

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2020-37579

(P2020-37579A)

(43) 公開日 令和2年3月12日(2020.3.12)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 C 0 8 4
C 1 2 N 9/99 (2006.01)	C 1 2 N 9/99 Z N A	4 H 0 4 5
A 6 1 K 38/16 (2006.01)	A 6 1 K 38/16 2 0 0	
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	

審査請求 有 請求項の数 1 O L 外国語出願 (全 40 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2019-205190 (P2019-205190)	(71) 出願人	513076707
(22) 出願日	令和1年11月13日 (2019.11.13)		ステムジェン ソシエタ ペル アチオニ
(62) 分割の表示	特願2017-192907 (P2017-192907) の分割		イタリア国 2 0 1 2 2 ミラノ ヴィア
原出願日	平成23年9月30日 (2011.9.30)	(74) 代理人	110000109
(31) 優先権主張番号	10185930.4		特許業務法人特許事務所サイクス
(32) 優先日	平成22年10月1日 (2010.10.1)	(72) 発明者	ヴェスコビ アンジェロ ルイジ
(33) 優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁 (EP)		スイス国 ツェーハー6817 マロッジ
(特許庁注：以下のものは登録商標)		(72) 発明者	ビンダ エレーナ
1. TRITON			イタリア国 イー24123 ペルガモ
			ヴィア フラテッリ エスト エ エルレ
			アガッツィ 2
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 腫瘍幹細胞におけるE P H受容体発現

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】脳腫瘍に対し、特異的な治療法を開発すること、特に、グリア芽細胞腫の成長及び増殖に対する抑制物質の提供。

【解決手段】脳腫瘍の処理に使用される、エフリン受容体の発現及び/又は活性の阻害物質。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

脳腫瘍の処理に使用される、エフリン受容体の発現及び / 又は活性の阻害物質。

【請求項 2】

前記腫瘍がグリア芽細胞腫である、請求項1に記載の阻害物質。

【請求項 3】

前記脳腫瘍が多形性グリア芽細胞腫である、請求項1に記載の阻害物質。

【請求項 4】

前記処理が、手術後の脳腫瘍再発の治療である、請求項1のいずれか1項に記載の阻害物質。

10

【請求項 5】

前記処理が、手術後の脳腫瘍再発の予防処置であることを特徴とする、請求項1に記載の阻害物質。

【請求項 6】

前記処理が、脳腫瘍塊の成長を阻害することを特徴とする、請求項1に記載の阻害物質。

【請求項 7】

エフリン受容体の発現及び / 又は活性の前記阻害物質が、癌幹細胞増殖の阻害物質であることを特徴とする、請求項1に記載の阻害物質。

20

【請求項 8】

配列番号1及び配列番号3から成る群から選ばれる、請求項1から7のいずれか1項に記載の阻害物質。

【請求項 9】

少なくとも一つのエフリン受容体の発現及び / 又は活性の阻害物質、及び、薬学的に許容される生物活性手段を含む医薬組成物。

【請求項 10】

エフリン受容体の発現及び / 又は活性の前記阻害物質が、癌幹細胞増殖の阻害物質であることを特徴とする、請求項9に記載の医薬組成物。

【請求項 11】

エフリン受容体の発現及び / 又は活性の前記阻害物質が、癌幹細胞転移の阻害物質であることを特徴とする、請求項9に記載の医薬組成物。

30

【請求項 12】

前記癌幹細胞が悪性脳癌幹細胞である、請求項10又は11のいずれか1項に記載の医薬組成物。

【請求項 13】

エフリン受容体の発現及び / 又は活性の前記阻害物質が、配列番号1及び配列番号3から成る群から選ばれる、請求項9、10、11、又は12のいずれか1項に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

40

本発明は、中枢神経系悪性腫瘍の分野に関し、脳腫瘍の治療的及び予防的処理、及び、腫瘍塊成長の阻害に好適な医薬組成物を提供する。

【背景技術】**【0002】**

グリオーマはもっとも一般的な脳腫瘍であるが、特に、IV級グリオーマ--別に多形性グリア芽細胞腫 (GBM) とも呼ばれる--は、もっとも重篤なタイプである。この極めて浸襲的な腫瘍は、新規に生ずることもあるし (一次GBM)、或いは、低級グリオーマの悪性進行の結果として発達することもある (二次GBM)。いずれの場合も、その腫瘍に内在する特性のために、予後は暗く、放射線療法及び化学療法を併用しても平均生存期間は、14、6ヶ月である (12.)。

50

【 0 0 0 3 】

多形性グリア芽細胞腫は、きわめて異種性の高い腫瘍であり、強度の出血性部分及び広範な壊死領域を呈する、明白に異なる種々の細胞及び組織から成る異種性を示し、顕微鏡レベルでは、大量の微細血管増殖及び粹組み様パターン（pseudopalisading patterns）の存在と一致する（9.）。

【 0 0 0 4 】

もっとも重要なことは、GBMは、分散性組織分布パターンによって特徴づけられ、このため、腫瘍細胞は、脳内に広く撒布され、これが、完全な外科的切除を妨げる。それ故、患者の大多数に病気が再発する。さらに、GBMの進行は広範な血管形成を伴う。

【 0 0 0 5 】

新規マーカーの開発、すなわち、GBMの成長及び拡散を阻止し、それを治療するための方法の開発に必要な特異的分子標的を特定することの必要性及び重要性の認識が次第に高まりつつある。

【 0 0 0 6 】

ここ10年、有望な研究がいくつか為されており、それらは、様々な種類の腫瘍の発生、維持及び進行に関与すると考えられる、癌幹細胞（CSCs）の特定及び分離に取り組んでいる。従来から、癌の持続的成長、クローン性多様化及び進化、癌転移及び治療後の再発は、腫瘍細胞による、該腫瘍が由来する幹細胞--癌幹細胞と呼ばれる--の増殖能力の保持の結果である可能性が示唆されている。造血系悪性腫瘍、乳癌、及び、ヒト脳組織中の幹細胞様神経前駆細胞にも、形質転換幹細胞様細胞が認められている。

【 0 0 0 7 】

悪性脳腫瘍は、或いは、少なくともその内のいくつかは、癌幹細胞を含むという発見は、研究及び臨床の両レベルに新しい機会を提供する。事実、仮に、この癌幹細胞仮説が、これらの細胞は、腫瘍の全体量において僅かな細胞プールしか構成していないことを明らかにするとしても、この小プールは、術後の腫瘍の確立と拡張、及びその恒久化を引き起こす真犯人である可能性がある。

【 0 0 0 8 】

GBMでは、長期増殖性癌幹細胞（CSCs）が研究されているが（GBM-CSCs）、これは、神経幹細胞の機能的特徴の完全補完体を所有するだけでなく（13.）、ヒトGBM病態の主要な組織学的、細胞学的、及び構造的特徴を緊密に模倣する腫瘍を生成する能力を有する（5.）。

【 0 0 0 9 】

これらのGBM-CSCsは、ヒト疾患の真正の現象コピーを経時的に産み出すことが可能であるため、GBM生理学的機序をインビトロ/インビボで研究するに際しもっとも好適なモデルとなるので、これらは、GBMそのものの浸襲的・血管形成的態様の調節に直接関わる遺伝子/経路の発見を可能とすると考えられる。腫瘍細胞上に特異的に見出される分子マーカー、又は、悪性細胞には過剰に発現されるが、正常細胞ではほとんど存在しないか下方調整される分子マーカーは、標的照準性薬剤送達などの治療法にとっては魅力的な製剤標的となる。Eph受容体は、ヒトゲノムにコードされるチロシンキナーゼファミリーの内、最大ファミリーを含み、病気の進展において重要な役割を、即ち、外部刺激を受容し、細胞の内部にシグナルを伝達し、生体機能の維持に必須な数多くのプロセスを起動するという重要な役割を果たす。これらは、その全てが、隣接細胞の膜に定着するエフリン（Ephrin）と呼ばれるリガンドを認識するという点で、他のRTKとは区別される。通常、リガンド結合は、Eph受容体のチロシンリン酸化を誘発する（4.）。

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 1 0 】

従って、脳腫瘍に対し、新規で、より特異的な治療法を開発すること、特に、グリア芽細胞腫の成長及び増殖に対する抑制物質を特定することが本発明の目的である。

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 1 1 】

本発明は、エフリン受容体の、発現の阻害物質及び / 又は活性の阻害物質の内の少なくとも一つと、薬学的に許容される生体活性手段とを含む医薬組成物に関する。

【 0 0 1 2 】

本発明の詳細な説明においてさらに詳述するように、本発明の医薬組成物は、エフリン受容体--神経組織の発生の際高度に発現され、脳細胞内のシグナル伝達及び多くの生理過程の調節を左右する--という分子標的に対し特異的である利点を有する。

【 0 0 1 3 】

本発明のもう一つの側面は、エフリン受容体の発現阻害物質及び / 又は活性阻害物質を脳腫瘍の治療に使用することである。

10

【 0 0 1 4 】

本発明の特徴及び利点は、下記の詳細な説明、例示的・非限定的目的のために提示される実施例、及び、添付の図面1-12から明白となろう。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 1 5 】

【 図 1 A 】 実施例2に記載するように、ヒトのGBM-CSC細胞におけるEph受容体及びエフリンリガンドの発現を示す。 1(A)、RT-PCRによって分析したGBM-CSC細胞における、エフリン受容体 (Ephs) 及びエフリンリガンド (ephrins又はEFNs) の、mRNAの相対的発現レベル。 1(B)(a)、GBM-CSCにおけるEph受容体発現のサイトフルオロメトリー (cytofluorimetric) 分析。 1(B)(b)、各種GBM-CSC細胞系統におけるEphA2受容体の発現強化を裏付けるFACS分析。 1(C)、代表的GBM-CSC細胞系統におけるEphA2受容体及びephrin (エフリン) A1リガンド両方の発現を裏付ける免疫蛍光標識細胞の、種々の倍率における共焦点画像 (Confocal images)。

20

【 図 1 B 】 実施例2に記載するように、ヒトのGBM-CSC細胞におけるEph受容体及びエフリンリガンドの発現を示す。 1(A)、RT-PCRによって分析したGBM-CSC細胞における、エフリン受容体 (Ephs) 及びエフリンリガンド (ephrins又はEFNs) の、mRNAの相対的発現レベル。 1(B)(a)、GBM-CSCにおけるEph受容体発現のサイトフルオロメトリー (cytofluorimetric) 分析。 1(B)(b)、各種GBM-CSC細胞系統におけるEphA2受容体の発現強化を裏付けるFACS分析。 1(C)、代表的GBM-CSC細胞系統におけるEphA2受容体及びephrin (エフリン) A1リガンド両方の発現を裏付ける免疫蛍光標識細胞の、種々の倍率における共焦点画像 (Confocal images)。

30

【 図 1 C 】 実施例2に記載するように、ヒトのGBM-CSC細胞におけるEph受容体及びエフリンリガンドの発現を示す。 1(A)、RT-PCRによって分析したGBM-CSC細胞における、エフリン受容体 (Ephs) 及びエフリンリガンド (ephrins又はEFNs) の、mRNAの相対的発現レベル。 1(B)(a)、GBM-CSCにおけるEph受容体発現のサイトフルオロメトリー (cytofluorimetric) 分析。 1(B)(b)、各種GBM-CSC細胞系統におけるEphA2受容体の発現強化を裏付けるFACS分析。 1(C)、代表的GBM-CSC細胞系統におけるEphA2受容体及びephrin (エフリン) A1リガンド両方の発現を裏付ける免疫蛍光標識細胞の、種々の倍率における共焦点画像 (Confocal images)。

40

【 図 2 】 実施例3に記載されるように、EphA2による発現レベルは、患者のGBM一次腫瘍組織においても強化される。 2(a)、一次GBM凍結標本において、腫瘍中心部のEphA2タンパクレベルの免疫局在性。 2(b)、一次GBM凍結標本において、腫瘍周辺部のEphA2タンパクレベルの免疫局在性。 2(c)、GBM-CSCにおけるEphA2受容体タンパクのサイトフルオロメトリー分析。

【 図 3 A 】 実施例4に記載する通り、GBM-CSCにおける、ephrin A1-Fc又はEphA2-Fc処理の、EphA2受容体のリン酸化及び低下に及ぼす影響。 3(A)(a)、GBM-CSCにおいて、表示の濃度におけるephrinA1-Fc又はEphA2-Fc処理の、EphA2受容体の発現及びリン酸化に及ぼす作用の用量-反応曲線及びFACS分析である。 3(A)(b)、GBM-CSCにおいて、表示の期間におけるephrinA1-Fc又はEphA2-Fc処理の、EphA2受容体の発現及びリン酸化に及ぼす作用の継時曲線及びFACS分析である。 3(B)(a) 上部パネル：GBM-CSCにおいて行ったヒトEphA2

50

の免疫蛍光試験は、細胞の多くがその受容体に関して陽性であることを裏付ける。 3(B) (b-c) 上部パネル：GBM-CSCにおいて、それぞれ、ephrin A1-Fc 1.0 μ g/mL及び5.0 μ g/mL 後に行った、ヒトEph2の免疫蛍光試験は、その同じ抗原に関してごく僅かの細胞しか標識されないことを裏付ける。 3(B) 中央パネル：ephrinA1-Fc処理GBM-CSCにおける、EphA2 受容体の、全細胞分解産物におけるウェスタンブロット。細胞は、ephrinA1-Fcの不在下(-)又は存在下(+)に表示の期間育成した。 3(B) 下部パネル：全細胞分解産物を、EphA2の免疫沈降レベルのフォスフォチロシン特異的(4G10)抗体によって免疫プロットさせた。

3(C)、GBM-CSCにおける、EphA2-Fc処理後のEphA2受容体発現を示すウェスタンブロット分析。

【図3B】実施例4に記載する通り、GBM-CSCにおける、ephrin A1-Fc又はEphA2-Fc処理の、EphA2受容体のリン酸化及び低下に及ぼす影響。 3(A)(a)、GBM-CSCにおいて、表示の濃度におけるephrinA1-Fc又はEphA2-Fc処理の、EphA2受容体の発現及びリン酸化に及ぼす作用の用量-反応曲線及びFACS分析である。 3(A)(b)、GBM-CSCにおいて、表示の期間におけるephrinA1-Fc又はEphA2-Fc処理の、EphA2受容体の発現及びリン酸化に及ぼす作用の継時曲線及びFACS分析である。 3(B)(a) 上部パネル：GBM-CSCにおいて行ったヒトEphA2の免疫蛍光試験は、細胞の多くがその受容体に関して陽性であることを裏付ける。 3(B) (b-c) 上部パネル：GBM-CSCにおいて、それぞれ、ephrin A1-Fc 1.0 μ g/mL及び5.0 μ g/mL 後に行った、ヒトEph2の免疫蛍光試験は、その同じ抗原に関してごく僅かの細胞しか標識されないことを裏付ける。 3(B) 中央パネル：ephrinA1-Fc処理GBM-CSCにおける、EphA2 受容体の、全細胞分解産物におけるウェスタンブロット。細胞は、ephrinA1-Fcの不在下(-)又は存在下(+)に表示の期間育成した。 3(B) 下部パネル：全細胞分解産物を、EphA2の免疫沈降レベルのフォスフォチロシン特異的(4G10)抗体によって免疫プロットさせた。

3(C)、GBM-CSCにおける、EphA2-Fc処理後のEphA2受容体発現を示すウェスタンブロット分析。

【図3C】実施例4に記載する通り、GBM-CSCにおける、ephrin A1-Fc又はEphA2-Fc処理の、EphA2受容体のリン酸化及び低下に及ぼす影響。 3(A)(a)、GBM-CSCにおいて、表示の濃度におけるephrinA1-Fc又はEphA2-Fc処理の、EphA2受容体の発現及びリン酸化に及ぼす作用の用量-反応曲線及びFACS分析である。 3(A)(b)、GBM-CSCにおいて、表示の期間におけるephrinA1-Fc又はEphA2-Fc処理の、EphA2受容体の発現及びリン酸化に及ぼす作用の継時曲線及びFACS分析である。 3(B)(a) 上部パネル：GBM-CSCにおいて行ったヒトEphA2の免疫蛍光試験は、細胞の多くがその受容体に関して陽性であることを裏付ける。 3(B) (b-c) 上部パネル：GBM-CSCにおいて、それぞれ、ephrin A1-Fc 1.0 μ g/mL及び5.0 μ g/mL 後に行った、ヒトEph2の免疫蛍光試験は、その同じ抗原に関してごく僅かの細胞しか標識されないことを裏付ける。 3(B) 中央パネル：ephrinA1-Fc処理GBM-CSCにおける、EphA2 受容体の、全細胞分解産物におけるウェスタンブロット。細胞は、ephrinA1-Fcの不在下(-)又は存在下(+)に表示の期間育成した。 3(B) 下部パネル：全細胞分解産物を、EphA2の免疫沈降レベルのフォスフォチロシン特異的(4G10)抗体によって免疫プロットさせた。

3(C)、GBM-CSCにおける、EphA2-Fc処理後のEphA2受容体発現を示すウェスタンブロット分析。

【図4A】ephrinA1-Fc及びEphA2-Fc処理は、実施例5に記載するように、インビトロでGBM-癌幹細胞の増殖を下げる。 4(A)(a-c)、培養下のGBM-CSCに対する、表示の濃度におけるephrinA1-Fc添加後に見られる成長動態曲線。 4(A)(d)、ヒト神経幹細胞に対するephrinA1-Fc添加後に見られる成長動態曲線。 4(A)(e)、U87ヒトグリオーマ細胞に対するephrinA1-Fc添加後に見られる成長動態曲線。 4(A)(f)、培養下のGBM-CSC細胞に対する、ephrinA1-Fc又はEphA2-Fc添加後に見られる成長動態曲線。 4(B)(a)、BrdU細胞増殖アッセイによって推定される細胞増殖指数。 4(B)(b)、KI167陽性免疫反応細胞の定量によって推定される細胞増殖指数。 4(C)(a,c)、二つの急性に解離されたGBM-CSC系統の神経球の、EphA2-Fc不在下に育成した場合の位相差顕微鏡画像(Phase-bright microscopy images)。 4(C)(b,d)、二つの急性に解離されたGBM-CSC系統の神経球の、EphA2-Fc存在下に育成した場合の位相差顕微鏡画像(Phase-bright microscopy images)。

【図4B】 ephrinA1-Fc及びEphA2-Fc処理は、実施例5に記載するように、インビトロでGBM-癌幹細胞の増殖を下げる。 4(A)(a-c)、培養下のGBM-CSCに対する、表示の濃度におけるephrinA1-Fc添加後に見られる成長動態曲線。 4(A)(d)、ヒト神経幹細胞に対するephrinA1-Fc添加後に見られる成長動態曲線。 4(A)(e)、U87ヒトグリオーマ細胞に対するephrinA1-Fc添加後に見られる成長動態曲線。 4(A)(f)、培養下のGBM-CSC細胞に対する、ephrinA1-Fc又はEphA2-Fc添加後に見られる成長動態曲線。 4(B)(a)、BrdU細胞増殖アッセイによって推定される細胞増殖指数。 4(B)(b)、KI167陽性免疫反応細胞の定量によって推定される細胞増殖指数。 4(C)(a,c)、二つの急性に解離されたGBM-CSC系統の神経球の、EphA2-Fc不在下に育成した場合の位相差顕微鏡画像 (Phase-bright microscopy images)。 4(C)(b,d)、二つの急性に解離されたGBM-CSC系統の神経球の、EphA2-Fc存在下に育成した場合の位相差顕微鏡画像 (Phase-bright microscopy images)。

