

令和 6 年 5 月 31 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K16404

研究課題名（和文）大腸癌における糖鎖を標的としたレクチン新薬の臨床応用を目的とした基礎的研究

研究課題名（英文）Lectin drug conjugate therapy for colorectal cancer

研究代表者

大原 佑介（Ohara, Yusuke）

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：90757791

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：所属研究室ではレクチンマイクロアレイ技術、臨床に即した動物モデルを駆使して膵癌特異的糖鎖を同定し（H-Type 1/3/4）、特異的に結合するレクチンrBC2LC-Nを発見した。レクチンとエンドトキシンの融合薬を作製し、マウス膵癌モデルにて著しい抗腫瘍効果を認めた。この膵癌に対する成果をもとに、現在レクチン創薬に向けて準備しているが、膵癌よりも罹患率が高い大腸癌への適応を視野に入れ研究を行った。本研究では大腸癌における糖鎖発現、マウスでの抗腫瘍効果の確認、薬理動態の解明を行い、本研究室が推進する創薬を大腸癌へ応用するための基盤となる実験を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本課題においては、糖鎖、レクチンをターゲットとした新規大腸癌治療戦略における基礎的研究の成果を得ることができた。これらにより本コンセプトが十分に臨床応用可能な治療になりうることを示すことができたと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Our laboratory has identified pancreatic cancer-specific glycans (H-Type 1/3/4) using lectin microarray technology and clinically relevant animal models, and discovered a lectin, rBC2LC-N, which binds specifically to these glycans. We produced a fusion drug of lectin and endotoxin, which showed remarkable anti-tumor effects in a mouse pancreatic cancer model. Based on the results for pancreatic cancer, we are now preparing for lectin drug discovery, and have conducted research with a view to its application to colorectal cancer, which has a higher incidence than pancreatic cancer. In this study, we conducted experiments to elucidate glycan expression in colorectal cancer, to confirm its antitumor effect in mice, and to elucidate its pharmacokinetics, which will serve as a basis for the application of drug discovery to colorectal cancer, which our laboratory is promoting.

研究分野：消化器外科学

キーワード：レクチン 糖鎖 大腸癌 抗がん治療

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

大腸癌は日本の生活の欧米化に伴い、罹患者数で第1位(13万人/年)死亡者数で第2位(5万人/年)となり、大腸癌治療の発展が社会的に急務である。病巣が大腸局所に留まるステージの場合、外科切除で高い根治性が期待できるが、既に肝転移、肺転移、腹膜播種を来した様な進行状態においては、各種の抗癌剤治療を施しても根治には至らない。現状の大腸癌治療ガイドラインでは分子標的薬を含めた既存の種々の抗癌剤を時間的に多段階に組み合わせることを推奨しているが、各抗癌剤の予後に対する上乗せ効果は数か月程度であり、また抗体薬であっても正常細胞へのダメージは深刻である。さらには分子標的薬、免疫チェックポイント阻害薬等の開発がなされているが、治療が甚だしく高額となることが多く我が国の医療財政を圧迫し、適応を厳格にすべきとの方針が打ち出されている。これらのことから、既存の薬剤とはメカニズムの異なる新規の抗癌剤開発が求められている。

【癌細胞表面を覆う糖鎖を治療標的とする意義】

細胞膜タンパク質や脂質の多くは糖鎖修飾を受けている為、細胞の最外層は糖鎖層であり、「細胞の顔」として働いている。その構造は細胞の種類、分化度を鋭敏に反映し、各種癌においても細胞膜上のタンパク質は悪性度に伴い特徴的な糖鎖修飾を受けている。従って、癌の標的治療を開発する際、糖鎖の奥に隠れた蛋白ペプチドではなく、表面に露出している糖鎖を狙う方が効率的なはずである。しかし、1) 生体試料中の微量な糖鎖を解析する技術が今まで無く、有効な癌の標的糖鎖を選別出来なかった、2) 糖鎖の構造は免疫動物に共通である為、ある糖鎖を狙った抗体を作る事は極めて困難、という理由で糖鎖を標的とする創薬研究は全く行われてこなかった。

