

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591403

研究課題名(和文)急性骨髄性白血病に対する新規ミサイル療法の開発

研究課題名(英文)Cell targeting therapy for acute myeloid leukemia

研究代表者

瀧本 理修 (Takimoto, Rishu)

札幌医科大学・医学部・准教授

研究者番号：10336399

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：急性骨髄性白血病(AML)は抗がん剤、分子標的薬の進歩に伴って、予後が改善しつつあるが再発難治例に対する有効な治療法は十分な効果が得られていない。申請者らは白血病細胞では糖鎖転位酵素活性が亢進し糖鎖要求度が亢進していることに着目し、白血病細胞特異的な細胞標的療法を考案した。すなわち、リポソームに糖鎖を結合し、抗がん剤を内包化することで白血病細胞特異的に薬剤を送達するDDSを開発した。本研究期間中にin vitro並びにin vivoで高い送達性と抗腫瘍効果を確認し、臨床応用に向けた準備を予定している。

研究成果の概要(英文)：Acute myelogenous leukemia (AML) will achieve complete remission by induction therapy due to improvements in supportive and optimization therapy. In order to improve treatment efficacy by anti cancer drugs, specificity of drugs to leukemic cells should be important to ameliorate prognosis, since maximum dose of chemotherapeutic agents might be administered to AML patients, expecting less toxicity and more efficacy. We targeted AML cells utilizing fucose-bound liposome, since we found AML cells actively uptake L-fucose. Herein we report that intravenously injected L-fucose-bound liposomes containing daunorubicin can be successfully delivered to AML cells. This resulted in efficient tumor growth inhibition as well as prolonged survival in tumor-bearing mice. Thus, biological targeting utilizing characteristics of AML cells by fucose-bound liposome could be a promising new strategy for AML treatment.

研究分野：臨床腫瘍学

キーワード：AML fucose DDS

1. 研究開始当初の背景

急性骨髄性白血病は、現在本邦で年間 7000 名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。近年、血液腫瘍に対する骨髄移植療法、化学療法や分子標的療法は目覚ましい進歩を遂げ、一部の症例では長期生存も可能となってきた。しかし、急性骨髄性白血病の過半数は移植療法を行っても再発により死亡する。その原因の一つとして、抗癌剤や分子標的薬の特異性（白血病細胞に対する指向性）が乏しく正常細胞への影響が免れないため total cell kill が期待できないことがある。このようなことから、白血病細胞を特異的に標的とし、正常細胞への影響を排除した新たな細胞標的療法を考案した。骨髄性白血病細胞は一般に CD33 (siglec-3, sialic acid-binding immunoglobulin superfamily lectins) を発現する。CD33 は、免疫グロブリンスーパーファミリーに属し、シアル酸 ligand の認識に関与しており、糖鎖修飾を受けその機能は制御されている (J Bio Chem 275, 8625, 2000)。この CD33 の糖鎖修飾を触媒する α 1-3 fucosyl transferase (FUT) は数種類同定されているが、各種白血病細胞株において FUT4, FUT7 の発現が亢進している事が報告されている (Snapp KR, et al. Blood 89, 1997)。また、骨髄球系細胞においてはシアルル Lec 抗原の GlcNAc に、FUT (主に FUT3) により、糖鎖が 1 → 4 結合され生成されるシアルル Le^a 抗原 (CA19-9) が基盤となって合成される SLe^x が高発現している事も明らかにされている (Robinson NE, et al. Glycobiology 4, 1994)。加えて POFUT により糖鎖修飾され活性化される Notch1 も急性骨髄性白血病の予後不良因子である事が報告されている。つまり白血病細胞では糖鎖修飾酵素活性が高く (Snapp KR, et al., Blood 89, 1997)、かつ糖鎖を積極的に取り込み、上述したような糖鎖抗原を細胞表面に表出すると考えられる。即ち、薬物担体などを糖鎖修飾することで白血病細胞特異的に薬物を送達し、薬剤の局所濃度を高めることにより、より有効な治療法が可能になると考えられる。

2. 研究の目的

糖鎖要求度が高いと想定される白血病細胞株に対し導入実験を行ったところ、preliminary ながら *in vitro* で高い効率で FAM を導入することに成功した。以上のことから、糖鎖修飾リポソームを用いれば、白血病細胞への特異性の高い薬剤の送達が期待され、副作用が少なく、かつ効率の良い治療効果が期待できるものと考えられる。

