

平成21年5月15日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2005～2008
 課題番号：17390344
 研究課題名（和文） 合成糖鎖による抗腫瘍効果の解析-新規抗癌剤の開発を目指して-
 研究課題名（英文） Analysis of antitumor effects of chemically synthesized carbohydrates for the development of new anticancer drugs.

研究代表者
 浅尾 高行 (ASAO TAKAYUKI)
 群馬大学・大学院医学系研究科・准教授
 研究者番号：40212469

研究成果の概要：

化学合成にて得られた糖鎖コレスタノールは、In Vitroでもマウス癌性腹膜炎での検討でも濃度依存性に増殖を抑制しアポトーシスを誘導することが明らかとなった。シクロデキストリンに包摂した糖鎖は細胞膜のマイクロドメインに集積し細胞内に入ることが確認された。

一方、糖コレスタノールの細胞における分子レベルの作用機序については、ミトコンドリアを中心としたカスパーゼカスケードの活性化によりアポトーシスが誘導されことを証明し、糖コレスタノールの細胞死誘導のメカニズムが明らかになった。実用化に抜けた検討では、腹腔内投与による血中濃度は2峰性を示し、腹膜播種組織への選択的な取り込みが明らかとなった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	6,400,000	0	6,400,000
2006年度	4,900,000	0	4,900,000
2007年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
年度			
総計	15,500,000	1,260,000	16,760,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：糖鎖・抗腫瘍効果・リポソーム・アポトーシス・ミトコンドリア・マイクロデキストリン

1. 研究開始当初の背景

糖鎖は、細胞調節の様々な部位で重要な役割を担っていることが明らかとなりポストゲノムの中心的な柱として注目されている。これまでの我々の検討でもフコシル基を持

つ糖鎖が、大腸癌の発生や、腹膜との接着、温熱や抗癌剤への耐性に大きく関わっていることを明らかにしてきた。この中で、fucosyltransferase の酵素としての基質活性をもつオリゴ糖に修飾を与えた後、培養細胞に付加すると、細胞内に取り込まれ、蛍光

ラベルした糖鎖を用いた実験では細胞質特にゴルジ装置に集積することが明らかとなった。そして、この糖鎖は細胞内で修飾を受け細胞の表面抗原として発現することを明らかとし (priming) てきた。この現象は、外来より投与した合成糖鎖により、遺伝子レベルでの制御とは別に、細胞の糖鎖合成系を制御する可能性を示唆している。癌細胞の糖鎖の合成系に変化を与えることを目的として疎水基を結合したある種のオリゴ糖鎖を培養液に加えることで細胞の増殖抑制がかかり、ある程度の濃度ではアポトーシスを誘導することが明らかとなった。この有効濃度は、抗ガン剤のモル濃度と同等かそれ以下であり、糖鎖そのものが抗腫瘍効果を発揮することを意味しており、これまでにない新たな知見であるとともに、条件の調整や分子構造の修飾により、糖鎖による腫瘍の治療、すなわち糖鎖抗ガン剤の可能性を予感させるものであった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、合成糖鎖によるアポトーシス誘導作用の検討とその機序の解明、さらにはこれを応用した癌の新たな治療法の開発にある。

3. 研究の方法

(1) 試薬の調節

糖コレステロール (GlcNAcChol、GC; GlcNAcGalChol、GGC) を化学合成にて作成した。実験にはリポゾームもしくはシクロデキストリンに包接して用いた。

(2) 抗腫瘍効果のアッセイ法

主にMTTアッセイ法により増殖抑制効果を検討した。In vivo ではColon 26細胞をマウス腹腔内に投与する癌性腹膜播種モデルを用い、転移の程度を大網、腸管膜の腫瘍重量で評価した。

(3) 抗腫瘍活性のメカニズムの解析

マウス大腸癌細胞colon26とシクロデキストリン包接・糖コレステロール (GlcNAcChol、GC; GlcNAcGalChol、GGC) を用いて、糖コレステロールの細胞増殖抑制に関わる分子とその関与を、関連分子とその特異抗体を用いた発現レベルの変化をウエスタンブロット解析を

