

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16528

研究課題名(和文)大腸癌腹膜播種に対する糖鎖標的レクチン治療の開発

研究課題名(英文)Lectin Drug Conjugate Therapy for Peritoneal Metastasis of Colorectal Cancer

研究代表者

大原 佑介(Ohara, Yusuke)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：90757791

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：rBC2LC-Nレクチンに抗がん化合物をconjugateしたものを膵癌担癌マウスに投与することで、著しい抗腫瘍効果を示した抗がん効果は膵癌腹膜播種について確認されており、実験系は大腸癌腹膜播種と同一で進行可能であると考えた。手術で保管したヒト大腸癌24例のホルマリン組織をレクチン染色を行ったところ21例が強陽性、3例が弱陽性であり膵癌同様に大腸癌においてもrBC2LC-Nレクチンに対する親和性を確認した。大腸癌細胞株についてはHT-29、LoVo、LS174T、DLD-1を選択した。この4つのセルラインにrBC2LC-N-PE38を投与すると、HT-29において抵抗性があることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

各種分子標的抗体薬は大腸がんでも一定の効果を示しているが、腹膜播種の様な病態に対する治療方法は未だに不十分である。抗体薬の多くががん細胞表面下層の膜タンパクを標的とするが、がん細胞の最外層は進展度、転移・再発を反映した特徴的な糖鎖層で覆われている。従って、がん標的治療の候補はタンパクではなく、表面糖鎖の方が効率的なはずである。本研究は糖鎖を標的としレクチン 糖鎖の結合力に注目した研究であった。大腸癌の細胞株によるレクチン-糖鎖の親和性が明らかとなり、難治性の大腸癌腹膜播種に対する新規治療に向けての基礎データを蓄積することができた。

研究成果の概要(英文)：First, we identified rBC2LC-N lectin for target of pancreatic cancer therapy, and demonstrated that the lectin-toxin conjugate could provide significant therapeutic effect against human pancreatic cancer in xenograft mouse model. Then we aimed to clarify the therapeutic efficacy of lectin drug conjugate therapy for colorectal cancer in vivo. Lectin drug conjugate, rBC2LCN-PE38, which was administered to colorectal cancer cell line derived mouse xenograft models, significantly suppressed tumor growth. Lectin drug conjugate therapy has the potential to be a novel targeted therapeutic option for colorectal cancer.

研究分野：消化器外科学

キーワード：レクチン 大腸癌 腹膜播種 抗癌剤

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞膜タンパク質や脂質の多くは糖鎖修飾を受けている為、細胞の最外層は糖鎖層であり、「細胞の顔」として働いている。その構造は細胞の種類、分化度を鋭敏に反映し、各種癌においても細胞膜上のタンパク質は悪性度に伴い特徴的な糖鎖修飾を受けている。従って、がんの標的治療を開発する際、糖鎖の奥に隠れた蛋白ペプチドではなく、表面に露出している糖鎖を狙う方が効率的なはずである。しかし、1) 生体試料中の微量な糖鎖を解析する技術が今まで無く、有効な癌の標的糖鎖を選別出来なかった、2) 糖鎖の構造は免疫動物に共通である為、ある糖鎖を狙った抗体を作る事は極めて困難、という理由で糖鎖を標的とする創薬研究は全く行われてこなかった。

大腸がんは日本の生活の欧米化に伴い、罹患者数で第2位、死亡者数で第3位と社会的な重要性の高い癌種になった(2015年統計)。病巣が大腸局所に留まるステージの場合、外科切除で高い根治性が期待できるが、既に腹膜播種を来した様な進行状態においては、未だに有効な治療方法が確立していない。臨床症状としては、腸閉塞などの臓器症状をはじめ、癌性腹膜炎に由来する腹水増多、低栄養状態の増悪をきたし、最終的にがん悪液質を増悪させ死に至らしめる。この腹膜播種の治療抵抗性をもたらしている要因は二つある。一つは腹膜播種巣と原発巣あるいは肝・肺転移巣との間の腫瘍病理学的な性質の違い、もう一つは血行性転移ではない腹膜播種への薬剤送達の困難さである。

