マクロファージ (TAMs) と称され、炎症反応に伴うがんの増殖や転移を促進することが示唆されている。

申請者は慢性的な炎症組織のマクロファージで高発現を示す細胞表面抗原、葉酸受容体 β (FR β)を関節リウマチ滑膜組織より同定し、炎症性マクロファージの病態における重要性を指摘するとともに、このマクロファージの選択的除去が関節リウマチの治療面において有効であることを報告した。

2. 研究の目的

各種固形がん、およびマウスモデルにおけるFR β 発現 TAMs の存在を検討するとともに、

FR β 発現 TAMs の選択的除去を目的としたイムノトキシンを作製し、上記モデルにおいて、がん増殖抑制効果を検討する事を目的とした。

3. 研究の方法

ヒト固形がん組織 (脳腫瘍、肺がん、膵臓がん)、およびマウスモデル (C6 ラット脳腫瘍、M109 肺がん細胞) におけるFR β 発現 TAMs 局在性の検討は免疫組織化学染色にて行った。

FR β 発現 TAMs の選択的除去を目的としたイムノトキシンの作製は、抗マウスFR β モノクローナル抗体の抗原認識領域 (CDR 領域) 遺伝子と遺伝子改変型緑膿菌毒素 (PE38) と融合させ、大腸菌発現系から精製を行った。

C6 ラットグリオーマのヌードマウス皮下移植モデルに先述のイムノトキシンを投与

し、腫瘍体積を計測した。

4. 研究成果

①【ヒト固形がんにおける FR β 発現 TAMs の存在】ヒト固形がんにおける FR β 発現 TAMs の存在は、悪性脳腫瘍(Grade IV)、肺がん、膵臓がんにおいて確認した。FR β 陽性 TAMs はがん組織と間質の境界に集簇を形成して存在した。また、悪性脳腫瘍および膵臓がんにおいては、がんの悪性度と正の相関性を示した。

FR β 陽性マクロファージの正常組織における存在は、肺組織および肝臓において僅かながら確認された(全マクロファージの内の1%程度)。また、末梢血単球では FR β の発現が見られない事がフローサイトメータおよび RT-PCR にて確認された。

②【マウスモデルにおける FR β 陽性 TAMs の存在】C6 ラットグリオーマおよび M109 肺がん細胞を移植したモデルを作製し、FR β 陽性 TAMs の存在を検討したところ、皮下移植モデルおよび肺転移モデルの両方において FR β 陽性 TAMs の存在が確認できた。FR β 陽性 TAMs は腫瘍血管領域近傍に集簇を形成して局在する事が免疫組織化学染色にて明らかとなった。

③【イムノトキシンの FR β 陽性 TAMs 選択除去によるがん増殖抑制】FR β 陽性 TAMs を選択的に除去する目的でリコンビナントタイプイムノトキシンを作製した。

イムノトキシンは一般的に生体内における安定性(血中半減期)が低い事が問題視されている。この問題を解決するために VH 領域と VL 領域をジスルフィド結合で安定化させるためにシステイン残基を導入すると共に、立体障害の起こらないペプチドをデザインして挿入した。

作製したイムノトキシンをを用いてのラットグリオーマのヌードマウス皮下移植モデ

ルにイムノトキシンを投与し、腫瘍体積を経日的に測定した。イムノトキシン投与群は対照群に比べて有意にがんの増殖を抑制した。

免疫組織化学的染色より、イムノトキシン投与群の組織では血管面積の縮小に伴う腫瘍細胞の増殖抑制が確認された。

【今後の展開】

本研究では FR β 陽性 TAMs が、がん増殖に促進的な役割を担うことや、その選択的除去が治療面に有効である可能性を動物モデルにて明らかにした。しかしながら、FR β 陽性マクロファージへの分化プロセスについては不明のままである。

また、イムノトキシンのベースとなる PE38(遺伝子改変型緑膿菌毒素)は、臨床試験(Phase III)で使用実績があるが高い頻度で免疫原性が現れるために連続投与に向かないことが指摘されている。実際のがん治療に用いられる抗体医薬は連続投与が前提であることから、連続投与可能なイムノトキシンの開発が望まれる。

今後は FR β 陽性マクロファージの病態-特にがんと間質の相互作用における役割や、FR β 陽性マクロファージへの分化プロセスを明らかにするだけでなく、免疫原性の少ない連続投与可能なイムノトキシンを新たに作製し、FR β 陽性マクロファージの選択的除去の治療面における有効性を展開してゆきたい。

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3件)

① Nagai T, Tanaka M, Tsuneyoshi Y, Xu B, Michie SA, Hasui K, Hirano H, Arita K, Matsuyama T. Targeting tumor-associated macrophages in an experimental glioma model with a recombinant immunotoxin to folate receptor-beta. *Cancer Immunol Immunother.* 58:1577-1586(2009) 査読有り

②永井拓 松山隆美 田中将志
炎症の遷延化とがんの増殖を抑制するイム
ノトキシン
ケミカルエンジニアリング 11:55-62(2009)
査読なし

③Nagai T., Tanaka M., K Hasui, Shiramaha
H., Kitajima S., Yonezawa S., Xu B., and
Matsuyama T.
Effect of an immunotoxin to folate
receptor-beta on bleomycin-induced
experimental pulmonary fibrosis
Clin. Exp. Immunol. (in press, Article ID:
CEI 4182) 査読有り

〔学会発表〕(計4件)

①永井拓 がん増殖の抑制と抗炎症作用を
示す低分子高機能型抗体(イムノトキシン)
科学技術振興機構 新技術説明会(招待講
演) 2010年1月29日 東京

②永井拓 葉酸受容体 β 陽性マクロファージ
を標的としたイムノトキシンのブレオマ
イシン誘発マウス肺線維症に対する治療効
果の検討 日本免疫学会 大阪 2009 12
月4日

③永井拓 Targeting FR-beta macrophages
as a novel strategy against glioblastoma.
日中病理学シンポジウム(招待講演) 2009年
8月4日 済南市 中国

④永井拓 肺線維症マウスにおける葉酸リ
セプター β 発現マクロファージの選択的除
去の効果 日本リウマチ学会 東京 2009
年4月23日

〔産業財産権〕

○出願状況(計2件)

名称: がん関連マクロファージを標的とした
固形がん治療剤

発明者: 永井拓 松山隆美 田中将志

権利者: 国立大学法人 鹿児島大学

種類: 特願

番号: 2008-130882

出願年月日: 平成20年5月19日

国内外の別: 国内

名称: 間質性肺炎治療剤

発明者: 永井拓 松山隆美 田中将志

権利者: 国立大学法人 鹿児島大学

種類: 特願

番号: 2009-04826

出願年月日: 平成21年2月27日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永井拓 (NAGAI TAKU)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・助
教

研究者番号: 90363647