

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17469

研究課題名（和文）糖鎖修飾を標的とした転移制御とナノキャリアを用いた大腸癌の新規薬物治療の開発

研究課題名（英文）Development of new treatment for colorectal cancer using metastasis control targeting sugar chain modification and a Fucose-Bound Nanoparticle.

研究代表者

吉田 真誠 (Yoshida, Makoto)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：70561025

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）：大腸癌が腫瘍マーカーであるCA19-9を高産生するため、その骨格となるフコースの要求度が高いことを利用し、新規ミサイル療法を開発した。TGF- β によるEMTを抑えるためのsiRNA FUT3/6及び現在の大腸癌に対する標準治療薬である5-FU/LV/SN38/L-OHPをF50フコース結合リポソーム内に内包化することで、より特異的にこれらの治療薬がCA19-9を高産生する大腸癌細胞に送達され、高い抗腫瘍効果を有することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

EMTを惹起した癌細胞に特異的にsiRNA FUT3/6を送達することで、より効率的に転移・浸潤を抑制できる可能性がある。また、5-FU/LV/SN38/L-OHPの多剤療法は有害事象を高率に認めるが、本治療は腫瘍細胞に特異的に送達されるので、より有害事象が少ない可能性が示唆され、そのため高い抗腫瘍効果を有することが期待される。本治療は大腸癌の有害事象の少ない、新たな治療法となる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Since colorectal cancer produces high tumor marker CA19-9, we have developed a new missile therapy by taking advantage of the high demand for fucose, which is the skeleton. siRNA FUT3 / to suppress EMT by TGF- β . By encapsulating 5-FU / LV / SN38 / L-OHP, which is the standard treatment for 6 and current colorectal cancer, in F50 fucose-bound liposomes, these treatments increase CA19-9 more specifically. It was found that it was delivered to the produced colon cancer cells and had a high antitumor effect.

研究分野：消化器内科学

キーワード：大腸癌 フコース結合リポソーム EMT siRNA FUT3/6 5-FU/LV/SN38/L-OHP

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年, Bevacizumab や Cetuximab といった分子標的剤が登場し, 切除不能進行大腸癌に対する治療成績は向上しつつあるが, 生存期間中央値は 25-30 カ月に過ぎず未だ十分とは言い難い. 我々は 大腸癌細胞では, 積極的にフコースを摂取すると共に複数の蛋白質にルイス型あるいはコアフコース型の糖鎖修飾が行われ, 大腸癌細胞のフコシル化蛋白増加が血管浸潤ならびにステージの進行に正の相関があることを見出し報告してきた. そのため, CA19-9 産生大腸癌細胞がフコースの要求度が高いことを利用し, 表面修飾可能なリポソーム作製技術 (Nat Biotechnol, 2008) を用いて, 癌に対して特異性の高い送達性を有する SN38 内包化フコース結合リポソームによる新規治療法を報告してきた. しかし, *in vivo*において, SN38 の治療開始 100 日以内は良好な成績であったが, 100 日以降の長期の成績は十分ではなかった (*J Natl Cancer Inst* 2016). そのため, 大腸癌細胞において TGF- β 1 受容体が Fucosyltransferase 3/6 によりフコシル化することで EMT を惹起し, 浸潤・転移を促進していること (Br J Cancer, 2013, 図 1) に着目し, siRNA FUT3/6 内包化フコース結合リポソームが治療効果改善に繋がる可能性を考えた.

2. 研究の目的

EMT を惹起するフコシル化の制御目的に siRNA FUT3/6 及び殺細胞性効果の向上目的に 5-FU/LV/SN38/L-OHP といった現在大腸癌に用いられている抗癌剤のすべてを内包化したフコース結合リポソームを作製し, 大腸癌に対する新たな分子標的ミサイル療法を開発すること.

3. 研究の方法

細胞株: 大腸癌細胞株である Colo205 と Ls174T を ATCC より購入し, 推奨されている条件で培養・継代を行った.

siRNA FUT3/6: siRNA3 及び siRNA6 を dharmacon より購入し, 推奨されている方法で使用した.

WST-1 assay: WST-1 アッセイの試薬をタカラバイオより購入し, 100 μ l/well になるように 96 ウェルプレートで細胞株を培養した. 細胞濃度は 2×10^4 個/well, 培養時間は 48 時間とした. S 細胞培養後に WST-1 液を 1well あたり 10 μ l ずつ加え, 1 時間後にマイクロプレートリーダーで測定した.

