

令和 2 年 6 月 19 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10687

研究課題名(和文) 内因性レクチンを薬剤キャリアーとする新規がん治療開発

研究課題名(英文) Development of Novel Therapeutic Strategy for Cancer: Targeting Cell Surface Glycan Using Endogenous Lectin-Drug Conjugate (LDC)

研究代表者

榎本 剛史 (Enomoto, Tsuyoshi)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：10628762

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：消化器悪性腫瘍手術検体を用いた組織アレイを作成し、複数の内因性レクチンを標識し、網羅的なレクチン染色により臓器別の悪性腫瘍の糖鎖発現パターンを把握した。本研究で作成した複数の癌腫の組織アレイを用いたレクチン染色の解析で、胃がん、大腸がんの腫瘍細胞に特異的に反応するレクチンA、レクチンBを同定することができた。これらはさらに解析を進め、現在薬剤融合薬(Lectin-Drug conjugate)を調整している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

様々な分子標的治療薬が開発されているが特異度の面で十分とはいえず、未だ手術を凌駕する薬剤は開発されていない。本研究はヒト由来の内因性レクチンの中から消化器悪性腫瘍表面糖鎖を特異的に認識する内在性レクチンを選定した。一方で正常組織の反応性も高く、内因性レクチンを改変せずに薬剤の担体としても用いることは困難であることも示唆した。今後、レクチンの薬剤送達キャリアーとしての高い能力による新たなDrug Delivery法によるがん治療戦略の基盤を形成する研究である。

研究成果の概要(英文)：The outermost coatings of cancer cells are composed of cell-specific glycan layers (glycocalyx). Lectins, proteins with glycan-binding potential, were evaluated for possible use as drug carriers in treatment of gastrointestinal malignancy. We constructed a tissue array using surgical specimens of gastrointestinal malignant tumor, labeled multiple endogenous lectins, and studied expression pattern of malignant tumors by organ by comprehensive lectin staining. By the analysis of lectin staining using the tissue array of multiple carcinomas created in this study, we were able to identify lectins A and B that react specifically with tumor cells of gastric cancer and colon cancer. We are further analyzing these and are currently adjusting the drug fusion drug (Lectin-Drug conjugate), and would show the concept of utilizing lectins as drug carriers to target glycans on the cancer cell surface, highlighting new insights into cancer treatments.

研究分野：消化器悪性腫瘍

キーワード：レクチン 糖鎖 膵癌 胃癌 大腸癌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍、特に消化器癌においては、医療が高度化した現在においても外科切除が最も有効な治療とされる。様々な分子標的治療薬が開発されているが、特異度の面で十分とはいえず、未だ手術を凌駕する薬剤は開発されていない。我々は糖結合タンパクである「レクチン」を用い、癌細胞膜上の表面糖鎖と認識することで、糖鎖を標的とした抗がん治療が可能であると着想した。当グループは、既に細菌由来の rBC2 レクチンがヒト膵癌に特異的に結合しマウスにも安全に投与出来る事を明らかにしたが、異種タンパクである rBC2 レクチンと緑膿菌外毒素の組み合わせによる、この新規薬剤は臨床応用に時間がかかる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究はヒト由来の内因性レクチンの中から rBC2 レクチンと同様に膵癌表面糖鎖を特異的に認識する内在性レクチン選り出す事を第一の目標とする。引き続き、その内因性レクチンに抗癌物質を融合させ、新規抗癌レクチン複合体を開発し in vitro, in vivo での抗癌作用、安全性を確認する。レクチンの薬剤送達キャリアとしての高い能力だけでなく安価な細菌の系で生産出来る経済性も魅力で高額で費用対効果が悪い抗体薬に取って代わる新たな Drug Delivery 法によるがん治療戦略の基盤を形成する。

3. 研究の方法

【悪性腫瘍の組織アレイ作成と非内因性レクチン染色による糖鎖パターンの把握】

筑波大学付属病院倫理委員会の承認を得て、手術検体を用いた組織アレイの作成を行った。具体的な癌腫としては、食道、胃、大腸、膵臓(膵腺癌、神経内分泌腫瘍、IPMN)、胆管、肝、乳、肺(腺癌、扁平上皮癌)をそれぞれ10~20症例の組織アレイを作成し、これまでに標識レクチンを用いた免疫化学染色を行い、癌細胞に特異的に反応するレクチンを同定した。使用したレクチンはそれぞれの認識する糖鎖別に4パターン(フコシル化、シアル化、N型糖鎖分岐、O型糖鎖分岐)に分類し、合計14種類のレクチンで行った。

【標識内因性レクチン調製】

まず、体内に存在する内因性レクチンのうち、悪性腫瘍との関連が報告されている4種類のレクチンに関して認識糖鎖を確認した。4種類のレクチンは1: DC-SIGN(Ligands: LewisX (LNFP3), LDNF, ManLAM, ICAM-2(Lewis Y))、2 Prolectin(Ligands: H type 1/3, LewisY)、3 CLEC-2(Ligands: sialylated O-glycan (Podoplanin, Rhodocytin))、4 CHI3L1(YKL-40)を候補内因性レクチンとし、2種の内因性レクチン(Prolectin、DC-SIGN)に関して、コンストラクトを大腸菌内で合成し、精製した。レクチン染色を行うため、内因性レクチンを精製した内因性レクチンにHRP標識し、標識レクチンを用いて、組織アレイを用いた網羅的なレクチン染色を行った