10

【図4C】 ephrinA1-Fc及びEphA2-Fc処理は、実施例5に記載するように、インビトロでGBM-癌幹細胞の増殖を下げる。 4(A)(a-c)、培養下のGBM-CSCに対する、表示の濃度におけるephrinA1-Fc添加後に見られる成長動態曲線。 4(A)(d)、ヒト神経幹細胞に対するephrinA1-Fc添加後に見られる成長動態曲線。 4(A)(e)、U87ヒトグリオーマ細胞に対するephrinA1-Fc添加後に見られる成長動態曲線。 4(A)(f)、培養下のGBM-CSC細胞に対する、ephrinA1-Fc又はEphA2-Fc添加後に見られる成長動態曲線。 4(B)(a)、BrdU細胞増殖アッセイによって推定される細胞増殖指数。 4(B)(b)、KI167陽性免疫反応細胞の定量によって推定される細胞増殖指数。 4(C)(a,c)、二つの急性に解離されたGBM-CSC系統の神経球の、EphA2-Fc不在下に育成した場合の位相差顕微鏡画像 (Phase-bright microscopy images)。 4(C)(b,d)、二つの急性に解離されたGBM-CSC系統の神経球の、EphA2-Fc存在下に育成した場合の位相差顕微鏡画像 (Phase-bright microscopy images)。

20

【図5A】 可溶性リガンド及び受容体は、実施例6に記載するように、GBM脳腫瘍原発細胞集団をインビトロで消失させる。 5(A)、GBM-CSC細胞における連続クローン原性アッセイ (Serial clonogenic assays)。 5(B)(a,d)、二つのGBM-CSC系統培養体から得られた神経球の位相差顕微鏡写真で、ephrinA1-Fcの、安静コントロール (resting controls) のクローンサイズに及ぼす作用を示す。 5(B)(b,e)、ephrinA1-Fc, 0.5 μ g/mLと共に育成した二つのGBM-CSC系統から得られた神経球の位相差顕微鏡写真で、ephrinA1-Fcのクローンサイズに及ぼす作用を示す。 5(B)(c,f)、二つのGBM-CSC系統培養体から得られた神経球の位相差顕微鏡写真で、ephrinA1-Fc, 1.0 μ g/mLのクローンサイズに及ぼす作用を示す。 5(C)(a)、EphA2発現において異なる、二つの細胞集団のソーターによる精製。EphA2タンパクの発現は、GBM-CSCのクローン効率に直接相関することを示す。実験方法のスキーム 5(C)(b)、EphA2++及びEphA2--GBM-CSCのクローン原性パーセント。

30

【図5B】 可溶性リガンド及び受容体は、実施例6に記載するように、GBM脳腫瘍原発細胞集団をインビトロで消失させる。 5(A)、GBM-CSC細胞における連続クローン原性アッセイ (Serial clonogenic assays)。 5(B)(a,d)、二つのGBM-CSC系統培養体から得られた神経球の位相差顕微鏡写真で、ephrinA1-Fcの、安静コントロール (resting controls) のクローンサイズに及ぼす作用を示す。 5(B)(b,e)、ephrinA1-Fc, 0.5 μ g/mLと共に育成した二つのGBM-CSC系統から得られた神経球の位相差顕微鏡写真で、ephrinA1-Fcのクローンサイズに及ぼす作用を示す。 5(B)(c,f)、二つのGBM-CSC系統培養体から得られた神経球の位相差顕微鏡写真で、ephrinA1-Fc, 1.0 μ g/mLのクローンサイズに及ぼす作用を示す。 5(C)(a)、EphA2発現において異なる、二つの細胞集団のソーターによる精製。EphA2タンパクの発現は、GBM-CSCのクローン効率に直接相関することを示す。実験方法のスキーム 5(C)(b)、EphA2++及びEphA2--GBM-CSCのクローン原性パーセント。

40

【図5C】 可溶性リガンド及び受容体は、実施例6に記載するように、GBM脳腫瘍原発細胞集団をインビトロで消失させる。 5(A)、GBM-CSC細胞における連続クローン原性アッセイ (Serial clonogenic assays)。 5(B)(a,d)、二つのGBM-CSC系統培養体から得られた神経球の位相差顕微鏡写真で、ephrinA1-Fcの、安静コントロール (resting controls) のクローンサイズに及ぼす作用を示す。 5(B)(b,e)、ephrinA1-Fc, 0.5 μ g/mLと共に育成した二つのGBM-CSC系統から得られた神経球の位相差顕微鏡写真で、ephrinA1-Fcのク

50

ローンサイズに及ぼす作用を示す。 5(B)(c, f)、二つのGBM-CSC系統培養体から得られた神経球の位相差顕微鏡写真で、ephrinA1-Fc, 1.0 μ g/mLのローンサイズに及ぼす作用を示す。 5(C)(a)、EphA2発現において異なる、二つの細胞集団のソーターによる精製。EphA2タンパクの発現は、GBM-CSCのローン効率に直接関連することを示す。実験方法のスキーム 5(C)(b)、EphA2++及びEphA2--GBM-CSCのローン原性パーセント。

【図6】実施例7に記載する副集団(SP)分析を示す。 5.0 μ g/mL EphA2-Fc又はephrinA1-Fcによる48時間処理後の、ヒトの安静GBM-CSCのHoechst 33342染料染色プロフィールである。

【図7】ephrinA1-Fcは、実施例8に記載するように、GBM-CSCに対し分化促進作用を及ぼす。 Fc処理コントロール・対・ephrinA1-Fc処理GBM-CSCにおける、神経細胞(ME-PE tubIII)、アストロサイト(星状細胞)(ME-FITC GFAP)、及び希突起神経膠細胞(ME-P E GalC)の出現頻度のサイトフルオロメトリー定量。

【図8A】実施例10に記載するように、可溶性ephrinA1-Fc又はEphA2-FcのいずれかによるEphA2活性化は、インビトロで、細胞骨格再編成を誘発し、GBM-CSC細胞の拡散及び移動を抑制する。 8(A)(a, b-d挿入画像)、未処理GBM-CSC細胞におけるFアクチンタンパク(ファロイジン染色)局在の共焦点画像(Confocal localization)である。これらの細胞は、高い移動性表現型を有する。 8(A)(e-f)、それぞれ、ephrinA1-Fc又はEphA2-Fc処理5分後の、Fアクチンタンパク(ファロイジン染色)局在の共焦点画像である。細胞は球形を維持し、拡散しなかった。 8(B)、上部パネル：ephrinA1-Fc刺激がFAKの急速な不活性化及び脱リン酸化を誘発することを示すウェスタンブロット分析。細胞は、ephrinA1-Fcの不在下(-)又は存在下(+)に表示の時間育成し、次いで分解した。 8(B)(a)、下部パネル：Cultrex浸襲アッセイで、膜の下面に移動したヒト皮膚微少血管内皮細胞(HMVEC)を固定、染色したものを示す。コントロールとして、基礎培養液に懸濁したHMVECをチェンバーの頂上に撒いた。 8(B)(b, c)、基礎培養液に懸濁してチェンバーの頂上に撒き、VEGF(20ng/mL)又はGBM-CSC調整培養液含有の下部分画におけるHMVEC。 8(B)(e, f)、EphA2-Fc(5.0 μ g/mL)の存在下チェンバーの頂上に撒き、VEGF(20ng/mL)又はGBM-CSC調整培養液含有下部分画におけるHMVEC。 8(B)(d)、コントロールとして上面に撒いたコントロールヒトIgGは、下部分画VEGFに対する反応としての細胞移動に影響を及ぼさなかった。 8(C)(a)、共焦点免疫蛍光画像は、GBM-CSC Fc処理コントロールにおいて、リン酸化ERK1/2に関して陽性であることを示す。 8(C)(b)、MEK1の活性化の化学的阻害物質(U0126)処理後のGBM-CSCにおけるリン酸化ERK1/2の免疫性局在の共焦点画像。 8(C)(c-d)、共焦点免疫蛍光画像は、GBM-CSCにおいて、それぞれ、EphA2-Fc又はephrinA1-Fc添加後6時間におけるリン酸化ERK1/2陽性の出現頻度を示す。 8(C)下部パネル：リン酸化ERK1/2に関して等価とされた細胞分解産物のウェスタンブロット分析は、ephrinA1-Fcの濃度増加は、GBM-CSCにおいて、ERK1/2をエンハンスすることを裏付ける。

【図8B】実施例10に記載するように、可溶性ephrinA1-Fc又はEphA2-FcのいずれかによるEphA2活性化は、インビトロで、細胞骨格再編成を誘発し、GBM-CSC細胞の拡散及び移動を抑制する。 8(A)(a, b-d挿入画像)、未処理GBM-CSC細胞におけるFアクチンタンパク(ファロイジン染色)局在の共焦点画像(Confocal localization)である。これらの細胞は、高い移動性表現型を有する。 8(A)(e-f)、それぞれ、ephrinA1-Fc又はEphA2-Fc処理5分後の、Fアクチンタンパク(ファロイジン染色)局在の共焦点画像である。細胞は球形を維持し、拡散しなかった。 8(B)、上部パネル：ephrinA1-Fc刺激がFAKの急速な不活性化及び脱リン酸化を誘発することを示すウェスタンブロット分析。細胞は、ephrinA1-Fcの不在下(-)又は存在下(+)に表示の時間育成し、次いで分解した。 8(B)(a)、下部パネル：Cultrex浸襲アッセイで、膜の下面に移動したヒト皮膚微少血管内皮細胞(HMVEC)を固定、染色したものを示す。コントロールとして、基礎培養液に懸濁したHMVECをチェンバーの頂上に撒いた。 8(B)(b, c)、基礎培養液に懸濁してチェンバーの頂上に撒き、VEGF(20ng/mL)又はGBM-CSC調整培養液含有の下部分画におけるHMVEC。 8(B)(e, f)、EphA2-Fc(5.0 μ g/mL)の存在下チェンバーの頂上に撒き、VEGF(20ng/mL)又はGBM-CSC調整培養液含有下部分画におけるHMVEC。 8(B)(d)、コントロールとして上面に撒いたコ

10

20

30

40

50

ントロールヒトIgGは、下部分画VEGFに対する反応としての細胞移動に影響を及ぼさなかった。8(C)(a)、共焦点免疫蛍光画像は、GBM-CSC Fc処理コントロールにおいて、リン酸化ERK1/2に関して陽性であることを示す。8(C)(b)、MEK1の活性化の化学的阻害物質(U0126)処理後のGBM-CSCにおけるリン酸化ERK1/2の免疫性局在の共焦点画像。8(C)(c-d)、共焦点免疫蛍光画像は、GBM-CSCにおいて、それぞれ、EphA2-Fc又はephrinA1-Fc添加後6時間におけるリン酸化ERK1/2陽性の出現頻度を示す。8(C)下部パネル：リン酸化ERK1/2に関して等価とされた細胞分解産物のウェスタンブロット分析は、ephrinA1-Fcの濃度増加は、GBM-CSCにおいて、ERK1/2をエンハンスすることを裏付ける。

【図8C】実施例10に記載するように、可溶性ephrinA1-Fc又はEphA2-FcのいずれかによるEphA2活性化は、インビトロで、細胞骨格再編成を誘発し、GBM-CSC細胞の拡散及び移動を抑制する。8(A)(a, b-d挿入画像)、未処理GBM-CSC細胞におけるFアクチンタンパク(ファロイジン染色)局在の共焦点画像(Confocal localization)である。これらの細胞は、高い移動性表現型を有する。8(A)(e-f)、それぞれ、ephrinA1-Fc又はEphA2-Fc処理5分後の、Fアクチンタンパク(ファロイジン染色)局在の共焦点画像である。細胞は球形を維持し、拡散しなかった。8(B)、上部パネル：ephrinA1-Fc刺激がFAKの急速な不活性化及び脱リン酸化を誘発することを示すウェスタンブロット分析。細胞は、ephrinA1-Fcの不在下(-)又は存在下(+)に表示の時間育成し、次いで分解した。8(B)(a)、下部パネル：Cultrex浸襲アッセイで、膜の下面に移動したヒト皮膚微少血管内皮細胞(HMVEC)を固定、染色したものを示す。コントロールとして、基礎培養液に懸濁したHMVECをチェンバーの頂上に撒いた。8(B)(b,c)、基礎培養液に懸濁してチェンバーの頂上に撒き、VEGF(20ng/mL)又はGBM-CSC調整培養液含有の下部分画におけるHMVEC。8(B)(e,f)、EphA2-Fc(5.0 µg/mL)の存在下チェンバーの頂上に撒き、VEGF(20ng/mL)又はGBM-CSC調整培養液含有下部分画におけるHMVEC。8(B)(d)、コントロールとして上面に撒いたコントロールヒトIgGは、下部分画VEGFに対する反応としての細胞移動に影響を及ぼさなかった。8(C)(a)、共焦点免疫蛍光画像は、GBM-CSC Fc処理コントロールにおいて、リン酸化ERK1/2に関して陽性であることを示す。8(C)(b)、MEK1の活性化の化学的阻害物質(U0126)処理後のGBM-CSCにおけるリン酸化ERK1/2の免疫性局在の共焦点画像。8(C)(c-d)、共焦点免疫蛍光画像は、GBM-CSCにおいて、それぞれ、EphA2-Fc又はephrinA1-Fc添加後6時間におけるリン酸化ERK1/2陽性の出現頻度を示す。8(C)下部パネル：リン酸化ERK1/2に関して等価とされた細胞分解産物のウェスタンブロット分析は、ephrinA1-Fcの濃度増加は、GBM-CSCにおいて、ERK1/2をエンハンスすることを裏付ける。

【図9】rhBMP4によるGBM-CSCの処理は、実施例11に記載するようにephrinA1-Fcの阻害作用をエンハンスする。9(a)、GBM-CSC細胞における、mRNAの単離前に表示の濃度で48時間コントロールFc又はrhBMP4で処理した場合と比べた、特異的プライマーによる、EphA2平均レベル測定の前PCR分析。9(b)、rhBMP4の不在下又は存在下にephrinA1-Fcと共に培養されたGBM-CSCの成長動態曲線。成長曲線は、一つのGBM-CSC系統を代表する。

【図10】ephrinA1-Fc及びEphA2-Fc処理は、実施例12に記載するように、インビボ、異種移植モデルにおいて腫瘍成長を抑制する。10(a)、細胞注入後35日における、種々の処理と関連する腫瘍形態の比較。10(b)、腫瘍サイズの相対的測定値。グラフは、6匹のマウスから成る4群の平均±s.e.m.を示す。

【図11A】可溶性リガンド又は受容体におけるEphA2の追加は、実施例13に記載するように、ヒトGBMの同所性移植モデルにおいてGBM-CSCの発癌性を抑制する。11(A)、Luc-GBM-CSC腫瘍異種移植組織の生物発光のモニタリングから、腫瘍からの対応するシグナルの増加が示される。11(B)、安静GBM-CSC、及びEphA2-Fc又はephrinA1-Fcで前処理したGBM-CSCの頭蓋内注入後、インビボで検出される腫瘍成長及び腫瘍サイズの相違。11(C)(a)、共焦点画像は、同所性移植6週後における、未処理Luc-GBM-CSCから得られた腫瘍を示す。11(C)(b-c)、共焦点画像は、同所性移植6週後における、それぞれ、ephrinA1-Fc又はEphA2-Fcで処理したLuc-GBM-CSCから得られた腫瘍を示す。

【図11B】可溶性リガンド又は受容体におけるEphA2の追加は、実施例13に記載するように、ヒトGBMの同所性移植モデルにおいてGBM-CSCの発癌性を抑制する。11(A)、Luc-G

10

20

30

40

50

BM-CSC腫瘍異種移植組織の生物発光のモニタリングから、腫瘍からの対応するシグナルの増加が示される。11(B)、安静GBM-CSC、及びEphA2-Fc又はephrinA1-Fcで前処理したGBM-CSCの頭蓋内注入後、インビボで検出される腫瘍成長及び腫瘍サイズの相違。11(C)(a)、共焦点画像は、同所性移植6週後における、未処理luc-GBM-CSCから得られた腫瘍を示す。11(C)(b-c)、共焦点画像は、同所性移植6週後における、それぞれ、ephrinA1-Fc又はEphA2-Fcで処理したluc-GBM-CSCから得られた腫瘍を示す。

【図11C】可溶性リガンド又は受容体におけるEphA2の追加は、実施例13に記載するように、ヒトGBMの同所性移植モデルにおいてGBM-CSCの発癌性を抑制する。11(A)、luc-GBM-CSC腫瘍異種移植組織の生物発光のモニタリングから、腫瘍からの対応するシグナルの増加が示される。11(B)、安静GBM-CSC、及びEphA2-Fc又はephrinA1-Fcで前処理したGBM-CSCの頭蓋内注入後、インビボで検出される腫瘍成長及び腫瘍サイズの相違。11(C)(a)、共焦点画像は、同所性移植6週後における、未処理luc-GBM-CSCから得られた腫瘍を示す。11(C)(b-c)、共焦点画像は、同所性移植6週後における、それぞれ、ephrinA1-Fc又はEphA2-Fcで処理したluc-GBM-CSCから得られた腫瘍を示す。

【図12】EphA2-Fc及びephrinA1-Fc投与は、実施例14に記載するように、ヒトGBMの同所性移植モデルにおいて確立された一次腫瘍の成長を抑える。ephrinA1-Fc又はEphA2-Fcによって14日間処理後の、luc-GBM-CSC腫瘍異種移植組織の生物発光のモニタリング。

【発明を実施するための形態】

【0016】

本発明は、エフリン受容体の発現阻害物質及び／又は活性阻害物質の内の少なくとも一つと、薬学的に許容される生体活性手段とを含む医薬組成物に関する。

【0017】

本発明では、エフリン受容体の活性阻害物質とは、生物学的反応は引き起こさないが、アゴニスト介在反応は阻止又は低減する、一種の受容体リガンドが意図される。

【0018】

本発明では、エフリン受容体の発現阻害物質とは、該受容体の発現及び／又は活性の下方調節因子であることが意図される。

【0019】

本発明の医薬組成物は、エフリン受容体、即ち、神経組織の発生の際高度に発現され、脳細胞内のシグナル伝達及び多くのプロセスの調節に必須であるエフリン受容体という分子標的に対し特異的である利点を有する。

【0020】

多形性グリア芽細胞腫(GBM)という分子標的に作用する特異的医薬組成物は、外科的切除を不要とするので、手術後の脳内における腫瘍細胞の広範な拡散--これは、しばしば、腫瘍再発をもたらす--を免れると予想される。

【0021】

本発明による医薬組成物のもう一つの利点は、腫瘍塊全体ではなく真の腫瘍原発細胞を標的とするので、一般に用いられる放射線療法及び化学療法の単独使用又は併用よりも、毒性が低く、効力が高く、特異的であることである。

【0022】

この治療法は、腫瘍原発細胞について、細胞毒性手段によって該細胞を殺そうとするのではなく、該細胞が非毒性表現形を獲得するよう細胞の「リプログラミング」を実行するというシナリオを演出する。

【0023】

もう一つの局面では、本発明は、エフリン受容体の、発現阻害物質及び／又は活性阻害物質の内の少なくとも一つを含む医薬組成物であって、エフリン受容体の、上記発現阻害及び／又は活性阻害物質が、癌幹細胞増殖の阻害物質である医薬組成物を提供する。

【0024】

GBMでは増殖性癌幹細胞の存在が確認されているので、腫瘍中に存在するこれらの癌幹細胞によって強化される、癌の増殖及び持続的成長に対しても、それらに作用する特異的

10

20

30

40

50

組成物を求める必要性の認識が次第に高まっている。

【0025】

驚くべきことに、本発明の組成物は、幹細胞の増殖能力に対しても作用する可能性がある。

【0026】

さらに別の局面では、本発明は、エフリン受容体の発現阻害物質及び／又は活性阻害物質の内の少なくとも一つを含む医薬組成物であって、エフリン受容体の、上記発現阻害及び／又は活性阻害物質が、癌幹細胞転移の阻害物質でもある医薬組成物を提供する。

