

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 18 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21590818

研究課題名（和文） 大腸癌特異的に抗がん剤を送達する新規システムの開発

研究課題名（英文）

Targeting anticancer drug delivery to colon cancer cells using a fucose-bound nanoparticle approach.

研究代表者

佐藤 康史 (SATO YASUSHI)

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号：80343383

研究成果の概要(和文):申請者らは大腸癌細胞においてフコース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、大腸癌細胞を標的とした新規の抗がん療法を考案した。すなわち、陰性に荷電した L-フコースに抗癌剤等を内包化させた cationic liposome (陽性荷電) を結合させた L-Fuc-liposome を静脈内投与することで大腸癌特異的に制癌剤を送達するフコシル化 liposome システムの開発を行ない、全く新しい in vivo 腫瘍ターゲティング法の確立を検討した。

研究成果の概要（英文）：

Increased expression of fucosyltransferases (FUTs) is common in colic adenocarcinoma cells⁵. FUTs are key enzymes accelerating malignant transformation through the fucosylation of different sialylated precursors, suggesting a crucial requirement for

L-fucose by colic adenocarcinoma cells. We developed L-fucose-bound liposomes as vehicles for

delivery of anticancer drugs specifically to these cells. We report that intravenously injected

L-fucose-bound liposomes containing Cisplatin were successfully delivered to colic cancer cells,

mediating efficient tumour growth inhibition in tumour-bearing mice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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

1. 研究開始当初の背景

大腸癌は本邦においても食生活の欧米化に伴い徐々に増加する傾向にあり、肺癌につい

で2番目に多い罹患率となっている。しかし、その早期発見は熟達した内視鏡医をもってしても困難なことが多く実際に診断時には

既に根治の見込みの少ない転移性進行がんへ移行していることも多い。現在、最も有効な抗がん剤レジメであるFOLFOX/FOLFIRIにbevacizumabやCetuximabなどの分子標的薬を加えた治療を行っても生存中央値は約20ヶ月前後であり十分とは言えない。また神経毒性や骨髄抑制などの副作用で化学療法の継続が困難な症例も多い。以上のことから大腸癌細胞を標的とした新たな細胞標的療法が期待されている。

大腸癌はCA19-9やCA-50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。これらの腫瘍マーカーは糖鎖抗原であり、大腸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^a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(sLec: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^a抗原(CA19-9)が合成される。

つまり大腸癌細胞ではfucosyl transferase活性が高く(Domino SE et al., *Tumour Biol.* 2007)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。即ち、薬物担体などをフコシル化することで大腸癌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、より腫瘍特異的で有効な治療法が可能になると考えられる。具体的には、リポゾームやポリマー担体などをフコシル化し、抗がん剤(Oxaliplatin, CPT-11(SN-38), 5-FU, Capecitabine, TS-1など)を封入し腫瘍への送達効果を高めることにより治療効

果を改善することなどが考えられる。

2. 研究の目的

大腸癌はフコースの要求度が高いことから、フコシル化リポゾームを用いれば、大腸癌においても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た。そこで、本研究では、フコシル化リポゾームの腫瘍特異的な送達を検証し、大腸癌細胞特異的な抗腫瘍効果を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

各種腫瘍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(Colo205、HCT-15、HT-29、Caco2、Lovo、SW1116など)5 x 10⁶個の細胞を25 cm²フラスコに播種し、無血清培地Opto-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。

各種腫瘍細胞のFucosyl transferase mRNAの発現の検討

各種樹立細胞株(Colo205、HCT-15、HT-29、Caco2、Lovo、SW1116など)1 x 10⁷個の細胞からtotal RNAを抽出し、FUC1-8までのisozymeについて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。

フコシル化liposomeの作成

フコシル化コレステロールを既報(Kawakami S, et al. BBRC 252, 1998)に従い作製後、1.2 μmolと0.8 μmol 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。

フコース受容体特異的な遺伝子導入の確認

フコース受容体を介したsiRNAの導入であることを確認するため、過剰なフコース存在下におけるsiRNA導入効率を検討する。liposome(Lipotrust 10 nmol)とL-Fucose(10 nmol)を懸濁し、5分間室温で放置した後、micropartition systemによりfreeのfucoseを除去する。次にFAM標識siRNA(random)を加えincubation後、チャンバー

