

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年4月19日現在

機関番号：32643

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22890192

研究課題名（和文） 転移がんの克服を目指した新規治療抗体の創製：

擬似血管はがんのターゲットとなるか？

研究課題名（英文） Creation of a novel therapeutic antibody for tumor metastasis
～Targeting Tumor Vasculogenic Mimicry～

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

研究成果の概要（和文）：本課題では、悪性腫瘍に対する新規治療法の開発を目指した。特に、がん細胞由来の血管類似構造である腫瘍擬似血管 (Tumor Vasculogenic Mimicry: TVM) に着目した。まず、TVMワクチンの抗腫瘍効果を検討したところ、免疫群は未処置群に比べ腫瘍増殖が抑制される傾向にあった。そこで、ファージ表面提示法によるTVM抗体の作成を行った。また *in vitro* 上のTVMのACE活性の上昇は観察されなかった。TVMは腫瘍増殖に関与しつつも血管と異なる性質を有する可能性を明らかとした。

研究成果の概要（英文）：In this study, we had an attempt to develop a novel therapy for tumor. Recent years, it is reported that in the tumor tissue tumor cells compose luminal structure as like vessel. This structure is called as tumor vasculogenic mimicry (TVM). There are many red blood cells in a part of TVM. It is expected that TVM has an important role to metastasize via blood flow. Therefore, it expects that the inhibition of both angiogenesis and TVM can result in the inhibition of tumor growth and metastasis. Therefore, we had an attempt to create anti-TVM antibody for tumor therapy, using phage-display technique. Next, we evaluated tumor growth suppressive effect by TVM vaccine therapy for tumor bearing mice to clarify how TVM development associates with metastasis. As the result, in TVM-immune mice, tumor growth had a tendency to be suppressed, compared with non-treated mice. In addition, to evaluate TVM property as blood vessel, we measured enzyme activity which has high activity in endothelial cell. As the result, in TVM, we can't confirm the elevated activity. Thus, we clarified that TVM possess properties differing from blood vessel in spite of being similar in structure to them.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,260,000	378,000	1,638,000
2011年度	1,160,000	348,000	1,508,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,420,000	726,000	3,146,000

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：転移、腫瘍擬似血管、ファージ表面提示法、免疫抗体ライブラリ

1. 研究開始当初の背景

「悪性新生物:がん」は、1981年に本邦の死亡原因第1位になって以降、患者数は未だ増加の一途を辿っており、効果的ながん治療法ならびに診断法の開発が求められている。近年のライフサイエンス研究の進展に伴い、がんの発症機構が徐々に明らかとなりつつある中で、腫瘍組織血管における血管新生の重要性が取り上げられてきた。そのような背景も相俟って、現在、この腫瘍組織血管をターゲットとした分子標的治療薬の開発が強力に推進されている。中でも腫瘍組織の血管新生に関与することが報告されている血管内皮細胞増殖因子 (Vascular endothelial growth factor: VEGF) を標的として阻害するモノクローナル中和抗体は、直腸がんに対する有効性を示す医薬品として上市されている。しかしながら、転移がんなど未だ現状の分子標的治療薬によっても奏功が認められないがんが存在し、その効果にも個体差がある。さらに、そうしたがん患者の治療に繋がる腫瘍特異的なマーカー分子および分子標的治療薬としては、世界的に認められている物質は存在していないのが現状である。

一方で近年、腫瘍細胞の発生に伴い、がん組織が発達したり、転移したりする初期の段階に、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に示すように擬似血管は、血管内皮細胞が担い手となって進行する従来の腫瘍血管新生経路とは別に、腫瘍形成の初期および転移初期段階にがん細胞自身が血管内皮細胞様の構造を形成し、血管として機能しているものである。そのため、擬似血管をターゲットとした特異的分子標的治療薬を創出できれば、初期のがん治療が可能となるばかりか、現在治療が困難とされている転移がんをも治療可能な新たな作用点の医薬品になると強く期待される。そこで本研究申請課題は、腫瘍組織における擬似血管に着目し、申請者がこれまでの研究で独自に発展させてきた生物学的DDS技術とも呼べる機能性蛋白質創出技術(フェージ表面提示法)を駆使した擬似血管ターゲティング抗体の創出を2年間で行うものである。

