

令和 2 年 7 月 3 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11304

研究課題名(和文) EMTとニッチの制御を目指した高分子ミセルを用いた難治性卵巣癌に対する治療の開発

研究課題名(英文) Development of a new therapy for refractory ovarian cancer via liposomal nanoparticle targeting control of EMT

研究代表者

大道 正英 (Ohmichi, Masahide)

大阪医科大学・医学部・教授

研究者番号：10283764

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、難治性卵巣癌の抗癌剤耐性に癌幹細胞マーカーの一つであるCD24陽性細胞が関与していることを明らかにした。そこでCD24陽性卵巣癌細胞に特異的に抗癌剤を届けるべく、抗CD24抗体を外郭に結合させた高分子ミセルを作成し、内部にシスプラチンを内包させ、卵巣癌腹膜播種モデルマウスに投与したところ、シスプラチン単剤投与群あるいは外郭に上記抗体をもたないシスプラチン内包高分子ミセル投与群よりも有意に生存期間が延長した。その腫瘍では、E-cadherinの発現増強とsnailの発現減少を認め、抗CD24抗体結合シスプラチン内包ミセルが、EMTを抑制し抗腫瘍効果をもたらすことが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

卵巣癌は、当初抗癌剤に感受性を示しても次第に耐性を示すことが多く、そのため予後不良の婦人科癌である。抗癌剤耐性獲得のメカニズムを明らかにしそれを克服することを目的として、本研究を行った。本研究により、卵巣癌がシスプラチン耐性を獲得するメカニズムの一つが明らかとなり、今回開発した高CD24抗体を外郭にもつ高分子ミセルが有効である可能性がマウスモデルで示唆されたことは、臨床応用にむけての第一歩となりうると考えている。

研究成果の概要(英文)： We produced liposomal cisplatin to treat ovarian cancer cells. In order to target CD24-positive cells, an anti-CD24 monoclonal antibody was modified to the above drug, because we have found that CD24 is involved in ovarian cancer metastasis through up-regulation of epithelial-mesenchymal transition (EMT). Treatment of our liposomal cisplatin with anti-CD24 antibody inhibited EMT. Furthermore, significantly prolonged survival was observed under treatment of the above liposomal cisplatin compared with that of cisplatin or liposomal cisplatin without anti-CD24 antibody. These results suggest the potential of targeting anticancer therapeutics for CD24-positive ovarian cancer cells to prevent disease progression.

研究分野：婦人科腫瘍

キーワード：卵巣癌 EMT 癌幹細胞

1. 研究開始当初の背景

卵巣癌は生存率が最も低い婦人科癌である。その理由として、当初抗癌剤に感受性を示しても次第に耐性を示す場合が多いことが考えられている。ことに、転移病巣や再発病巣は、多くの場合、主要な治療薬であるプラチナ製剤に耐性を示すため、卵巣癌治療においてはプラチナ製剤耐性化を凌駕し卵巣癌の特徴的な進展様式である腹膜播種を制御することを可能とするような新たな治療戦略が求められる。

近年、癌幹細胞が、様々な抗癌剤や放射線療法の抵抗性を示し、癌再発の原因であると考えられ注目されている。また、癌細胞の浸潤・転移の過程においては、上皮間葉形態転換 Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) がおきていることが分かって来た。癌幹細胞が浸潤・転移する過程においても EMT 現象が起きていることが近年報告され、浸潤・転移にも癌幹細胞が関与していることから、癌幹細胞の制御の重要性がますます高まってきている。

2. 研究の目的

種々の癌種で癌幹細胞のマーカーとして報告されているものの一つに CD24 がある。我々はこれまでに、卵巣癌病理組織において、CD24 陽性症例では、陰性症例と比べて無増悪生存期間、全生存期間、どちらも有意に短縮することを報告し、CD24 が卵巣癌の予後不良因子であることを見出した。また、卵巣癌細胞株 Caov-3 において、CD24 陽性分画の浸潤能が亢進すること、シスプラチン耐性能が亢進することから、CD24 陽性細胞を選択的に治療標的とする方法を見出し検討することを目的とした。