3. 研究の方法

(1).各種白血病細胞の糖鎖抗原の発現

各種樹立細胞株 5×10^6 個の細胞を用いて、Flowcytometry により糖鎖抗原の発現を検討する。更に、細胞中のこれらの分子の発現を Western blot 法により検討し、発現との相関を

検討する。

(2).各種白血病細胞の糖鎖修飾酵素 mRNA の発現の検討:各種樹立細胞株 1×10^7 個の細胞から total RNA を抽出し、cDNA を合成後、RT-PCR (taqMan PCR も同時に施行し発現量を定量的に検討する) を行いそれらの発現を確認する。なお、いずれの isozyme も cDNA sequence が同定されており、primer の設計は可能である (Mas, et al., Glycobiology, 1988)。

(3).抗がん剤内包化糖鎖修飾 Liposome の作製:糖鎖修飾リポソームを既報に従い (Kawakami S, et al. BBRC 252, 1998) 作製後、 $1.2 \mu\text{mol}$ と $0.8 \mu\text{mol}$ 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、糖鎖修飾コレステロールと DOPE のモル比は後述する ratio の検討結果を受けて決定する。

(4).糖鎖修飾 Liposome による FAM 標識核酸の導入:抗がん剤内包化糖鎖修飾 liposome の作製に向けて、糖鎖修飾率の最適化を検討する目的で liposome (Lipotrust (DC16-4) 10 nmol) と糖鎖 (0-20 nmol) を懸濁し、5 分間室温で放置した後、以下の検討に用いる。なお、micropartition system により free の糖鎖を除去する。なお、free の糖鎖は比色定量法により検出可能であるため、liposome との結合率、結合能は比較的容易に検討可能である。次に FAM、蛍光色素である Cy5, Cy3 を加え incubation 後、チャンバースライドに播種した HL60, K562, Kasumi1, HEL 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 行い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糖鎖修飾率と liposome の比率を決定する。

(5).糖鎖受容体特異的な薬物導入の確認

糖鎖受容体を介した導入であることを確認するため、過剰な糖鎖存在下における FAM, Cy3, Cy5 などの蛍光物質の導入効率を検討する。糖鎖修飾 Liposome に FAM, Cy3, Cy5 を内包化し、チャンバースライドに播種した HL60, K562, Kasumi1, HEL 細胞に添加し、1 時間培養する (liposome + 糖鎖)。また、liposome 単独群 (Liposome), liposome 添加前 10 分間、 $1 \mu\text{mol}$ ($\times 100$) の糖鎖を加え preincubation した群も同時に検討する。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。

(6).各種白血病細胞株における FAM 標識物

の導入効率の比較:糖鎖修飾 liposome による FAM や Cy3, Cy5 の導入効率の検討を行う。上述の方法に従い、糖鎖修飾 liposome を作製し、HL60, K562, Kasumi1, HEL などの白血病細胞株における FAM-siRNA, Cy3, Cy5 の導入を蛍光顕微鏡下で観察する。更に、flowcytometry で全細胞数に対する陽性細胞を検討し定量的な導入効率を求める。

(7).抗がん剤含有糖鎖修飾 Liposome による抗腫瘍効果の検討:糖鎖修飾 liposome に Doxorubicin や Daunorubicin などの白血病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。具体的には糖鎖修飾 liposome を作製し、Doxorubicin や Daunorubicin などの抗がん剤を 0 - 1000 μ M の濃度で封入し、HL60, K562, Kasumi1, HEL 細胞などの白血病細胞株を各種抗がん剤単独もしくは糖鎖修飾 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、抗がん剤あるいは糖鎖修飾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。

(8).白血病細胞担癌モデルマウスに対する抗腫瘍効果:糖鎖修飾-liposome-抗癌剤投与による抗腫瘍効果を検証する。白血病細胞株 HL60 を移植したマウスに対する抗がん剤内包化糖鎖修飾 liposome の抗腫瘍効果を検討する。

