

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 1 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21390231

研究課題名（和文） 膵がん細胞を標的とした新しい抗がん療法の開発

研究課題名（英文） Targeting anticancer drug delivery to pancreatic cancer cells using a fucose-bound nanoparticle approach

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

研究成果の概要（和文）：膵癌は浸潤性が高く、早期に転移しやすいことから極めて予後不良な癌の一つであるが、現状では、進行膵癌に対する有効ながん薬物療法はない。そこで、膵癌細胞を標的とした新たな細胞標的療法を考案した。膵癌細胞の X 分子の要求度が高いことに着目し、その receptor-mediated endocytosis を利用した抗がん剤送達法を用いることによって、膵癌細胞を標的とした新規の抗がん療法を開発した（論文投稿中）。本製剤は X 分子要求度の高い各種膵癌細胞株に対する特異的な送達、ならびに高い抗腫瘍効果を *in vitro* および *in vivo* で示した。現在、実用化に向けた準備を進めている。

研究成果の概要（英文）：Owing to its aggressiveness and the lack of effective therapies, pancreatic ductal adenocarcinoma has a dismal prognosis. New strategies to improve treatment and survival are therefore urgently required. We developed X-bound nanoparticles as vehicles for delivery of anticancer drugs specifically to cancer cells. X-bound liposomes containing Cy5.5 or Cisplatin were effectively delivered into CA19-9 expressing pancreatic cancer cells. Intravenously injected X-bound liposomes carrying Cisplatin were successfully delivered to pancreatic cancer cells, mediating efficient tumor growth inhibition as well as prolonging survival in mouse xenograft models. This modality represents a new strategy for pancreatic cancer cell-targeting therapy.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	6,300,000	1,890,000	8,190,000
2010 年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
2011 年度	3,000,000	900,000	3,900,000
年度			
年度			
総計	13,700,000	4,110,000	17,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：①癌 ②糖鎖 ③内科

1. 研究開始当初の背景

膵癌は、現在本邦における癌死亡原因の第 5 位であり、年間約 2,200 人を超える死亡数が推計されており、年々増加の一途を辿っている。膵癌は浸潤性が高く、早期に転移しやすいことから極めて予後不良な癌の一つであ

る。更に、診断時に手術不能の IVb 期に既に進行している例が約 60%であり、例え病期 IVb 以下で手術が行われても 90%の症例は再発し 5 年生存率は 10%と報告されている。現状では、このような進行膵癌に対する有効ながん薬物療法はなく、最も有効性の高いとさ

れている Gemcitabin による抗がん治療を行っても平均余命は約 5.7 ヶ月と極めて不良である。また、最近注目されている分子標的療も、欧米を中心に臨床試験が試みられているが特異性に問題があり、満足すべき成果は得られていないのが現状である。

2. 研究の目的

そこで、膵癌細胞が腫瘍マーカー CA19-9 を産生し、その産生に X 分子が必要であることに着目し、膵がん細胞特異的に薬剤を送達するシステムを開発し、より有効かつ副作用の少ない治療法を考案し、がん治療成績の向上を目的として細胞標的製剤を開発することとした。

3. 研究の方法

(1) 各種膵癌細胞培養上清中の腫瘍マーカー濃度の測定: 各種樹立細胞株 (PK59, ASPC-1, PANC-1, MIAPaCa など) 5×10^6 個の細胞を 25 cm² フラスコに播種し、無血清培地 Opti-MEM 3ml で 48 時間培養し、培養上清中の腫瘍マーカー (CA19-9, SPAN-1, DuPAN2 など) を ELISA 法で検討する。

(2) X 分子結合 Liposome の作製: 既報に従い (Kawakami S, et al. BBRC 252, 1998) 作製後、1.2 μ mol と 0.8 μ mol DOPE をクロロホルムで溶解し蒸散する。次に 20 mM HEPES に溶解し 10 分間超音波処理を行い、ミリポア処理を行う。粒子のサイズは dynamic light scattering spectrophotometer (LS-900, Otsuka Electronics, Osaka Japan) にて測定し、血液脳関門を通過しない 100-200 nm の粒子径であることを確認する。さらに Z potential は laser electrophoresis zeta-potential analyzer (LEZA-500T, Otsuka electronics) を用いて測定する。なお、X 分子結合コレステロールと DOPE のモル比は後述する ratio の検討結果を受けて決定する。

(3) X 分子結合 Liposome による Cy5.5 の導入: X 分子結合 Liposome を加え incubation 後、チャンバースライドに播種した ASPC-1, PANC-1, PK59, MIAPaCa 細胞に添加し、1 時間培養する。培養後、細胞を PBS で洗浄し 4% paraformaldehyde で固定後、PBS で洗浄、DAPI による counterstaining し蛍光顕微鏡下に観察する。また、flowcytometry を用いて、導入効率を定量的に解析し最も高い導入効率を得られる比率を決定する。