【0027】

本発明の利点はさらに、癌幹細胞の確立を阻害するだけでなく、癌幹細胞--その転移能力が阻止される--の拡張をも阻害することによっても示される。

【0028】

さらに別の局面では、本発明は、エフリン受容体の発現阻害物質及び／又は活性阻害物質の内の少なくとも一つを含む医薬組成物であって、上記癌幹細胞が悪性脳腫瘍幹細胞である医薬組成物を提供する。GBMは、侵襲性が高く、悪性の進行を呈する、脳腫瘍の内でもきわめて重篤な型を代表する。

【0029】

本発明の医薬組成物は、多形性グリア芽細胞腫という分子標的に対し特異的に作用し、悪性癌幹細胞の進行を阻害するという利点を有する。

【0030】

さらに別の局面では、本発明は、エフリン受容体の発現阻害物質及び／又は活性阻害物質の内の少なくとも一つを含む医薬組成物であって、エフリン受容体の上記発現阻害物質及び／又は活性阻害物質が、配列番号1及び配列番号3から成る群から選ばれる医薬組成物を提供する。本発明の目的のために、エフリン受容体の各発現及び活性阻害物質は、下記のような対応配列番号を有する：

配列番号1は、エフリンA1のアミノ酸配列、アミノ酸配列 gi[333596]ref[NP_004419.2]、エフリンA1異性形、前駆体[ホモサピエンス]に合致し；

配列番号2は、エフリンA1のヌクレオチド配列、ヌクレオチド配列 gi[33359681]ref[NM_004428.2]、ホモサピエンス ephrinA1 (EFNA1)、転写変異体1 mRNAに合致し；

配列番号3は、EphA2のアミノ酸配列、アミノ酸配列 gi[32967311]ref[NP_004422.2]、エフリンA型受容体2前駆体[ホモサピエンス]に合致し；

配列番号4は、EphA2のヌクレオチド配列、ヌクレオチド配列 gi[296010835]ref[NM_004431.3]、ホモサピエンス EPH受容体A2 (EPHA2)、mRNAに合致する。

【0031】

本発明のさらに別の局面は、脳腫瘍の治療に使用されるエフリン受容体の発現阻害物質及び／又は活性阻害物質である。本発明によって提供される利点は、脳腫瘍の発生及び進行に關与する分子標的に作用する特異的阻害物質の使用に基づく。

【0032】

好ましい実施態様では、本発明は、脳腫瘍の治療に使用されるエフリン受容体発現阻害物質及び／又は活性阻害物質を提供する。ここに、エフリン受容体の上記発現阻害抑制物質及び／又は活性阻害物質は、配列番号1及び配列番号3から成る群から選ばれる。

【0033】

本発明の目的のために、エフリン受容体の発現及び活性の各阻害物質は、前述の対応配列番号を有する。

【0034】

エフリン受容体の調節されない過剰発現は、腫瘍発生と相関し、腫瘍の成長及び生存に關わり、ヒト癌の進行では血管形成及び転移を伴う。従って、エフリン受容体の発現及び活性の阻害は、腫瘍進行の阻止のために有利である。

【0035】

本発明のさらに別の局面は、エフリン受容体の発現阻害物質及び／又は活性阻害物質の

10

20

30

40

50

使用であって、上記脳腫瘍がグリア芽細胞腫である場合の使用であり、さらに別の局面では、上記脳腫瘍が多形性グリア芽細胞腫である場合の使用である。

【0036】

本発明のさらに別の局面は、エフリン受容体の発現阻害物質及び／又は活性阻害物質の使用であって、上記処理が、術後における、脳腫瘍再発の予防処理となる使用である。

【0037】

本発明のさらに別の局面は、エフリン受容体の発現阻害物質及び／又は活性阻害物質の使用であって、上記処理が、術後における、脳腫瘍再発の治療処理となる使用である。

【0038】

腫瘍血管において発現されるエフリン受容体も、その内在性リガンド、エフリンA1との連結を通じて、血管形成及び腫瘍の新規血管形成に重要な役割を果たす。腫瘍におけるこれらのシグナル伝達は、内皮細胞において、細胞骨格の可塑性、基質付着、及び／又は細胞間接着を調節することによって、該細胞の転移及び毛細管構造への集積を促進する。

【0039】

驚くべきことに、本発明によるエフリン受容体の発現阻害物質及び活性阻害物質は、血管形成及び腫瘍の新規血管形成を阻止し、腫瘍の成長及び術後の再発を抑制する。

【0040】

本発明のさらに別の局面は、エフリン受容体の発現阻害物質及び／又は活性阻害物質の使用であって、上記処理によって脳腫瘍塊の成長が抑制される使用である。

【0041】

本発明のさらに別の局面は、エフリン受容体の発現阻害物質及び／又は活性阻害物質の使用であって、エフリン受容体の上記発現阻害物質及び／又は活性阻害物質が、癌幹細胞増殖の阻害物質となる使用である。

【0042】

本発明の利点はさらに、エフリン受容体阻害が癌幹細胞の転移及び増殖を阻止するという事実によっても証明することが可能である。

【0043】

本発明による医薬組成物のもう一つの利点は、腫瘍塊中の特異的癌幹細胞集団を標的とし、該癌幹細胞だけを選択的に除去し発癌性を消去するよう効果的に設計された、個別の患者に合わせた治療法を提供することが可能となることである。

【実施例1】

【0044】

腫瘍サンプルからの、多形性グリア芽細胞腫由来癌幹細胞 (GBM-CSC) の単離

腫瘍標本は、神経外科治療室から患者の切除手術後に入手した。成人のグリア芽細胞腫 (GBM) 組織サンプルは、世界保健機構ガイドラインに従って入手し、分類した。各癌組織は、二つの組織片に分割した。第1のものは病理組織学的分析のために使用した：詳細には、組織を、4%パラホルムアルデヒドに24時間浸し、次いで、パラフィン包埋し、免疫組織化学検査に供するか、若しくは、40%から始まる連続希釈濃度のスクロース液に入れて浮遊切片を得、共焦点顕微鏡検査に供した。

【0045】

第2組織片は、GBM癌幹細胞系統を得るために使用した。組織は切断して1mm³の小片とし、Gritt A, 1996及びGalli R, 2004 (6.及び5.) に倣って、下記のように、機械的に、酵素的に細かくした：小片を、6ウェルプレート (Nunc) に納めた、0.8mg/mlのパパイン (200U/mL, Worthington)、0.2mg/mLのL-システイン (Sigma)、0.2mg/mLのEDTA (Sigma) を含む4 mLのEBSS液に移し、37℃で45分インキュベートした。次に、組織切片を、焼成研磨パストールピペットで注意深く細かくした。細胞を遠心によって収集し、ばらばらの単細胞を、いわゆる完全培養液、DMEM/F12 (1:1v/v Gibco) 血清無添加培養液に懸濁させて、25cm²組織培養フラスコ (Nunc) に8,000/cm²の密度となるように撒いた。完全培養液は、2mMのL-グルタミン、0.6%グルコース、9.6 µg/mlのブトレッシン、6.3ng/mlのプロゲステロン、5.2ng/mlの亜セレン酸ナトリウム、0.025mg/mlのインスリン、0.1mg/mlのトラン

10

20

30

40

50

スフェリン（ナトリウム塩、II級、Sigma）を、20ng/mLの上皮増殖因子（EGF、Peprotech）及び線維芽細胞増殖因子（FGF2、Peprotech）の存在下に含む。新鮮培養液を4日毎に加えた。

【0046】

撒布後10-20日に、各フラスコに生じた一次球体の数を評価した。次に、球体を、15ml試験管（BD）において192×gで10分遠心することによって収集した。次に、一次球体を機械的に細かくして単一細胞懸濁液とし、再度プレートに撒いて培養した。各系統において通常（2-7）日までに、継代を可能とするほどの新規球体が形成された。

【0047】

これらの細胞系統は、グリア芽細胞腫由来癌幹細胞（又は、腫瘍原発細胞）（GBM-CSC）という名称によって特定された。

10

【0048】

無事に確立された細胞系統から得たGBM-CSCの一部を、完全培養液プラス10%DMSO（Sigma）において、第3、第4サブカルチャー各工程において凍結し、保存した。残余のものはさらに拡張させた。

【0049】

結果：脳腫瘍、特にグリア芽細胞腫は、腫瘍発現能力を持って生まれ、神経幹細胞の機能的特徴によって定義される細胞（GBM-CSC）となる。従って、正常な神経発生の調節機構に関する研究は、GBM-CSCの新規阻害物質の特定を実現し、脳腫瘍に対する、より特異的な治療戦略の開発を導く可能性がある。

20

【実施例2】

【0050】

RT-PCR及び細胞フルオロメトリー分析による、GBM-CSC細胞系統におけるEph受容体発現の定量

制御されていない又は過剰発現Eph受容体は、形質転換、腫瘍の増殖及び生存を増進する可能性がある。ヒトのGBM標本と、その中に含まれるGBM-CSCについて、新鮮単離、連続サブカルチャーの両標本において、エフリン及びエフリン認識受容体の発現と制御を調べた。

【0051】

RNA抽出及びcDNA調製

30

RNeasy Miniキット(Qiagen)を用いて、全体RNAを下記から抽出した：グリア芽細胞腫と診断された、様々な患者から単離されたGBM-CSC細胞系統、新鮮な一次GBM標本、非侵襲性U87細胞（市販のヒト星状細胞腫系統）、及び、正常なヒトの神経幹細胞（HNSC、我々の研究室で取得可能、13.）。

【0052】

cDNAは、Superscript RNase H-逆転写酵素（Gibco）をメーカーの指示に従って用いて得た。cDNA合成のため、1 µgの全体RNAをオリゴdTプライマーに付着させた。

【0053】

PCR増幅

これらのcDNAは、それぞれ個別に、EphA1, EphA2, EphA3, EphA4, EphA5, EphA7, EphA8, EphA10, EphB1, EphB2, EphB3, EphB4, EphB6受容体、及び、EFNA1, EFNA2, EFNA3, EFNA4, EFNA5, EFNB1, EFNB2, EFNB3リガンドの特定のために設計されたPCRプライマーを用いて増幅した。

40

【0054】

鋳型として使用されるcDNAは全て、下記のプライマーペアを22回の増幅サイクルで用いる -アクチンRT-PCRによってあらかじめ正規化した： -アクチンF1(5'-GGCATCGTGATGGA CTCCG-3')及び -アクチンR1(5'-GCTGGAAGGTGGACAGCGA-3')。次に、610bpのPCR産物を、2%アガロースゲルの上に走らせ、1 µgのヒト脳の全体RNA（Ambion）由来のcDNAから得た同じPCR産物に対し信号強度に関して比較した。特異的プライマーを下記のように設計した：

50

• EphA1	順行: 5' - GCC TGA CAC CAC ATA CAT CG - 3'	
	逆行: 5' - ATA TGC GGG TGG CTA AAC TG - 3'	
• EphA2	順行: 5' - AAA GCC GGC TAC ACA GAG AA - 3'	
	逆行: 5' - TTG GAC AAC TCC CAG TAG GG - 3'	
• EphA3	順行: 5' - GAG TTT GCC AAG GAA TTG GA - 3'	
	逆行: 5' - TTG GGA TCT TCC CTC CTC TT - 3'	
• EphA4	順行: 5' - ACC AAG CAG TGC GAG AGT TT - 3'	
	逆行: 5' - CTC CCC GTA CGA CAT CAC TT - 3'	
• EphA5	順行: 5' - CAA GCC TAA TAT GGC GGT GT - 3'	
	逆行: 5' - GTG AAC TGC CCA TCG TTT TT - 3'	10
• EphA7	順行: 5' - ATC ATT GGG AGA AGG CAC TG - 3'	
	逆行: 5' - ATG GAC AAC ATT TGG GTG GT - 3'	
• EphA8	順行: 5' - GAG AAC GGC TCT CTG GAC AC - 3'	
	逆行: 5' - CCT CCA CAG AGC TGA TGA CA - 3'	
• EphA10	順行: 5' - CGA CTA ATG CTC GAC TGC TG - 3'	
	逆行: 5' - TGA TCA AGC AAC TGC CAC TC - 3'	
• EphB1	順行: 5' - CAG GGT ACT CGG AGA AGC AG - 3'	
	逆行: 5' - CCA GCA TGA GCT GGT GTA GA - 3'	
• EphB2	順行: 5' - AGT TCG GCC AAA TTG TCA AC - 3'	
	逆行: 5' - AGG CAG GTG AAT GTC AAA CC - 3'	20
• EphB3	順行: 5' - AGC AAC CTG GTC TGC AAA GT - 3'	
	逆行: 5' - GGA TGA GCT TGT CCA GGG TA - 3'	
• EphB4	順行: 5' - GAG AGC TGT GTG GCA ATC AA - 3'	
	逆行: 5' - TGT AGG TGG GAT CGG AAG AG - 3'	
• EphB6	順行: 5' - TCA TTG CAC ATG GAA AGC AT - 3'	
	逆行: 5' - GGG TGA GTC CAG ACA AGG AA - 3'	
• EFNA1	順行: 5' - GGT GAC TGT CAG TGG CAA AA - 3'	
	逆行: 5' - AGT GGA AGG AGC AGC ACAT - 3'	
• EFNA2	順行: 5' - ATC TAC TGC CCG CAC TAT GG - 3'	
	逆行: 5' - AGG CGT GGC AGA GAT GTA GT - 3'	30
• EFNA3	順行: 5' - CAT GCG GTG TAC TGG AAC AG - 3'	
	逆行: 5' - GTG GAA CTC GTA GCC CAG AG - 3'	
• EFNA4	順行: 5' - ACA TTG TCT GCC CCC ACT AC - 3'	
	逆行: 5' - TGG GCT GAC TCA GAC TTC CT - 3'	
• EFNA5	順行: 5' - AGG ACT CCG TCC CAG AAG AT - 3'	
	逆行: 5' - ATC TGG GAT TGC AGA GGA GA - 3'	
• EFNB1	順行: 5' - GCC TGG AGT TCA AGA AGC AC - 3'	
	逆行: 5' - GAA CAA TGC CAC CTT GGA GT - 3'	
• EFNB2	順行: 5' - GTG CCA AAC CAG ACC AAG AT - 3'	
	逆行: 5' - GAT GTT GTT CCC CGA ATG TC - 3'	40
• EFNB3	順行: 5' - AGG CAG AGG GTG GTT ATG TG - 3'	
	逆行: 5' - TCT CTT TCC ATG GGC ATT TC - 3'	

【 0 0 5 5 】

細胞系統に関するフローサイトメトリー分析

各種GBM-CSC細胞系統におけるEph受容体発現を定量するために、細胞標本（各試験管当たり500,000個の細胞）を遠心し、0.2mLの完全培養液に再懸濁した。次に、細胞を、暗い中4 で30分一次抗体に暴露した。U87細胞を腫瘍細胞に対する参照コントロールとして、HNSCを神経幹細胞の参照コントロールとして用いた。

【 0 0 5 6 】

細胞内染色のために、細胞標本（各試験管当たり500,000個の細胞）を、交互に、0.5mL 50

のCytofix/Cytoperm液 (BD Biosciences) で室温で30分処理することによって透過可能とした。細胞を、2mLのBD Perm/Wash 1X (BD) で洗浄し、室温で10分インキュベートした。遠心後、それらの細胞を、適切な一次抗体混合物を含む0.2mLのBD Perm/Wash液1X (BD) に再懸濁した。

【 0 0 5 7 】

用いた一次抗体は下記の通り：

- ・ 抗EphA1山羊ポリクローナル抗体 (0.3 μ g, R&D)
- ・ 抗EphA2山羊ポリクローナル抗体 (0.5 μ g, R&D)
- ・ 抗EphA3山羊ポリクローナル抗体 (0.3 μ g, Gene Tex)
- ・ 抗EphA5兔ポリクローナル抗体 (0.5 μ g, Abcam)
- ・ 抗EphA7兔ポリクローナル抗体 (0.5 μ g, Abcam)
- ・ 抗EphA8山羊ポリクローナル抗体 (0.5 μ g, Santa Cruz)
- ・ 抗EphB1兔ポリクローナル抗体 (0.5 μ g, Abcam)
- ・ 抗EphB2兔ポリクローナル抗体 (0.5 μ g, Abcam)
- ・ 抗EphB6兔ポリクローナル抗体 (0.5 μ g, Santa Cruz)

10

【 0 0 5 8 】

十分に洗浄した後、0.3mLの適切な二次抗体を加えた：

- ・ 驢馬抗山羊Ig PE標識抗体 (0.2 μ g, Jackson Immunoresearch)
- ・ 驢馬抗兔Ig FITC標識抗体 (0.5 μ g, Jackson Immunoresearch)

【 0 0 5 9 】

20

各サンプルを、暗い中4 で30分インキュベートした。2回の洗浄後、細胞を、0.5mLの完全培養液に再懸濁し、フローサイトメトリーによって分析した。これらのアッセイでは、自発性蛍光及びアイソタイプコントロールの検査を通例として行った。上記全てのアッセイにおいて、分析は、Summit 4.3ソフトウェア使用のフローサイトメトリー検査機Cyan (Coulter) によって実行した。背景蛍光は、特異的一次抗体を、特異的アイソタイプコントロールで置換することによって評価した。さらに、自発性蛍光の測定も、試験した各条件について通例的に行った。

【 0 0 6 0 】

結果：エフリン受容体及びそれらの認識リガンドの過剰発現は、多くのタイプのヒト癌の進行と関連する可能性がある。図1Aに示すように、エフリン受容体 (13種を分析) とリガンド (8種を分析) のメッセンジャーRNA転写物は、通常のPCRによって回収することが可能である。全てのcDNAは、 β -アクチンによってあらかじめ正規化した。腫瘍細胞に対する参照としてヒトの星状細胞腫細胞系統 (U87) を用い、正常神経幹細胞の参照としてヒトの神経幹細胞 (HNSC) を用いた。興味あることに、正常及び癌幹細胞と違って、エフリンA1リガンドは、U87細胞では、メッセンジャーRNA転写物レベルでもタンパクレベルでも回収されない。

30

【 0 0 6 1 】

注目すべきことに、図1B (a) に示すように、GBM-CSCにおけるエフリン受容体の発現がサイトフルオロメトリー分析によってタンパクレベルで裏付けられた。さらに、図1B (b) に見られるように、EphA2が、GBM由来癌幹細胞系統 (n=6) において広く強調される。このヒストグラムは、3回の別々のアッセイの平均 \pm s.e.m. を示す。

40

【 0 0 6 2 】

さらに、代表的GBM-CSC細胞系統におけるEphA2受容体及びエフリンA1リガンドの広範な発現例が図1Cに示される。免疫蛍光標識の共焦点画像は、腫瘍細胞における、EphA2受容体 (a、及び、その局所拡大画像b-c)、及び、エフリンA1リガンド (d、及び、その局所拡大画像e) の存在及び微弱な陽性染色を裏付ける。スケールバーは、40 μ m (a, d); 20 μ m (b, c); 13 μ m (e) である。

【 実施例 3 】

【 0 0 6 3 】

一次GBM組織におけるEphA2受容体発現の定量

50

強化レベルのEphA2がGBM-CSC細胞系統において再現可能であることが明らかにされた後、新鮮腫瘍組織においても免疫反応性EphA2の存在が特定され、これによって、この受容体が単にインビトロで長期に培養されたために生じたものなのかもしれない、という可能性は排除された。