(9).糖鎖修飾-liposome-抗癌剤、糖鎖修飾 liposome 投与による副作用の検討
糖鎖修飾 liposome-抗癌剤あるいは糖鎖修飾 liposome 投与後の各臓器障害の有無、特に肝細胞や中枢組織への移行の程度が懸念されるため、マウスの体重、肝障害の有無(血清 AST/ALT)、アミラーゼ(アミラーゼ、トリプシン)、血糖値、各種血液末梢検査(白血球、赤血球、血小板)データを投与後 24 時間(急性毒性)について同検査を行って検討する。

4. 研究成果

(1). 白血病細胞株における糖鎖タンパクの発現:各種白血病細胞株における糖鎖タンパクの発現を Flowcytometry で検討した。その結果、図 1 に示すように AML 細胞株において糖鎖蛋白 A, B の発現が極めて高いことが明らかになった。一方、T-ALL 由来である Molt4 ではこれらの糖鎖蛋白は認められず糖鎖要求度は低い可能性がある。

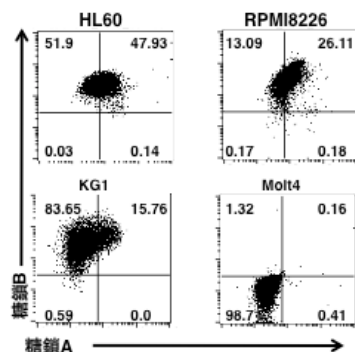


図 1. 各種白血病細胞株における糖鎖蛋白 A, B の発現を Flowcytometry で検討した。

(2). 白血病細胞株への糖鎖修飾リポソームの導入効果(図 2):糖鎖発現細胞と低発現細胞株に FAM 内包化糖鎖修飾リポソームを暴露し、その取り込みを検討した。その結果、糖鎖高発現株である HL60 細胞では糖鎖濃度依存的に導入効果が認められた。一方低発現株である Molt4 では導入効果が低く、糖鎖修飾リポソームは糖鎖発現細胞で標的化が可能であることが示唆された。

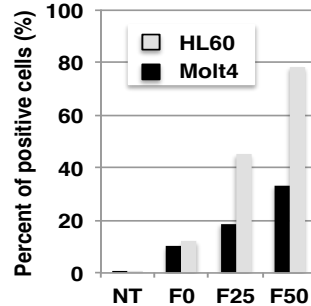


図 2. 各種白血病細胞株に対する糖鎖結合リポソームの導入効果。

(3). 抗がん剤内包化糖鎖結合リポソームの AML 細胞に対する抗腫瘍効果:daunorubicin を内包化した糖鎖修飾リポソーム(F50)と未結合リポソームを暴露し、in vitro での抗腫瘍効果を検討した。その結果糖鎖蛋白発現株である HL60 細胞において F50 が高い抗腫瘍効果を示した。

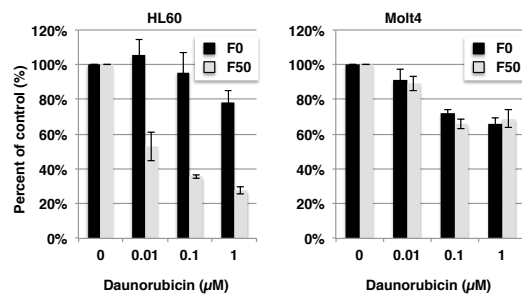


図 2. 各種白血病細胞株に対する抗がん剤内包化糖鎖結合リポソームの抗腫瘍効果。

(4): 白血病細胞担癌モデルマウスにおける抗がん剤内包化糖鎖結合リポソームの抗腫瘍効果の検討:抗がん剤を内包化した糖鎖結合リポソーム(F50)と未結合リポソーム(F0)を HL60 担癌モデルマウスに尾静脈(週 2 回 3 週間)から投与し抗腫瘍効果を検討した。その結果 14 日目の時点で、有意に F50 投与群で高い抗腫瘍効果が認められた(図 3)。

