

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 1 日現在

機関番号：20101  
研究種目：挑戦的萌芽研究  
研究期間：2012～2013  
課題番号：24659372  
研究課題名（和文） 腫瘍細胞指向性の新規超音波造影剤を用いた膵癌診断法の開発  
研究課題名（英文） A novel ultrasound imaging for pancreatic cancer using tumor directed-contrast media

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  
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）2,900,000 円、（間接経費）870,000 円

研究成果の概要（和文）：難治性癌である膵癌は、有用な modality が存在せず早期診断が困難である。現在、体外式超音波検査法、CT や超音波内視鏡が膵の腫瘍性病変の鑑別診断に用いられているが、腫瘍形成性膵炎などの良性疾患との鑑別に苦慮する事も稀ではない。これまで申請者らは、膵癌細胞の高いフコース要求性に着目し、その receptor-mediated endocytosis を利用したフコース結合ナノキャリアを開発し、癌細胞そのものを標的とした新規抗がん療法を報告した (PLoS ONE 2012)。本研究では、フコース結合ナノキャリアの高い膵癌指向性を利用し、ペルフルブタンを内包化することで膵癌細胞に uptake させ可視化し、超音波診断を可能にする新しい超音波造影剤の開発を目指した。その結果、フコース結合ナノキャリアにペルフルブタンを内包化した超音波造影剤のプロトタイプを作製し、モデルラットを用いて *in vivo* での描出に成功した。

研究成果の概要（英文）：Patients with pancreatic ductal carcinoma (PDAC) are dismal prognosis due to absence of effective modality to diagnose at early stage. We have recently developed a novel targeting nanoparticle for PDAC using fucose receptor mediated-endocytosis (PLoS ONE, 2012). Our nanoparticles carrying anti-cancer drugs could specifically delivered agents to PDAC cells and suppressed tumor growth. We then utilized this strategy for diagnosing PDAC as a novel ultrasound imaging. We encapsulated perfulbutane (PFB) into our nanoparticles and succeeded to image PDAC as a tumor in xenografted rat model using ultrasound sonography.

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：超音波造影剤，膵癌

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25,000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り早期診断法の開発が期待されている。現状では、膵癌の診断にはCT、超音波診断に加え、超音波内視鏡下吸引細胞診 (EUS-FNA) を用いて確定診断を行っている。しかしながら、EUS-FNAは浸襲的であり癌細胞の播種の問題、正診率が低いなどの問題もあり、画像診断法の改善が求められている。特に超音波診断においては腫瘍形成性膵炎との鑑別が容易ではなく、優れた modality の開発が期待されている。

2. 研究の目的：申請者らは、膵癌ではCA19-9

やSLXといった臓器特異的な腫瘍マーカーを産生することが知られていることに着目し、経静脈的に膵癌細胞に特異的に取り込ませる、新たな標的抗がん療法を開発した (PLoS ONE, 2012)。即ち、これらの腫瘍マーカーはそれぞれI型、II型糖鎖であり、癌細胞表面の糖タンパク上の carbohydrate へのフコシル化で生じる。例えば、CA19-9 (シアリル Le<sup>a</sup> 抗原) の合成には、基幹領域の Galβ1-3GlcNAc のガラクトース (Gal) に、シアル酸転移酵素によりシアル酸 (NeuAc) を2-3結合させ、シアリル Lec 抗原 (s Lec : シアリルルイス c 抗原 : DUPAN-2) が形成される。次いで、シアリル Lec 抗原の GlcNAc に、フコシルトランスフェラーゼ (主に FUT3) により、フコース (Fuc) を1-4結合させて、

シアリル Le<sup>a</sup> 抗原 (CA19-9) が合成される。また、II 型糖鎖である SLX (シアリル Le<sup>x</sup> 抗原) でも同様にフコシルトランスフェラーゼ (FUT6) により最終的にフコシル化を受ける。つまり癌細胞では fucosyltransferase 活性が高く (Mas, et al., Glycobiology, 1988), かつ fucose を積極的に取り込み, 上述したようなフコシル化糖鎖抗原を血中に放出すると考えられる。そこで, 申請者らが持つリポソーム修飾技術を応用し (Sato Y, Kato J, Takimoto R, et al. Nat Biotech 2008), 薬物担体にフコースを結合し膵癌細胞特異的に薬物を送達する新規治療法を報告した (PLoS ONE 2012. 図 1)。そこで, 本技術を用いてフコース結合リポソームにペルフルブタンを内包化し膵癌指向性を高めた超音波検査用造影剤を開発することを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) フコース結合 Liposome の作製, 至適化: フコース結合コレステロールを既報に従い (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。

