

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25462274

研究課題名(和文) 悪性脳腫瘍に対するDDS製剤を用いた個別化治療に向けての基礎的検討

研究課題名(英文) Basic research of DDS therapy for malignant brain tumor

研究代表者

黒田 順一郎 (Kuroda, Junichiro)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・助教

研究者番号：90536731

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)：DDS製剤の悪性脳腫瘍治療への臨床展開を目的として脳腫瘍細胞因子と腫瘍組織環境因子に着目して基礎的検討を行った。標的とする因子は悪性腫瘍に血液凝固異常が多発することから外因系凝固のトリガー分子である組織因子を選定し、抗組織因子モノクローナル抗体を用いた薬剤送達法を検討した。先ず、神経膠腫臨床検体の免疫染色を行い悪性度が高まるにつれ組織因子が高発現することを確認した。次に膠芽腫細胞株を皮下移植した動物実験を行って抗組織因子抗体が腫瘍に高集積し、正常臓器には集積しないことを確認した。硬組織因子抗体に抗癌作用を持つ薬剤を付加した抗体薬剤複合体への展開が期待される。

研究成果の概要(英文)：We focused on brain tumor cell factor and tumor tissue environmental factor to develop DDS therapy for malignant brain tumor. Tissue factor is one of the trigger molecule for exogenous coagulation in malignant tumor. We examined drug delivery method using anti tissue factor antibody. First of all, immunostaining of glioma was carried out, and it was confirmed that tissue factor was highly expressed as malignancy increased. Next, we conducted animal experiments in which the glioblastoma cell line was transplanted subcutaneously, and it was confirmed that the anti-tissue factor antibody highly accumulated in the tumor and did not accumulate in normal organs. It is expected to develop into an antibody drug complex using tissue factor antibody.

研究分野：brain tumor

キーワード：brain tumor drug delivery system tissue factor antibody ADC

### 1. 研究開始当初の背景

悪性神経膠腫はその治療に摘出術、放射線治療と化学療法からなる集学的治療を要する予後不良の疾患であり、既存の標準治療を上回る効果的な新規治療法の開発が望まれている。

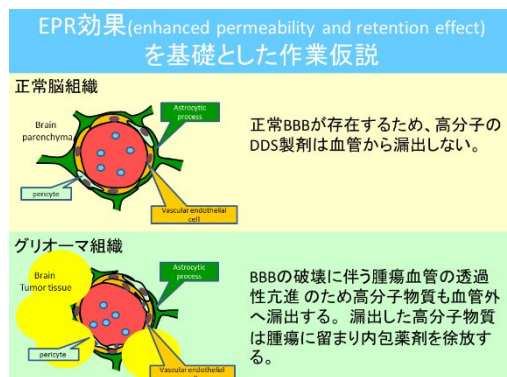
ドラッグデリバリーシステム(以下 DDS)は薬物の動態を生体内で時間的・空間的に制御する革新的技術である。数十～数百 nm オーダーのナノ粒子の腫瘍組織への選択的集積性と停留性 (enhanced permeability and retention 効果: EPR 効果)が認められ (Cancer Res 1986;46:6387-92)、この EPR 効果を利用した高分子 DDS 製剤 (ドキシル、Abraxane) も既に臨床応用されているところである。

加えて実臨床ではタキソール、シスプラチン、カンプトテシン内包ミセルによる臨床試験が国内外で進行中である。

抗がん性 DDS 製剤はその特性上、腫瘍血管に富み、血管透過性の亢進した腫瘍において治療効果を最大限に発揮することと考えられることから悪性脳腫瘍は特に良い適応であると考えられる。将来の悪性脳腫瘍治療への臨床展開へ向けて、前臨床研究にて DDS 製剤の効果予測因子について知見を得ておくことは極めて有用である。