2. 研究の目的

本研究課題においては、特に、現在悪性腫瘍の形成に重要であると考えられている腫瘍血管新生経路とは異なり、近年がん組織における初期の腫瘍形成および転移の進行に関与すると考えられてきている擬似血管に焦点を

絞り、擬似血管をターゲットとした分子標的治療薬の開発を行う。

本研究における分子標的治療薬としては、現在、乳がんや関節リウマチなどの疾患に著効を示す抗体医薬を用いることとする。本申請課題は、申請者がこれまでの研究で独自に開発してきた機能性人工蛋白質創出技術(フェージ表面提示法)を駆使することで、初期のがんや転移がん治療を目指した擬似血管特異的抗体の創製およびその治療効果の検討を行うものである。まず腫瘍増殖および転移の抑制に対して擬似血管を標的とすることが有効か否かを評価するために、擬似血管を抗原として用いたワクチン療法の効果を検討する。次に、擬似血管を抗原としてマウスに免疫を行い、回収した遺伝子の情報を元に免疫抗体ライブラリを作製する。

医療技術の発達により様々な疾患に対する治療法が確立されている一方で、がんは未だ根治が達成されていない重篤な疾患の1つである。また、本研究課題のように擬似血管をターゲットとしたDDS医薬品を創製することができれば、現在がん発症メカニズムの主因と考えられている血管内皮細胞により誘導される血管新生とは異なる腫瘍構築の初期経路を阻害可能な治療ストラテジーとなる。そのため、未だ治療が難しいと考えられている初期のがんや転移がんの克服をも可能になると予想される。また、擬似血管に対する特異的抗体を創出するにあたり適用するフェージ表面提示法は、抗原を免疫してから抗体を単離するまでに数週間程度であり、既存の抗体作製法であるハイブリドーマ法と比較しても極めて簡便な方法であるといえる。このように腫瘍組織における擬似血管に着目した研究は未だ国内外においてもほとんど存在せず、極めて新規性の高い研究であると考えられる。また擬似血管の働きを抗体によって特異的に抑制しようとするアプローチは皆無であり、本アプローチが実現すれば、医療の発達に著しく貢献できると予想される。

3. 研究の方法

(1) *in vitro*にて構築した擬似血管を用いたDCワクチン療法による腫瘍増殖抑制効果の検討

マトリゲル上にてがん細胞を培養し、チューブ化したものを擬似血管抗原として用いた。抗原をアジュバントとして用いる樹状細胞に導入しマウスに投与することで、腫瘍増殖に対する抑制効果を検討した。

(2) 擬似血管を抗原として用いた抗体ライブラリの作成

擬似血管抗原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2回免疫し、血清抗体価を測定した。抗体価の上昇を確認後、マウスより脾臓を摘出して、cDNAを回収した。これら遺伝子から抗体の変領域のVL、VH鎖を合成して一本鎖抗体ライブラリの作成を進めた。

(3) がん細胞のマトリゲル上での培養による管腔形成と血管としての特性評価

抗体における抗原として用いる管腔形成後のサンプルの血管としての特性を評価するために、血管内皮細胞において活性が上昇している因子の活性を測定した。

4. 研究成果

我々は、まず初めにTVMの治療標的としての有用性を明らかにするために、TVMを抗原としたワクチン療法を用いてマウスにおける腫瘍増殖抑制効果を検討した。抗原としては、がん細胞をマトリゲル上で培養してチューブ化したものをTVMとして用いた。その結果、予めTVMを抗原として免疫した群においては、免疫を行っていない群と比較してがんの増殖が抑制される傾向にあった。したがって、TVMは有効な治療標的となる可能性が明らかとなった。