Colony formation assay: 6 ウェルプレートに細胞株を 0.3×10^6 個/well ずつ seeding し, 48 時間後に colony 数を測定した.

Invasion assay: Cell Biolabs より CytoSelect Cell invasion assay kit を購入した. 推奨されている方法で使用した.

Western blotting: Br J Cancer, 2013 に記載した方法を使用した. 抗体は E-cadherin は ab15148, ZEB1 は ab203829, Snail は ab216347 を使用した.

Flow Cytometric analysis: PLoS One, 2012 に記載した方法に従った. フコース結合リポソームに Cy5.5 を conjugate し, 測定した.

細胞内への Cy5.5 の取り込み評価: PLoS One, 2012 に記載した方法を従い, fluorescence microscopy (Keyence, BZ-8000) を使用した.

siRNA FUT3/6, 5-FU/LV/SN38/L-OHP 内包化リポソームの作成: PLoS One, 2012 に記載した方法を従い片山化学工業(株)に作成依頼し, siRNA FUT3/6 内包化フコースリポソーム及び 5-FU/LV/SN38/L-OHP 内包化フコース結合リポソームを作成した. フコース濃度は 50 μ g/ml (F50) と control として 0 μ g/ml (F0) の 2 種類を作成した. また, それぞれに Cy5.5 を標識したフコース結合リポソームも作成した.

Xenograft Model の作成:

4-6 週齢の BALB/c nude マウスを使用した.

(1) 皮下モデルは 2×10^6 個の大腸癌細胞株 (colo205) を両背部の皮下に注射した.

(2) 同所モデル: 盲腸漿膜下に 3×10^6 個の大腸癌細胞株 (colo205) を注射した.

4. 研究成果

(1) 大腸癌細胞株 Colo205 と Ls174T を serum-free 培地で 48 時間培養し, 培養液の CA19-9 濃

度をELISAで測定し、CA19-9を高産生していることを確認した。また、FUT3/6発現をq-PCRとWestern blotting (WB)で測定しFUT3/6の高発現を確認した。次にsiRNA FUT3/6で処理することで、FUT3とFU6の発現が低下することをq-PCR及びWBで確認した。

(2) 未処理のColo205とLs174TとsiRNA FUT3/6で処理したColo205とLs174TをInvasion assayで比較し、siRNA FUT3/6で処理したColo205とLs174Tが有意に細胞浸潤活性低下していることを確認した。また、E-cadherin, Zeb1, Snail1といったEMT関連分子の発現を未処理のColo205とLs174TとsiRNA FUT3/6で処理したColo205とLs174Tとでq-PCR及びWBで比較し、E-cadherin, Zeb1, Snail1の発現低下を確認した。以上からTGF- β 1受容体のフコシル化の抑制により、EMTが制御されていることが示唆された。

(3) Cy5.5で標識したFUT3/6内包化F0, F50フコース結合リポソームはF0に比較し、F50が有意にColo205やLs174Tに対して、有意に高い送達性を有することをFlow Cytometric analysis及び、fluorescence microscopyで確認した。この事から既報(PLoS One, 2012)と同様にCA19-9を高産生する大腸癌細胞株において、フコース結合リポソームは特異的に送達されることがわかった。

(4) siRNA FUT3/6内包化F0, F50フコース結合リポソームをColo205やLs174Tに処理し、F50フコース結合リポソームの方が有意にF0フコース結合リポソームよりFUT3/FUT6の発現を低下させることをq-PCRとWBで確認した。

(5) 5-FU/LV/SN38/L-OHPのみおよび、5-FU/LV/SN38/L-OHP内包化F0, F50フコース結合リポソームの抗腫瘍効果を検討した。大腸癌細胞株colo205やLs174Tにおいて、前述の薬剤で処理し、WST-1 assayやcolony formation assayで評価した。5-FU/LV/SN38/L-OHPのみと5-FU/LV/SN38/L-OHP内包化F0フコース結合リポソーム間に有意差はなかったが、5-FU/LV/SN38/L-OHP内包化F50フコース結合リポソームで有意に高い抗腫瘍効果を示した。(Fig. 1)

