

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462621

研究課題名(和文) 卵巣癌のCD24を介したEMT標的分子の解明とdrug delivery治療

研究課題名(英文) CD24-targeting drug delivery system enhanced effect of cisplatin-resistant ovarian cancer cells

研究代表者

寺井 義人 (TERAI, YOSHITO)

大阪医科大学・医学部・准教授

研究者番号：90278531

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：CD24発現細胞をターゲットとしたシスプラチン内包高分子ミセル(CDDP-CD24-LIPO)を開発し検討を行った。CDDP耐性をもつ卵巣癌細胞株であるCaov3の腹膜播種モデルで検討した。播種病巣のプラチナ残留濃度はCDDP-CD24-LIPO群がCDDP群に対して有意に高値であったが($p<0.05$)、腎臓における濃度は有意に低く、腎障害の回避が示唆された。全生存期間はCDDP群 47.8 ± 7.4 日に対して、CDDP-CD24-LIPO群 71.2 ± 28.3 日と有意に延長を認めた($p<0.05$)。CDDP-CD24-LIPOは難治性卵巣癌の播種病巣への移行性が高く、優れた治療効果を認めた。

研究成果の概要(英文)：We developed a cisplatin encapsulated polymer micelle targeting (CDDP-CD24-LIPO) of drug delivery system for cisplatin-resistant ovarian cancer cells. We examined the peritoneal dissemination model of cisplatin-resistant ovarian cancer cell lines (Caov3). The cisplatin concentration of disseminated cancer cells with CDDP-CD24-LIPO group was significantly higher than that with CDDP group ($p<0.05$), the cisplatin concentration in the kidney was significantly lower. Overall survival with CDDP-CD24-LIPO group (71.2 ± 28.3 days) showed a significantly prolonged compared with CDDP group (47.8 ± 7.4 days) ($p<0.05$). CDDP-CD24-LIPO has enhanced therapeutic effect in refractory ovarian cancer.

研究分野：婦人科腫瘍学

キーワード：卵巣癌 EMT CD24 ドラッグデリバリー 腹膜播種転移 薬剤耐性 高分子ミセル

1. 研究開始当初の背景

卵巣癌は primary cytoreductive surgery と adjuvant chemotherapy が基本的治療であるが、生存率が最も低い婦人科癌である。その理由として、当初抗がん剤に感受性を示していてもしだいに耐性を示す場合が多いことが考えられる。特に転移病巣は多くの場合抗がん剤耐性を示す。近年、正常細胞における幹細胞(stem cells)の研究が話題となっているが、癌細胞においても Cancer Stem Cells (CSCs)が注目されている(O'Brien CA. Nature. 2007 445: 106)。そして、CSCs は non CSCs と比較して、強い自己複製能と腫瘍形成能を有することが明らかになってきており、抗癌剤治療や放射線療法に抵抗を示し、癌再発の原因細胞であると考えられている。一方、癌細胞の転移浸潤過程において、細胞間接着や細胞極性を失い、間葉系細胞に変化し、間質内へ浸潤し転移する現象として上皮・間葉形態転換(EMT: Epithelial-Mesenchymal Transition)が注目されている。進行卵巣癌の上皮・間葉形態転換 EMT 現象の制御を癌幹細胞 CSCs の視点から研究し、CSCs マーカーの CD24 を介した EMT に関わる新規遺伝子の検索を行い、癌の浸潤・転移における EMT 現象のメカニズムを解明することができれば、難治性卵巣癌の新たな治療戦略となり得ると考えた。

2. 研究の目的

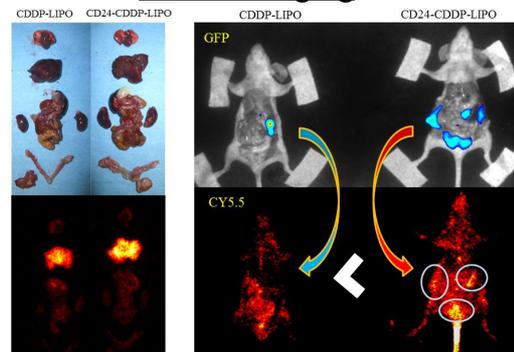
CD24 は細胞表面に存在し、様々な癌種で予後不良因子マーカーと報告されている。われわれはこれまでの研究で難治性卵巣癌の浸潤・転移において CD24 が関与していることを明らかにした。今回、CD24 特異的抗体を外郭に搭載し、CD24 発現細胞をターゲットとしたシスプラチン内包高分子ミセル(CDDP-CD24-LIPO)を開発し、治療応用へ向け検討を行った。

3. 研究の方法

【方法】CDDP 耐性をもつ卵巣癌細胞株である Caov3 に GFP (Green Fluorescent Protein) を導入した Caov3-GFP を、週齢 5 週のヌードマウスの腹腔内に投与し、難治性卵巣癌の腹膜播種モデルを作製した。