そこで次に我々は、ファージ表面提示法を用いることでTVMに対する抗体の創出を試みた。前述したTVMをアジュバントと共に混合してエマルジョンを作成し、2回免疫を行った。マウスより血清を回収してTVMに対する抗体価を測定したところ、非免疫群と比較してTVMに対する抗体価の有意な上昇を確認した。そのマウスより脾細胞を摘出し、遺伝子を回収して、現在免疫ファージ抗体ライブラリの作成を進めている。

また我々は、TVMの血管としての特性を明らかにするために、血管内皮細胞において活性の上昇が確認されている分子についてTVMを用いて測定した。その結果、プレリミナリーな結果ではあるものの、TVMにおける発現上昇は確認されなかった。まだ一部の活性に関してはしか検討できていないので断言することは難しいが、TVMは血管に類似した形態を示すものの、全く別の働きをする細胞群である可能性が示された。

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)

[雑誌論文] (計5件)

- ① 野村鉄也、DDS技術を駆使した腫瘍組織血管標的がん免疫療法の開発、Drug

Delivery System、査読無、26-4、2011、430-431

- ② Abe Y, Yoshikawa T, Inoue M, Nomura T, Furuya T, Yamashita T, Nagano K, Nabeshi H, Yoshioka Y, Mukai Y, Nakagawa S, Kamada H, Tsutsumi Y, Tsunoda S、Fine tuning of receptor-selectivity for tumor necrosis factor- α using a phage display system with one-step competitive panning、Biomaterials、査読有、32(23)、2011、5498-5504
- ③ Nomura T, Abe Y, Kamada H, Shibata H, Kayamuro H, Inoue M, Kawara T, Arita S, Furuya T, Yamashita T, Nagano K, Yoshikawa T, Yoshioka Y, Mukai Y, Nakagawa S, Taniai M, Ohta T, Serada S, Naka T, Tsunoda SI, Tsutsumi Y、Therapeutic effect of PEGylated TNFR1-selective antagonistic mutant TNF in experimental autoimmune encephalomyelitis mice、J. Control. Release、査読有、149(1)、2011、8-14
- ④ Nabeshi H, Yoshikawa T, Kamada H, Shibata H, Sugita T, Abe Y, Nagano K, Nomura T, Minowa K, Tsunoda S, Tsutsumi Y、Arsenic trioxide induces down-regulation of gp46 via protein oxidation: proteomics analysis of oxidative modified proteins in As203-treated HTLV-1-infected cells、Pharmazie、査読有、65(9)、2010、702-707
- ⑤ Kayamuro H, Yoshioka Y, Abe Y, Arita S, Katayama K, Nomura T, Yoshikawa T, Kubota-Koketsu R, Ikuta K, Okamoto S, Mori Y, Kunisawa J, Kiyono H, Itoh N, Nagano K, Kamada H, Tsutsumi Y, Tsunoda S、Interleukin-1 family cytokines as mucosal vaccine adjuvants for induction of protective immunity against influenza virus、J Virol、査読有、84(24)、2010、12703-12

[学会発表] (計3件)

- ① Nomura T、Vaccination with tumor endothelial cells isolated from solid tumor inhibits tumor growth and angiogenesis、AAPS Annual Meeting and Exposition、2011年10月26日、Walter E. Washington Convention Center (Washington DC)
- ② 野村鉄也、腫瘍血管内皮細胞を標的としたがん免疫療法の開発、日本薬学会第131

年会、2011年3月29日、ツインメッセ
静岡（静岡）

- ③ 野村鉄也、生物学的 DDS 技術を駆使して
作製した TNFR1 選択的アンタゴニストの
多発性硬化症治療薬としての応用、第 19
回 DDS カンファレンス、2011年9月4日、
グランシップ（静岡）

〔その他〕

ホームページ等

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