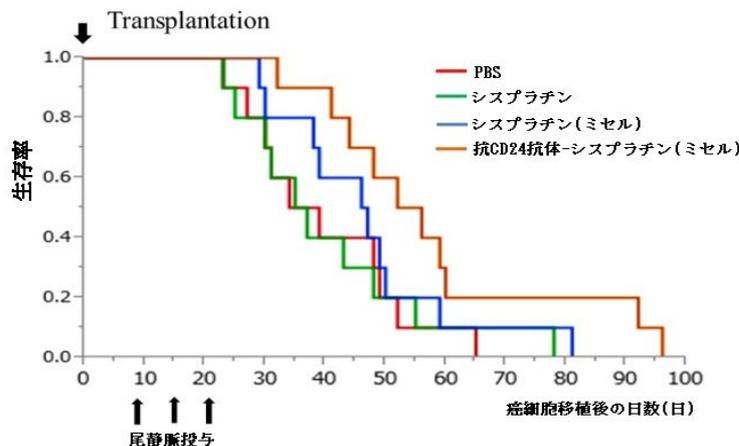
3. 研究の方法

まず Caov-3 細胞の CD24 発現をフローサイトメトリーにて検討したところ、その約 30% は CD24 陽性、約 70% が CD24 陰性であった。そこで CaOV-3 卵巣癌腹膜播種モデルマウスを用いて、抗 CD24 抗体を利用した治療の効果を検討することとした。卵巣癌の化学療法の主軸となるシスプラチンに抗 CD24 抗体を併用する手段として、シスプラチンを外側から紐状の高分子で覆い隠した微粒な粒子構造をもつ高分子ミセルを考案した。また、CD24 陽性細胞を選択的に治療標的とするため、外郭に抗 CD24 抗体を修飾させたシスプラチン内包高分子ミセルも作成した。これらのミセルは高分子であるため、正常血管では血管外へ漏出しにくく、癌組織のようにリンパ系排泄機構が発達していない組織では集積しやすいという利点がある。我々は、Caov-3 卵巣癌腹膜播種モデルマウスに、PBS (コントロール)、シスプラチン、シスプラチン (ミセル)、抗 CD24 抗体修飾シスプラチン (ミセル) を、それぞれ尾静脈から静注し、抗腫瘍効果を検討した。

4. 研究成果

上記 4 群における生存率を検討したところ、抗 CD24 抗体修飾シスプラチン (ミセル) 群で最も生存期間が延長した (図 1)。

図1. 卵巣癌腹膜播種モデルマウスへの各種薬剤の効果 (生存曲線)



次にこれらのマウス腫瘍における EMT 現象を免疫組織染色にて観察した (図 2)。抗 CD24 抗体修飾シスプラチン (ミセル) 群の腫瘍組織では、腫瘍で見られる E-cadherin の発現低下と Snail の発現増加がともに解除され、EMT が抑制されていることが確認された (図 2、3)。とくに、この現象は、シスプラチン (ミセル) 群よりも抗 CD24 抗体修飾シスプラチン (ミセル) 群で有意に上昇しており (図 3)、我々の開発した抗 CD24 抗体結合シスプラチン内包ミセルの抗腫瘍効果の有効性が示唆された。

図2. 腹膜播種マウスモデルにおけるEMTマーカーの発現 (免疫組織染色)

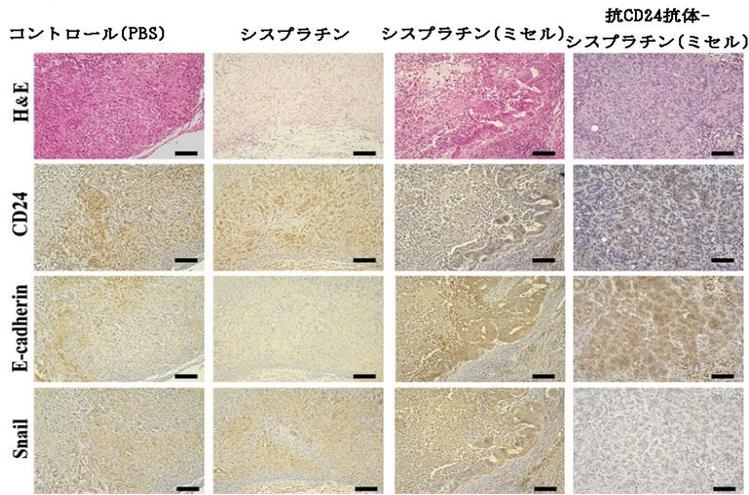
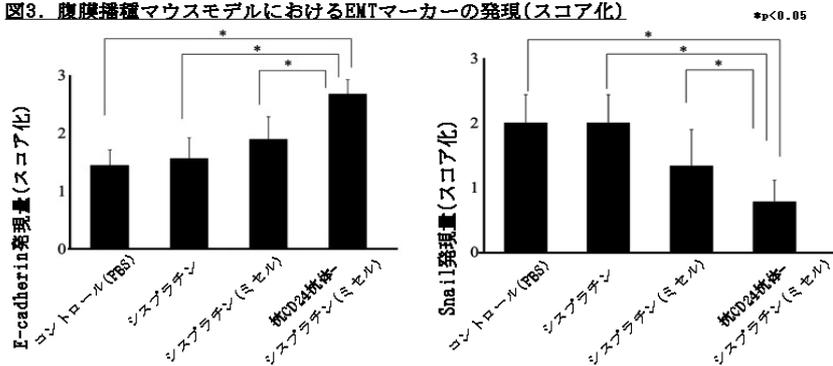
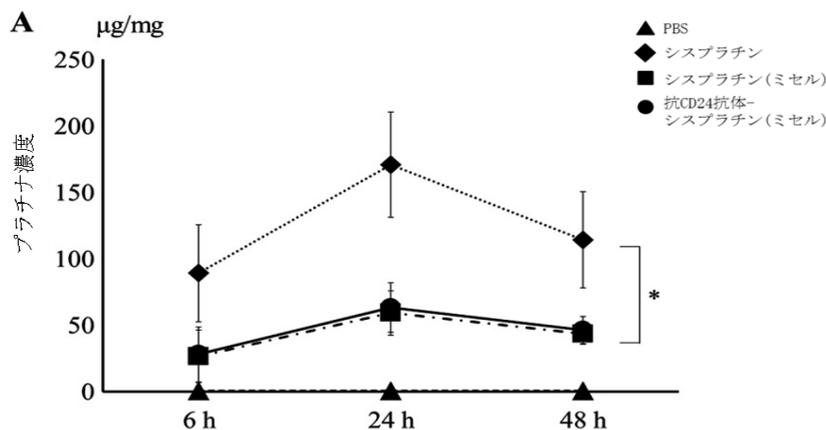