(2) フコース結合 Liposome によるペルフルブタンの導入: フコース結合 liposome の作製に向けて, フコース結合率の最適化を検討する目的でフコース濃度 (0-100  $\mu\text{g/ml}$ ) をふりリポソームを作製する。なお, micropartition system により free の Fucose を除去した。なお, free の Fucose は比色定量法により検出可能である (Gibbons MN. Analyst, 80, 268, 1967) 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。次にペルフルブタン, FAM, Cy5.5 を内包化し (既にフコース結合リポソームへの薬剤の内包化技術は確立している, PLoS ONE, 2012), チャンバースライドに播種した細胞株に添加し 2 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。flowcytometry を用いて, 導入効率を定量的解析も行う。

(3) 膵癌担癌ラットの作製とフコース結合 liposome-ペルフルブタンによる検出の検討:

(i) ノードラットに  $5 \times 10^6$  個のヒト癌細胞株を接種し, 皮下腫瘍モデルならびに

orthotopic モデルを作製する。腫瘍径が約 5 mm になった時点で研究を開始する。

(ii) 担癌ラットを作製後, 腫瘍の特異的抽出をフコース結合 liposome-ペルフルブタンを経静脈投与し体外式超音波検査 (ハーモニック B モード) にて造影効果を確認する。

### 4. 研究成果

(1) フコース結合 Liposome の作製, 至適化: ペルフルブタンガス内包化フコース結合リポソーム (Fuc-liposome-PFB) は既報 (Yoshida, M., Takimoto R., et al, PLoS ONE, 2012) にもとづいて作製した (図 1 A)。このリポソームは粒子径 (図 1 B), ゼータポテンシャル (図 1 C) とともに既報に合致し均一で陰性荷電を有していた。また, 製剤を試験直前に溶媒に希釈する際も簡便で, 実用可能なレベルであった。しかし, *in vivo* での使用にあたり, 6ヶ月前に作製された試薬を用いると超音波画像が得られず, ガスの充填に問題が生じることが考えられた。ガス濃度の測定 (経時変化) 結果を基に検討する余地があると考えられ, 今後の検討課題である。

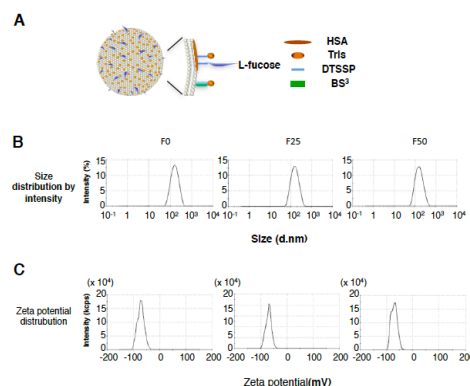


図 1. Fuc-liposome-PFB の性状解析結果

(2) フコース結合 Liposome によるペルフルブタンの導入: Fuc-liposome-PFB の細胞への導入効果を *in vitro* で解析した。その結果, 図 2 に示すように Fuc-liposome-PFB を CA19-9 産生膵癌細胞株 (BxPC3) に暴露すると 2 時間で取り込みが認められた。しかし, フコース非結合ペルフルブタンガス内包化リポソーム (F0) ではこの取り込みは見られず, また CA19-9 非産生膵癌細胞株 (PANC-1) に対しても導入は見られなかった。つまり, フコース結合ペルフルブタンガス内包化リポソームの特異性が認められた (図 2)。次に, *in vivo* での特異性を検証する為に, CA19-9 産生膵癌細胞株 (BxPC3) を用いてラト皮下腫瘍モデルを作製した。プロトタイプ F50-liposome-PFB を 100  $\mu\text{l}$  尾静脈より投与し, リアルタイムにエコー装置 (ALOKA Prosoud ALPHA7) にて観察した。

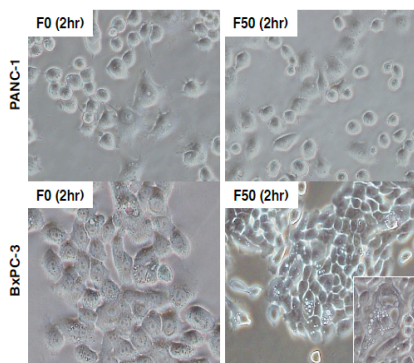


図2. Fuc-liposome-PFBのin vitroにおける導入効果

その結果、図3に示すように、同所モデルにおいて極僅かな集積を認めた。

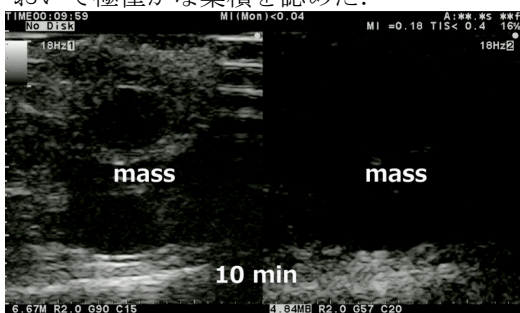


図3. 同所モデルにおけるFuc-liposome-PFBの超音波所見(ハーモニックBモード)。

以上より今回開発したFuc-liposome-PFBが膵臓がん指向性超音波造影剤として有用である可能性が示唆された。今後、製剤の改良を重ね臨床応用可能なレベルを目指す予定である。