【0064】

一次組織の免疫組織化学検査

免疫組織化学的染色のために、一次GBM腫瘍組織を、採取後、パラフォルムアルデヒド中で24時間固定した。次に、組織を、PBSに溶解した10%、20%、及び30%スクロース液において4℃で凍結しないように冷却保存し、次いで、2:1(v/v)の20%スクロース/Tissue-Tek OCT包埋化合物混合物(embedding compound mixture)において一晚包埋工程(embedding step)処理した。クライオスタットで10ミクロン厚の連続切片に切り出し、ゼラチン被覆スライドガラスにマウントし、二重免疫標識を実行した。手短に言うと、切片を空気乾燥し、0.005% BSA及び0.1%トリトンを含む0.1M Tris-HClバッファー(pH7.6)で濯ぎ、一次抗体と、4℃で一晩インキュベートした(13.)。

【0065】

組織切片は、山羊抗ヒトEphA2(1:50、R&D)抗体、又は、モノクローナルマウスIgG1抗ヒトEphA2クローンD7抗体(1:100、Sigma)によって染色した。

【0066】

一次組織のフローサイトメトリー

前述の酵素的消化及び機械的分離の直後に、一次腫瘍標本から単離した細胞懸濁液に対し、EphA2受容体発現に関してFACS分析を行った。手短に言うと、GBM組織解離から得られる細胞をLDS 751(10ng/mL, Molecular Probes)によって室温で15分染色して無傷の有核細胞を特定した。細胞をフローサイトメータ(FACS Aria, BD Biosciences)によって分析し、バックゲーティング技術(LDS751陽性細胞)を用いて、FSC対SSCドットプロットにおいて、無傷の有核細胞を特定する領域(P1)を導出した。無傷の有核細胞を特定するために、7AAD陰性細胞を含む領域に領域(P1)を加えることによって複合ゲートを創出した。次に、陽性/死亡細胞を特定するために、GBM組織解離から得られたCSCを、山羊抗ヒトEphA2(0.5 µg, R&D)及び7AAD(5 µg/mL, Coulter)とインキュベートした。

【0067】

結果：グリオーマ患者から得られた一次グリオーマ及びその隣接する「正常」(周辺)部分におけるEphA2受容体の局在を調べるために免疫組織化学法を用いた。図2の上部パネルに示す結果は、腫瘍の中心部(a)の方が、悪性度の低い周辺部(b)(少なくとも2 cm 中心部から離れている)よりもEphA2信号がより高まっていることをはっきりと示す。スケールバーは50 µm。同じ図の下部パネルに示すように、サイトフルオロメトリー分析によって、EphA2受容体タンパクは、速やかに解離されたGBM-CSCにおいても患者の腫瘍から構造的に回収、検出された(n=4)(矢印)。

【実施例4】

【0068】

可溶性ephrinA1-Fc(R&D)及び可溶性EphA2-Fc受容体(R&D)の、ヒトGBM-CSCにおけるEphA2発現及びリン酸化に及ぼす作用

リガンド誘発性受容体変性によって、EphA2発現の低下が起こることがあり、これは、細胞外基質(ECM)に対する細胞接着性の上昇、細胞転移の低下、及び悪性増殖の抑制をもたらす。従って、GBM-CSC細胞におけるこの受容体の過剰発現は、細胞の悪性行動に反映されると考えられ、ephrinA1-Fcによる該受容体への結合は、発癌性に対抗すると考えられる。

【0069】

この観点から、GBM-CSCにおいて、EphA2の発現又は活性の強制的抑制の、発癌性に及ぼす作用を定量した。EphA2受容体に結合させてその発現を下げ、それが、これらの細胞の全体機能特性の調節にどのように影響するのかを、インビトロ及びインビボで定量した。EphA2には、可溶性ephrinA1-Fc、マウスephrinA1-ヒトIgG1Fcキメラタンパクを結合させ

た(engaged)。さらに、EphA2は、そのキナーゼ活性が、リガンド結合に完全に依存するものではないという点で、Eph受容体の中でも特異であるようである。EphA2の、このリガンド独立作用は、悪性進行を左右する影響プロセスにおいて重要である。

【0070】

それとは別に、内在性EphA2リン酸化阻止の作用を、EphA2-Fc受容体--受容体の細胞外リガンド結合部分を、ヒトIgG1のFc部分に融合させたキメラタンパクで、これも周辺リガンドと競合的に結合する--を用いて分析した。

【0071】

サイトフルオロメトリー分析

用量-反応分析のために、機械的解離の直後に、ephrinA1-Fcの存在下に(0.001, 0.01, 0.1, 0.5, 1.0 µg/mL)、細胞を撒き、24時間インキュベートした。継時分析のために、細胞を、ephrinA1-Fc(1.0 µg/mL)と6、24、48、72時間インキュベートした。

【0072】

細胞標本(500,000細胞/サンプル)を遠心し、0.2mLの完全培養液に再懸濁した。次に、細胞を、抗EphA2山羊ポリクローナル抗体(0.5 µg, R&D)に、暗い中4で30分暴露した。十分洗浄した後、驢馬抗山羊Ig FITC標識抗体(0.56 µg/サンプル、Jackson Immuno research)を加え、各試験管を、暗い中4で30分インキュベートした。2回の洗浄後、細胞を、0.5mLの完全培養液に再懸濁し、フローサイトメトリーによって分析した。これらの全てのアッセイにおいて、常法に従って、自発性蛍光及びアイソタイプコントロール(isotype control)を行った。

【0073】

免疫細胞化学

細胞は、Cultrex被覆12-mm直径ガラス製カバースリップ(Trevigen)に、 2.5×10^4 細胞/cm²の密度となるように、コントロールとして完全培養液にて、若しくは、ephrinA1-Fcの存在下に(0.5, 1.0 µg/mL)撒き、24時間インキュベートした。細胞は洗浄し、4%パラフォルムアルデヒドPBS液pH7.4中で固定し、免疫染色を実行した。カバースリップは、10%正常山羊血清(NGS)又は10%牛胎児血清(FBS)、0.3% TritonX-100、及び適当な一次抗体又は抗血清(兔抗ヒトエフリンA1, 1:50 Abcam、山羊抗ヒトEphA2, 1:50 R&D)を含むPBSにおいて4で一晩インキュベートした。それとは別に、細胞は、マウスのモノクローナルIgG1 EphA2クローンD7(1:100, Sigma)によって免疫染色した。

【0074】

PBSで十分に洗浄した後、細胞は、暗い中室温(RT)で、下記の適当な二次抗体と45分反応させた:

- ・ Cyanine Cy2又はAlexa-Fluor 488接合山羊抗兔(1:200, Jackson Immuno research, 1:2000, Invitrogen)
- ・ Cyanine Cy3又はAlexa-Fluor 546接合驢馬抗山羊(1:500, Jackson Immuno research, 1:2000, Invitrogen)
- ・ Ciannine Cy3接合山羊抗マウス(1:800, Jackson Immuno research)

【0075】

洗浄後、細胞核を、4,6-ジアミジン-2-フェニルインドールジヒドロクロリド(DAPI、50g/mlのPBS溶液、Sigma)によって室温で10分カウンター染色し、PBS中で3度、蒸留水中で1度濯ぎ、Fluorsave(Calbiochem)と共にガラススライドにマウントした。

【0076】

一次及び二次抗体に対する適切なコントロールにおいて、非特異的染色及び抗体同士の交差反応のいずれも検出されなかった。

【0077】

画像は、Zeiss Axioplan2顕微鏡及びLeica DMIRE2共焦点顕微鏡によって分析した。

【0078】

ウェスタンブロット

細胞は、解離後直ぐ、ephrinA1-Fc 5.0 µg/mL又はEphA2-Fc 5.0 µg/mLの存在下に完全

10

20

30

40

50

培養液に撒き、10、30、60分、及び24時間インキュベートした。細胞はさらに、Cultrex被覆 (Trevigen) フラスコに撒き、その分化を、EGF/FGF2の除去及び白血病阻害因子の添加 (LIF 10ng/mL) によって誘発し、7-10日間インキュベートした。次に、細胞を、再懸濁し、遠心し、分解した。分解バッファーは、1%プロテアーゼ抑制因子カクテル (Sigma) 及び10%フォスファターゼ抑制因子カクテル (Roche) を添加した、50mM Tris-HCl pH7.4、1mM EDTA、及び、1% TritonX-100から構成される。細胞を収集し、PBSで洗浄し、14.460 × gで遠心した。タンパクの定量は、一連のアルブミン標準使用のDC Protein Assay (Bio-Rad) によって行った。70 µgの各分解産物にゲル負荷バッファーを加え、タンパクは、標準プロトコールに従って、10%ポリアクリルアミドゲルによって溶解し、Hybond ECL ニトロセルロース膜 (GE) 上に移動させた。膜は、Trisバッファー生理的食塩水 (TBS)-T (TBSプラス0.02% Tween20) 及び5%ミルクでブロックし、下記の一次抗体と4 で一晩インキュベートした：

- ・ IgG山羊抗ヒトEphA2 (1:750, R&D)
- ・ IgG1マウス抗ヒトEphA2クローンD7 (1:500, Sigma)

【0079】

この工程に次いで、西洋わさびペルオキシダーゼ (HRP) を接合させた下記の二次抗体 (1:10,000; Bio-Rad) と30分インキュベートした：

- ・ 驢馬抗山羊IgG (1:5000, Promega)
- ・ 兎抗マウスIgG (1:10,000, GE)

【0080】

ペルオキシダーゼ活性は、化学蛍光強化システム (GE) をメーカーの指示に従って用いることによって検出した。負荷コントロールとして、マウス抗グリセルアルデヒド-3-フォスフェートデヒドロゲナーゼ (GAPDH) 抗体 (1:500, Zymed) を用いた。

【0081】

免疫沈降

細胞は、ephrinA1の不在下又は存在下 (1.0, 5.0 µg/mL) に、若しくは、マウスモノクローナルIgG1異性体コントロール (isotype control) (R&D) の不在下又は存在下に24時間育成し、次いで前述の通りに分解した。EphA2リン酸化のレベルを定量するために、100 µgの総タンパクを含む細胞分解物をマウス抗ヒトEck/EphA2 (1:500, Upstate) と、ゆっくりと掻き回しながら4 で一晩インキュベートした。メーカーの指示に従って、ビーズ (DynaL Invitrogenビーズ分離) を分解バッファーによって十分に洗浄し、免疫複合体を、2x LDSサンプルバッファー (Invitrogen) によって溶出し、煮沸し、短時間遠心した。タンパクを溶解し、マウス4G10白金抗ヒトフォスフォチロシン (1:1000, Upstate) 使用のウェスタンブロットによって検出した。

【0082】

結果：リガンド誘発性受容体内部移行 (ligand-induced receptor internalization、細胞内移動) の低下及び変性は、このタンパクの安定性を増し、EphA2の過剰発現に寄与すると考えられる。受容体リン酸化と、それに続く受容体の低減の結果として発癌性シグナル伝達の抑制を含むephrinA1-Fcには、二重の腫瘍抑制機能が認められる。

【0083】

図3Aの細胞フルオロメトリー分析は、ephrinA1-Fcが、ヒトGBM-CSCにおいて、EphA2受容体下降を介して発癌性シグナル伝達を抑制することを明瞭に示す。ephrinA1-Fcの抑制作用は、用量依存性か時間依存性かのいずれかである。数値は、2回の測定の平均値 ± s.e.m. を表す。

【0084】

さらに、図3Bの上部パネルに掲げるように、GBM-CSCで行ったヒトEphA2に関する免疫蛍光検査は、細胞の多くが、受容体に関しては陽性であるが(a)、一方、ephrinA1-Fc 1.0 µg/mL後(b)及び5.0 µg/mL後(c)では、同じ抗原に関してごく僅かな細胞しか標識されなかったことを裏付ける。スケールバーは20 µmである。同じ図の中央パネルにおいて、全細胞分解産物のウェスタンブロットによって、ephrinA1-Fc処理GBM-CSCにおいて、EphA2受

10

20

30

40

50

容体の発現の低下がタンパクレベルで確認された。注目すべきことに、プロットは、ephrinA1-Fc介在によるEphA2受容体の招集は、濃度 / 時間依存的に、GBM-CSCにおけるEphA2発現を著明に下げることが裏付けられる。細胞は、ephrinA1-Fcの不在下(-)又は存在下(+)に表示の期間育成した。定量される免疫反応タンパクの濃度は60分以内に完全に排除された。このことは、その認識リガンドによるEphA2の結合が、受容体の急速な陥入と一致することを示唆する。ヒトの線維芽細胞系統(HF)を、EphA2抗体の陰性コントロールとして用いた。GAPDHを、分解産物と等しい負荷コントロールとして含める。提示のデータは、3種の異なるGBM-CSC系統の内の1つの代表例である。

【0085】

ephrinA1-Fcは、GBM-CSCにおいて、EphA2受容体のリン酸化及び変性をトリガーする。ephrinA1-Fcによる処理後の免疫沈降によって評価されるように(図3B、下部パネル)、GBM-CSCにおいてチロシンリン酸化EphA2の濃度レベルは急激に増加する。これは、ephrinA1-Fc介在性の受容体活性化を示す。解離後直ぐに、細胞は、漸増濃度のephrinA1-Fcか、又はFc異性形コントロール(isotype control)によって48時間処理した。全細胞分解産物に対する、免疫沈降EphA2レベルのフォスフォチロシン特異的(4G10)抗体によるイムノプロットは、ephrinA1-Fcによる、EphA2の活性化及びリン酸化の上昇を裏付ける。最後に、図3Cに示すように、EphA2-Fc処理は、GBM-CSCにおいて、EphA2タンパクの発現を下げるというよりむしろ内在的EphA2のリン酸化を阻止すると考えられる。安静GBM-CSC、及び、表示の期間EphA2-Fc(5.0 µg/mL)によって活性化されたGBM-CSCに対しウェスタンブロット分析を行った。

【0086】

分化GBM-CSCにおいてEphA2受容体の発現レベルが検出されなかったことに注意。これは、EphA2受容体が、GBM癌幹細胞の発癌性、例えば、異常増殖及び転移の調節に与るという可能性を示している。表示の免疫プロットは、それぞれ異なる時期に分析された3回のプロットの代表例である。

【実施例5】

【0087】

インビトロにおける、ephrinA1-Fc又はEphA2-Fc受容体のヒトGBM-CSC増殖に対する作用

EphA2の下方制御 / リン酸化強化、又はその認識リガンドとの競合結合が、GBM-CSCの発癌性に影響を及ぼすかどうかを決定するために、ここでは、最重要な幹細胞のパラメータ、例えば、分裂の全体的対称性に対する、ephrin A1-Fc及びEphA2-Fcの細胞分裂抑制作用を分析した。成長の活性状態におけるGBM-CSC細胞を、可溶性ephrinA1-Fc又はEphA2-Fcに暴露し、次いで、動態からの偏差を評価した。

【0088】

成長曲線

GBM-CSC細胞の増殖指数を分析するために、神経球懸濁液を、15mLの試験管(BD)に移し、192×gで10分遠心し機械的に細かくして、単一細胞懸濁液とした。トリパンブルー排除によって細胞をカウントし、 8×10^3 細胞/cm²の生細胞を、マウスのモノクローナルIgG1アイソタイプコントロール(R&D)、ephrinA1(0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 又は5.0 µg/mL)、又はEphA2-Fc(5.0 µg/mL)の存在下に撒いた。次いで、サブカルチャー工程(0 DIV)で得られた全細胞数をプロットした。各サブカルチャー継代(4-6日置き)において、単一細胞懸濁液を得、生細胞の全数をトリパンブルー排除によってカウントした。 8×10^3 細胞/cm²の生細胞を同じ条件下に再度撒いた。これによって、動態パラメータ(kinetic parameter)(成長曲線勾配、Gritti A, 2001を参照)(7.)の定義が得られるので、CSC-HNSC拡大率、腫瘍細胞に対する参照コントロールとして使用されるU87細胞、神経幹細胞の参照コントロールとして使用されるHNSCの定量において上述の組み換えタンパクの役割の指標が得られる。

【0089】

ephrinA1-Fc及びEphA2-Fc処理の結果が真正幹細胞に対し作用を及ぼすかどうかを評価するために、急性解離細胞(acutely dissociated cells)による増殖分析を、GBM-CSCに

ついて、(前述のように)それらを一次腫瘍組織標本から単離して直ぐにEphA2-Fc(5.0 $\mu\text{g/mL}$)の存在下にサブカルチャーすることによって実行した。

【0090】

K167免疫反応性

この研究は、K167分析(1.)による増殖指数の定義によって補完した。手短に言うと、細胞を、EGF/FGF2の存在下に、Cultrex被覆(Trevigen)ガラス製カバースリップに撒き、ephrinA1-Fc(0.5,1.0 $\mu\text{g/mL}$)に24時間暴露した。増殖細胞は、IgG兔ポリクロナール抗K167(1:1000,Novocastra)による間接的免疫細胞化学法によって定量した。Cy2山羊抗兔二次抗体を上述のように使用した(1:200,Jackson Immunoresearch)。各フィールドの細胞の全数は、4,6-ジアミジン-2-フェニルインドールジヒドロクロリド(DAPI、Sigma,50g/mlのPBS溶液)によって室温で10分細胞核をカウンター染色することによって定量した。

【0091】

BrdUアッセイ

増殖は、メーカー(Roche)によって提供された説明書に従ってBrdU比色アッセイキットを用いて監視した。手短に言うと、GBM-CSCを、96ウェルマイクロプレートに5000細胞/ウェルの密度で撒いた。この細胞を、エフリンA1(0.001, 0.01, 0.1, 0.5, 1.0 $\mu\text{g/mL}$)に24時間暴露し、その後、BrdU(1:10)に24時間暴露した。細胞増殖指数は3重に評価した。

【0092】

結果：図4Aの成長動態実験によってはっきり示されるように、ephrinA1-FcリガンドによるEphA2受容体の活性化及び急速な内部移行(internalization)は、GBM-CSC系統の増殖指数を大きく下げる。アイソタイプコントロール(Fc)による細胞成長に比べ、培養下のGBM-CSCに対するephrinA1-Fcの添加後には、成長動態における様々な違いが(a-c)、ヒトの神経幹細胞添加後では同様の(d)、U87ヒトグリオーマ系統(e)とは相違する変化が検出された。ephrinA1-Fcは、濃度依存的にGBM-CSC細胞の増殖を減衰させる。成長曲線は、3種のGBM-CSC系統を代表する。(f) ephrinA1-Fcと共に育成した細胞に対し、EphA2-Fcは、GBM-CSCの成長動態の大きな低下を誘発することが示された。このデータはまたしても、GBM-CSCプールの消失におけるephrinA1-Fc及びEphA2-Fcの機能的役割を示唆すると考えられる。図示のグラフは全て3回の実験を代表する。fの成長曲線は、一つのGBM-CSC細胞系統を代表する。

【0093】

図4Bに報ずるように、BrdUの取り込み(a)も、K167免疫反応細胞(b)のいずれも、表示の濃度の可溶性リガンドの存在下では大きく低下した。ephrinA1-Fcは、U87細胞の増殖に対しては何ら抑制作用を発揮しなかった。aは、一つのGBM-CSC細胞系統を表す。表示のデータは、4回の独立実験の平均 \pm s.e.m.である。

【0094】

図4Cは、GBM-CSC細胞を、一次腫瘍組織標本から単離後直ぐにEphA2-Fc(5.0 $\mu\text{g/mL}$)に暴露すると、培養下のそれらの細胞の拡張が阻止されることをはっきりと示す。二つの急性解離GBM-CSC細胞系統由来の神経球の、EphA2-Fcの不在下(a,c)又は存在下(b,d)における位相差顕微鏡画像は、クローン形態の明瞭な差を示す。未処理GBM-CSC由来クローンは、典型的な円形形態を呈するのに、一方、EphA2-Fc処理後に得られた神経球は、不規則な形状を持ち、細胞接着の増大、及び恐らくは細胞分化を示唆する、たくさんの突出長尺細胞の存在によって特徴づけられる(n=4)。バー、50 μm 。