図3. 腹膜播種マウスモデルにおけるEMTマーカーの発現(スコア化)



シスプラチンの腎毒性への影響についても検討をおこなった。CaOV-3 卵巣癌腹膜播種モデルマウスに薬剤 4 種を投与し、6、24、48 時間後の腎組織中のシスプラチン濃度を検討したところ、シスプラチンを高分子ミセルに内包することにより腎組織中のシスプラチン濃度の上昇が有意に抑制された。抗 CD24 抗体の修飾の有無では差は認めなかった(図 4)。

図4. マウスモデルにおける薬剤投与後の腎組織中プラチナ濃度



以上のことより、抗 CD24 抗体結合シスプラチン内包高分子ミセルは、EMT の抑制を介して抗腫瘍効果をもたらし、シスプラチンによる腎毒性の副作用も軽減させうることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nakamura K, Terai Y, Tanabe A, Ono YJ, Hayashi M, Maeda K, Fujiwara S, Ashihara K, Nakamura M, Tanaka Y, Tanaka T, Tsunetoh S, Sasaki H, Ohmichi M.	4. 巻 37
2. 論文標題 CD24 expression is a marker for predicting clinical outcome and regulates the epithelial-mesenchymal transition in ovarian cancer via both the Akt and ERK pathways.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Oncology Reports	6. 最初と最後の頁 3189-3200
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/or.2017.5583.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ashihara K, Terai Y, Tanaka T, Tanaka Y, Fujiwara S, Maeda K, Tunetoh S, Sasaki H, Hayashi M, Ohmichi M.	4. 巻 19
2. 論文標題 Pharmacokinetic Evaluation and Antitumor Potency of Liposomal Nanoparticle Encapsulated Cisplatin Targeted to CD24-positive Cells in Ovarian Cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 1872-1880
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ol.2020.11279	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 芦原 敬允, 寺井 義人, 土橋 裕允, 藤原 聡枝, 田中 良道, 田中 智人, 恒遠 啓示, 佐々木 浩, 林 正美, 大道 正英
2. 発表標題 難治性卵巣癌モデルマウスに対するCD24を標的とした高分子ミセルを用いた新規治療
3. 学会等名 第69回日本産科婦人科学会学術集会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	林 正美 (Hayashi Masami) (00551748)	大阪医科大学・医学部・准教授 (34401)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	田中 良道 (Tanaka Yoshimichi) (10625502)	大阪医科大学・医学部・講師 (34401)	
研究分担者	恒遠 啓示 (Tsunetoh Satoshi) (70388255)	大阪医科大学・医学部・講師 (34401)	
研究分担者	田辺 晃子 (Tanabe Akiko) (70454543)	大阪医科大学・医学部・非常勤講師 (34401)	
研究分担者	佐々木 浩 (Sasaki Hiroshi) (80432491)	大阪医科大学・医学部・講師 (34401)	
研究分担者	兪 史夏 (Yoo Saha) (80625674)	大阪医科大学・医学部・非常勤医師 (34401)	
研究分担者	寺井 義人 (Terai Yoshito) (90278531)	大阪医科大学・医学部・非常勤講師 (34401)	
研究分担者	田中 智人 (Tanaka Tomohito) (90411363)	大阪医科大学・医学部・講師 (34401)	
研究分担者	藤原 聡枝 (Fujiwara Satoe) (90707960)	大阪医科大学・医学部・講師 (34401)	