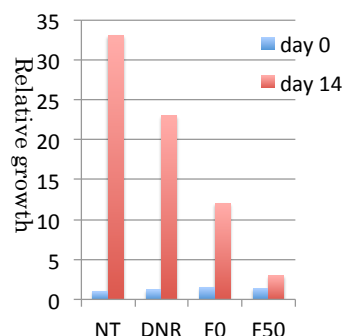


図 3. HL60 細胞担癌マウスに対する抗腫瘍効果。F50 投与群では有意に腫瘍増殖が抑制された。

以上より、糖鎖結合リポソームは糖鎖蛋白発現白血球細胞に高い抗腫瘍効果がみられ、臨床的に有用な可能性があると考えられた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 21 件)

1. Ishiwatari H, Takimoto R, (他 8 名) Phase I trial of oral S-1 combined with hepatic arterial infusion of gemcitabine in unresectable biliary tract cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2015 Apr;75(4):805-12. doi:10.1007/s00280-15-2704-0. (査読あり) .
2. Hirayama Y, Takimoto R, (他 18 名) Effect of duloxetine in Japanese patients with chemotherapy-induced peripheral neuropathy: a pilot randomized trial. *Int J Clin Oncol*. 2015 Mar 12. (Epub ahead of print) (査読あり) . <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25762165>
3. Hoki T, Miyanishi K, Takimoto R, Kato J. (他 9 名) Increased duodenal iron absorption through upregulation of DMT1 due to enhancement of IRP1 activity in patients with NASH. *Hepatology*. 2015 Mar 7. doi:10.1002/hep27774. (Epub ahead of print) (査読あり) .
4. Ishiwatari H, Takimoto R, (他 11 名) EUS-guided celiac plexus neurolysis by using highly viscous phenol-glycerol as a neurolytic agent (with video). *Gastrointest Endosc*. 2015 Feb;81(2):479-83. doi:10.1016/j.gie.2014.10.031. (査読あり)
5. Sato Y, Takimoto R, (他 18 名) A dose-escalation study of oxaliplatin/capecitabine /irinotecan (XELOXIRI) and bevacizumab as a first-line therapy for patients with metastatic colorectal cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2015 Mar;75(3):587-94. doi:10.1007/s00280-014-2672-9. (査読あり) .
6. Tamura F, Sato Y, Takimoto R, Kato J, (他 15 名) RNAi-mediated gene silencing of ST6GalNAc I suppresses the metastatic potential in gastric cancer cells. *Gastric Cancer*. 2014 Dec 23. [Epub ahead of print] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25532910> (査読あり)
7. Iyama S, Takimoto R, Kobune M, Kato J, (他 17 名) al. Efficacy of Enteral Supplementation Enriched with Glutamine, Fiber, and Oligosaccharide on Mucosal Injury following Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Case Rep Oncol*. 2014 Oct 22;7(3):692-9. doi: 10.1159/000368714. (査読あり) .
8. Ishiwatari H, Takimoto R, (他 11 名) Phenol-based endoscopic ultrasound-guided celiac plexus neurolysis for East Asian alcohol-intolerant upper gastrointestinal cancer patients: a pilot study. *World J Gastroenterol*.