【膵癌細胞に特異的に発現している糖鎖および、それを認識するレクチンの発見】

所属研究室では難治癌の代表である膵癌にターゲットを絞り研究を重ねてきた。膵癌細胞株 Capan-1 を免疫不全マウスに皮下移植すると非常にヒト膵癌検体と病理組織学的構造が類似することを発見した。この Capan-1 細胞株に対してレクチンマイクロアレイを施行し、特異的に発現している糖鎖(H-Type 1/3/4)および、それを認識するレクチン(rBC2LC-N)を発見した。この rBC2LC-N にエンドトキシンを conjugate したレクチン-トキシン融合薬(rBC2-PE38)を開発し、Capan-1 の細胞株に投与すると抗癌効果が1000倍に増大した。さらにこの rBC2-PE38 を Capan-1 のマウス腹膜播種モデルに投与すると、強い腫瘍縮小効果を来し生存期間が62日から105日に延長するという極めて優れた結果を得た(Shimomura O, Oda T, et al. 2018)。この結果を受けて所属研究室は rBC2LC-N をキャリアとした革新的なドラッグデリバリーシステムを構築し、膵癌患者に投与することを計画している。既に製薬会社と開発協力について締結し、3年以内のヒト投与ならびに抗悪性腫瘍薬としての上市を目指している。膵癌患者への投与に対する安全性ならびに効果が確認され次第、他の癌種にも投与を拡大することを計画している。膵癌の次にターゲットとなるのは大腸癌であると考えており、本研究は大腸癌への臨床応用に向けた基礎実験と位置付けている。

2. 研究の目的

1. 大腸癌細胞株には糖鎖 H-Type 1/3/4 が発現しているか。
2. 大腸癌組織検体には糖鎖 H-Type 1/3/4 が発現しているか。
3. マウス大腸癌モデルにおいてレクチン-トキシン融合薬は抗腫瘍効果を発揮するか。
4. ヒト大腸癌にて臨床応用する上で、問題となる組織障害性はあるか。

3. 研究の方法

実験1 ヒト大腸癌細胞株での糖鎖 H-Type 1/3/4 の発現解析

ヒト大腸癌細胞株(CACO-2、CW-2、H414、HCT116)を細胞培養し、糖鎖 H-Type 1/3/4 を標識するレクチン rBC2LC-N を用いた染色を行う。細胞株をヌードマウスに皮下移植を行い腫瘍形成したうえでパラフィン包埋切片とし、同様のレクチン染色を行う。細胞株によって糖鎖発現が異なることが予想されるため、in vivo 実験での最適な細胞株を選別することが目的である。

実験2 臨床検体での糖鎖 H-Type 1/3/4 の発現解析

過去に大腸癌切除を行った臨床検体を用いて糖鎖 H-Type 1/3/4 の発現解析を行う。大腸癌原発巣50例、肝転移巣20例を選択し、大腸癌検体のパラフィン包埋切片にてレクチン染色を行い、発現を確認する。臨床データは年齢、性別、組織型、ステージ、予後の情報がリンクしており、糖鎖発現との関連を明らかにすることができる。

実験3 大腸癌切除検体移植マウス(tumor-graft)に対するレクチン-トキシン融合薬による抗腫瘍効果の解析

新鮮大腸癌切除検体をヌードマウスに皮下移植し、レクチン-トキシン融合薬をマウス尾静脈より投与し、抗腫瘍効果が発現されるかを明らかにする。既に当研究室では手術で切除した新鮮な組織検体の一部のマウスの tumor-graft とすることで実臨床での大腸癌に類似した腫瘍塊を得る技術を完成している(Akashi Y, Oda T et al., 2013)。このことから、実臨床にきわめて

近い動物実験系においてレクチン-トキシン融合薬の抗腫瘍効果を確認することができる。10 症例の tumor-graft 作製を計画する。

実験 4 レクチン-トキシン融合薬のマウス体内分布の解析

マウス皮下腫瘍モデルに、蛍光標識したレクチン-トキシン融合薬を投与する。血液を投与 1 時間、12 時間、24 時間、48 時間、72 時間で採取する。また投与 24 時間の肝、肺、腎、腸管組織、腫瘍を採取する。これらのサンプルの蛍光強度を測定し血中動態、腫瘍集積、他臓器集積を明らかにする。肝、肺、腎、腸管は組織内の炎症、線維化等を HE 染色にて病理組織学的に検証する。レクチン-トキシン融合薬が優秀な腫瘍集積能力を持つことを明らかにする。

4. 研究成果

まず臨床大腸癌検体を年 100 例ほど集積し保管した。通常のパラフィン切片に加えて生検体としてバイオバンクを通じて集積した。それぞれの組織型、ステージ、臨床経過をファイルに集積した。ヒト大腸癌細胞株に H-type 1/3/4 がどの程度発現しているかをまず明らかにすることを考えた。大腸癌細胞株については大腸癌の組織型、マウスへの移植経験等の観点から論文をサーベイし、HT-29、LoVo、LS174T、DLD-1 を選択した。レクチン染色を施行すると LS174T、DLD-1 は強陽であったが、HT-29、LoVo は弱陽性であった。我々は今までに腺癌細胞株においても細胞株間のレクチン染色の強弱がみられたが、本実験の結果をみると同様のことが大腸癌細胞株にも当てはまる。このことは広く大腸癌細胞に本治療の効果が得られるわけではないことを示しており、癌細胞のサブタイプの検証が必要であると考えた。一方で、レクチン染色の結果が単なる非特異的反応ではなく、癌細胞の糖鎖発現に由来している可能性が高くなった。