近年、分子標的薬、抗体薬が精力的に開発されているが、これは癌細胞膜表面の受容体—リガンド結合による増殖シグナルを抑制する消極的な“cytostatic (静細胞的)”効果に留まる。アバスチンの成功例に見るように一定の効果はあるものの、多くの抗体医薬が莫大な開発費を費やして上市された結果「数ヶ月の延命に数百万円」と言われる低い費用対効果と、さらには国民医療費を圧迫する医療経済的問題に発展している。難治癌に対する抗癌効果を増すために、緑膿菌外毒素やジフテリアトキシンなどの毒素を抗体やリガンドに融合させた immunotoxin や ligandtoxin によって積極的に細胞を殺す“cytocydal (殺細胞的)”な治療薬の開発も盛んである。しかし、1 受容体に対して 1 分子しか結合できない事に加え、毒素を運ばせる抗体やリガンドの分子量が大き過ぎる為に細胞内への毒素の取り込み (=internalization) が効率的に行えず、臨床応用につながっていない。

レクチンは糖鎖と特異的に結合するタンパク群を指すが、最初に報告されたレクチン(1888年)が細胞を凝集する強い毒性を持っていた為、今までに発見された数千のレクチン全てが細胞凝集毒性を持つかの様な誤解が広まっている。その為、レクチンは癌細胞などが発現する糖鎖マーカーを検出する手段(診断プローブ)として使われた例はあるが、治療薬として実用化されたものは一つも無い。一方、近年レクチンに対する知見が蓄積してくると、レクチンによっては血液凝集活性が弱いものもあり、さらには、ヒトの生体の中にも 100 種以上のレクチンが存在して様々な生理活性に関与している事が明らかになった。そこで、私は、レクチンを治療担体として毒素を融合させ、大腸癌の腹膜播種を治療する新規治療を開発したいと発案した。

2 . 研究の目的

各種分子標的抗体薬は大腸がんでも一定の効果を示しているが、腹膜播種の様な病態に対する治療方法は未だに不十分である。抗体薬の多くががん細胞表面下層の膜タンパクを標的とするが、がん細胞の最外層は進展度、転移・再発を反映した特徴的な糖鎖層で覆われている。従って、がん標的治療の候補はタンパクではなく、表面糖鎖の方が効率的なはずである。本研究では、大腸がんを、a)大腸癌原発巣、b)肝・肺転移、c)腹膜播種に分け、各種糖鎖と特異的に結合すレクチン 96 種類をプロットしたレクチンマイクロアレイにより大腸がん腹膜播腫に特異的な糖鎖発現を同定する。それに続き、陽性反応を示したレクチンをラベルし、臨床検体における反応性を確認、担保する。本研究は、レクチンを薬剤担体として腹腔内投与する事により、大腸がんの腹膜播腫の表面糖鎖を標的する新規治療法開発を視野に入れた基盤的知見を得る。

3 . 研究の方法

- (i)大腸癌臨床検体の採取と保存
- (ii)膵癌細胞におけるがん特異的に発現する糖鎖と、親和性のあるレクチンの同定
- (iii)ヒト臨床大腸癌検体における rBC2LC-N レクチン染色
- (iv)ヒト大腸癌細胞株における lectin affinity assay
- (v) ヒト大腸癌細胞株における MTT-assay
- (vi) ヒト大腸癌細胞株 xenograft mouse における抗腫瘍効果

4 . 研究成果

- (i)臨床大腸癌検体を年100例ほど集積し保管した。通常のパラフィン切片に加えて生検体としてバイオバンクを通じて集積した。
- (ii)候補レクチンについては当科のグループで膵癌に対するレクチン解析において rBC2LC-Nレクチンを同定した。これは膵癌細胞株Capan1の細胞表面Glycanに特異的に集積した。rBC2LC-Nレクチンに抗がん化合物をconjugateしたものを担癌マウスに投与することで、著しい抗腫瘍効果を示した (O Shimomura, T Oda, et al. Mol Cancer Ther, 2018)。抗がん効果は膵癌腹膜播種について確認されており、実験系は大腸癌腹膜播種と同一で進行可能であると考えた。
- (iii)手術で保管したヒト大腸癌 24 例のホルマリン組織をレクチン染色を行ったところ 21 例が強陽性、3 例が弱陽性であり膵癌同様に大腸癌においても rBC2LC-N レクチンに対する親和性を確認した(Figure 1A)。
- (iv)大腸癌細胞株については HT-29、LoVo、LS174T、DLD-1 を選択した。レクチン染色を施行するとLS174T、DLD-1 は強陽性であったが、HT-29、LoVo は弱陽性であった(Figure 1 C)。
- (v)この4つのセルラインに rBC2LC-N-PE38 を投与すると、IC50 値はHT-29:4888pg/ml、LoVo : 817pg/ml、LS174T : 778pg/ml、DLD-1 : 403pg/ml であり、HT-29 において抵抗性があることがわかった(Figure 1 DE)。
- (vi)これらのセルラインを用いマウスゼノグラフトモデルを作成し、rBC2LC-N-PE38 を腹腔内投与した。結果 LS174T、DLD-1 には著しい抗腫瘍効果を認めたものの HT-29 と LoVo は効果が認められなかった。セルラインの rBC2LC-N レクチンに対する親和性の差が抗腫瘍効果の差となったと考えた (Figure 2)。