- 2014 Aug 14;20(30):10512-7. doi: 10.3748/wjg.v20.i30.10512. (査読あり) .
9. Hirayama Y, Takimoto R, (他 15 名) Long-term survey of survival time, histological transformation, and secondary malignancies in Japanese patients with advanced-stage follicular lymphoma in the rituximab era: Hokkaido Hematology Study Group. *Int J Hematol*. 2014 Sep;100(3):281-9. doi: 10.1007/s12185-014-1629-4. (査読あり) .
10. Iyama S, Takimoto R, (他 18 名) Narrowband ultraviolet B phototherapy ameliorates acute graft-versus-host disease by a mechanism involving in vivo expansion of CD4+ CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *Int J Hematol*. 2014 Apr;99(4):471-6. doi: 10.1007/s12185-014-1530-1. (査読あり)
11. Ono K, Takimoto R, Kato J, (他 13 名) A novel strategy inducing autophagic cell death in Burkitt's lymphoma cells with anti-CD19-targeted liposomal rapamycin. *Blood Cancer J*. 2014 Feb 7;4:e180. doi: 10.1038/bcj.2014.2. (査読あり) .
12. Hirakawa M, Takimoto R, Kato J, (他 12 名) Fucosylated TGF- β receptors transduces a signal for epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer cells. *Br J Cancer*. 2014 Jan 7;110(1):156-63. doi: 10.1007/s00280-013-2073-5. (査読あり) .
13. Hirakawa M, Takimoto R, (他 21 名) A phase II study of neoadjuvant combination chemotherapy with docetaxel, cisplatin, and S-1 for locally advanced resectable gastric cancer: nucleotide excision repair (NER) as potential chemoresistance marker. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2013 Mar;71(3):789-97. doi: 10.1007/s00280-013-2073-5. (査読あり) .
14. Tanaka S, Takimoto R, Kato J, (他 8 名) Increased hepatic oxidative DNA damage in patients with nonalcoholic steatohepatitis who develop hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol*. 2013 Nov;48(11):1249-58. doi: 10.1007/s00535-012-0739-0. (査読あり) .
15. Hayashi T, Takimoto R, Kato J, (他 12 名) Rapid on-site evaluation by endosonographer during endoscopic ultrasound-guided fine needle aspiration for pancreatic solid masses. *J Gastroenterol Hepatol*. 2013 Apr;28(4):656-63. doi: 10.1111/jgh.12122. (査読あり) .
16. Ishiwatari H, Takimoto R, Kato J, (他 14 名) Treatment of pancreatic fibrosis with siRNA against a collagen-specific chaperone in vitamin A-coupled liposomes. *Gut*. 2013 Sep;62(9):1328-39. doi: 10.1136/gutjnl-2011-301746. (査読あり) .
17. Kobune M, Takimoto R, Kato J, (他 12 名) Stromal cells expressing hedgehog-interacting protein regulate the proliferation of myeloid neoplasms. *Blood*

Cancer J. 2012 Sep 7;2:e87.
doi:10.1038/bcj.2012.36 (査読あり) .
18. Yoshida M, Takimoto R, Kato J. (他 11 名) Targeting anticancer drug delivery to pancreatic cancer cells using a fucose-bound nanoparticle approach. PLoS One. 2012;7(7):e39545. doi: 10.1371/journal.pone.0039545. (査読あり).
19. Kikuchi S, Kobune M, Takimoto R, (他 11 名) Improvement of iron-mediated oxidative DNA damage in patients with transfusion-dependent myelodysplastic syndrome by treatment with deferasirox. Free Radic Biol Med. 2012 Aug 15;53(4):643-8. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.06.006. (査読あり) .
20. Kikuchi S, Kobune M, Takimoto R, (他 10 名) Prognostic significance of serum ferritin level at diagnosis in myelodysplastic syndrome. Int J Hematol. 2012 May;95(5):527-34. doi: 10.1007/s12185-012-1048-3. (査読あり) .
21. Hayashi T, Takimoto R, (他 8 名) A phase I trial of arterial infusion chemotherapy with gemcitabine and 5-fluorouracil for unresectable biliary tract cancer. Int J Clin Oncol. 2012 Oct;17(5):491-7doi: 10.1007/s10147-011-0320-5. (査読あり)

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)
名称 : 組み合わせ医薬製剤
発明者 : 加藤淳二, 瀧本理修
権利者 : 北海道公立大学法人札幌医科大学
種類 : 製剤
番号 : PCT/JP2011/074221
出願年月日 : 2011 年 10 月 20 日
国内外の別 : 国内, 米国, 欧州

名称 : carrier that targets fucosylated molecule-producing cells
発明者 : 加藤淳二, 瀧本理修
権利者 : 北海道公立大学法人札幌医科大学
種類 : 製剤
番号 : 13/278, 159
出願年月日 : 2011 年 10 月 20 日
国内外の別 : 米国

○取得状況 (計 1 件)
名称 : フコシル化糖鎖産生細胞用物質輸送担体
発明者 : 加藤淳二, 瀧本理修
権利者 : 北海道公立大学法人札幌医科大学
種類 : 製剤
番号 : 特願 2009-088149
出願年月日 : 2009 年 3 月 31 日
取得年月日 : 2014 年 9 月 19 日
国内外の別 : 国内

[その他]

なし

6. 研究組織
(1) 研究代表者
瀧本 理修 (TAKIMOTO RISHU)
札幌医科大学・医学部・准教授
研究者番号 : 10336399

(2) 研究分担者
加藤 淳二 (KATO JUNJI)
札幌医科大学・医学部・教授
研究者番号 : 20244345

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