【ラベルした候補内因性レクチン染色による各種正常組織、複数の癌種への反応性】

(1) 精製したラベル化内因性レクチンによる臨床消化器癌検体染色の結果

悪性腫瘍との関連が報告されている 4 種の内因性レクチン (DC-SIGN、Prolectin、CLEC-2、YKL-40) に関して、臨床悪性腫瘍標本への反応性が有するかを免疫染色法にて確認した。

DC-SIGN : 5 種類の膵癌細胞株に対して反応性を確認した。比較的分化度の保たれた 2 種類の細胞株で陽性を確認できた。臨床膵癌細胞への反応性は、弱陽性が 16/23 症例 (69.6%) 強陽性が 7/23 (30.4%) であった。一方正常膵組織への反応性は、腺房細胞 23/23 症例 (100%) 膵管上皮 23/23 (100%) といずれの症例でも正常膵組織への高い反応性が示された。

Prolectin : 膵癌細胞株への反応性は、低分化な腫瘍像を形成する 2 種類に高い反応性が示され、他の 3 種類細胞株では弱陽性であった。臨床膵癌への反応性は、弱陽性 3/11 症例、陰性 8/11 症例であった。また正常膵への反応性も弱陽性 2/11 症例、陰性 9/11 症例と反応性に乏しい印象であった。また、大腸癌に対しては 2/6 症例で陽性、胃癌に対しては 3/11 症例、胆管癌に対しては 2/12 症例で陽性が確認された。

CLEC-2 : 血小板、巨核球、好中球、マクロファージなどに発現しがん細胞の転移などに関連性が報告されているレクチンである。膵癌細胞株への反応性は、4/5 種類で強い反応性が確認された。また臨床膵癌に対しても腫瘍細胞、間質細胞の共に高い反応性が示唆された。また正常膵組織に対しても膵管上皮、腺房細胞ともに高い反応性が示された。

YKL-40 : マクロファージ、血管平滑筋、樹状細胞などに発現が確認され、膵癌の予後因子としても報告されているレクチンである。膵癌細胞株へは 4/5 種類で陽性、臨床膵癌細胞へは 20/20 全症例で陽性、正常膵組織に対しても腺房細胞、膵管上皮細胞ともに高い反応性が示された。

以上の内因性レクチン 4 種類を用いた染色結果から、内因性レクチンは腫瘍細胞に反応性が確認されたものの、正常膵組織にも強力に反応性を有することが分かり、内因性レクチンを改変せずに薬剤の担体としても用いることは困難であると判断した。

(2) 内因性レクチン以外の網羅的レクチン染色の結果

上記の内因性レクチンの染色以外に、作成した組織アレイを用いて 14 種類のレクチンを用いた網羅的染色結果、大腸癌、結腸癌に特異的に反応し、正常大腸上皮に反応しないレクチン A を同定することができた。更に我々が既に発見し論文報告した膵癌細胞に特異的に反応する BC2 レクチン (Shimomura O et al., Molecular Cancer Therapeutics 2018) とは別に、新たに膵癌細胞、膵粘液産生腫瘍 (IPMN) に高い反応性を示し、正常膵管上皮に反応しないレクチン B の同定にも成功した。これらの知見は今度更に症例数を増やして確認するとともに、他の癌腫においても特定の反応するレクチンの発見を行っていく予定。

4 . 研究成果

本研究期間中、膵臓癌をはじめとした胃癌、大腸癌などの消化器悪性腫瘍手術検体を用いた組織アレイを作成し、複数の内因性レクチンを標識し、網羅的なレクチン染色により臓器別の悪性腫瘍の糖鎖発現パターンを把握した。今回我々が確認した 4 種類の内因性レクチンに関しては、悪性腫瘍への反応性は確認されたが、周囲の間質や正常細胞への反応も同様に観察され、これらの内因性レクチンを用いた糖鎖標的治療は困難であると判断した。約 6000 種あるとされるレクチンの中でも、我々が同定した rBC2LC-N レクチンなどのように血液凝集活性が無く、人体に投与できる可能性があるレクチンが存在する。本研究で作成した複数の癌腫の組織アレイを用いたレクチン染色の解析で、胃がん、大腸がんの腫瘍細胞に特異的に反応するレクチン A、レクチン B を同定することができた。これらはさらに解析を進め、現在薬剤融合薬 (Lectin-Drug conjugate) を調整している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 木村 聡大, 小田 竜也, 下村 治, 栗盛 洸, 古田 智章, 宮崎 貴寛, 楊 よ, 大原 佑介, 明石 義正, 榎本 剛史, 大河内 信弘, 平林 淳, 舘野 浩章
2. 発表標題 レクチン修飾リポソームによる新規糖鎖標的抗がん治療法開発
3. 学会等名 日本外科学会定期学術集会抄録集 119回
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小田 竜也, 舘野 浩章, 下村 治, 平林 淳
2. 発表標題 2019238131 糖鎖原理に基づく難治性がんの新治療戦略 糖鎖標的がん治療 rBC2LC-Nレクチンをドラッグキャリアとする新規肝癌治療戦略
3. 学会等名 日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

〔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	小田 竜也 (Oda Tatsuya) (20282353)	筑波大学・医学医療系・教授 (12102)	