【実施例6】

【0095】

可溶性ephrinA1-Fc又は可溶性EphA2-Fc受容体の、ヒトGBM-CSCのクローン形成能及び自己再生能に及ぼす作用

GBM-CSCの自己再生能--癌幹細胞が、自己の複数のコピーを一定時間に生産する能力と定義される--は、それらの細胞の振る舞いがどの程度活動的であるかの予測指数となる。

ここでは、分裂の全体対称性を左右する重大な幹細胞パラメータ、例えば、関連自己再生活性を分析した。

【0096】

ephrinA1-Fc又はEphA2-Fc暴露後の自己再生指数を、クローン原性アッセイ及びGBM-CSC細胞仕分けによって評価した。

【0097】

クローン原性アッセイ

単一クローンの解離によって得られたGBM-CSC系統をカウントし、1000生細胞/ウェルを、L-ポリリシン被覆(0.1mg/mL, Sigma) 24ウェルプレートに撒いた。7-10日後、生成された二次球の数を評価した(7.)。細胞を、マウスのモノクローナルIgG1アイソタイプコントロール(R&D)、ephrinA1-Fc(0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 5.0 µg/mL)、又はEphA2-Fc(5.0 µg/mL)の存在下に撒いた。幹細胞コントロールとしてHNSCを用いた。

【0098】

細胞仕分け

2×10^6 個のGBM-CSC細胞を遠心し、DNアーゼ(1:1000、最終濃度1 µg/mL, Sigma)添加の、0.5mLの完全培養液に再懸濁した。

【0099】

次に、96マルチウェルプレートの各ウェルの単一細胞仕分けのために、単一細胞仕分けモード及びACDU(Automated Cell Deposition Unit--自動化細胞集積機)を用いて、GBM-EphA2受容体陽性又は陰性細胞を仕分けし、分析した(FACSAria、BD Biosciences)。

【0100】

FACS Ariaには、488、633、及び紫色レーザーが装備される。細胞は、前進及び直交光散乱信号によって特定され、電子的に開門通過される。抗EphA2に結合する細胞を表す事象は、その光散乱(FSC及びSSC)及び蛍光サイン(FITC)によって特定される。最大3種の細胞集団が同時に仕分けされた。機器の生データは、記録保存及びデータ処理のために電子的に保存された。

【0101】

細胞撒布の10-14日後(DAP)、各ウェルにおいて生成された一次球の数(クローン効率)を評価した。

【0102】

結果: 図5Aに示すように、ephrinA1-Fcは、インビトロのヒトGBM-CSCにおいて全体的分裂対称性及び関連自己再生能に影響を及ぼす。

【0103】

方法に記述された連続的クローン原性アッセイにおいて、コントロールFcと共に育成させた細胞に比べ、表示濃度の可溶性ephrinA1-Fcによって刺激されたGBM-CSCは、より低いクローン効率を表すことが示され、それは、HNSCには近似するが、U87細胞とはまったく異なっていた。EphA2のリガンド介在性活性化は、神経前駆体クローン形成のパーセント(クローン効率)を用量依存的に低下させた。コラムは、3回の別々のアッセイの平均であり、バーは、s.e.m.である。

【0104】

さらに、ephrinA1-Fcは、インビトロのGBM細胞において形態変化を誘発する。二つのGBM-CSC系統培養体から得られた、図5Bに掲げる神経球の位相差顕微鏡写真は、ephrinA1-Fcのクローンサイズに及ぼす作用をはっきりと示す。(a,d)安静(resting)コントロール、(b,e)ephrinA1-Fc 0.5 µg/mL、(c,f)ephrinA1-Fc 1.0 µg/mL。これは、GBM-CSCブールの消失におけるephrinA1-Fcの関与を裏付けるものと考えられる。注目すべきことに、ephrinA1-Fcの飽和用量(5 µg/mL)は、HNSCの神経球形成を完全に阻止した(データ図示せず)。スケールバー100 µm (a-c); 50 µm (d-f)。

【0105】

最後に図5Cに掲げるように、EphA2/細胞仕分けを実行したところ、インビトロにおいて、EphA2陽性サブ集団は、EphA2陰性細胞に対し、クローン原性が顕著に高かった。コラ

10

20

30

40

50

ムは、5回の別々のアッセイの平均であり、バーは、s.e.m.である。

【実施例 7】

【0106】

可溶性 ephrinA1-Fc 又は可溶性 EphA2-Fc 受容体の、発癌性 GBM-CSC プールに及ぼす作用

エフリンA1-Fc及びEphA2-Fc処理の結果が、波及的関与 (wave committed) の前駆細胞ではなく、真正の幹細胞に影響を及ぼすかどうかを評価するために、ephrinA1-Fc及びEphA2-Fcの、GBM-CSC副集団 (SP) に及ぼす作用を調べた。

【0107】

さらに、EphA2-Fc刺激GBM-CSC (5.0 µg/mL、24時間) を、神経幹細胞、脳腫瘍幹細胞、及び癌幹細胞 / 発癌細胞集団マーカーの発現に関して、FACSによってその特徴を明らかにした。

10

【0108】

副集団

このSP細胞は、二重波長分析のドットプロットにおいて特徴的低蛍光尾部によって特定され、研究対象とするGBM-CSC (関門通過生細胞の1.41%・対・骨髄の0.03%) において検出された。ベラパミル--Hoechst 33342排出を仲介する特異的ABCトランスポーターを抑制することが知られる薬剤--によるGBM-CSC処理は、この集団を消滅させた。細胞は、Moflo (Coulter) において、350nm UV光による励起後、二重波長分析 (青、450-465nm; 赤、630-730nm) を用いて分析した。細胞は、5.0 µg/mLのephrinA1-Fc又はEphA2-Fcの存在下に24時間育成し、次いで、DMEM/F12、プラス、DNアーゼ (1 µg/mL, Sigma)、BSA (2mg/mL, Sigma)、ヘパリン (4 µg/mL, Sigma)、及びEDTA (200 µg/mL, Sigma) において最終濃度が 2×10^6 /mLとなるように再懸濁した。次に、GBM-CSCを、2 µg/mLのHoechst 33342染料 (Invitrogen) によって、時折掻き回しながら37 °で2時間放置して標識した。抑制コントロールとして、カルシウムチャンネルブロッカー・ベラパミル (Sigma) を、Hoechst 33342による標識前に、最終濃度が50 µMとなるように加え、室温で10分インキュベートした。

20

【0109】

インキュベーション終了時、細胞を冷却下に遠心し、氷冷PBSに再懸濁した。ヨウ化プロピジウム (PI) (2 µg/mL、最終濃度、Sigma) を加え室温で5分放置し、次いで、蛍光活性化細胞仕分け (FACS) 分析を行った。これは、死細胞・対・生細胞の区別を可能とする。

30

【0110】

ABCトランスポーター遺伝子ABCG2 (Bcrp1とも呼ばれる) は、マウス骨髄及びその他の組織中のSP表現型の主要介在因子の一つである。我々は、マウスモノクローナルIgG2b抗体 (1:50, eBioscience)、及びalexa Fluor 488接合二次山羊抗マウス抗体 (1:2000, Invitrogen) を用い、前述のように免疫蛍光染色試験を行って、GBM-CSC細胞においてABCG2タンパクを検出した。

【0111】

フローサイトメトリーによる免疫表現型プロファイリング

フローサイトメトリー分析は前述のように行った。下記の一次接合抗体を用いた。

40

- ・マウス抗CD133-PE接合 (0.25 µg, MACS)
- ・マウス抗CD44-PE接合 (20 µL/1x10⁶ 細胞、BD)
- ・マウス抗CD184-CXCR4-APC接合 (20 µL/1x10⁶ 細胞、BD)
- ・マウス抗CD81-TAPA1-FITC接合 (20 µL/1x10⁶ 細胞、BD)
- ・マウス抗CD15 SSEA1-FITC接合 (20 µL/1x10⁶ 細胞、BD)
- ・マウス抗CD117-cKit-PE接合 (0.2 µg, BD)

【0112】

細胞は暗い中室温で30分インキュベートし、洗浄し、0.5mLの完全培養液に再懸濁し、フローサイトメトリーによって分析した。これらのアッセイでは、自発性蛍光及びアイソタイプコントロールを常法として、これらの分析において実行した。

50

【0113】

結果：図6に明瞭に記載されるように、GBM-CSC SPは、ephrinA1-Fc及びEphA2-Fcによる処理によって完全に消失又は激減した。

【0114】

Hoechst 33342単独、又は、100 $\mu\text{mol/L}$ のベラパミルと組み合わせてHoechst 33342によって細胞を標識し、次いでフローサイトメトリーによって分析した。可溶性リガンド又は受容体のいずれかによって処理したGBM-CSCは、ベラパミル存在下と同様、検出不能の副集団細胞を示した。図示のデータは、少なくとも2回の独立した実験の代表的ドットプロットである。

【0115】

EphA2-Fcは、癌幹細胞又は腫瘍原発細胞において、副集団の増加に関与すると考えられる。いくつかのマーカーの発現量又は発現パターンは、EphA2-Fc刺激後減少した（データ図示せず）。

【実施例8】

【0116】

可溶性ephrinA1-Fc又は可溶性EphA2-Fc受容体の、ヒトGBM-CSC多能性に及ぼす作用

幹細胞の資格を持つためには、GBM-CSCは多能性でなければならない。そこで、ephrinA1-Fc又はEphA2-Fc処理後のGBM-CSCにおいて、より分化した表現型が獲得されるかどうかを調べるために分化実験を行った。ephrinA1-Fc又はEphA2-Fcの不在下又は存在下に育成したクローン小球において、蛍光信号強度に関して細胞蛍光測定を行った。

【0117】

フローサイトメトリー

自己再生アッセイによって得られたクローン球に対しFACS分析を行い、神経マーカー発現を、系統特異的マーカーを用いて評価した。

【0118】

星状細胞（グリア繊維状酸性タンパク、GFAP）、神経細胞（III-チューブリン）、及び希突起神経膠細胞（ガラクトセレブロシドC, GalC）の定量には、虹色校正粒子混合物（8ピーク）、3.0-3.4 μm （BD Biosciences）を校正のために用い、細胞標識の強度は、当量フィコエリスリン分子量（MEPE）又は当量フルオレセイン分子量（MEFL）として表した。手短に言うと、細胞内染色のために、細胞は、1.0又は5.0 $\mu\text{g/mL}$ のエフリンA1の存在下に撒き24時間放置し、次いで再懸濁し、0.5mLのCytofix/Cytoperm液（BD）と室温で30分インキュベートすることによって膜透過させた。細胞を、2 mLのBD Perm/Wash 1x（BD）によって洗浄し、室温で10分インキュベートした。遠心後、この細胞を、適切な一次抗体混合物を含む0.2mLのBD Perm/Wash 1x（BD）に再懸濁した。膜抗原のために、細胞は、0.2 mLの培養液に再懸濁し、次いで、下記の一次抗体と4で30分インキュベートした：兔ポリクローナル抗GFAP（1:400, Dako Corporation）、マウスモノクローナル抗III-チューブリン（1:400, Babco）、及び、マウスモノクローナル抗GalC（1:400, Chemicon）。細胞は、洗浄し、二次抗体に+4で30分暴露した。細胞内抗原の場合は、二次抗体は、1:800山羊抗兔Ig FITC標識抗体又は山羊抗マウスIgG R-PE標識抗体（BD）であり、一方、膜抗原の場合は、1:1000 FITC接合F(ab')₂山羊抗マウスIgM又はFITC接合山羊抗マウスIgM（Jackson ImmunoResearch）を用いた。十分に洗浄した後、細胞を再懸濁し、フローサイトメトリーによって分析した。

【0119】

結果：図7に示すように、コントロールFcに対し、可溶性リガンド及び受容体は共に、GBM-CSCにおいて明瞭な形態的变化を誘起した。蛍光信号強度の細胞蛍光測定法を用いることによって、ephrinA1-Fcによって刺激された細胞は、グリア（GFAP）の免疫反応性に関して当量フルオレセイン分子量において用量依存性増加を示すことが明らかになった。インビトロにおいて、ephrinA1-Fc及びEphA2-Fcは、より成熟した表現型の獲得を誘発し、これらの表現型は、主に星状膠細胞様運命を辿るので、発癌性GBM-CSCプールを衰滅する。ヒストグラムは三重測定値の平均 \pm s.e.m.を示す。

10

20

30

40

50

【実施例 9】

【0120】

可溶性ephrinA1-Fc又は可溶性EphA2-Fc受容体の、ヒトGBM-CSCのアポトーシス又は細胞周期に及ぼす作用

細胞周期分析及びBrdU/DNA分析及び検出

細胞周期分析のために、 1×10^6 細胞 / サンプルを、ephrinA1-Fc (5 μ g/mL) 又はEphA2 (5 μ g/mL) の存在下に6、24、48時間培養した。次に、細胞を、20 μ Mの5-ブromo-2-デオキシウリジン (BrdU, 1:500, Sigma) に37 で20分暴露し、70%エタノールPBS液で固定し、4 に維持し染色に備えた(3.)。DNAは、1 mLの3N HCl、20分RT (室温) によって変性し、得られたペレットを、1%BSA (Sigma) を含む1 mLの0.5% Tween-20 (Sigma) とRTで15分インキュベートした。次に、細胞を、抗BrdUモノクローナル抗体 (1:10、BD) と暗い中RTで60分インキュベートした。使用した二次抗体は、Alexa 488山羊抗マウスIgG (1:500、Invitrogen) である。次に、細胞を、2.5 μ g/mLのヨウ化プロピジウム (PI) のPBS液、及び7 μ LのRNアーゼ (3mg/mL) の水溶液に再懸濁し、暗い中4 で一晩染色した。各サンプルで少なくとも30000個の細胞について、FACSCalibur (BD Biosciences) を用いて、2-パラメータBrdU/DNA分析を行い、データはSummit 4.3ソフトウェアを用いて分析した。

【0121】

末端デオキシヌクレオチジルトランフェラーゼ介在dUTP-FITCニック末端標識アッセイ (TUNEL)

アポトーシスは、TUNELアッセイキット (Roche Diagnostics) を、2パラメータフローサイトメトリーに関するメーカーの指示に従って用いることによって測定した。分析は、FACSCalibur (BD Biosciences) で行い、データは、Summit 4.3ソフトウェア (Coulter) を用いて分析した。

【0122】

結果 : FACS-Tunel 及びBrdUによって測定すると、コントロール細胞に対し、可溶性リガンド、可溶性受容体のいずれも、細胞死 / アポトーシスを誘発せず、又は、GBM-CSC及びHNSCの細胞周期相を変えない (データ図示せず)。

【実施例 10】

【0123】

可溶性ephrinA1-Fc又は可溶性EphA2-Fc受容体の、GBM-CSCの拡散及び移動、及び、包含される関連細胞内経路に及ぼす作用

EphA2の過剰発現又は活性消失は、GBM-CSC細胞浸襲においても組み込まれた介在因子であり、細胞骨格修飾又は持続的リン酸化、及びFAK及びその他の細胞内経路のキナーゼ活性を引き起こす。

【0124】

細胞の運動性は、細胞骨格の修飾に依存するので、GBM-CSCの細胞骨格再編成及び形態変化を阻止することによる、ephrinA1-Fc及びEphA2-Fcの発癌抑制機能は、Fアクチンリング束を示す細胞の頻度をファロイジン (phalloidin) によって測定することによって評価した。

【0125】

さらに、血管細胞の運動性及び浸襲能の調節における可溶性リガンド又は受容体の有効性も定量した。

【0126】

細胞骨格マーカーの免疫染色

GBM-CSCを、ephrinA1-Fc (5.0 μ g/mL) 又はEphA2-Fc (5.0 μ g/mL) の不在下又は存在下に、Cultrex被覆ガラス製カバースリップ (12mm直径) に、 2.5×10^4 細胞/cm²の密度で撒き、5及び30分放置した。Fアクチン染色のために、細胞を、4%パラフォルムアルデヒドに20分放置して固定し、0.1%(v/v)Triton-X 100によって膜透過させ、Alexa555標識ファロイジン (1:40, Invitrogen) と室温で30分インキュベートした。

【0127】

移動性アッセイ

浸襲度アッセイは、Pennacchietti 2003(10.)に倣って、24ウェル・トランスウェルチェンバー（8- μ mポアサイズ、6.5mm、0.33cm²、Corning Costar）において実行した。フィルターの上面にはCultrexをコートし、 1×10^5 のヒト皮膚微少血管内皮細胞（HMVEC）を、EphA2-Fc（5.0 μ g/mL）の不在下又は存在下に1.5 mLのDMEM/F12に撒いた。下方分画には、移動の陽性刺激として、血管内皮増殖因子（VEGF、20ng/mL）、又は、GBM-CSC細胞調整培養液（ 1×10^6 細胞撒布後1日の培養液から採取した1mL）を用いた。刺激は、EphA2-Fcの不在下又は存在下に、2.6mLのDMEM/F12基礎培養液に溶解してフィルターの上面に加えた。

【0128】

撒布後7-14日、フィルター上面の細胞は機械的に除去し、下面に移動したものを固定し、DiffQuick（Dade Behring）をメーカーの指示に従って染めた。細胞の移動度は、デンストメータスキャナーによって得た体積密度値によって評価した。

【0129】

ウェスタンブロット

ephrinA1-Fc又はEphA2-Fc処理の、GBM-CSCの悪性態様に与える影響の結果を定量するために、細胞を、ephrinA1-Fc（1.0又は5.0 μ g/mL）又はEphA2-Fc（5.0 μ g/mL）の存在下に撒き、適当時間インキュベートし、次いで分解した。手順は全て前述の通りに行った。

【0130】

下記の一次抗体を用いた：

- ・ 兔抗フォスフォ FAK (Tyr576/577, Tyr 925) (1:1000, Cell Signaling)
- ・ 兔抗ヒト全体 p42/p44 MAPK (ERK1/2) (1:1000, Cell Signaling)
- ・ 兔抗ヒトフォスフォ ERK1/2 Thr202/Tyr204) (1:1000, Cell Signaling)
- ・ 兔抗フォスフォ Akt (Ser473) (1:1000; Cell Signaling)
- ・ 兔抗フォスフォ mTOR (Ser2481) (1:1000, Cell Signaling)
- ・ 兔抗フォスフォ PI3K p85 (Tyr458)/p55 (Tyr199) (1:1000, Cell Signaling)
- ・ 兔抗ヒト E-カドヘリン (1:1000, Cell Signaling)
- ・ マウス抗ヒトゲルソリン (1:1000, Sigma)

【0131】

この工程に続いて、驢馬抗兔HRP（1:10,000, GE）及び兔抗マウスHRP（1:10,000, GE）とインキュベートした。

【0132】

組織コントロールとして、ヒト脳タンパク混合物（70 μ g, Clontech）、又は、ヒト脳腫瘍全タンパク分解産物LYS054（70 μ g, Abserotech）を用いた。

【0133】

さらに、ERK1/2のリン酸化物は免疫細胞化学法によっても検出した。細胞は、ephrinA1-Fc（5.0 μ g/mL）又はEphA2-Fc（5.0 μ g/mL）の不在下又は存在下に、Cultrex被覆（Trevigen）ガラス製カバースリップに撒き、1、6、及び24時間放置した。安静細胞（resting cells）、又は、MEK1/2抑制剤U0126（10 μ M 2時間、Cell Signaling）で前処理した細胞をコントロールとして用いた。免疫細胞化学試験は、兔ポリクロナール抗フォスフォ-MAPK(t202/y204)(1:1000, Cell Signaling)、及び、Alexa Fluor 488 IgG（1:2000, Invitrogen）を用いて前述の通りに行った。