中心に行った。

(4) 糖コレステロールの体内動態

糖コレステロールの体内動態は、糖コレステロールのLC/MS分析から定量してその分布を調べた。

4. 研究成果

(1) 糖鎖コレステロール (GCC) の抗腫瘍効果
濃度依存的に抗腫瘍効果が認められた (図1)。

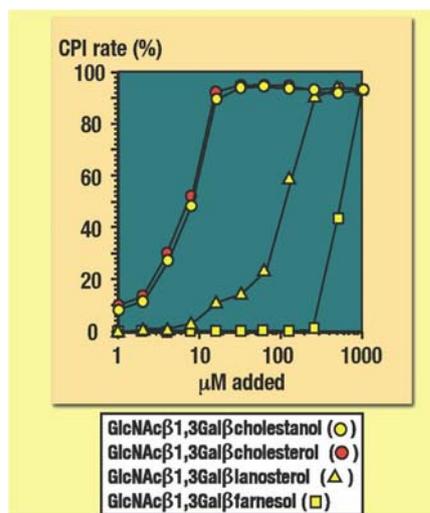


図 1

マウス腹膜播種モデルでの結果

GCC の腹腔内投与により腹膜播種の抑制効果が認められた (図2)。

コントロール (図3)。

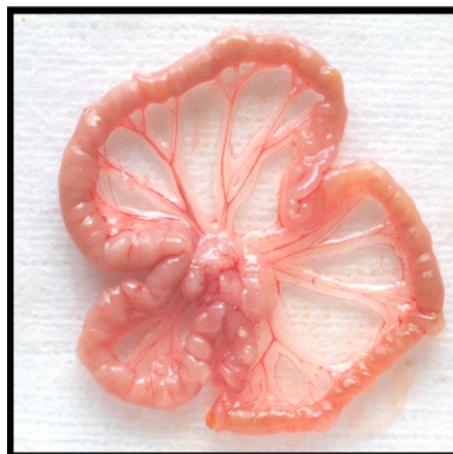


図 2

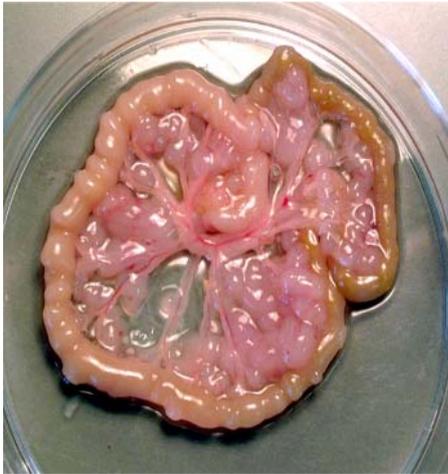


図 3

マウス腹膜播種モデルにて生存率の延長が認められた (図 4)

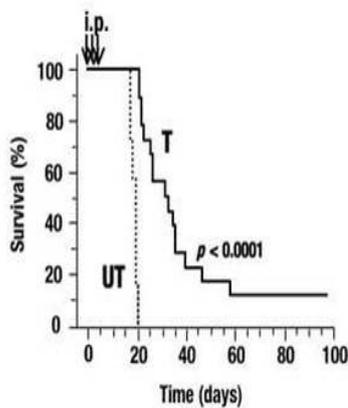


図 4

(2) 細胞内の取り込み

colon26 細胞に GGC を処理すると経時的に細胞内及びミトコンドリア分画で経時的に GGC 濃度は増加した。ショ糖濃度勾配遠心によって得られた分画では GGC 濃度を示すグラフのピーク位置とマイクロドメインのマーカ分子の分布が一致した。また、ミトコンドリアからの cytochrome c の放出を調べたところ、GGC 処理細胞ではミトコンドリアから細胞質へ経時的な cytochrome c の放出が認められたが、糖を含まないコレステロール処理では cytochrome c の放出は認められなかった。細胞膜表面のマイクロドメインはコレステロールに親和性が高いため、コレステロール誘導体であるコレステロールをアグ

リコンとする糖コレステロールを培地中に加えると、速やかに細胞のマイクロドメインを経由して細胞内へ取り込まれ、ミトコンドリアに集積し、cytochrome c の放出につながると考えられた。

