

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 25 年 3 月 31 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22501042

研究課題名（和文）

ケモカイン機能の利用したがん細胞呼び込み型 DDS 製剤の開発と腹膜播種治療への応用

研究課題名（英文）

Development of DDS which accumulate cancer cell by chemokines function in peritoneal carcinomatosis therapy

研究代表者

小泉 桂一（KOIZUMI KEIICHI）

富山大学・和漢医薬学総合研究所・准教授

研究者番号：10334715

研究成果の概要（和文）：

胃がん、大腸、肝臓や卵巣がん等の固形がん細胞株は、CXCR4 を発現していた。さらに、のボイデンチャンバー法において、これらの細胞株は CXCL12 への遊走性が確認された。しかしながら、リアルタイムの遊走活性モニタリング装置の解析では、その遊走の方向性は見いだせず、運動性の自由度が亢進している結果となった。

研究成果の概要（英文）：

We examined expression of several chemokine receptors in human solid cancer such as gastric, colorectal, liver, ovarian cancer cell lines. These cell lines selectively expressed CXCR4 at high levels. These cells showed significant chemotactic response to CXCL12 in Boyden chemotaxis chamber. However, this response could not be observed in Real-time migration activity monitoring device. On the other hand, flexibility of the kineticism of these cells increased.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012 年度	600,000	180,000	780,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・臨床腫瘍学

キーワード：ドラッグデリバリー

1. 研究開始当初の背景

がん転移、特に腹腔にちりぢりに散在した腹膜播種性転移がん細胞の外科的摘出は不可能であり、既存の抗がん剤による治療、さらには現状の DDS 技術を駆使しても散在する

がん細胞への薬物送達是非常に困難である。これまでに申請者は、転移性がん細胞はある種のケモカインに向かって移動する、すなわち、ケモカインによる種々転移性がん細胞の「呼び込まれ機構」を解明してきた。さらに、

この「呼び込まれ機構」が、がんの転移成立における重要な役割を担っていることを明らかにしてきた。

2. 研究の目的

従来の DDS の概念は、薬物を細胞（組織）に送達させることであった。しかしながら本研究では上記現象を利用して、DDS の概念を一新する「薬物自体ががん細胞を呼び込む」、いわば「自立的がん細胞呼び込み型 DDS 製剤」の開発することを目的とし、将来的にこの DDS 製剤を適応した治療により播種性がん転移の撲滅を目指す。

3. 研究の方法

(1) 高集積性がん組織マイクロアレイによる腹膜播種性がん細胞のケモカイン受容体の網羅的な探索

これまでに申請者らは、胃がんの原発巣に発現する種々のケモカイン受容体を検索した結果、ケモカイン受容体 CXCR4 の高発現と胃がん細胞の腹膜播種性転移との臨床統計学的な相関を明らかにしてきた。しかしながら、腹膜播種性転移は胃がんに限らず、大腸、肝臓や卵巣がんにおいてもリスクファクターである。ところで、臨床検体の免疫染色を行い、臨床統計学的な検討を行う際の最大の問題点は、多数症例の収集の難しさである。この問題を解決するために、申請者らは、スライドガラス 1 枚に約 1000 症例の圧倒的多数の種々がん組織を搭載した「高集積性がん組織マイクロアレイ」を作製済みである。本実験では、このマイクロアレイを種々ケモカイン受容体抗体で免疫染色を行い、発現受容体の有無ならびに発現の強弱で階層に分類する。最終的に、腹膜播種性転移の有無と上記階層分類を統計学的な解析を行い、胃がん以外にも、大腸、肝臓や卵巣がんの腹膜播種性転移を制御しているケモカイン受容体を網羅的に探索する

(2) トキシン融合ケモカインの作製（トキシン融合 CXCL12 の作製）

これまでに申請者らは、ケモカイン CXCL12 は腹膜播種性転移胃がん細胞株 NUGC4 細胞の受容体 CXCR4 を介して遊走能力を亢進することを明らかにしてきた。さらに、ケモカイン CXCL12 はこの NUGC4 細胞の受容体 CXCR4 と共に細胞内に取り込まれることを確認している。本計画では、直接的にがん細胞内に取り込まれることで、強力な毒性を発揮するジフテリアトキシンフラグメント A を融合させた改変 CXCL12 の作製を行う。