### 2. 研究の目的

悪性脳腫瘍は浸潤性増殖、薬剤耐性を示し、さらに環境因子としての血液脳関門が存在することから治療抵抗性・予後不良の疾患である。予後改善に向けて、今回、我々は近年のナノテクノロジー技術の発展を背景に化学療法で新たな展開が期待されるドラッグデリバリーシステム(以下 DDS)製剤による新規治療法の開発を目的とした研究を立案・計画した。研究代表者はこれまで、DNA トポイソメラーゼ I 阻害剤のカンプトテシン内包高分子ミセル製剤が静脈内投与で膠芽腫同所移植モデルに到達し顕著な抗がん作用を示す事、及びミセル製剤の薬効に血管透過性などの腫瘍組織因子が密接に関与することを見出している。今回の研究では DDS 製剤の悪性脳腫瘍治療への臨床展開を目的として脳腫瘍細胞因子と腫瘍組織環境因子に着目し、DDS 製剤の薬効への関与を明らか



にする。

### 3. 研究の方法

(1) 悪性腫瘍組織は腫瘍細胞および間質細胞から形成される。このことから効果的な薬剤送達を行うためにキャリアに抗体を付加する場合のターゲット分子として、腫瘍細胞と腫瘍間質の両方に発現しているものが理想的と考えられる。翻って悪性腫瘍と血液凝固異常の関係は以前より指摘され、悪性脳腫瘍では血栓塞栓症が高率に起こることが知られている。そこで外因系凝固のトリガー分子である組織因子 (tissue factor, TF) に着目した。以上の仮説を元に、研究協力者である松村研究室で樹立された抗ヒト組織因子モノクローナル抗体 1849c (以下、抗 TF 抗体) を供与してもらい、この抗体を用いた免疫染色で神経膠腫 FFPE 切片における組織因子の発現を検討した。腫瘍組織における組織因子発現強度は以下の基準で分類した。

1. 陰性 (染色なし)
2. 弱陽性 (50%未満の細胞の染色)
3. 陽性 (50%以上の細胞の弱い染色)
4. 強陽性 (50%以上の細胞が強染色) の4段階とした。

(2) in vivo イメージングで使用する膠芽腫細胞株選定を目的として7種の膠芽腫細胞株 (U118MG, LN229, U87MG, DBTRG05MG, U251MG, MO59K, LN18) について組織因子の発現を検討とした。評価は抗 TF 抗体を一次抗体としたフローサイトメトリーで行った。

(3) TF 発現を認め、かつ、ヌードマウスへの腫瘍形成性が認められた膠芽腫細胞株 U87MG を用いて皮下移植モデルを作成した。担がんマウスの尾静脈から蛍光分子を付加した抗 TF 抗体を注入して、in vivo イメージングを行った。抗体ラベリングのために Alexa Fluor 647 を付加した。TF 抗体量として 300 マイクログラム / 個体をワンショットで注入して 168 時間後に IVIS in vivo イメージングシステムを用いて評価した。その後、マウスを sacrifice して ex vivo で腫瘍組織、及び各臓器への抗体分布を検討した。

### 4. 研究成果

(1) 免疫染色を行う神経膠腫臨床サンプルとして星細胞腫の WHO グレード 1 から 4 の腫瘍を用いた。TF 陽性率は腫瘍の悪性度とともに上昇した。実臨床で抗がん剤の積極的対象となるグレード 3 と 4 の腫瘍では陽性と強陽性を合わせた比率はグレード 3 が 73% (16 / 22)、グレード 4 が 75% (30 / 40) であった。この結果から TF を標的分子とした DDS の開発の妥当性はあると考え

られた。

グリオーマ臨床サンプルにおけるTissue factor発現と腫瘍悪性度



悪性グリオーマのTF免疫染色(GEM)

Grade <sup>a</sup>	Total	Level of expression of Tissue Factor <sup>b</sup>				% of ++ and +++
		-	+	++	+++	
I	12	0	7	5	0	
II	14	1	11	2	0	27
III	22	1	5	14	2	73
IV	40	0	10	17	13	75

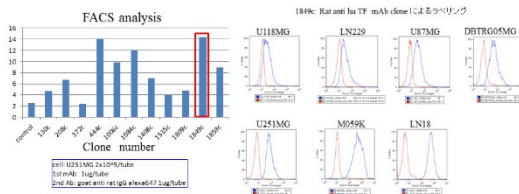
<sup>a</sup> Histologic diagnosis based on the World Health Organization classification system.  
<sup>b</sup> Expression of tissue factor protein was classified as follows: (-), negative; (+) weakly positive (<50% positive tumor cells); (++) moderately positive(≥50% positive tumor cells with weak intensity); (+++), strongly positive (≥50% positive tumor cells with strong intensity).