(3) 糖コレステロールの抗腫瘍活性のメカニズムの解析

GGC 及び GC 処理細胞では、apoptosis の抑制分子である BCL-XL の抑制と、apoptosis 誘導分子である tBid、Bax をはじめ Apaf-1、caspase-9、caspase-3 から PARP に至る一連の caspase-cascade 関連分子の連続した活性化が起こることを確認した (図 5)。またこれらの反応はいずれも糖存在下でのみ観察され、糖を含まない Chol 処理ではこれらの変化は認められない。従って、糖コレステロールによる細胞死は、caspase cascade 活性化による糖特異 apoptosis 誘導が明らかになった。

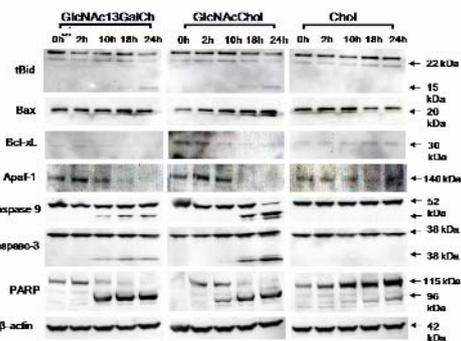


図5

(4) 糖コレステロールの体内動態

糖コレステロール (GlcNAcChol) の腹腔内及び尾静脈投与後の血中濃度の推移を比較すると前者では投与後短時間内に 2 峰性のピークが認められものの、いずれも 24 時間内にほぼバックグラウンド値を示した。糖コレステロール (GlcNAcChol) の腹腔内及び尾静脈投与後の組織内分布を調べると前者では腸間膜への

集積が、後者では肝臓・腎臓などへの集積が注目された。

(5) 腹膜播種の機序は、主として播種癌細胞が主として腸間膜、大網から腫瘍形成を開始することに起因すると考えられている。糖コレステロールの投与経路として腹腔内投与を考える上で、播種後に形成された腫瘍組織に集積しうるかを確認するために、ビオチン基導入GlcNAcCholを化学合成し、マウス癌性腹膜炎モデルにおいて投与後、凍結標本を得た。蛍光標識アビジンによる染色でその分布を調べたところ、腸間膜の腫瘍部に特異的なGlcNAcCholの集積が観察された。

(6) ハイパーサーミアとの併用効果

ハイパーサーミアによる効果の増強が認められた(図6)。

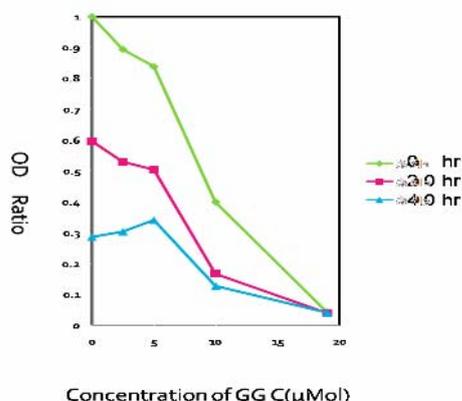


図6

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4件)

1. Asao T, Yamaguchi S, Tsutsumi S, Mochiki E, Kuwano H. Experimental results and early clinical experience with an easy method for intracorporeal knot tying using a novel laparoscopic needleholder. Surg Endosc. 2007 Sep;21(9):1553-6. 査読有

2. Asao T, Sakurai H, Harashima K, Yamaguchi S, Tsutsumi S, Nonaka T, Shioya M, Nakano T, Kuwano H. The synchronization of chemotherapy to circadian rhythms and irradiation in pre-operative chemoradiation therapy with hyperthermia for local advanced rectal cancer.. Int J Hyperthermia. 2006 Aug;22(5):399-406. 査読有
3. Tsutsumi S, Yamaguchi S, Tsuboi K, Fukasawa T, Yamaki S, Asao T, Kuwano H. Oral regimen consisting of UFT/UZEL for elderly patients with colorectal cancer. Hepatogastroenterology 2006, Mar-Apr; 53(68): 209-212. 査読有
4. Tsutsumi S, Shimura T, Morinaga N, Mochiki E, Asao T, Kuwano H. Loss of KAI1 expression in gastric cancer. Hepatogastroenterology. ,52(61); 281-4. 2005. 査読有