(4) X 分子受容体特異的な薬物導入の確認: X 分子受容体を介した導入であることを確認するため、過剰な X 分子存在下における Cy5.5 の導入効率を検討する。X 分子結合 Liposome を加え incubation 後、チャンバースライドに播種した ASPC-1, PANC-1, PK59, MIAPaCa 細胞に添加し、1 時間培養する。培養後、細胞を PBS で洗浄し 4% paraformaldehyde で固定後、PBS で洗浄、DAPI

による counterstaining し蛍光顕微鏡下に観察する。

(5) 抗がん剤含有 X 結合 Liposome による抗腫瘍効果の検討: X 分子 liposome に Gemcitabin や Cisplatin などの膵癌治療に臨床的に用いられている抗がん剤を封入し抗腫瘍効果の増強を検討する。Gemcitabin や Cisplatin などの抗がん剤を 0 - 1000 μ M の濃度で封入し、ASPC-1, PANC-1, PK59, MIAPaCa などの膵癌細胞株を各種抗がん剤単独もしくは X 分子結合 liposome 抗がん剤に暴露し、殺細胞効果を WST-1 assay で検討する。なお、導入効率が高いため短時間の暴露後、抗がん剤あるいはリポソーム抗がん剤を洗浄・除去後に殺細胞効果を検討する。

(6) 膵癌 (ASPC-1, PK59, PANC-1, MIAPaCa) 担癌マウスの作製と X 分子結合-liposome-抗腫瘍剤による抗腫瘍効果の検討: ヌードマウスに 5×10^6 個のヒト膵癌細胞株 (ASPC-1, PK59, PANC-1, MIAPaCa) を接種し、担癌マウスを作製する。腫瘍径が約 5 mm になった時点で研究を開始する。担癌マウスを作製後、X 分子結合 liposome-Cy5.5, liposome-Cy5.5 あるいは liposome 単独群に分け (5 匹) 経静脈投与し、delivery 効率を検討する。更に、X 分子結合-liposome-抗腫瘍剤, liposome-抗腫瘍剤あるいは抗腫瘍剤単独をそれぞれの系において 10 匹ずつのマウスに経静脈投与し、腫瘍径の変化を経時的に観察し、抗腫瘍効果を検討する。なお、投与後 1 週目、2 週目に腫瘍を摘出し、腫瘍細胞内にみられる腫瘍細胞を HE 染色で同定し形態を観察、さらに同一切片内の凍結切片標本におけるアポトーシス細胞を TUNEL 染色を行い検討する。さらに、同動物実験系における抗腫瘍効果を生存率を求めることで検討を行う。

4. 研究成果

(1) 各種膵がん細胞における腫瘍マーカーの産生 (図 1)

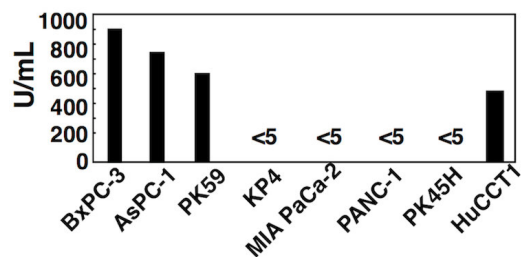


図 1

細胞の無血清培地から作製した培養上清の CA19-9 を ELISA 法で測定したところ、BxPC3, AsPC-1, PK59 および HuCCT-1 は CA19-9 高産生株であった。

(2) CA19-9 高産生株に対する FAM, Cy5.5 の導入効果 (図 2)

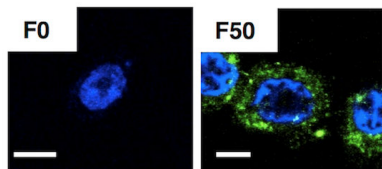
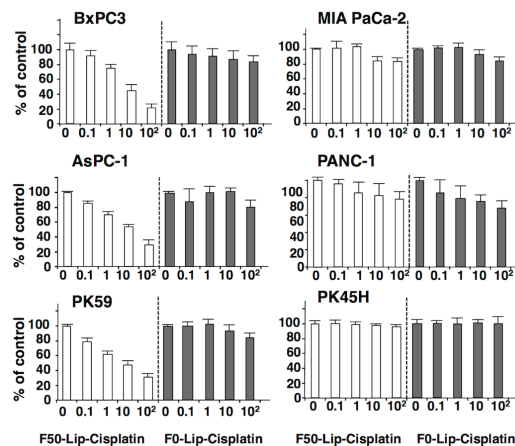


図 2

BxPC3 細胞に FAM 内包化 X 分子結合 (F50), 非結合 Liposome (F0) を暴露し, 細胞を洗浄後, 蛍光顕微鏡で観察した. その結果 X 分子結合 Liposome (F50) では FAM が効率的に導入されていることが確認された. また, CY5.5 内包化 X 分子結合, 非結合 Liposome を用いて Flowcytometry を施行したところ, CA19-9 産生細胞において高い導入が確認された (data not shown). 以上から, X 分子結合 Liposome の CA19-9 産生膵癌細胞への特異的送達が *in vitro* で確認された.