(6) 大腸癌細胞株colo205をBALB/c nudeマウスの皮下に移植した皮下モデルを作製した。Cy5.5を標識したsiRNA FUT3/6および5-FU/LV/SN38/L-OHP内包化F0, F50フコース結合リポソームを尾静脈注射し、IVISで腫瘍細胞への取り込みを測定した。F50リポソームはF0リポソームと比較し、より腫瘍細胞へ特異的に送達されていることを確認した。更に盲腸にcolo2015を移植し、大腸癌のOrthotopicモデルを作成した。siRNA FUT3/6内包化F0, F50フコース結合リポソームを最初の1週は2回、その後は週1回尾静脈注射を行い、4週目にsacrificeした。盲腸の腫瘍細胞を採取し、E-cadherin, Zeb1, Snail1といったEMT関連分子の発現をq-PCR及びWBで測定し、siRNA FUT3/6内包化F50フコース結合リポソームはF0に比較し、有意にEMT関連分子の発現が低下していることを確認した。

(7) 更に、5-FU/LV/SN38/L-OHP, 5-FU/LV/SN38/L-OHP内包化F0, F50フコース結合リポソームを前述のOrthotopicモデルに最初の週は2回、その後は週2回尾静脈注射した。それぞれのモデルマウスの生存期間をKaplan-meier法にて、各治療間で生存率の有意差の有無を評価した。5-FU/LV/SN38/L-OHP内包化F50フコース結合リポソームが5-FU/LV/SN38/L-OHPや5-FU/LV/SN38/L-OHP内包化F0フコース結合リポソームと比較し、有意に腫瘍細胞の縮小を認め、生存期間の延長も認めた。

(8) 次にsiRNA FUT3/6内包化F50フコース結合リポソームと5-FU/LV/SN38/L-OHP内包化F50フコース結合リポソームの併用療法(A)とsiRNA FUT3/6内包化F0フコース結合リポソームと5-FU/LV/SN38/L-OHP内包化F0フコース結合リポソームの併用療法(B)の有効性を比較検討した。前述のOrthotopicモデルにそれぞれを最初の週は2回、その後は週2回尾静脈注射した。再度、それぞれのモデルマウスの生存期間をKaplan-meier法にて、各治療間で生存率の有意差の有無を評価した。併用療法(A)は併用療法(B)と比較し、有意に腫瘍細胞の縮小を認め、生存期間の延長も認めた (Fig. 2)。

<引用文献>

- (1) Osuga T, Yoshida M, et al J Natl Cancer Inst 2016
- (2) Hirakawa M, Yoshida M, et al. Br J Cancer, 2013
- (3) Yoshida M, et al PLoS One 2012 7(7):e39545

Fig1.

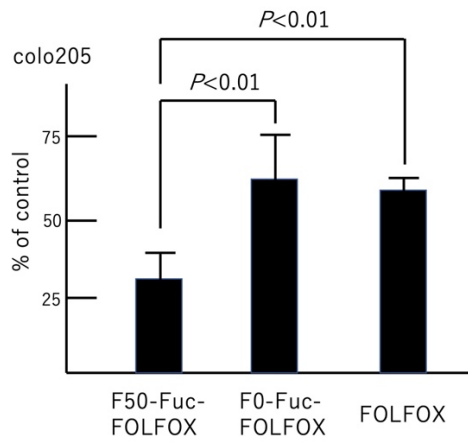
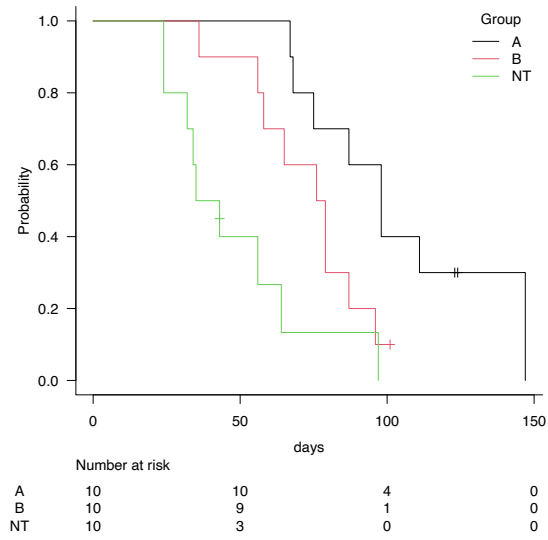


Fig2.



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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------