スライドに播種した SW1116 細胞等に添加し、1 時間培養する (liposome + F)。また、liposome 単独群 (Liposome), liposome 添加前 10 分間、1 μmol (x100) の L-Fucose 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 counter staining し蛍光顕微鏡下に観察する。

各種大腸癌細胞株における siRNA 導入効率の比較

CA19-9 高発現株と低発現株における Fucose-liposome による siRNA 導入効率の検討を行う。上述の方法に従い、Fucose-liposome を作製し、高発現株 SW1116 と低発現株 Lovo あるいは他の細胞株における FAM-siRNA 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 FAM 陽性細胞を検討し定量的な導入効率を求める。

抗がん剤含有フコシル化 liposome による抗腫瘍効果の検討

フコシル化リポソームにオキザリプラチン、5-FU, SN-38 (CPT-11) などの大腸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。具体的には Fucose-liposome を作製し、各種抗がん剤を 0 - 1000 μM の濃度で封入し、SW1116, lovo などの各種大腸癌細胞株を各種抗がん剤もしくはフコシル化 liposome 抗がん剤に暴露し、殺細胞効果を WST-1 assay で検討する。

大腸癌 (SW1116, Lovo) 担癌マウスの作成とフコシル化-liposome-抗がん剤による抗腫瘍効果の検討

SCID もしくはヌードマウスに 5×10^6 個の大腸癌細胞を接種し、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。

フコシル化-liposome-抗がん剤、liposome-抗がん剤あるいは抗がん剤単独をそれぞれの系において 12 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同定し、形態並びにアポトーシスの有無を検討する。

同様に担癌マウスを作成後、フコシル化-liposome-FAM-siRNA, liposome-FAM-siRNA あるいは liposome 単独群に分け (5 匹) 経静脈投与し、腫瘍組織の凍結切片を作成後、

蛍光顕微鏡で観察し delivery 効率を検討する。

同マウスにおける抗腫瘍効果と導入率ならびに臓器特異性 (分布) を検討する。

さらに、最終的には抗腫瘍効果と生存率の検討を行う。

Orthotopic model を用いた検討

より実的なモデルを用いて、フコシル化-liposome-抗がん剤投与による抗腫瘍効果を検証する。大腸癌細胞株 SW1116 に pGL-4 luciferase vector を遺伝子導入した細胞株を樹立し、大腸へ移植したモデル(マウス管腔内移植大腸癌モデル;Cancer Sci. 95、2004)を作製する。また大腸癌 肝転移モデルも作成する。次に、フコシル化-liposome-抗がん剤あるいはフコシル化-lip-FAM-siRNA を尾静脈より静注し、IVIS in vivo image analyzer (Xie X et al. Cancer Cell 12, 52-65, 2007) で経時的な抗腫瘍効果および局在を観察する。また腫瘍体積、ならびに生存率を検討することで、効果を確認する。

4. 研究成果

各種大腸癌樹立細胞株 (Colo205、HCT-15、HT-29、Caco2、Lovo、SW1116 など) において、CA19-9 の産生、発現に依存して Fuc-liposome の取り込みが増加していることを確認した。また、Fuc-liposome に CDDP, 5FU, CPT-11 を封入し殺細胞効果を WST-1 assay で検討したところ、CA19-9 高産生腫瘍においてのみ、濃度依存性の抗腫瘍効果の増強が観察された。また、in vivo でヒト大腸癌細胞株腫瘍の担癌マウスに対し Fuc-liposome-Cy5 を尾静脈投与したところ、高い腫瘍集積性が確認された。さらに、Fuc-liposome-CDDP を担癌マウスに投与したところ、コントロールに比べ抗腫瘍効果が得られた。

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 1 件)

M Yoshida; R Takimoto; K Murase; Y Sato; M Hirakawa; F Tamura; T Sato; S Iyama; T Osuga; K Miyanishi; K Takada; T Hayashi; M Kobune; J Kato, Targeting Anticancer Drug Delivery to

Pancreatic Cancer Cells Using A Fucose-Bound Nanoparticle Approach. *PLoS ONE*. In press.査読あり

〔学会発表〕（計 0 件）

〔図書〕（計 0 件）

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 康史 (SATO YASUSHI)
札幌医科大学・医学部・講師
研究者番号：80343383

(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