1) CDDP-CD24-LIPO に CY5.5 (Cyanine5.5) を修飾させ、尾静脈投与を行い、蛍光生体イメージングでマウスの観察を行った。2) 次に PBS、CDDP、CD24-CDDP-LIPO の組織移行性を検討するため、誘導結合プラズマ発光分析法(ICP-OES)を用いて、播種病巣、肝臓および腎臓におけるプラチン濃度を治療後 6 時間後、24 時間後、48 時間後と経時的に測定した。3) 最後に PBS 群と CDDP 群そして CDDP-CD24-LIPO 群に分配し、尾静脈からの薬剤投与を低用量で複数回行う

Photon imaging

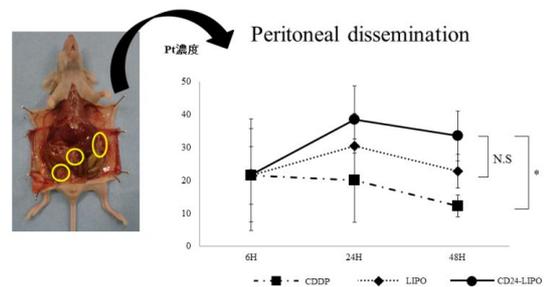


た。治療効果として各群の腹囲増加率と生存期間を計測した。

4. 研究成果

【成績】1) 蛍光生体イメージングで観察したところ、GFP 陽性の腹腔内腫瘍におい

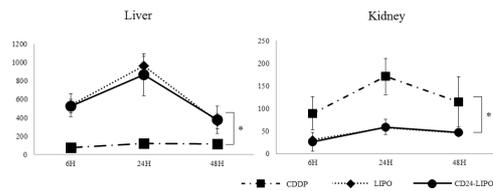
ICP-OESによる組織内残留濃度



播種病巣において、24H後・48H後ともにCD24-CDDP-LIPO群で有意にシスプラチン残留濃度が高かった。

てCY5.5の集積を認め、播種病巣への薬剤移行を認めた。また、肝臓および腎臓にCY5.5の集積を認めた。

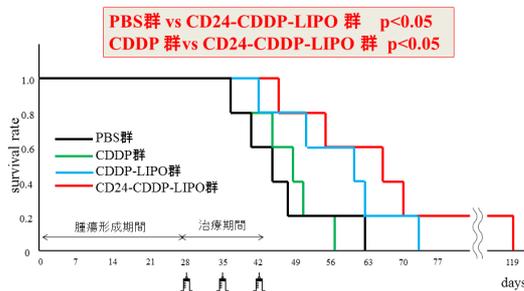
ICP-OESによる組織内残留濃度



CDDP-LIPOとCD24-CDDP-LIPOはCDDPと比べて腎臓への集積は低いが生臓への集積が高い(リポソームの特徴)

2) 播種病巣のプラチナ残留濃度は24時間後 (38.4±15.8 bpm vs 20.7±9.1 bpm) 48時間後 (34.8±11.8 bpm vs 14.7±3.2 bpm)

生存曲線



ともに CDDP-CD24-LIPO 群が CDDP 群に対して有意に高値であった (p<0.05)。CDDP-CD24-LIPO 群は腎臓における濃度が CDDP 群に比べ有意に低く、腎障害の回避が示唆される一方で、リポソームが分解される肝臓で有意に高かった。しかし、血中 ALT 値と肝臓の脂肪変性、巣状壊死において両群に差を認めなかった。3) CDDP-CD24-LIPO 群の治療期間における腹囲増加は他の2群と比べ有意に軽減していた。さらに全生存期間は PBS 群 46.8±9.9 日、CDDP 群 47.8±7.4 日に対して、CDDP-CD24-LIPO 群 71.2±28.3 日と有意に延長を認めた (p<0.05)。

以上から、CDDP-CD24-LIPO は難治性卵巣癌の播種病巣への移行性が高く、優れ

た治療効果を認めた。CDDP-CD24-LIPO を用いた新たな卵巣癌分子標的療法が期待される。これらの結果は現在論文作成中である。

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 8 件)