(3) CXCL12-DTA によるがん細胞の呼び込み効果ならびに殺細胞作用の同時測定

ケモカイン受容体を有する細胞は、ケモカインの濃度勾配にそって、ケモカイン産生源に向かって遊走する。本研究では、

CXCL12-DTA による NUGC4 細胞の遊走ならびに殺細胞作用を、リアルタイムの遊走活性モニタリング装置を使用して同時評価を行う。

(4) 治療実験用 CXCL12-DTA 産生アデノウイルスベクターの作製

作製したコンストラクトを利用して、定法に従い CXCL12-DTA 産生アデノウイルスベクターの作製

4. 研究成果

これまでに申請者は、転移性がん細胞はある種のケモカインに向かって移動する、すなわち、ケモカインによる種々転移性がん細胞の「呼び込まれ機構」を解明してきた。本研究では上記現象を利用して、DDS の概念を一新する「薬物自体ががん細胞を呼び込む」、いわば「自立的がん細胞呼び込み型 DDS 製剤」の開発することを目的とし、将来的にこの DDS 製剤を適応した治療により播種性がん転移の撲滅を目指すことにある。初年度は、これらの条件を探索するために、当初計画に示したケモカイン CXCL12 を含めて様々な種類のケモカインに対する、各種がん細胞の遊走能力の評価をリアルタイムの遊走活性モニタリング装置を使用して評価を行った。その結果、胃がん以外にも、大腸、肝臓や卵巣がん等の細胞は、CXCL12 への遊走性が強かった。一方で、血球系のがん細胞は、その他のケモカインへの遊走性が強いことが確認できた。

次年度は、各種ケモカイン受容体の発現を網羅的に検索した。その結果、腹膜播種が問題となる大腸がんでは、CCR6 の発現が確認できた。

最終年度は、各種がん細胞標本を用いてケモカイン受容体の発現を解析した。その結果、胃がん細胞には、ケモカイン受容体 CXCR4 が高発現していることが確認できた。次に、そのリガンドであるケモカイン CXCL12 に対する遊走特性を評価した。ボイデンチャンパー法では、胃がん細胞は下層のケモカイン CXCL12 に向かって遊走し、その方向性を見いだせた。しかしながら、リアルタイムの遊走活性モニタリング装置の解析では、遊走の方向性は見いだせず、運動性の自由度が亢進している結果となった。これまで、我々も含めて、数多くの研究グループがケモカインによる固形がんの遊走機序を提案している。これらの機序は、ボイデンチャンパー法による、一方向性への移動を基に、論じられている。しかしながら、本研究により、ケモカインによる固形がんの遊走は、決して一方向性ではなく、運動性の自由度の亢進の結果、見かけ上、遊走が亢進している、予期しない結果となった。今後は、他がん種でも同様か検討を行い、本研究の戦略の見直しを図る予定である。

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 7 件)

1. Ji-ye Kee, Aya Ito, Shozo Hojo, Isaya Hashimoto, Yoshiko Igarashi, Kazuhiro Tsukada, Tatsuro Irimura, Naotoshi Shibahara, Takashi Nakayama, Osamu Yoshie, Hiroaki Sakurai, Ikuo Saiki and Keiichi Koizumi: Chemokine CXCL16 suppresses liver metastasis of colorectal cancer via augmentation of tumor-infiltrating NKT cells in a murine model. *Oncol. Rep.*, 29:975-82. 2013
2. Prangsaengtong O, Senda K, Doki Y, Park J-Y, Jo M, Sakurai H, Shibahara N, Saiki I, and Koizumi K.: Calpain 1 and -2 play opposite roles in cord formation of lymphatic endothelial cells via eNOS regulation. *Human Cell*, 25: 36-44, 2012.
3. Kee J-Y, Arita Y, Shinohara K, Ohasgi Y, Sakurai H, Saiki I, Koizumi K.: Anti-tumor immune activity by chemokine CX3CL1 in an orthotopic implantation of lung cancer model in vivo. *Mol. Clin. Oncol.*, 2012.
4. Kudo Y, Iizuka S, Yoshida M, Nguyen PT, Siriwardena SB, Tsunematsu T, Ohbayashi M, Ando T, Hatakeyama D, Shibata T, Koizumi K., Maeda M, Ishimaru N, Ogawa I, Takata T.: Periostin directly and indirectly promotes tumor lymphangiogenesis of head and neck cancer. *PLoS One*. 2012;7(8):e44488. Epub 2012 Aug 30.
5. Prangsaengtong O., Koizumi K., Senda K., Sakurai H., and Saiki I.: eNOS and Hsp90 interaction directly correlates with the cord formation in human lymphatic endothelial cells. *Lymphat. Res. Biol.*, 9: 53-59, 2011.
6. Refaat A., Zhou Y., Suzuki S., Takasaki I., Koizumi K., Yamaoka S., Tabuchi Y., Saiki I., and Sakurai H.: Distinct roles of TAK1-c-Rel and IRF4 pathways in HTLV-1-transformed Th17 cells producing IL-9. *J. Biol. Chem.*, 286: 21092-21099, 2011
7. Suzuki S., Zhou Y., Refaat A., Takasaki I., Koizumi K., Yamaoka S., Tabuchi Y., Saiki I., and Sakurai H.: Human T cell lymphotropic virus 1 manipulates interferon regulatory signals by controlling the TAK1-IRF3 and IRF4 pathways. *J. Biol. Chem.*, 285: 4441-4446, 2010.