【0134】

結果：可溶性受容体、可溶性リガンドのいずれも細胞拡散を阻止する。接着及び拡散は、アクチン及び微少管細胞骨格の二つの変化に相伴って進行する。図8Aに掲載される細胞骨格再編成から、高い移動性表現型を有し、Cultrexの上に広く拡散する未処理のGBM-CSC細胞（a）は、平らな多角形形態によって特徴付けられ、それらは、良く組織された（well-organized）アクチン細胞骨格、ストレス線維に高密度に配置される比較的多数のFアクチンフィラメント、及び線維芽細胞様形態を伴うことがはっきりと見てとれる。（b-d挿入画像）、GBM-CSC態様に特徴的なリング状アクチン束。逆に、ephrinA1-Fc（e）及びEphA2

10

20

30

40

50

-Fc (f) 処理細胞は、円形を持続し、双極性細長細胞によって特徴付けられ、拡散はせず、比較的無秩序な微少管を提示し、細胞・細胞接触部に焦点的Fアクチン陽性を伴う。大パネルのバーは5 μ m ; 小パネルのバーは10 μ m。

【 0 1 3 5 】

図8Bの上部パネルに示されるデータは、EphA2活性化は、インビトロにおいて、細胞の接着、拡散、及び移動を抑制し、FAKの急速な不活性化及び脱リン酸化を誘発する可能性のあることを裏付ける。細胞は、ephrinA1-Fcの不在下 (-) 又は存在下 (+) に、表示の期間育成し、次いで分解した。処理細胞のチロシン残基576/577又は925におけるリン酸化FAKの発現低下は、ウェスタンブロットによってタンパクレベルで評価した。もっとも著明なレベルは、処理後60分及び24時間に観察された。FAKは再びチロシンリン酸化される。負荷コントロール：GAPDH。

10

【 0 1 3 6 】

注目すべきことに、図8B (下部パネル) に掲げるCultrex浸襲アッセイによって示されるように、EphA2発現内皮細胞のインビトロ移動も、組み換えEphA2-Fcの投与によって高度に抑制された。血清無添加HMVECをチェンバーの頂上に撒き、フィルターの下面に向かって6時間移動させた。(a) コントロールとして基礎培養液に懸濁したHMVEC。下部分画のVEGF (20ng/mL) 添加又はGBM-CSC調整培養液を、それぞれ、チェンバー上面のEphA2-Fc (5.0 μ g/mL) の不在 (b, c) 又は存在 (e, f) と組み合わせる。上面のコントロールヒトIgGは、VEGFに反応する細胞移動に影響を及ぼさない。膜の下面に移動した細胞を、方法に記載したように、固定、染色した。スケールバーは200 μ m。

20

【 0 1 3 7 】

最後に、ephrinA1-Fc及びEphA2-Fcは、GBM-CSCにおいて、ERK1/2のリン酸化によってMAPキナーゼ依存性経路の活性化を起動する可能性のあることが示された。図8Cの共焦点免疫蛍光画像によって示されるように、Fc処理コントロール (a) に比べると、リン酸化ERK1/2陽性出現頻度の特異的な急激増加が、育成培養液にEphA2-Fc (c) 又はephrinA1-Fc (d) の添加後6時間に検出可能であった。観察される陽性の平均レベルは24時間安定であった。(b) ERK基質部位における可溶性リガンド及び受容体介在性リン酸化は、U0126-MEK1活性化の化学的抑制因子、によって細胞を前処理することによって阻止される。スケールバーは20 μ m。同じ図の下部パネルに掲載されるウェスタンブロット分析は、ephrinA1-Fc濃度の上昇は、GBM-CSCにおいてERK1/2活性化を強化することを裏付ける。GAPDHをサンプル負荷のコントロールとして用いた。ephrinA1-Fcは、Akt及びmTORの強い活性化が検出されたことから (図示せず)、MAPKの下流へのシグナル伝達を強化する可能性さえあることが考えられる。

30

【 実施例 1 1 】

【 0 1 3 8 】

BMP4は、GBMにおいて、インビトロでもインビボでも、癌幹細胞プールの消滅をもたらす分化促進カスケードを誘導する (11.)。下記に、BMP4及びephrinA1-Fcの併用処理の作用を述べる。

【 0 1 3 9 】

リアルタイムPCR

40

GBM-CSC細胞を、組み換えヒトBMP4 (100ng/mL, R&D) に48時間暴露した。全体RNA及びcDNAを前述に倣って取得し、次いで、EphA2発現の定量分析を行った。定量的RT-PCR反応を、Brilliant SYBR Green QPCR Core Reagent Kit (Stratagene) を用いて3重に実施した。SYBRグリーン染料は、いずれのPCR産物にも結合するので、配列特異的プローブの使用を要しない。蛍光発光をリアルタイムで記録した (Chromo 4 Four-Color Real-Time PCR Detector, MJ)。遺伝子発現プロファイリングは、相対的定量化の比較Ct法を用いて完了した。RNAの相対量は、2つの内在コントロールであるGAPDH及び18SリボソームRNA (18S rRNA) に対して正規化した。

【 0 1 4 0 】

成長曲線：

50

GBM-CSCを、ephrinA1-Fc (1.0 μ g/mL又は5.0 μ g/mL) の存在下に、および、それぞれ、BMP4 (100 ng/mL, R&D)、又は白血病阻害因子 (LIF, 10ng/mL, Chemicon)--ヒトCNS幹細胞継代 (progeny) における神経分化の強力な調節因子--の存在下に撒いた。細胞増殖指数を上述の成長曲線分析によって評価した。

【0141】

結果：図9に示すように、rhBMP4暴露は、分化およびGBM-CSCプールの消滅を通じて、GBM-CSCにおけるEphA2タンパクの降下を加速する。(a) 特異的プライマーによるQRT-PCR分析から、rhBMP4処理細胞では、GAPDH正規化EphA2転写物は、対応コントロールに比べ減少することが明らかになった。ヒストグラムは、2種類のGBM-CSC系統による3回の異なる実験で定量した正規化平均 \pm s.e.m. を示す。さらに、図9(b)に掲げるように、rhBMP4は、GBM-CSC及びHNSC増殖に対するephrinA1-Fc抑制作用を誘発する。成長動態の違いが、rhBMP4の不在下又は存在下にephrinA1-Fcと共に育成されたGBM-CSC細胞の間に検出された。即ち、前者は、より速い成長率によって特徴付けられ、後者は、低速で分裂するGBM-CSCを含む。bにおける成長曲線は、一つのGBM-CSC系統を代表する。同じ結果がLIF刺激後にも得られた(データ図示せず)。

10

【実施例12】

【0142】

ヒトGBM-CSCの皮下 (s.c.) 異種移植腫瘍の成長に及ぼすephrinA1-Fc及びEphA2-Fc投与の作用

EphA2の過剰発現は腫瘍発生の原因となることが知られる。さらに、分裂の全体的対称性及び関連自己再生能などの、上に分析したGBM-CSCの幹細胞の重要なパラメータは、これらの細胞の腫瘍原発性能と直線的に相関する。ephrinA1-Fc又はEphA2-Fcによる、EphA2発現又は活性の下降作用をインビボで調べた。

20

【0143】

この実験では、発癌性GBM-CSCプールのインビトロ低下は、ephrinA1-Fc又はEphA2-Fc処理細胞の、インビボにおける腫瘍形成能力における同様の低下と関連するかどうかを、皮下 (s.c.) 異種移植において評価した。

【0144】

s.c. 注入には、免疫機能不備の無胸腺nu/nuマウス (雌3-4週齢、Charles River) を用いた。ヒトGBM皮下腫瘍異種移植は、100 μ LのPBSを、等容量のCultrex (Trevigen) と混ぜた混合液に 3×10^6 hGBM-CSC細胞を懸濁し、23ゲージ針を用いて、レシピエントマウスの右横腹に注入することによって確立した。

30

【0145】

マウスは7-35日監視し、試薬は、1 \times / 日を35日間、GBM-CSC注入部位の近傍に投与した (腫瘍辺縁注入)。

【0146】

M - C S S の腫瘍発現能の低下、及び、腫瘍確立と成長の阻止における可溶性リガンド / 受容体の能力を試験するために、動物を下記の群にランダムに割り当てた。

- ・コントロール-ベヒクル：細胞移植後、100 μ Lの生理的食塩水を腫瘍周辺部位に注入した、

40

- ・ephrinA1-Fc (同時処理群)：細胞の移植と、同時に、100 μ Lの、生理的食塩水に溶解したephrinA1-Fc液 (10 μ g/用量) の腫瘍周辺注入が伴った。

- ・ephrinA2-Fc (同時処理群)：細胞の移植には、100 μ Lの、生理的食塩水に溶解したEphA2-Fc液 (10 μ g/用量) の腫瘍周辺注入が伴った。

- ・EphA2-Fc (移植後処理群)：細胞移植後、細胞を7-10日育成し、次いで、マウスに、100 μ LのEphA2-Fcの腫瘍辺縁注入を行った (移植後腫瘍形成) (10 μ g/用量)。

【0147】

処理に対する腫瘍成長率の変化を評価するために、腫瘍測定値は週に一度ノギスによって定量し、絶対体積の外、それを1日目 (投与を開始) の個別腫瘍体積に対し正規化して表した。

50

$V \text{ (mm}^3\text{)} = \frac{1}{6} \times a \times b \times c$

【0148】

同じ期間に亘って動物の体重を定量し、分析した。コントロール、ephrinA1-Fc及びEphA2-Fc処理動物由来のGBM-CSC腫瘍異種移植片を切り出し、上述のように固定し、冷凍保存した。10ミクロン厚の連続切片を下記の抗体 / 抗血清によって免疫標識した：マウスIgG1抗ヒト核 (1:100, Chemicon)、マウスIgG1抗ヒトミトコンドリア (1:50, Chemicon)、及びマウスIgG2抗ヒトHLA-abc (1:100, Dako)。これは、腫瘍のヒト性を確認するためである。兎IgG抗Ki67 (1:1000, NovoCastra) を増殖指数検出のために用いた。切片を、十分に濯いだ後、適当な二次抗体：山羊抗マウス又は抗兎IgG Alexa Fluor 488-546 (1:1000, Invitrogen) と共に室温で1時間インキュベートした。切片を洗浄し、Fluorsaveでカ

10

【0149】

ヘマトキシリン・エオジン染色及び免疫組織化学検査を実行した。サンプルは、Zeiss Axiophot-2蛍光顕微鏡及びLeica DMIRE2共焦点顕微鏡によって観察し、撮影した。コントロール実験では、一次抗体又は抗血清を省略するか、又は、正常の非免疫血清を使用した

【0150】

結果：図10に明瞭に示されるように、ephrinA1-Fc又はEphA2-Fcの投与は、ヒトGBM-CSCの腫瘍発現能、及びマウス皮下モデルにおける腫瘍進行を強力に抑制した。ephrinA1-Fc / EphA2-Fcのインビボ送達

20

【実施例13】

【0151】

GBM-CSCのephrinA1-Fc及びEphA2-Fcに対するインビトロ暴露が、それらの細胞の同所性異種移植組織形成能に及ぼす作用

30

可溶性受容体及びリガンド分子の癌の成長における抗癌効力 (EphA2による発現又は活性の低下) を評価するために、より臨床との関連性の高い同所性腫瘍モデルを用いた。

【0152】

上記s.c.モデルにおいて得られた結果を裏付け、発展させるために、前処理実験を行った。可溶性リガンド又は受容体 (5.0 µg/mL) に対する48時間の暴露後、GBM-CSC (ルシフェラーゼのリポーター遺伝子に感染させたもの、Luc-GBM-CSC) を、scid/bgマウスの線条体に注入した。この実験により、エフリンリガンドに対する一過性の暴露が、GBM-CSCの発癌性を低下 / 阻止するかどうかを知ることができる。

【0153】

GBM-CSCのレンチウイルス感染

40

GBM-CSCを、リポーター遺伝子の蛍光ルシフェラーゼによって感染させた。

新規生成レンチウイルスベクター--そこでは、二方向性合成プロモーターによって二つのmRNAの協調的転写が仲介され、効率的二遺伝子転移が可能とされる、ベクターを用いた (2.)。

【0154】

このプロウイルスベクターは、上流側接続の、ヒトのサイトメガロウイルス (mCMV) 由来の最少コアプロモーター要素と、反対方向において、ヒトのフォスフォグリセレートキナーゼ (PGK) 由来の効率的プロモーターとから構成される二方向性プロモーターから成る。このベクターデザインは、プロモーター遺伝子として蛍光ルシフェラーゼ (f-luc) 及び緑色蛍光タンパク (GFP) を利用可能とし、これらは下記のために使用される：i) イン

50

ビトロでは、FACSによって、限界希釈によって、又は、インビボで、Ivis Imaging Xenogen分析によって導入遺伝子発現細胞を濃縮すること；ii)インビボで、脳の内部における腫瘍細胞の分布を簡単に監視すること。293T細胞に対し4-プラスミドを一過性同時トランスフェクションし超遠心によって濃縮することによって、VSV疑似型第3世代LVが生産される。ベクターの発現力価は、HeLa細胞において限界希釈法によって推定した。ベクターの粒子は、HIV-1 gag p24 antigen immuocaptureによって測定した。ベクターの感染能は、各ベクターについて力価と粒子の間の比として計算した。GBM-CSC細胞を、トランスフェクト293T細胞の一晩育成培養液の上清に16時間暴露した。次に、ウィルスを含む培養液を排除し、新鮮培養液 (luc-GBM-CSC) で置換した。

【 0 1 5 5 】

感染効率は、GFP発現細胞をカウントするか、又は、インビボLumina分析のいずれかによって評価した。

【 0 1 5 6 】

発光細胞は、完全培養液において5000細胞から100細胞へ連続希釈し、黒色、透明底部付き96ウェルプレート (Nunc) に撒いた。D-ルシフェリン (ONE-Glo、ルシフェラーゼアクセシシステム、Promega) を、各ウェル (100 μ l の完全培養液に再懸濁した、単一細胞を含む) に1:1(v/v) で加え、3分後に画像を撮影した。撮影時間は、1分 / プレートである。

【 0 1 5 7 】

GBM-CSCの、scid/bgマウス線条体への移植

Luc-GBM-CSC細胞を、ephrinA1-Fc (5 μ g/mL) 又はEphA2-Fc (5 μ g/mL) の不在下又は存在下に撒き、48時間後に同所性注入した。

【 0 1 5 8 】

DNアーゼ (1:1000, Sigma) 添加DMEMに撒いた 1×10^5 細胞 / μ L懸濁液の3 μ Lを、Hamiltonシリンジに接続したガラス電極による脳定位注入によって右側線条体へ送達した。脳実質の最適コンプライアンスを確保するため、注入は全て、6分という期間で行った。

【 0 1 5 9 】

動物は、正常生理的食塩水溶液として、ケタミン塩酸塩 (8mg/mL) 、キシラジン (0.8mg/mL) 、及び、14.25%のエチルアルコールを含む保存液、0.2ml/kgを腹腔内に注入することによって麻酔した。

【 0 1 6 0 】

麻酔されたマウスの頭部を、70%エチルアルコールとポビドンヨードの溶液で消毒した。頭部背面に正中切開を施し、頭蓋骨膜を外側に反転しブレグマを露出した。

【 0 1 6 1 】

2mmのドリル孔を作製した。硬膜を破らないように注意した。

【 0 1 6 2 】

下記の座標 (ブレグマからのmm) を用いた：前後 (AV) = 0；内外側 (ML) = +2.5mm；背腹側 (DV) = -3.0mm、頭蓋表面から。微量注入針を撤収し、皮膚は、4-0 Vicrylによって閉じた。動物は、神経学的機能不全の何らかの兆候がないかどうか毎日監視した。

【 0 1 6 3 】

Xenogen IVIS Luminaシステムによる腫瘍成長の評価

腫瘍の形成、拡張、及び体積は、インビボLumina分析 (Xenogen) で撮影した連続画像によって、数回 / 週、間接的に計算し、試薬処理をしないGBM細胞を移植されたコントロール動物のものと比較した。

【 0 1 6 4 】

メーカーの指示に従って、インビボ画像のために、画像撮影の15分前に、基質D-ルシフェリン (Caliper) を、動物に、PBS溶液として150mg/Kgで腹腔内注入によって投与し、次いで麻酔した (2.5%イソフルオラン) (8.) 。

【 0 1 6 5 】

次にマウスを、遮光カメラボックス内の温めた載物台の上に置き、2%イソフルオランに連続暴露した。画像撮影時間は、腫瘍成長と時点に依存して、自動モードで20秒から1分

10

20

30

40

50

に亘った。

【0166】

蛍光測定は、細胞接種後第1週の終わりから第6週まで、週に一度行った。

【0167】

発光性腫瘍から発射された低レベルの光は、IVIS™ カメラシステムによって検出し、積分し、デジタル化し、表示した。表示画像における興味の領域 (ROI) は、腫瘍部位の周囲に特定され、Living Imageソフトウェア (Xenogen) によって全体フラックス (フォトン/秒) として定量した。

【0168】

組織切片に対する免疫組織化学検査

6週後動物を屠殺した。屠殺した動物に、100mLの0.15M NaClによって経心臓灌流 / 固定を行い、次いで、4% PFAを含む0.1Mリン酸カリウムバッファー (KBS)、250mLを、Watson-Marlowペリスタルティックポンプを用いて120 mmHg圧で注入した。その後、前述のように、脳を固定し冷凍保存した。

【0169】

ヘマトキシン・エオジン (H&E) 染色及び免疫組織化学検査を実行した。10ミクロン厚の連続切片を前述のように処理した。組織切片においてヒト腫瘍細胞を回収するために、我々は、ヒト特異的抗体：マウスIgG1抗ヒトミトコンドリア (1:50, Chemicon)、マウスIgG1抗ヒト核 (1:100, Chemicon)、マウスIgG2a抗ヒトHLA-abc (1:100, Dako) のいずれかを用いるか、若しくは、我々は、ルシフェラーゼ (マウスIgG1 1:25, Invitrogen)、又は、ベクター中に存在するリポーター遺伝子緑色蛍光タンパク (GFP, 1:500, Mol Prob

10

20

【0170】

腫瘍細胞の増殖、分化、及び新規血管形成は、下記の抗体 / 抗血清使用の免疫組織化学検査によって評価した：兔抗GFAP (1:500, Dako)、抗K167 (1:200, Novocastra)、マウス抗ヒトPCNA (1:1500, Sigma)、ラット抗CD147 (1:600, serotech)、兔抗NG2 (1:300, Chemicon)。腫瘍体積及び拡張は連続再構築 (serial reconstruction) によって計算した。

【0171】

組織切片はさらに、下記の一次抗体によって染色した：

山羊抗ヒトEphA2 (1:50, R&D)、モノクローナルマウスIgG1抗ヒトEphA2クローンD7 (1:100, Sigma)、兔ポリクローナル抗ヒトエフリンA1 (1:50, Abcam)、兔抗ヒトフォスフォ・エフリンB (Tyr324/329) (1:100, Cell Signaling)、山羊抗エフリンB2 (1:10, R&D)、山羊抗ヒトエフリンB3 (1:10, R&D)、兔抗フォスフォ (S339) CXCR4 (1:100, Abcam)、山羊抗ヒトWnt5a (1:10, R&D)、兔抗ヒトE-カドヘリン (1:100, Cell Signaling)。