本研究は膵癌に特異的なレクチン糖鎖結合を見出し、抗腫瘍効果が得られたという知見を得て、大腸癌治療に応用したものである。大腸癌臨床検体においては高頻度で糖鎖の発現がみられたが、細胞株の実験では糖鎖発現のばらつきがみられ、それに応じて抗腫瘍効果の程度に差がみられた。結果としては合理的ではあるが、実際の臨床検体においても発現に差があることから本治療は適切にターゲットを絞り、レクチン染色で高発現する患者を対象とした治療として期待が持てると思った。腹膜播種モデルに対しては、動物モデルの作成と評価系について実験中であり、今後の研究課題である。

Figure 1

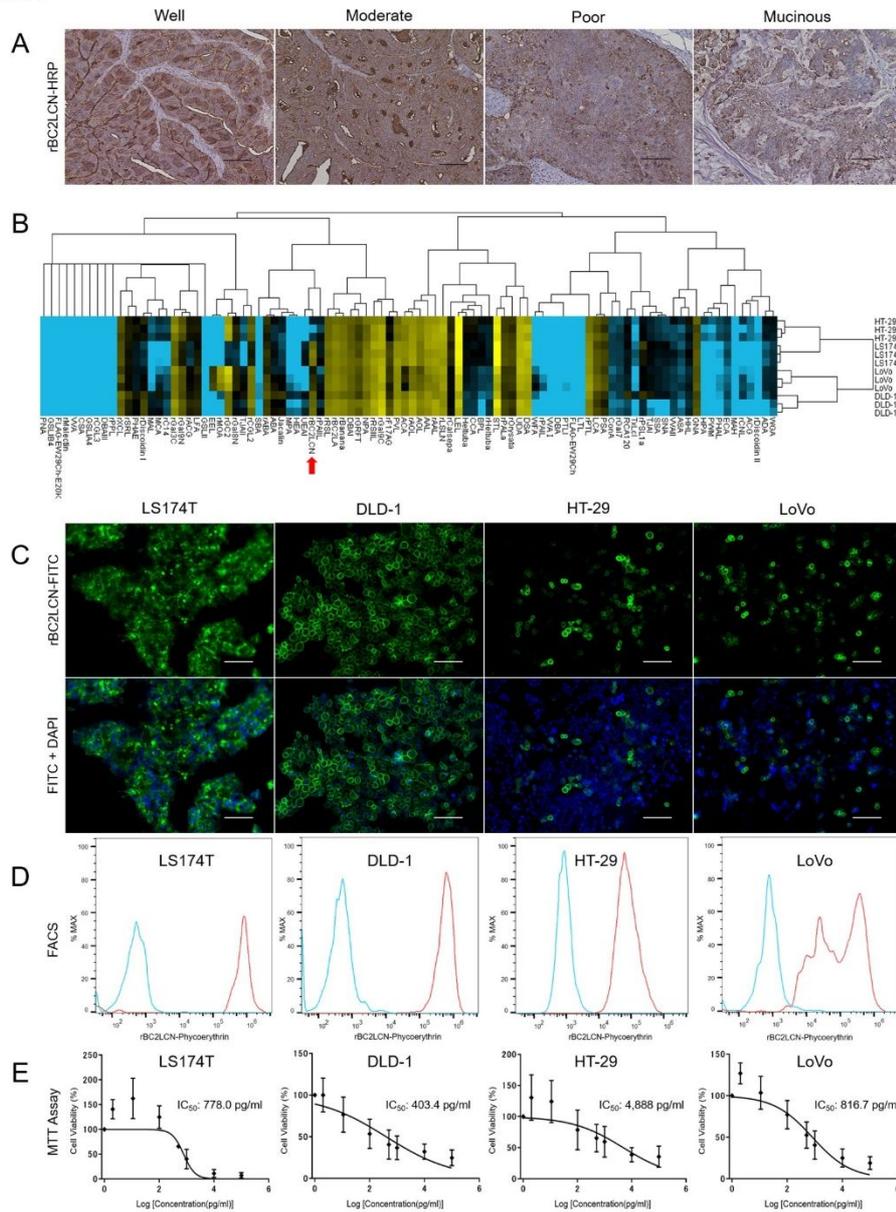
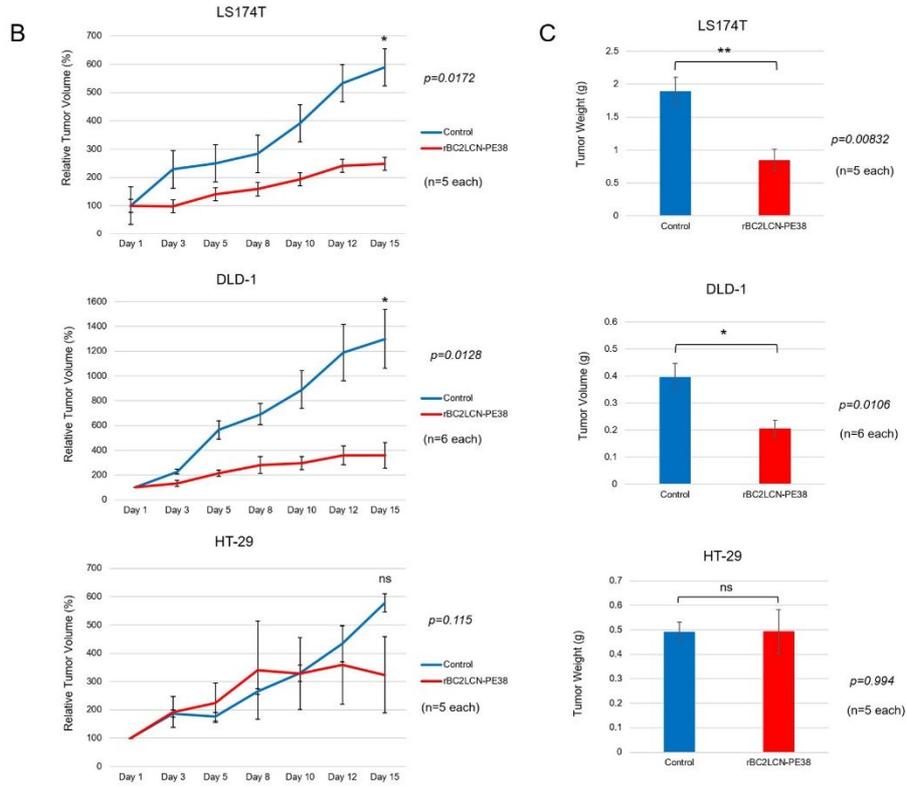
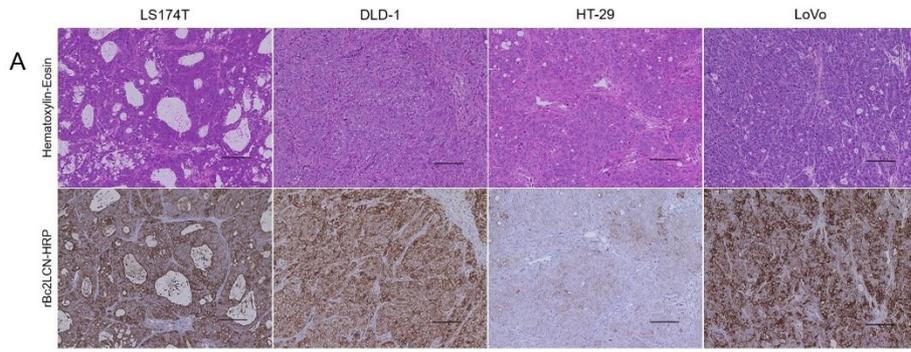


Figure 2



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Shimomura O, Oda T, Tateno H, Ozawa Y, Kimura S, Sakashita S, Noguchi M, Hirabayashi J, Asashima M, Ohkohchi N	4. 巻 1
2. 論文標題 A Novel Therapeutic Strategy for Pancreatic Cancer: Targeting Cell Surface Glycan Using rBC2LC-N Lectin-Drug Conjugate (LDC).	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Molecular Cancer Therapeutics	6. 最初と最後の頁 183-195
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1158/1535-7163.MCT-17-0232	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔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
---------------------------	-----------------------	----