1. Tanaka T, Terai Y, Kogata Y, Ashihara K, Maeda K, Fujiwara S, Yoo S, Tanaka Y, Tsunetoh S, Sasaki H, Kanemura M, Tanabe A, Ohmichi M. CD24 expression as a marker for predicting clinical outcome and invasive activity in uterine cervical cancer. *Oncol Rep.* 34(5):2282-8, 2015 (査読有り)
2. Nakamura M, Ono YJ, Kanemura M, Tanaka T, Hayashi M, Terai Y, Ohmichi M. Hepatocyte growth factor secreted by ovarian cancer cells stimulates peritoneal implantation via the mesothelial-mesenchymal transition of the peritoneum. *Gynecol Oncol.* 139(2):345-54, 2015 (査読有り)
3. Ono YJ, Tanabe A, Tanaka T, Tanaka Y, Hayashi M, Terai Y, Ohmichi M. Met signaling cascade is amplified by the recruitment of phosphorylated-Met to lipid rafts via CD24, and leads to drug resistance in endometrial cancer cell lines. *Mol Cancer Ther.* 14(10):2353-63, 2015 (査読有り)
4. Ono YJ, Hayashi M, Tanabe A, Hayashi A, Kanemura M, Terai Y, Ohmichi M. Estradiol-mediated hepatocyte growth factor is involved

- in the implantation of endometriotic cells via the mesothelial-mesenchymal transition in the peritoneum. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 308(11):E950-9, 2015 (査読有り)
5. Takai M, Nakagawa T, Tanabe A, Terai Y, Ohmichi M, Asahi M. Crosstalk between PI3K and Ras pathways via protein phosphatase 2A in human ovarian clear cell carcinoma. *Cancer Biol Ther.* 16(2):325-335, 2015 (査読有り)
 6. Kawaguchi H, Terai Y, Tanabe A, Sasaki H, Takai M, Fujiwara S, Ashihara K, Tanaka Y, Tanaka T, Tsunetoh S, Kanemura M, Ohmichi M. Gemcitabine as a molecular targeting agent that blocks the Akt cascade in platinum-resistant ovarian cancer. *J Ovarian Res* 7(1):38, 2014. (査読有り)
 7. Takai M, Terai Y, Kawaguchi H, Ashihara K, Fujiwara S, Tanaka T, Tsunetoh S, Tanaka Y, Sasaki H, Kanemura M, Tanabe A, Ohmichi M. The EMT (epithelial-mesenchymal-transition)-related protein expression indicates the metastatic status and prognosis in patients with ovarian cancer. *J Ovarian Res.* 27:7:76, 2014. (査読有り)
 8. Ono YJ, Terai Y, Tanabe A, Hayashi A, Hayashi M, Yamashita Y, Kyo S, Ohmichi M. [Decorin induced by progesterone plays a crucial role in suppressing endometriosis.](#) *J Endocrinol.* 223(2):203-216, 2014. (査読有り)

〔学会発表〕(計 4件)

1. 寺井義人難治性卵巣癌の浸潤・転移に関わる分子をターゲットとした新規治療法の開発第 66 回日本産科婦人科学会, 2014, 東京
2. 芦原敬允、寺井義人、川口浩史、中村路彦、中村起代子、藤原聡枝、田中智人、田中良道、佐々木浩、恒遠啓示、田辺晃子、金村昌徳、大道正英. 卵巣癌における CD24 と癌細胞浸潤能と薬剤耐性能との関連について第 13 回日本婦人科がん分子標的研究会学術集会, 2014, 鳥取
3. 田中智人、寺井義人、芦原敬允、川口浩史、前田和也、劉昌恵、中村路彦、高井雅聡、藤原聡枝、田中良道、恒遠啓示、佐々木浩、金村昌徳、田辺晃子、大道正英. 子宮頸癌における CD24 の発現意義第 13 回日本婦人科がん分子標的研究会学術集会, 2014, 鳥取
4. 芦原敬允、寺井義人、前田和也、小野賀大、中村起代子、兪史夏、田中智人、林正美、田辺晃子、金村昌徳、大道正英. シスプラチン内包 CD24 高分子ミセルの開発とマウス難治性卵巣癌モデルへの治療検討第 67 回日本産科婦人科学会, 2015, 横浜.

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

寺井 義人 (Terai Yoshito)
大阪医科大学・医学部・准教授
研究者番号：90278531

(2) 研究分担者

大道 正英 (Ohmichi Masahide)
大阪医科大学・医学部・教授

研究者番号：10283764

金村 昌徳 (Kanemura Masanori)
大阪医科大学・医学部・講師
研究者番号：40298782

田辺 晃子 (Tanabe Akiko)
大阪医科大学・医学部・講師
研究者番号：70454543

山下能毅 (Yamashita Yoshiki)
大阪医科大学・医学部・講師
研究者番号：50268207

林 正美 (Hayashi Masami)
大阪医科大学・医学部・講師
研究者番号：00551748

兪 史夏 (Yoo Saha)
大阪医科大学・医学部・助教
研究者番号：80625674

恒遠啓示 (Tsunetoh Satoshi)
大阪医科大学・医学部・講師
研究者番号：70388255

田中良道 (Tanaka Yoshimichi)
大阪医科大学・医学部・助教
研究者番号：10625502