30

【0172】

結果：図11に示すように、luc-GBM-CSC細胞を、scid/bgマウスの線条体に移植する前に、ephrinA1-Fc又はEphA2-Fc (5.0 µg/mL) にイン・ビトロで48時間暴露すると、腫瘍発現能は劇的に低下した。図11Aに掲げられる発光監視は、腫瘍からの対応的シグナル増加を明瞭に示す。GBM腫瘍の成長は、EphA2-Fc又はephrinA1-Fcによって処理されたluc-GBM-CSC発光系統では強力に抑制される。腫瘍は、細胞注入後7日から始めて週に1度、インビボ画像撮影によって監視した。グラフは、6匹のマウスから成る3群における平均 ± s.e.m.を示す。さらに、図11Bは、安静GBM-CSC、及びEphA2-Fc又はephrinA1-Fcで前処理したGBM-CSCの頭蓋内注入後、インビボで検出される腫瘍成長及び腫瘍サイズの違いを示す。移植注入された3匹の代表的scid/bgマウスから経時的に取られた背面画像を示す。腫瘍部位における経時的相対変化を示すため、疑似カラスケールバーは全ての背面画像に適用される。

40

【0173】

図11Cに掲げられる、同所性移植6週後に取られた共焦点画像によると、未処理luc-GBM-CSCから得られた腫瘍 (a) は、ルシフェラーゼ特異的免疫染色によって示されるように、

50

ephrinA1-Fc処理 (b) 及びEphA2-Fc処理 (c) の細胞から得られる腫瘍よりも効率的に脳実質に広がり、侵襲する。連続記録切片の免疫組織化学画像から得られる腫瘍サイズを、対応するBLI測定値と相関の程度を調べるために比較した (データ図示せず)。スケールバー、1 mm。

【実施例 14】

【0174】

あらかじめ確立された同所性腫瘍に対する、ephrinA1-Fc及びEphA2-Fcの、局所的・直接的微少灌流の作用

同様の方法を用いて、腫瘍成長のEphA2調節に及ぼす作用をインビボで調べた。これによって、EphA2受容体の活性化又は発現の状態と、GBM-CSCの発癌性との間に明瞭な相関を、特に、この二つのパラメータの間に逆相関を定義することが可能となるかも知れない。これによってさらに、インビボにおけるEphA2調節を、患者の腫瘍におけるhGBM-TCSCプールに対する有力な治療ツールとして使用する可能性を定めることが可能となるかも知れない。

【0175】

ephrinA1-Fc又はEphA2-Fcを注入するミニアルゼットポンプの、scid/bgマウス線条体への埋設

Luc-GBM-CSC同所性注入の10日後、即ち、腫瘍は実質的サイズを持つが、運動又は行動異常を引き起こすことはない時点で、ミニ浸透圧ポンプ (Alzet) の脳内カテーテルを、同じ穿頭孔からマウス線条体に挿入した。

【0176】

Alzetポンプは、塩スリーブ (salt sleeve) と呼ばれるポンプ内部の区画と、ポンプが埋設される組織環境の間の浸透圧差によって動作する。塩スリーブの高い浸透圧のために、水は、ポンプの外面を覆う半透膜を通じてポンプの中に入る。水が塩スリーブ中に入るにつれて、その水は、弾力的貯留槽を圧迫し、ポンプから試験液を指定の調節速度で移動させる。

【0177】

メーカー (脳灌流キット) の指示に従って、EphA2-Fc (30 µg) 又はephrinA1-Fc (30 µg) のPBS液、100 µLを貯留槽に入れ、14日間灌流した (0.25 µL / 時)。送達用量は1.8 µg / 日であった。

【0178】

動物は毒性の兆候がないかどうか注意深く監視した。腫瘍の形成、拡張、及び体積は、上述のように、インビボLumina分析 (Xenogen) で撮影した連続画像から、数回 / 週、間接的に計算した。灌流マウスは、処理無し (100 µLのPBS液) でGBM細胞を投与されたコントロールマウスの結果と比較した。

【0179】

カテーテル設置の2週後 (GBM-CSC注入の4週後)、マウスを屠殺した。経心臓灌流 / 固定、切除後固定・調整、及び免疫組織化学検査は、処理前の脳内実験に記載される。

【0180】

結果：図12は、GBM-CSC移植の7-10日後、細胞注入部位でscid/bgマウスの線条体に埋設されたミニアルゼットポンプによるephrinA1-Fc又はEphA2-Fcの連続投与が、腫瘍成長を抑制 (post-treatment) することを示す。scid/bgマウスの右側線条体にLuc-GBM-CSCを注入し、14日後、腫瘍が一定体積に達した時点で、ミニ浸透圧ポンプの脳内カテーテルを、同じ穿頭孔を通じてマウス線条体に挿入した (矢印：浸透圧ポンプの埋設)。腫瘍担持マウスに対し、EphA2-Fc、ephrinA1-Fc、又はコントロール-ベヒクルを、毎日の送達用量1.8 µg / 日で14日間注入した。腫瘍細胞移植後7日目から始めて週に一度の発光監視を実行した。EphA2-Fc、ephrinA1-Fc処理群はいずれも、コントロール群の発光値の増加とは対照的に、21日目まで正規化発光値の低下を示す。各マウスの発光値は、治療開始時に得られた対応読み取り値に対して正規化した。グラフは、6匹のマウスから成る3群における平均 ± s.e.m. を示す。

10

20

30

40

50

上記説明及び前述の実施例から、本発明によって記載され、取得される産物によって実現される利点は明白である。

【 0 1 8 1 】

参考文献

- 1.Alo PL, Visca P, Mazzaferro S, Serpieri DE, Mangoni A, Botti C, Monaco S, Carbone M, Zaraca F, Trombetta G, Di Tondo U (1999) Immunohistochemical study of fatty acid synthase, Ki67, proliferating cell nuclear antigen, and p53 expression in hyperplastic parathyroids (「細胞核抗原を増殖する脂肪酸合成酵素Ki67、及び、過形成副甲状腺におけるp53発現に関する免疫組織化学研究」). *Ann Diagn Pathol* 3:287-293. 10
- 2.Amendola M, Venneri MA, Biffi A, Naldini L (2005) Coordinate dual-gene transgenesis by lentiviral vectors carrying synthetic bidirectional promoters (「二方向性合成プロモーターを担持するレンチウイルスベクターによる、協調的二遺伝子導入」). *Nat Biotechnol* 23:108-16.
- 3.Erba E, Bergamaschi D, Bassano L, Damia G, Ronzoni S, Faircloth GT, D'Incalisi M (2001) Ecteinascidin-743 (ET-743), a natural marine compound, with a unique mechanism of action (「独特の作用機序を有する天然海洋化合物Ecteinascidin 743 (Et-743)」). *Eur J Cancer*; 37:97-105.
- 4.Gale NW, Yancopoulos GD (1997) Ephrins and their receptors: a repulsive topic? (「エフリンとその受容体：不快な話題か？」). *Cell Tissue Res* 290:227-41. 20
- 5.Galli R, Binda E, Orfanelli U, Cipelletti B, Gritti A, De Vitis S, et al. (2004) Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma (「ヒト・グリア芽細胞腫から、癌幹細胞様神経前駆体の単離とその特徴」). *Cancer Res*; 64(19): 7011-21.
- 6.Gritti A, Parati EA, Cova L, Frolichsthal P, Galli R, Wanke E, Faravelli L, Morassutti DJ, Roisen F, Nickel DD, Vescovi AL (1996) Multipotential stem cells from the adult mouse brain proliferate and self-renew in response to basic fibroblast growth factor (「成体マウス脳から得られた多能幹細胞、の線維芽細胞増殖基本因子に応答した、増殖と自己再生」). *J Neurosci* 16:1091-1100.
- 7.Gritti A, Galli R, A.L. V (2001) Cultures of Stem Cells of the Central Nervous System (「中枢神経系幹細胞の培養」), Humana Press Edition: S. Fedoroff. 30
- 8.Jenkins DE, Hornig YS, Oei Y, Dusich J and Purchio T (2005) Bioluminescent human breast cancer cell lines that permit rapid and sensitive in vivo detection of mammary tumors and multiple metastases in immune deficient mice (「免疫不全マウスにおいて乳腺腫瘍及び複数転移の、高速・高感度のインビボ検出を可能とする発蛍光性ヒト乳癌細胞系統」). *Breast Cancer Res*; 5:R444-54.
- 9.Holland EC (2000) Glioblastoma multiforme: the terminator (「多形性グリア芽細胞腫：ターミネーター」). *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:6242-4.
- 10.Pennacchietti S, Michieli P, Galluzzo M, Mazzone M, Giordano S and Comoglio P M (2003) Hypoxia promotes invasive growth by transcriptional activation of the met proto oncogene (「低酸素は、met癌原遺伝子の転写活性化によって侵襲的成長を促す」). *Cancer Cell* 3:347-361. 40
- 11.Piccirillo SG, Reynolds BA, Zanetti N, Lamorte G, Binda E, Broggi G, et al. (2006) Bone morphogenetic proteins inhibit the tumorigenic potential of human brain tumor-initiating cells (「骨の形態発生タンパクは、ヒト脳腫瘍原発細胞の発癌能力を抑制する」). *Nature*; 444(7120): 761-5.
- 12.Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC, Ludwin SK, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Cairncross JG, Eisenhauer E, Mirimanoff RO (2005) Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma (「グリア芽細胞腫に 50

に対する放射線療法と、同時的、副次的テモゾロマイド投与」)。N Engl J Med; 352(10): 987-96.

13.Vescovi AL, Parati EA, Gritti A, Poulin P, Ferrario M, Wanke E, Frolichsthal-Schoeller P, Cova L, Arcellana-Panlilio M, Colombo A, Galli R (1999) Isolation and cloning of multipotential stem cells from the embryonic human CNS and establishment of transplantable human neural stem cell lines by epigenetic stimulation (「ヒト胎児CNSからの多能幹細胞の単離とクローニング、及び、エピジェネティック刺激による移植可能ヒト神経幹細胞系統の確立」)。Exp Neurol 156:71-83.

【図1A】

	遺伝子	コントロール		GBM-CSCs	
		U87	HNSCs	#1	#7
体細胞	EphA1	-	+	+	-
	EphA2	+	+	+	+
	EphA3	-	+	微弱	+
	EphA4	+	+	+	+
	EphA5	+	-	-	-
	EphA7	+	+	-	-
	EphA8	-	-	-	-
	EphA10	-	-	-	-
	EphB1	-	-	-	-
	EphB2	+	+	+	+
	EphB3	+	+	+	+
	EphB4	+	+	+	+
	EphB6	+	+	+	-
リガンド	EFNA1	-	+	+	+
	EFNA2	-	微弱	+	-
	EFNA3	+	+	+	+
	EFNA4	+	+	+	+
	EFNA5	-	-	-	-
	EFNB1	+	+	+	+
	EFNB2	+	+	+	微弱
	EFNB3	-	+	+	微弱

図1A

【図1B】

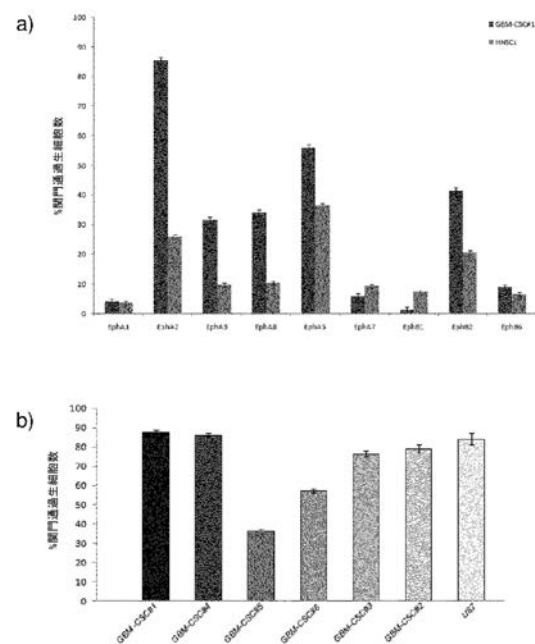


図1B

【図 1 C】

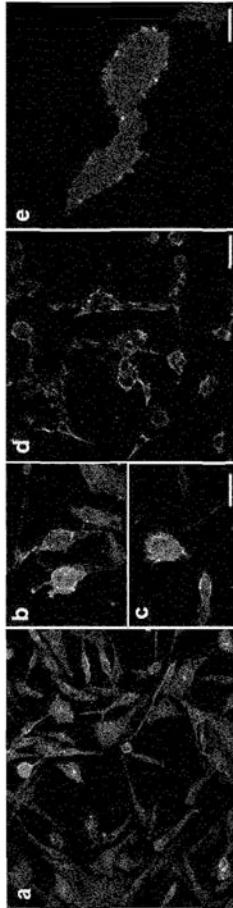


図1C

【図 2】

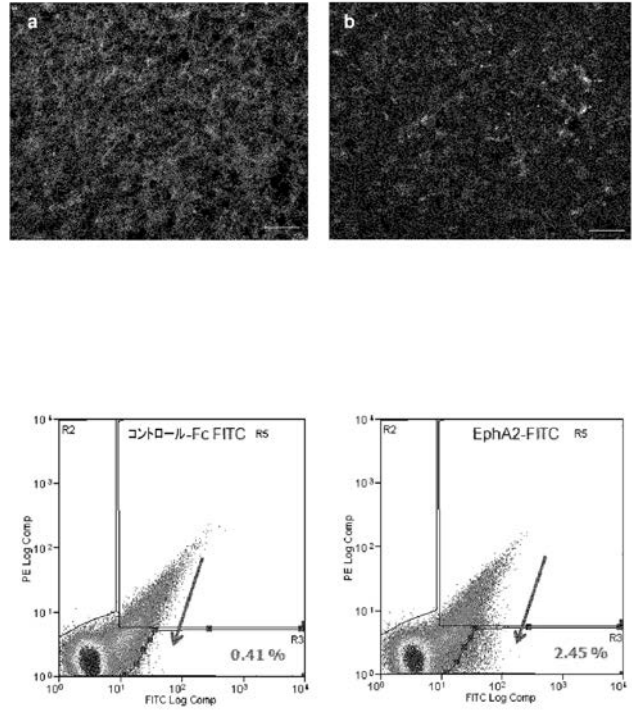


図 2

【図 3 A】

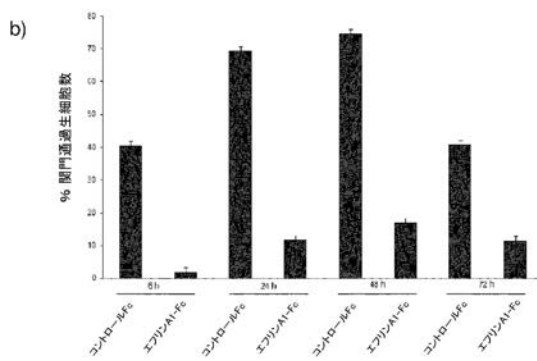
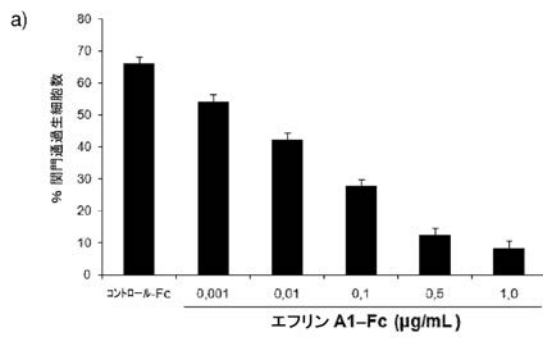