Kuroda J, Matsumura Y et. al unpublished data

(2)今回使用した7種すべての膠芽腫細胞株においてTFは発現していた。発現はLN18, M059K, U251MG, DBTRG05MG, U87MG, LN229, U118MGの順に高かった。

次にこれらの細胞株を用いた皮下腫瘍の作成実験を行った。当初は最もTF発現の高いLN18を用いて検討を行ったが腫瘍形成能は認められなかった。その他の高発現株でも同様の結果であり、最終的にU87MGで生着を認めin vivo実験で使用することとした。

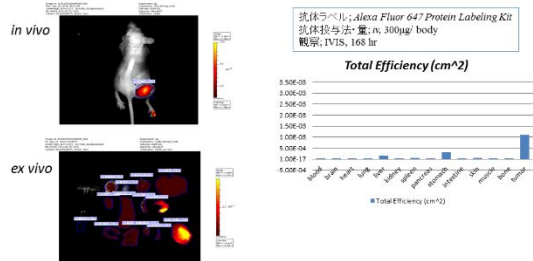
抗ヒトTF抗体のスクリーニングと膠芽腫細胞株におけるTFの発現



(3) in vivo イメージングでは蛍光ラベル抗体の集積はマウスの皮下腫瘍のみに認められた。機序として高分子である抗体がEPR効果によって腫瘍への集積したと、抗体の組織因子へのアクティブターゲティング効果が複合的に作用していると考察された。また、ex vivo イメージングでは各臓器を摘出して検討した。その結果、腫瘍組織への集積が突出して高かったが正常臓器ではわずかに胃と肝臓に腫瘍比で10%未満の集積を認めた。これは抗体に薬剤を付加したantibody drug complex製剤として抗がん治療を行う場合に病巣への高集積による高

い抗腫瘍効果と正常臓器への低集積に伴う低い副作用の両立が期待されることが示唆された。

抗ヒトTF抗体(1849c)投与による蛍光イメージング



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)  
 Hisada Y, Yasunaga M, Hanaoka S, Saijou S, Sugino T, Tsuji A, Saga T, Tsumoto K, Manabe S, Kuroda J, Kuratsu J, Matsumura Y, Discovery of an uncovered region in fibrin clots and its clinical significance., SCIENTIFIC REPORTS, 査読あり, 3:2604, 2014, DOI:10.1038/srep02604.

[学会発表](計 2件)  
 黒田順一郎、高島大輝、安永正浩、松村保広、倉津純一、悪性グリオーマの凝固機能異常に着目した新規イメージング及び治療法の開発、第74回脳神経外科学術総会、2015年10月、北海道

Kuroda J, Takashima H, Yasunaga M, Matsumura Y, Kuratsu J, The Development of novel imaging and treatment that focuses on coagulation dysfunction of malignant gliomas, EANS2015, 20015 October, Spain, Madrid

[図書](計 0件)

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

[その他]  
ホームページ等なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

黒田 順一郎 (KURODA, Junichiro)  
熊本大学・大学院生命科学研究部 (医)・  
助教  
研究者番号：9 0 5 3 6 7 3 1

### (2) 研究分担者

倉津 純一 (KURATSU, Junichi)  
熊本大学・大学院生命科学研究部 (医)・  
教授  
研究者番号：2 0 1 4 5 2 9 6

中村 英夫 (NAKAMURA, Hideo)  
熊本大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号：3 0 3 5 9 9 6 3

牧野 敬史 (MAKINO, Keishi)  
熊本大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号：9 0 3 8 1 0 1 1

秀 拓一郎 (HIDE, Takuichiro)  
熊本大学・医学部附属病院・診療講師  
研究者番号：4 0 4 2 1 8 2 0

篠島 直樹 (SHINOJIMA, Naoki)  
熊本大学・医学部附属病院・寄附講座教員  
研究者番号：5 0 6 4 8 2 6 9

矢野 茂敏 (YANO, Shigetoshi)  
熊本大学・大学院生命科学研究部 (医)・  
准教授  
研究者番号：6 0 3 3 2 8 7 1

### (3) 連携研究者

なし

### (4) 研究協力者

松村 保広 (MATSUMURA Yasuhiro)