#### 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10件)

- Hirakawa M, Takimoto R, Hayashi T, Kobune M, Kato J, et al. Fucosylated TGF- $\beta$  receptors transduces a signal for epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer cells. *Br J Cancer* 2014;110:156-63(査読あり).
- Ono K, Hayashi T, Miyanishi K, Sato Y, Takimoto R, Kobune M, Kato J, et al. A novel strategy inducing autophagic cell death in Burkitt's lymphoma cells with anti-CD19-targeted liposomal rapamycin. *Blood Cancer J* 2014;7:4e180(査読あり).
- Hirakawa M, Hayashi T, Sato T, Miyanishi K, Takimoto R, Kobune M, Hirata K, Kato J, et al. 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;71:789-797(査読あり).
- Tanaka S, Hayashi T, Sato T, Sato Y, Takimoto R, Kato J, et al. Increased hepatic oxidative DNA damage in patients with nonalcoholic steatohepatitis who develop hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol* 2013;28:656-663(査読あり).
- Ikeda Y, Hayashi T, Sato T, Miyanishi K, Takimoto R, Kohune M, Nobuoka T, Noguchi H, Oi M, Honma H, Hirata K, Hasegawa T, Kato J, et al. A case of idiopathic encapsulating peritoneal sclerosis with intractable ileus successfully treated by surgery and steroid therapy. *Clin J Gastroenterol* 2013 in press(査読あり).
- Hayashi T, Ishiwatari H, Takimoto R, Mitsuhashi T, Asanuma H, Ogino J, Hasegawa T, Sonoda T, Kato J, et al. Rapid on-site evaluation by endosonographer during endoscopic ultrasound-guided fine needle aspiration for pancreatic solid masses. *J Gastroenterol Hepatol* 2013;28:656-663(査読あり).
- Ishiwatari H, Takimoto R, Kato J, Niitsu Y, et al. Treatment of pancreatic fibrosis with siRNA against a collagen-specific chaperone in vitamin A-coupled liposomes. *Gut* 2013;62:1328-39(査読あり).
- Takahashi S, Takimoto R, Kobune M, Kato J, et al. Diagnostic validity of CT gastrography versus gastroscopy for primary lesions in gastric cancer: evaluating the response to chemotherapy, a retrospective analysis. *Gastric Cancer* 2013;16:543-548(査読あり).
- Torimoto Y, Takimoto R, Tanaka J, Yamamoto S, Kohgo Y, Fukuhara T, et al. A retrospective clinical analysis of Japanese patients with peripheral T-cell lymphoma not otherwise specified: Hokkaido Hematology StudyGroup. *Int J Hematol* 2013;98:171-8(査読あり).
- Kurosawa M, Takimoto R, Torimoto Y, Mori A, Takahashi T, Iizuka S, Ishida T,

Kobayashi R, Oda T, Sakai H, Yamamoto S, Takahashi F, Fukuhara T, et al. Epidemiology and treatment outcome of invasive fungal infections in patients with hematological malignancies. *Int J Hematol* 2012;96:748-57(査読あり).

〔学会発表〕(計 3件)

1. Takimoto R, Yoshida M, Murase K, Sato Y, Hirakawa M, Tamura F, Sato T, Osuga T, Miyanishi K, Takada K, Hayashi T, Kobune M, Kato J. Targeting Pancreatic Cancer Stem Like Cells Using a Nanoparticle Modified by L-Fucose. The American Association for the Study of Liver Diseases–Digestive Disease Week (DDW 2013): 2013 May 19-21: Orlando, U.S.A.

2. Kobune M, Kikuchi S, Iyama S, Takada K, Murase K, Ono K, Horiguchi H, Kamihara Y, Hayashi T, Sato T, Miyanishi K, Sato Y, Takimoto R, Kato J. Iron chelation therapy improves oxidative DNA damage in hematopoietic cells derived from transfusion-dependent myelodysplastic syndrome. Fifth Congress of the International BioIron Society (IBIS) Biennial World Meeting (BioIron2013): 2013 April 14-18: London, UK.

3. Takimoto R, Yoshida M, Sato Y, Hirakawa M, Tamura F, Sato T, Iyama S, Osuga T, Miyanishi K, Takada K, Hayashi T, Kobune M, Kato J. Targeting anticancer drug delivery to pancreatic cancer cells using a fucose-bound nanoparticle approach. Ninth AACR-Japanese Cancer Association Joint Conference: Breakthroughs in Basic and Translational Cancer Research: 2013 Feb 21-25: Maui, USA.

## 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・准教授  
研究者番号：10336399

林 毅 (HAYASHI Tsuyoshi)  
札幌医科大学・医学部・講師  
研究者番号：60381258

石渡 裕俊 (ISHIWATARI Hirotohi)  
札幌医科大学・医学部・助教  
研究者番号：90468083