(3) 抗がん剤内包化 X 分子結合 Liposome による特異的抗腫瘍効果 (図 3)

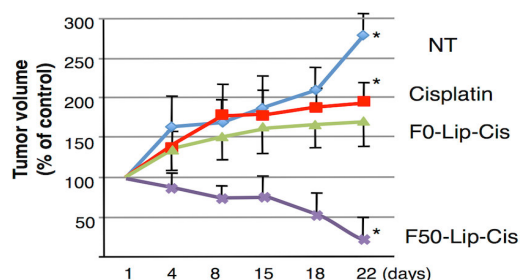


Cisplatin 内包化 X 分子結合あるいは非結合 Liposome を各種膵がん細胞株へ暴露し, WST-1 アッセイにより抗腫瘍効果を検討した. その結果, 図 3 に示すように, CA19-9 高産生株においてのみ X 分子結合 Liposome による抗腫瘍効果が認められた.

(4) 抗がん剤内包化 X 分子結合 Liposome による担がんマウスに対する抗腫瘍効果 (図 4)

膵がん細胞株をヌードマウス背部に移植し, 皮下腫瘍モデルを作製した. その結果, 図 4 に示すように, 抗がん剤内包化 X 分子結合 Liposome (F50) は最も腫瘍増殖抑制効果を発揮した.

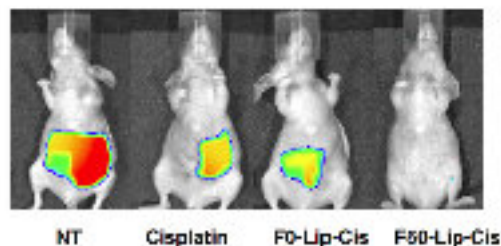
図 4



更に, 同所モデルにおいても, 明らかな腫瘍の抑制を認めた (図 5).

以上より, 抗がん剤の膵がん細胞特異的な送達により, 抗腫瘍効果が期待された.

図 5



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 8 件, 全て査読あり)

1. Hayashi T, Kobune M, Takimoto R, Kato J. A phase I trial of arterial infusion chemotherapy with gemcitabine and 5-fluorouracil for unresectable biliary tract cancer. *Int J Clin Oncol*. 2011 Sep 21.
2. Sato T, Kobune M, Takimoto R, Kato J. Iron chelator deferasirox rescued mice from Fas-induced fulminant hepatitis. *Hepatol Res*. 2011 Jul;41(7):660-7.
3. Sato T, Takimoto R, Kobune M, Kato J. Novel missense mutation in the TMPRSS6 gene in a Japanese female with iron-refractory iron deficiency anemia. *Int J Hematol*. 2011 Jul;94(1):101-3.
4. Kobune M, Takimoto R, Kato J. Establishment of a simple test for iron absorption from the gastrointestinal tract. *Int J Hematol*. 2011 Jun;93(6):715-9.
5. Sato Y, Takimoto R, Kobune M, Kato J. Argon plasma coagulation treatment of hemorrhagic radiation proctopathy: the optimal settings for application and long-term outcome. *Gastrointest Endosc*. 2011 Mar;73(3):543-9.
6. Sato Y, Takimoto R, Kobune M, Niitsu Y, Kato J. Phase II study of S-1, docetaxel and cisplatin combination chemotherapy in patients with unresectable metastatic gastric cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2010 Sep;66(4):721-8.
7. Kobune M, Takimoto R, Kato J. Drug resistance is dramatically restored by hedgehog inhibitors in CD34+

leukemic cells. Cancer Sci. 2009
May;100(5):948-55.

8. Hayashi T, Kobune M, Takimoto R, Kato J, Niitsu Y. Suppressive effect of sulindac on branch duct-intraductal papillary mucinous neoplasms. J Gastroenterol. 2009;44(9):964-75.

〔学会発表〕(計1件)

1. 瀧本理修, 加藤淳二. 膵癌に対する新規ミサイル療法の開発. 第18回浜名湖シンポジウム. 平成22年12月25-26日, 浜松.

〔図書〕(計0件)

なし

〔産業財産権〕なし

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

瀧本 理修 (TAKIMOTO RISHU)
札幌医科大学・医学部・講師
研究者番号: 10336399

(3) 研究分担者

小船 雅義 (KOBUNE MASAYOSHI)
札幌医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 90336389