

令和 3 年 5 月 23 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03599

研究課題名(和文)細胞の糖代謝特性を利用した新規大腸癌治療法の開発

研究課題名(英文)Development of a new treatment for colorectal cancer using the glucose metabolism characteristics.

研究代表者

加藤 淳二(Kato, Junji)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号：20244345

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：転移・再発大腸がんは予後不良の疾患で死亡数は増加が続いており、より有効な治療法の開発が待たれている。大腸がんの糖の取り込み亢進の特性を利用したFDG-PET検査は大腸がん診断に有用である。よって、FDGをcarrierとした抗がん剤は大腸がん治療薬として有望である。そこでFDG結合抗がん剤を作製し効果を検討することを目的とした。FDGを直接結合した蛍光試薬を作製して検討を行なったが、他の糖鎖と差を認めなかった。試薬の安定性が問題と考え、リポソームにFDGを結合した蛍光試薬を作製したところ、がん細胞への取り込みを認めた。今後FDG結合リポソームにより同機構を利用した新規抗がん剤の開発を進めたい。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大腸がん細胞特異的に送達される薬剤の開発は、より高い有効性と弱い副作用の治療を実現しうる有望な治療戦略である。FDG-PET検査に用いられるFDGはがん細胞に取り込まれるため抗がん剤にFDGを結合することでがん特異的送達性を狙った。リポソームにFDGを結合させ、蛍光試薬を内包化した薬剤を作製したところ、がん細胞への取り込みを認め、今後のFDGを利用した新規抗がん剤の開発の足掛かりとなった。

研究成果の概要(英文)：Metastatic / recurrent colorectal cancer is a disease with a poor prognosis, and the number of deaths continues to increase, and the development of more effective treatment methods is awaited. The FDG-PET examination, which utilizes the characteristics of increased sugar uptake in colorectal cancer, is useful for diagnosing colorectal cancer. Therefore, anticancer drugs using FDG as a carrier are promising as therapeutic agents for colorectal cancer. Therefore, we aimed to prepare an FDG-binding anticancer drug and examine its effect. A fluorescent reagent directly bound to FDG was prepared and examined, but no difference of anticancer effect from other sugar was observed. Considering that the stability of the reagent was a problem, we prepared a fluorescent reagent in which FDG was bound to liposomes, and found that it was taken up by cancer cells. In the future, we would like to promote the development of new anticancer agents that utilize this mechanism using FDG-binding liposomes.

研究分野：消化器内科学

キーワード：大腸癌 ドラッグデリバリーシステム

1. 研究開始当初の背景

2015年のがん統計予測では、大腸癌の罹患数は13.5万人にもものぼるとされている。さらに大腸癌の死亡数も増加の一途にあり、年間死亡者数は約48,000人にもものぼる(癌死亡率 第2位)。本疾患の治療成績は抗がん剤療法の進歩に加え、抗 VEGF 抗体や抗 EGFR 抗体などの分子標的薬の導入により向上してきている。しかしながら、未だ転移・再発大腸癌症例の生存期間中央値は25~30ヵ月と短く、予後不良な疾患である。よって、より有効な新規治療法の開発が待たれている。申請者らは、大腸癌(CRC)細胞のフコース要求度が高く、フコシル化蛋白陽性率が脈管浸潤やTNMステージと正の相関があることを見出し、報告している1。一方、CRC細胞のグルコース取り込みが亢進していることを利用した18F-FDG-PET検査は、大腸癌の診断に有用であるのみならず、maximal standardized uptake value (SUVmax) 高値が予後不良因子の一つであることが明らかにされている2。FDGはグルコースと同様に細胞膜のGlucose transporter (GLUT1)により細胞内に取り込まれ、Hexokinase 2 (HK2)によりリン酸化される。リン酸化されたFDGは、それ以上解糖系で代謝されず細胞内に蓄積される。つまり、GLUT1およびHK2の発現が高い細胞がFDGの取り込み率ならびに停滞率が高いことが予想され、FDGをcarrierとした抗がん剤はCRC治療薬として有望であると考えられる。しかしながら、FDGをDDSとして利用した抗がん剤は開発されていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、FDG取り込みが亢進している大腸癌細胞の細胞特性の解析を行うとともに、FDG修飾抗がん剤による新規大腸癌細胞標的療法を開発することである。すなわちFDG修飾抗がん剤を設計・作製しその特異性および抗腫瘍効果を明らかにすることを目的とした。大腸癌の診断に有用である18F-FDG-PET検査において腫瘍組織がFDGを取り込む機構と大腸癌細胞のFDGの取り込み率が高い症例では、その予後が不良であることが報告されている点に着目し、FDG取り込みが亢進している癌細胞を標的とした本治療法が、大腸癌の治療成績を向上させる可能性があると考えられた。