[学会発表] (計25件)

1. 浅尾高行 講演「最新医療に関する取組について」 第3回栃木メディカルビジネス協議会 2008年11月14日 自治医科大学, 東京
2. 浅尾高行, 松本明香, 山内逸人, 田部雄一, 藤井孝明, 深澤孝晴, 堤 荘一, 中村純一, 桑野博行, 塩谷真理子, 桜井英幸, 中野隆史: パネルディスカッション9「直腸癌に対する集学的治療」進行直腸癌に対する術前温熱化学療法 of 至適protocolの検討. 第46回日本癌治療学会総会 2008年10月30日-11月1日 大阪.
3. 浅尾高行, 松本明香, 山内逸人, 八巻さやか, 田部雄一, 深澤孝晴, 藤井孝明, 堤 荘一, 中村純一, 桑野博行: 口演 放射線治療2「下部振興直腸癌に対する術前放射線治療の工夫と副作用防止法」. 第63回日本大腸肛門病学会学術集会 2008年10月17日、18日 東京.
4. 浅尾高行, 松本明香, 山内逸人, 八巻さやか, 田部雄一, 深澤孝晴, 藤井孝明, 堤 荘一, 中村純一, 桑野博行: 口演 大腸癌手術「curved cutterの装着法の工夫—患者個人識別リストバンドの応用—」. 第63回日本大腸肛門病学会学術集会 2008年10月17日、18日 東京.
5. 浅尾高行 講演「大腸癌の治療と最近の化学療法」 日本病院薬剤師会 平成