[学会発表] (計 14 件)

1. 奇知芸, 伊東彩, 櫻井宏明, 入村達郎, 濟木育夫, 小泉桂一: IRF8 を介した TNF- α 誘導性のアポトーシスによる CXCL16 高発現大腸がんの肝転移抑制. 第 21 回がん転移学会総会・学術集会, 2012, 7, 12-13, 広島.
2. 奇知芸, 櫻井宏明, 入村達郎, 小泉桂一, 濟木育夫: ケモカイン CXCL16 による大腸がんの肝臓および肺への相反する制御. 第 16 回日本がん分子標的治療学会学術集会, 2012, 6, 27-29.
3. 河西美保, 小泉桂一, 濟木育夫, 櫻井宏明: 活性変異型 EGFR を発現するヒト非小細胞肺癌細胞における EGFR セリン・スレオニン残基のリン酸化機構. 第 16 回日本がん分子標的治療学会学術集会, 2012, 6, 27-29.
4. 奇知芸, 伊東彩, 櫻井宏明, 入村達郎, 濟木育夫, 小泉桂一: Chemokine CXCL16 oppositely modulates liver and lung metastasis of colon cancer cells. 第 70 回日本癌学会学術総会, 2011, 10-3-5, 名古屋
5. 小泉桂一: ケモカインとがん転移 — そのメカニズムと治療への応用に向けて —. 第 29 回日本ヒト細胞学会学術集会, 2011, 8, 20-21, 富山.
6. 伊東彩, 櫻井宏明, 入村達郎, 濟木育夫, 小泉桂一: 大腸がん細胞に発現するケモカイン CXCL16 は臓器特異的な免疫系を介して肝および肺への転移挙動を相反させる. 第 20 回日本がん転移学会学術集会・総会, 2011, 7, 1, 浜松
7. 奇知芸, 櫻井宏明, 入村達郎, 小泉桂一, 濟木育夫: ケモカイン CXCL16 による大腸がんの肝臓および肺への相反する制御. 第 15 回日本がん分子標的治療学会学術集会, 2011, 6, 22-24, 東京.
8. 河西美保, 小泉桂一, 濟木育夫, 櫻井宏明: 活性変異型 EGFR を発現するヒト非小細胞肺癌細胞における EGFR セリン・スレオニン残基のリン酸化機構. 第 15 回日本がん分子標的治療学会学術集会, 2011, 6, 22-24, 東京.
9. 櫻井宏明, 小泉桂一, 濟木育夫: 非小細胞肺癌細胞における EGFR の Ser/Thr リン酸化の解析, 第 14 回がん分子標的治療研究会総会, 2010, 7, 6-7, 東京.
10. 小泉桂一, 仙田一貴, 櫻井宏明, 濟木育夫: リンパ管新生に対する eNOS および Hsp90 の影響, 第 19 回日本がん転移学会学術集会, 2010, 6, 16-17, 金沢.
11. 櫻井宏明, 小泉桂一, 濟木育夫: TNF-

- α によるEGFRのSer/Thrリン酸化に対する抗EGFR薬の効果. 第19回日本がん転移学会学術集会, 2010, 6, 16-17, 金沢.
12. 長野一也, 山下琢矢, 岡村賢孝, 小泉桂二, 済木育夫, 堤康央, 角田慎一: 新規乳がん関連蛋白質EphA10 およびRREB-1の転移との関連解析, 第19回がん転移学会, 2010, 6, 16-17, 金沢.
13. Prangsaengtong O., Koizumi K., Sakurai H., and Saiki I.: The role of eNOS-Hsp90 interaction and Calpain 1 involvement in lymphangiogenesis in vitro. The 6th International Conference on the Biology, Chemistry, and Therapeutic Applications of Nitric Oxide, 2010, 6, 14-18, Kyoto.
14. 河西美保, 申明淑, 西村美紀, 小泉桂二, 済木育夫, 櫻井宏明: 肺がん細胞におけるEGFRのSer/Thrリン酸化の制御機構の解析. 第28回日本生化学会北陸支部大会, 2010, 5, 29, 福井.

[図書] (計1件)

1. Koizumi K., Kato S., Sakurai H., Hashimoto I., Yasumoto K., and Saiki I.: Therapeutics target of CXCR4 and its downstream in peritoneal carcinomatosis of gastric cancer. Front Biosci (Schol Ed), 4, 269-276 2012.

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: ナチュラルキラーT細胞およびその取得方法
 発明者: 小泉 桂一 外6名
 権利者: 国立大学法人富山大学
 種類: 特許
 番号: 特許出願2011-175630
 出願年月日: 2011年8月11日
 国内外の別: 国内

○取得状況 (計0件)

名称:
 発明者:
 権利者:
 種類:
 番号:
 取得年月日:
 国内外の別:

[その他]

ホームページ等
 特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小泉 桂一 (KOIZUMI KEIICHI)
 富山大学・和漢医薬学総合研究所・准教授
 研究者番号: 10334715

(2) 研究分担者 (H22年度のみ)

櫻井 宏明 (SAKURAI HIROAKI)
 富山大学・和漢医薬学総合研究所・准教授
 研究者番号: 00345571

(3) 連携研究者 (H22年度のみ)

済木 育夫 (SAIKI IKUO)
 富山大学・和漢医薬学総合研究所・教授
 研究者番号: 80133776
 福岡 順也 (FUKUOKA JUNYA)
 富山大学・大学病院・准教授
 研究者番号: 00324575