3. 研究の方法

(1) GLUT1とHK2の発現多寡がCRC患者の予後に与える影響

GLUT1およびHK2発現がCRC患者の予後に与える影響をGSE17536(publicly available gene expression data set)を用いて解析する。

(2) qRT-PCRを用いたGLUT1, HK2遺伝子のmRNA発現定量

CRC細胞株およびCRC患者検体から抽出した1gのRNAからSuperScript VIL0 cDNA合成キット(Invitrogen)を用いてcDNAを作製する。同cDNAを用いてGLUT1およびHK2発現の定量をqRT-PCR法で行う。

(3) FDG修飾蛍光剤、抗がん剤の作製

FDGを修飾させたFITCを作製する。さらに下記(4)にて細胞への取り込みが良好であれば、FDGを修飾させた抗がん剤を作製する。

(4) FDG-FITCのCRC細胞への導入

各種CRC細胞にFDG-FITCを添加し、0-24時間培養し、細胞内へのFITCの取り込みをflow cytometerで定量的に検討する。FDGの細胞内への取り込み率は培養液中のグルコース濃度によって変化する可能性があるため、培養液中の最適なグルコース濃度についても検討する。

(5) FDG修飾抗がん剤の抗腫瘍効果の検討

研究方法(3)でFDG修飾抗がん剤作製されれば、同抗がん剤を用いてCRC細胞に対する抗腫瘍効果を検討する。

(6) FDG結合リンカーの最適化

in vivoでの安定が得られるFDG修飾FITCまたは抗がん剤の適正なリンカーを検討する。

(7) FDG-FITCの細胞内の局在および動態

FITCの取り込みが良好であれば、最適なリンカーを用いて合成したFDG-FITCを用いてFDG-FITCの細胞内での局在について超解像顕微鏡を用いて解析する。

(8) CRC担癌マウス作製とFDG-FITCの腫瘍送達率およびFDG-抗がん剤の抗腫瘍効果の検討

研究方法(3)でFDG修飾抗がん剤が作製されれば、ヌードマウスに 5×10^6 個のCRC細胞株を皮下に接種し、担癌マウスを作製する。IVISによるin vivo imagingを行いFITCの腫瘍特異性を確認する。またFDG修飾抗がん剤の抗腫瘍効果を検討する。

4. 研究成果

(1) GLUT1とHK2の発現多寡がCRC患者の予後に与える影響

GLUT1およびHK2発現がCRC患者の予後に与える影響をGSE17536(publicly available gene expression data set)を用いて解析した結果、GLUT1かつHK2高発現群が有意に予後不良であることを見出した。

(2) qRT-PCR を用いた GLUT1 , HK2 遺伝子の mRNA 発現定量

CRC 細胞株および CRC 患者検体から抽出した 1g の RNA から SuperScript VILO cDNA 合成キット (Invitrogen) を用いて cDNA を作製し、同 cDNA を用いて GLUT1 および HK2 発現の定量を qRT-PCR 法で行った結果、正常大腸粘膜に比較して CRC 細胞株では GLUT1 および HK2 の発現が亢進していることを確認した。

(3) FDG 修飾蛍光剤, 抗がん剤の作製

FDG を修飾させた FITC を作製した。第 1 工程として FDG のピリジン溶媒中に無水酢酸を添加しアルコール官能基を Ac 対で保護した (化合物 1)。次に、化合物 1 のアノマー位を脱離容易な Br 糖に HBr を用いて合成を行った (化合物 2)。さらに化合物 2 の Br 糖に対してグリコシル化を行い、化合物 3 とした。化合物 3 の Cbz 基を Pd/C 存在下に水素添加を行い、脱保護して化合物 4 を得た。化合物 4 について Ac 基を加水分解条件において化合物 5 を合成した。化合物 5 に対して FITC をもつチオイソシアネートと反応を行い、FDG-FITC を合成した (図 1)。