図3A

【図 3 B】

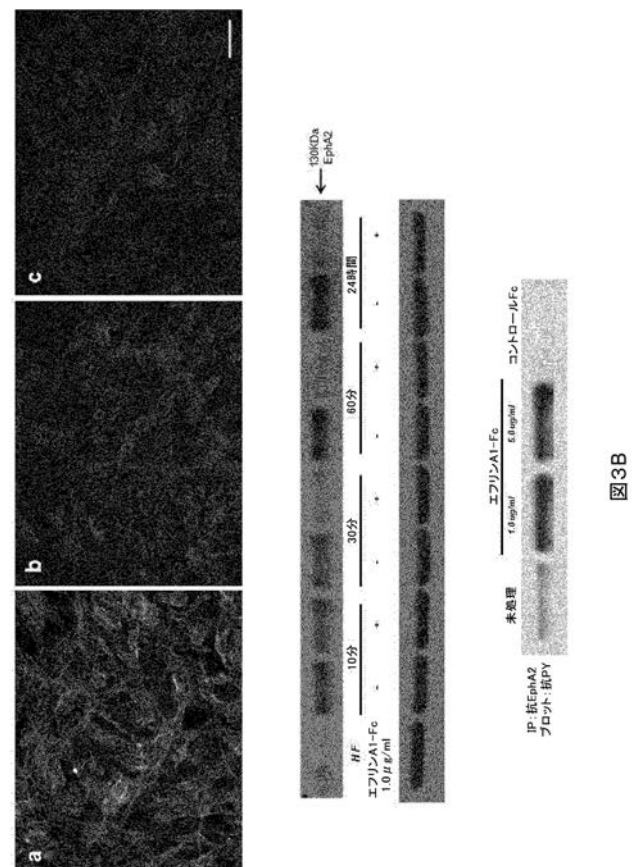


図3B

【図 3 C】

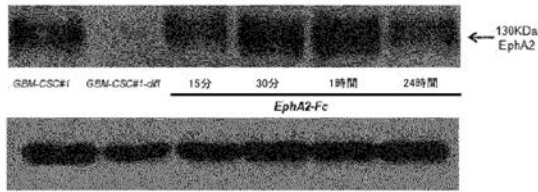


図3C

【図 4 B】

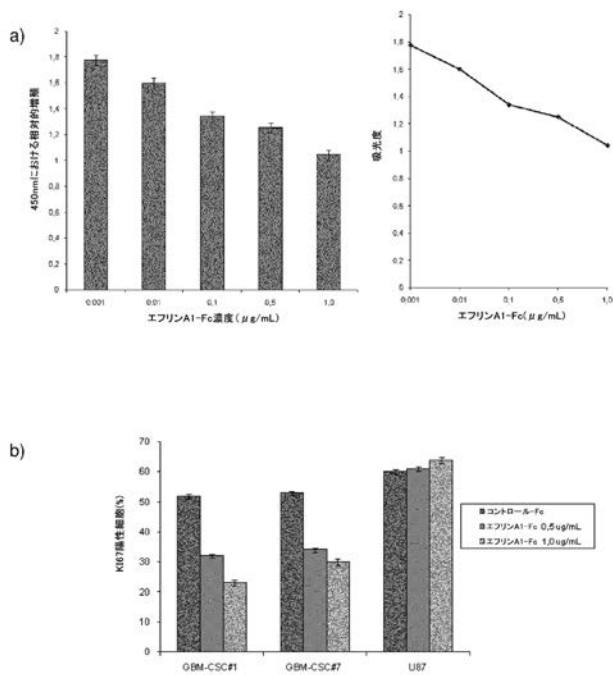


図4B

【図 4 A】

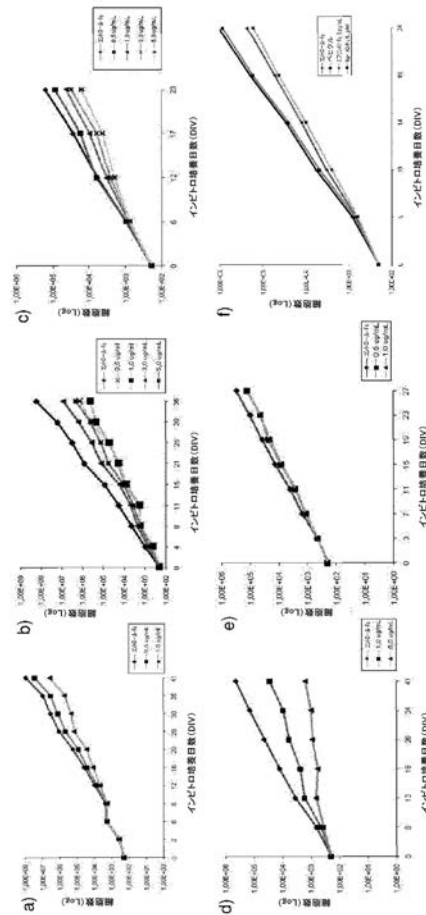


図4A

【図 4 C】

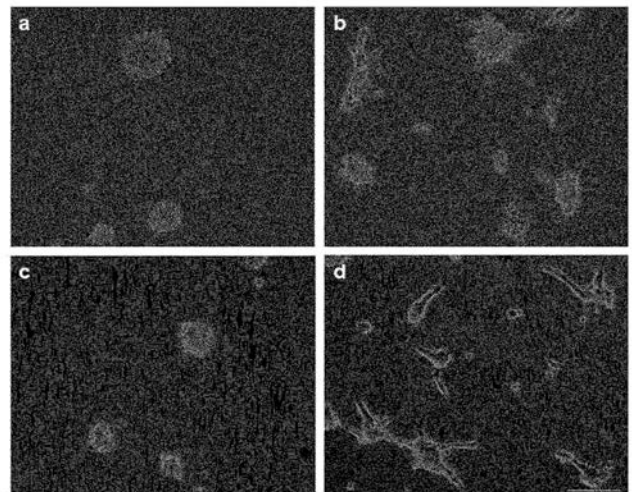


図4C

【図 5 A】

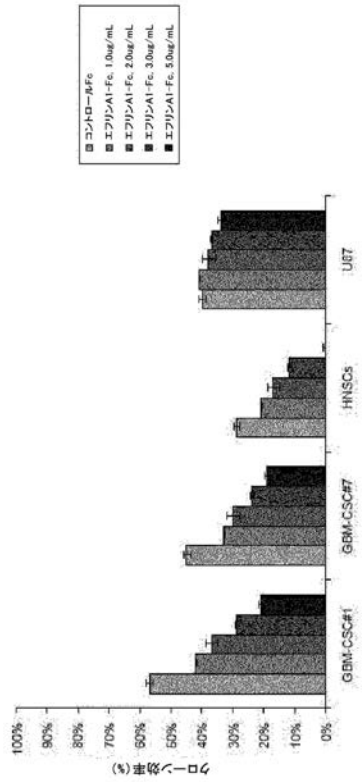


図5A

【図 5 B】

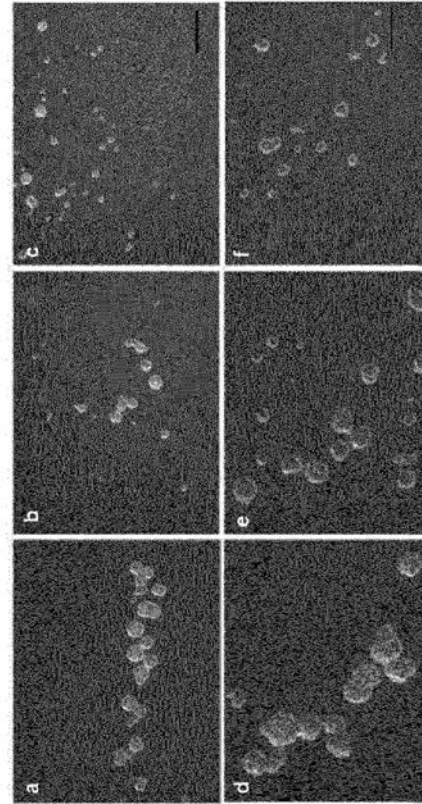


図5B

【図 5 C】

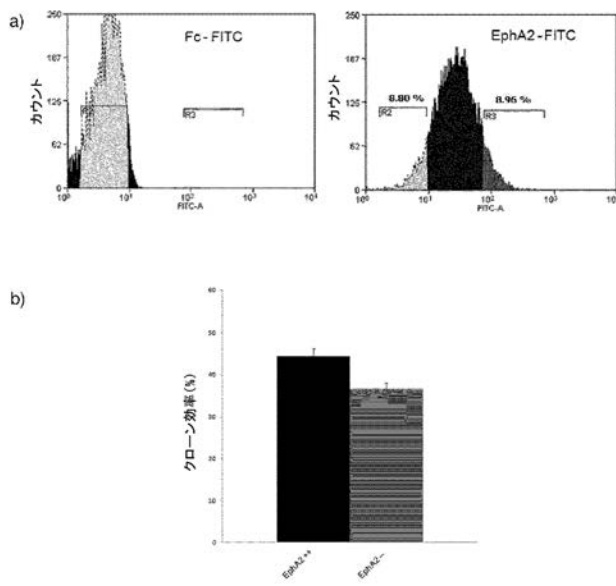


図5C

【図 6】

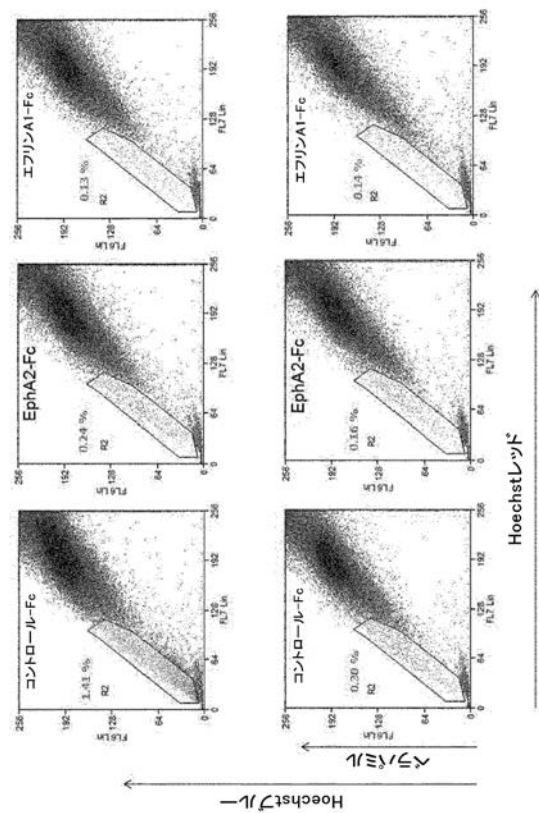


図6

【 図 7 】

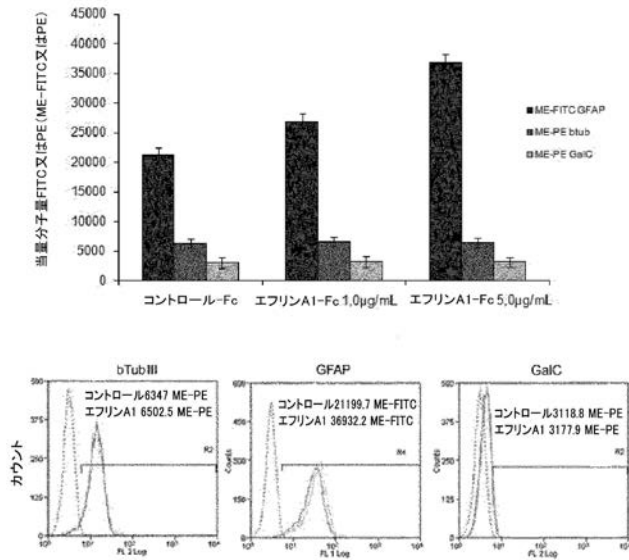


図7

【 図 8 A 】

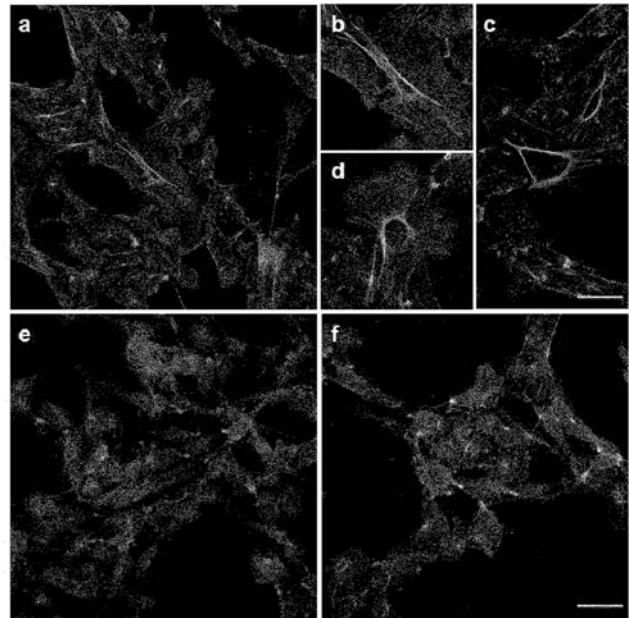


図8A

【 図 8 B 】

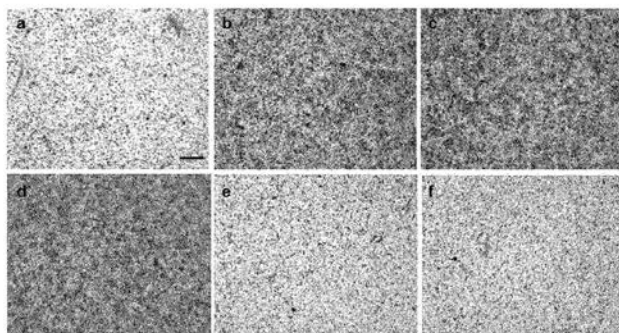
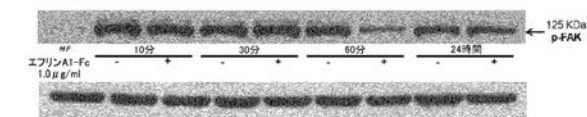


図8B

【 図 8 C 】

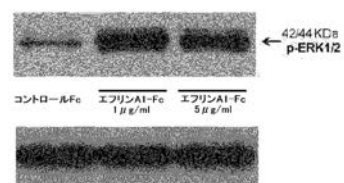
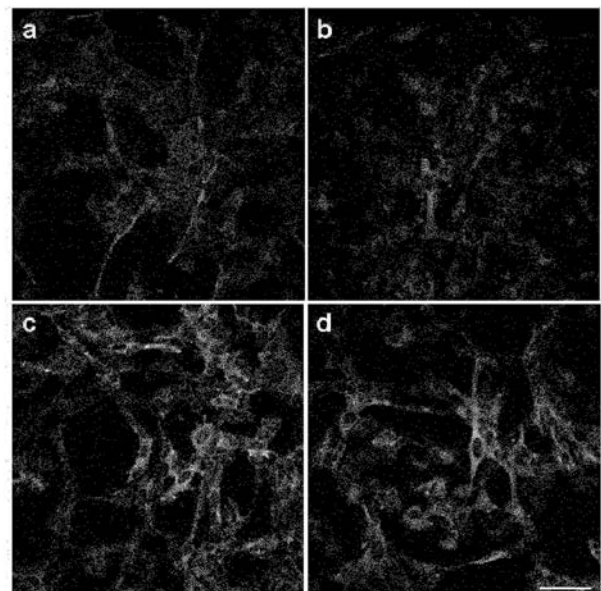


図8C

【 図 9 】

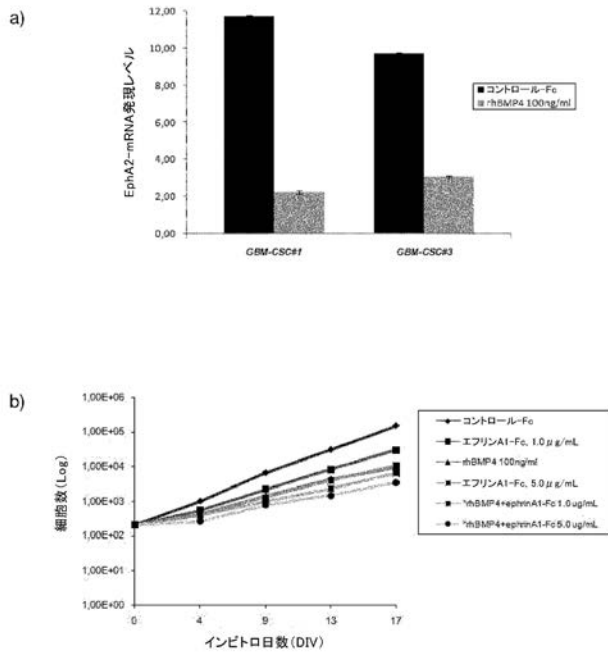


図9

【 図 10 】

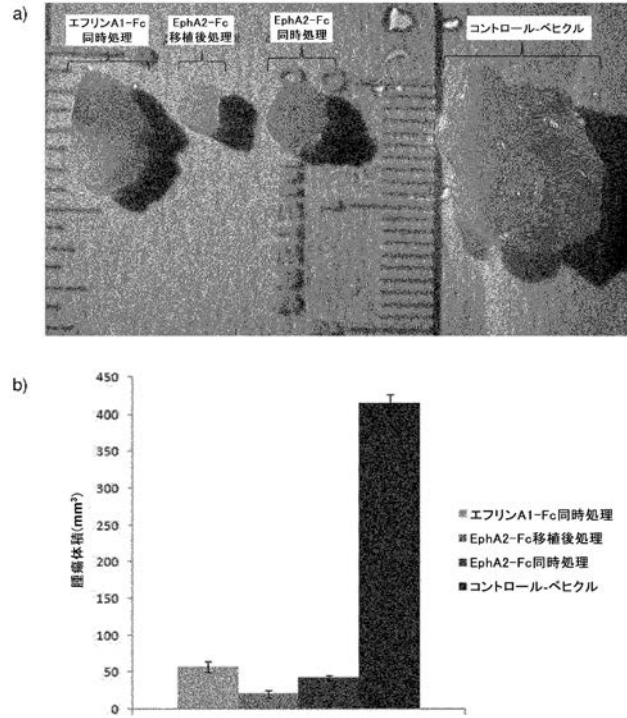


図10

【 図 11 A 】

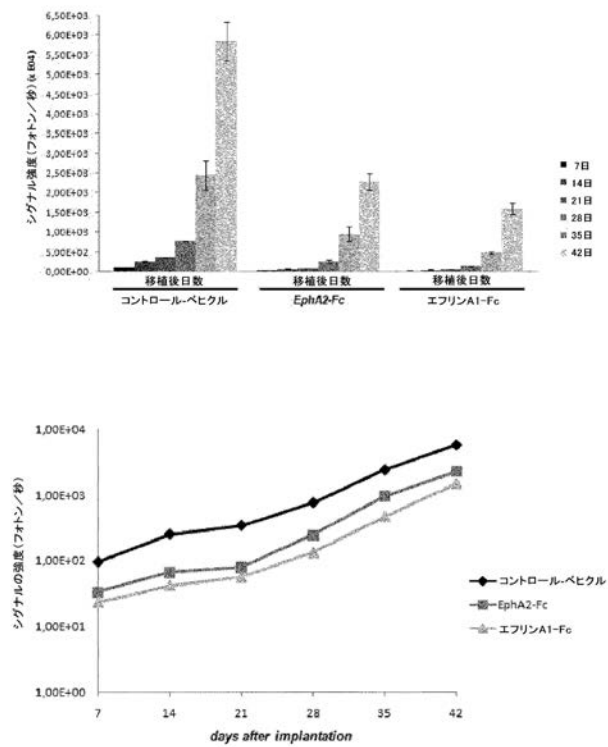


図11A

【 図 11 B 】

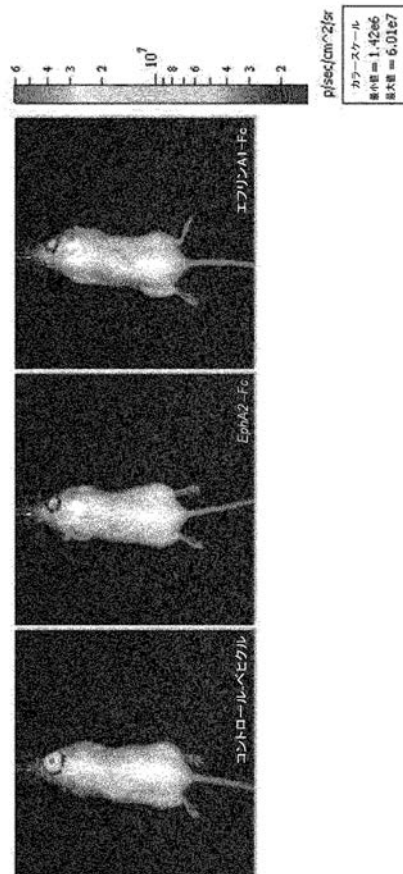


図11B

【図 1 1 C】

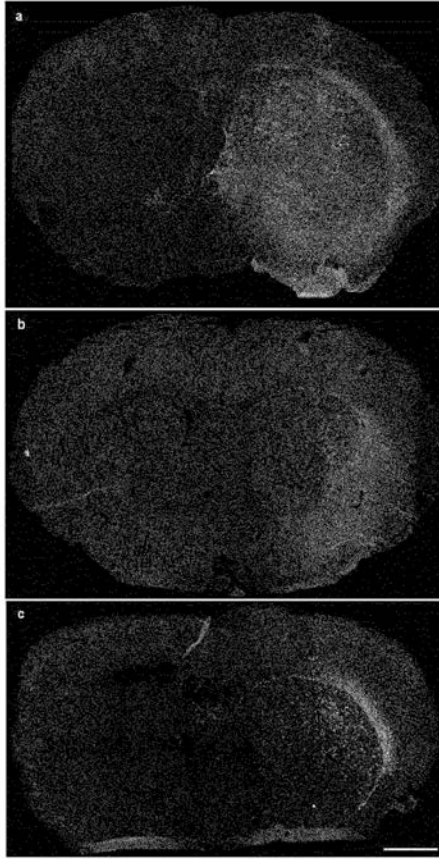


図11C

【配列表】

2020037579000001.app

【手続補正書】

【提出日】令和1年12月11日(2019.12.11)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

明細書に記載の発明。

【図 1 2】

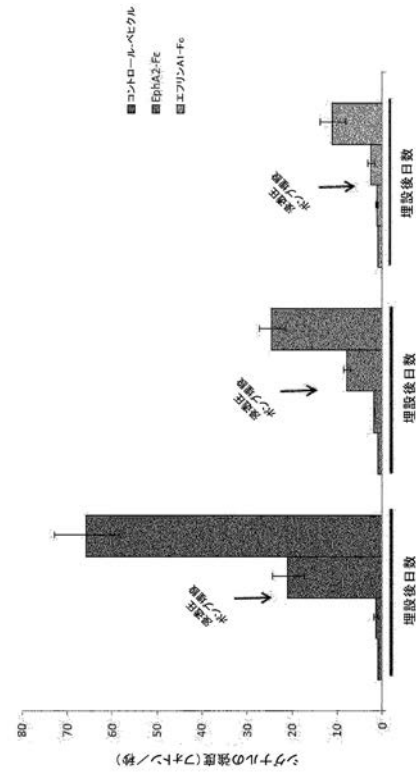


図12

 フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I			テーマコード(参考)
A 6 1 P	35/04	(2006.01)	A 6 1 P	35/04		
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 1 1	
C 0 7 K	14/47	(2006.01)	C 0 7 K	14/47		
C 0 7 K	14/705	(2006.01)	C 0 7 K	14/705		
C 1 2 N	15/12	(2006.01)	C 1 2 N	15/12		
C 1 2 N	15/54	(2006.01)	C 1 2 N	15/54		

Fターム(参考) 4C084 AA02 AA07 AA17 BA01 BA08 BA22 BA23 DC32 NA14 ZA021
 ZB211 ZB261 ZC201
 4H045 AA10 AA30 BA10 CA40 DA50 EA20

【外国語明細書】

2020037579000001.pdf

2020037579000002.pdf

2020037579000003.pdf

2020037579000004.pdf