- 20 年度第 2 期がん専門薬剤研修講義
2008 年 10 月 6 日 群馬大学, 群馬
6. 浅尾高行、桜井英幸、持木彫人、塩谷真理子、大野哲郎、藍原龍介、桑野博行: シンポジウム5 がんの播種性転移に対する温熱化学療法「胃癌腹膜播種に対する術後温熱化学療法と抗腫瘍糖鎖を利用した新規腹腔投与薬剤の開発」. 日本ハイパーサーミア学会第 25 回大会 2008 年 9 月 12 日、13 日 名古屋市
 7. 浅尾高行、山内逸人、田部雄一、深澤孝晴、斎藤加奈、山口 悟、堤 莊一、持木彫人、桑野博行: ビデオ その他「腹腔鏡手術における実践的体腔内縫合・吻合法の新展開」. 第 63 回日本消化器外科学会学術集会 2008 年 7 月 16 日～18 日 ロイトン札幌、札幌
 8. 浅尾高行、堤 莊一、山口 悟、渡邊玲奈、深澤孝晴、斎藤加奈、田部雄一、桑野博行: デジタルポスター22「側方郭清を省略した術前化学放射線温熱療法の治療成績」. 第 108 回 日本外科学会定期学術集会 2008 年 5 月 15 日(木)～17 日(土) 長崎
 9. 浅尾高行 講演「大腸癌と化学放射線療法の現況」 第 3 回 Colorectal Cancer Symposium in YAMANASHI 2008 年 2 月 22 日 山梨
 10. 浅尾高行 特別講演「鏡視下手術、私の工夫 —鏡視下手術用の新しいデバイスの開発経緯、その臨床応用—」 第 11 回栃木県内視鏡外科研究会 2008 年 1 月 26 日 宇都宮東武ホテルグランデ、宇都宮
 11. 浅尾高行、堤 莊一、山口 悟、持木彫人、大野哲郎、藍原龍介、桑野博行: ワークショップ 2-5 「新しい内視鏡外科医療機器・手術器具の開発・使用経験」腹腔鏡手術における簡便な再気腹方法の工夫 第 20 回日本内視鏡外科学会総会 2007 年 11 月 19-21 日、仙台
 12. 浅尾高行、堤 莊一、山口 悟、持木彫人、大野哲郎、藍原龍介、桑野博行: ワークショップ「腹腔鏡手術における簡便な再気腹方法の工夫」. 第 20 回 日本内視鏡外科学会総会 2007 年 11 月 19 日～21 日 仙台国際センター, 仙台市
 13. 浅尾高行: 講演「大腸癌外来化学療法」がん化学療法地域勉強会 2007 年 11 月 12 日 深谷赤十字病院, 深谷
 14. 浅尾高行: 講演「腹腔鏡下手術について」群馬県消化器内視鏡技師講習会 2007 年 10 月 13 日 群馬健康づくり財団, 前橋
 15. 浅尾高行: 講演「がんの手術と温熱療法」毎日健康フォーラム市民公開講座がん治療最前線 —ハイパーサーミア(温熱治療)の効果— 2007 年 9 月 22 日 福島県郡山市民文化センター
 16. 浅尾高行: 講演「がん治療におけるハイパーサーミア(温熱治療)の最先端」がんの手術と温熱療法 日本ハイパーサーミア学会第 24 回大会 市民公開講座 2007 年 9 月 15 日 前橋テルサ, 前橋
 17. 浅尾高行: 講演「栄養療法プラン作成実践講座 —採用されるNST報告書作成のこつ—」第 76 回老年病研究所研究会 2007 年 8 月 28 日 老年病研究所附属病院, 前橋
 18. 浅尾高行、山口 悟、堤 莊一、坪井香保里、深澤孝晴、斎藤加奈、田部雄一、桜井英幸、桑野博行: サージカルフォーラム「大腸(化学療法)」直腸癌に対する「夜間化学療法」を Synchronizeさせた術前化学放射線温熱療法. 第 107 回日本外科学会定期学術集会 2007 年 4 月 11 日～13 日 リーガロイヤルホテル大阪, 大阪
 19. 浅尾高行: 特別講演「栄養サポートチームの役割と実際」 前橋市医師会 NST学術講演会 2007 年 2 月 20 日 老年病研究所附属病院, 前橋
 20. 浅尾高行: 講演「NSTと栄養療法」 第 66 回老年病研究所研究会 2007 年 2 月 20 日 老年病研究所附属病院, 前橋
 21. 浅尾高行: 講演「安全な血管処理のコツ」 第 11 回 群馬県内視鏡外科研究会 実技セミナー 2007 年 1 月 13 日 群馬大学 刀城会館, 群馬
 22. 浅尾高行、宮崎達也、山口 悟、川手進、須納瀬 豊、清水弘行、杉本厚子、前田三枝子、高橋紘江、桑野博行: NST 支援ソフトの開発と有用性の検討 第 21 回 日本静脈経腸栄養学会 2006 年 1 月 26 日～27 日, 岐阜
 23. 浅尾高行、堤 莊一、山口 悟、坪井香保里、深澤孝晴、斎藤加奈、持木彫人、桑野博行: 結紮による血管処理法、止血法の工夫と専用器具の開発 第 18 回 日本内視鏡外科学会総会 2005 年 12 月 7 日～9 日, 東京
 24. 浅尾高行、井出宗則、坪井香保里、深澤孝晴、斎藤加奈、山口 悟、堤 莊一、桜井英幸、桑野博行: ビデオ

サージカルフォーラム「超低位直腸癌の外科治療1」夜間化学療法(Chronotherapy)を併用した術前放射線温熱療法による肛門温存術 第67回日本臨床外科学会総会 2005年11月9日-11日, 東京

25. 浅尾高行、堤 莊一、山口 悟、桑野博行シンポジウム 2「大腸癌術後補助化学療法のスタンダードを求めて」進行結腸癌に対するLV/5FUvsUFT療法のRCT 第60回日本大腸肛門病学会総会 2005年10月28日-29日, 東京

〔産業財産権〕

○出願状況 (計1件)

名称: コレスタノール誘導体の併用用途

発明者: 浅尾高行

権利者: 大塚製薬株式会社

種類・番号: PCT/JP2009/000985

出願年月日: 2008. 3. 5

国内外の別: 外国

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浅尾 高行 (ASAO TAKAYUKI)

群馬大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号: 40212469

(2) 研究分担者

桑野 博行 (KUWANO HIROYUKI)

群馬大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号: 90186560

加藤 広行 (KATO HIROYUKI)

群馬大学・医学部・講師

研究者番号: 70224532

堤 莊一 (TSUTSUMI SOUICHI)

群馬大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号: 30323356

研究協力者

矢澤 伸 (YAZAWA SHIN)

大塚製薬株式会社