図 1

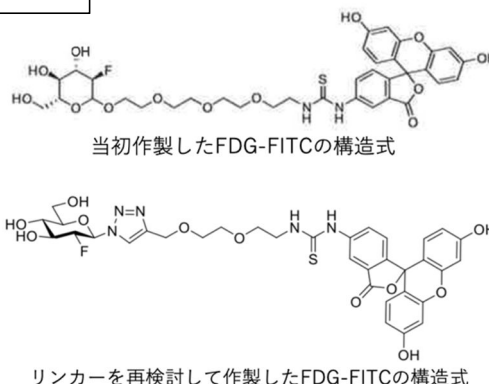
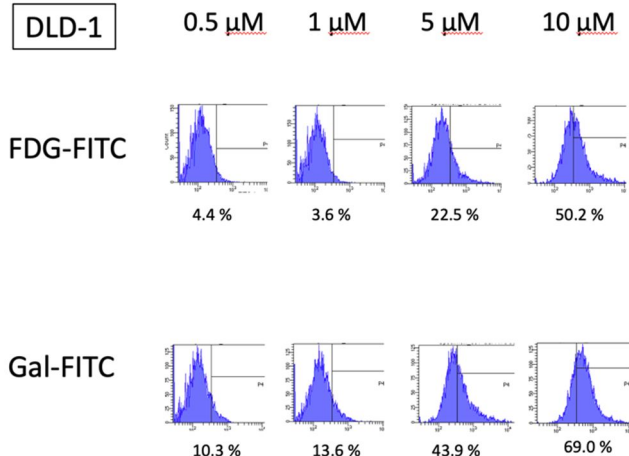


図 2



(4) FDG-FITC の CRC 細胞への導入

各種 CRC 細胞に FDG-FITC を添加し、0-24 時間培養し、細胞内への FITC の取り込みを flow cytometer で定量的に検討を行なった。FDG 修飾 FITC とコントロールとしてガラクトースを修飾した FITC とで比較検討を行なった。しかし結果としては、想定に反して FDG 修飾とガラクトース修飾で有意な差は認めなかった。培養液のグルコース濃度を低くして検討を行なったが結果は変わらず、試薬の溶液中の安定性に問題があると考えた。

(5) FDG 結合リンカーの最適化

溶液中に安定と考えられるリンカーを用いた FDG 結合 FITC の作製を試みた。FDG 結合 FITC の作製に成功した (図 1)。

(6) (5)を用いた CRC 細胞への導入の検討

CRC 細胞への導入は認められたが、FDG 修飾による差異は認められなかった (図 2)。

以上より、FDG を直接蛍光試薬や抗がん剤に結合するのではなく、我々の以前の研究でも使用した技術¹を応用し、リポソーム上に FDG を結合した蛍光薬、抗がん剤内包リポソームを作製する方針とした。

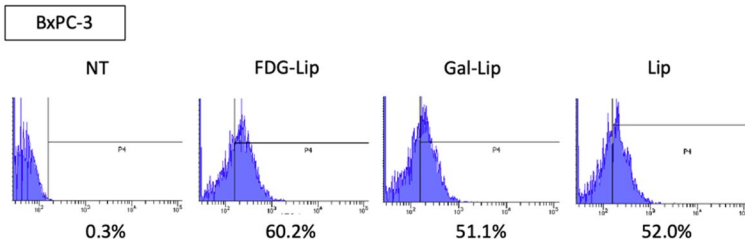
(7) FDG 結合リポソームの作製

Cy5.5 を内包化した FDG 結合リポソームを作製することができた。

(8) FDG 結合リポソームのがん細胞への取り込みについて検討

FDG 結合リポソームは他の糖が結合したリポソーム、糖末結合リポソームに比べてがん細胞に取り込まれる傾向が見られ、極めて有望な結果であると考えられた (図 3)。リポソームに内包化することで EPR 効果も得られると考えられる。この FDG 結合リポソームに抗がん剤を内包化し、今後 in vitro、in vivo にて検討を進めていき、FDG のがんへの

図 3



取り込み機構を利用したがん特異的に送達され、高い治療効果と良好な副作用プロファイルを実現する新規抗がん剤の作製を目指していく。

< 参考文献 >

- 1) Osuga T, Kato J, et al. J Natl Cancer Inst 2016.
- 2) Shi et al. BMC Cancer 2015.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	早坂 尚貴 (Hayasaka Naotaka) (00792665)	札幌医科大学・医学部・研究員 (20101)	
研究分担者	高田 弘一 (Takada Kohichi) (90398321)	札幌医科大学・医学部・講師 (20101)	
研究分担者	大須賀 崇裕 (Osuga Takahiro) (40619714)	札幌医科大学・医学部・助教 (20101)	
研究分担者	宮西 浩嗣 (Miyanishi Koji) (60372819)	札幌医科大学・医学部・准教授 (20101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------