さらに *in vitro* で rBC2LCN レクチンの結合パターンを *in vivo* で確認すべく、大腸癌細胞株を免疫不全マウスに移植し、マウスゼノグラフトモデルを作成して検証した。組織学的には DLD-1、HT-29、Lovo は低分化の癌細胞であり、LS174T は高分化-中分化の癌細胞であった。*in vitro* の研究同様に、LS174T、DLD-1、Lovo はレクチン染色で強陽性であり、HT-29 は弱陽性であった。rBC2LCN-N-PE38 をマウスに投与し、体重減少、各臓器障害の顕微鏡的評価、血液毒性について評価したが、有意な毒性所見はみられなかった。

本課題においては、レクチンをターゲットとした新規大腸癌治療戦略における基礎的研究の成果を得ることができた。これらにより本コンセプトが十分に臨床応用可能な治療になりうることを示すことができたと考える。

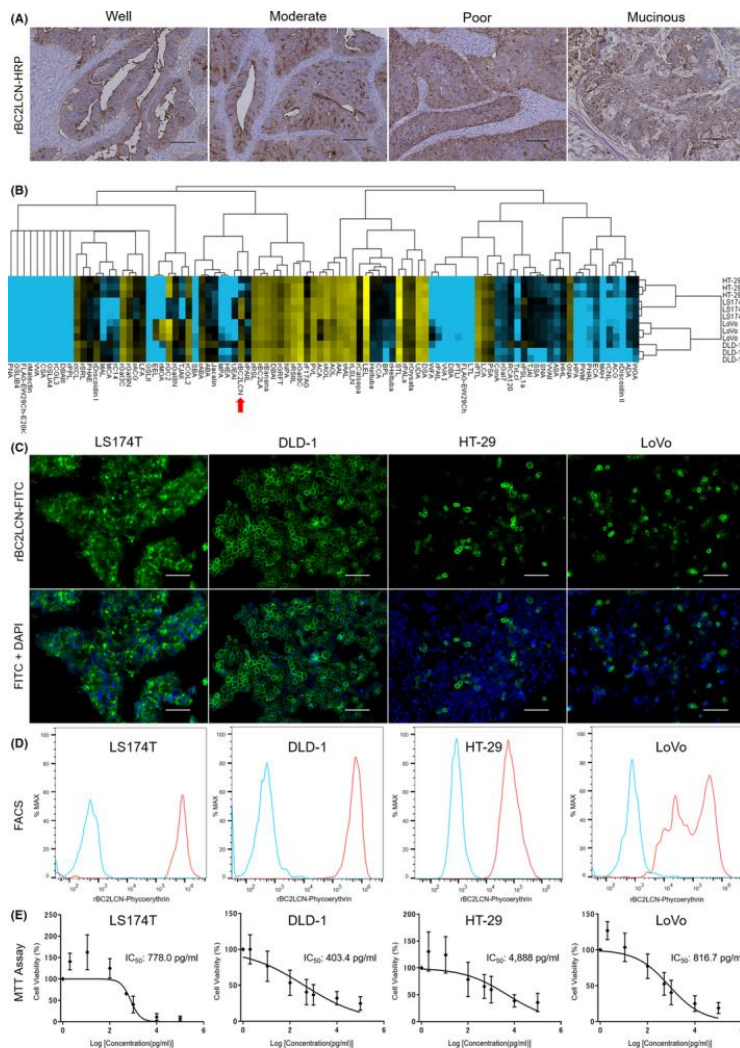


FIGURE 1

Evaluation of the affinity between rBC2LCN and colorectal cancer cell lines in vitro. A, rBC2LCN lectin staining for clinical colorectal cancers showing representative findings of cancers with diverse levels of cell differentiation (scale bar: 100 μ m). B, Quantification of lectin ligands present in cell lysates binding to 96 lectins arrayed on a high density microarray (yellow: high; black: intermediate; blue: low). The red arrow notes the position of rBC2LCN. C, Microscopy images of live cell staining with FITC labeled rBC2LCN (1 μ g/mL; scale bar: 100 μ m). D, Flow cytometric analysis of rBC2LCN PE (1 μ g/mL) binding to live cells. E, Cytocidal effect of rBC2LCN PE38 on each cell line was evaluated using Cell Counting Kit WST 8 Assay. PE, phycoerythrin

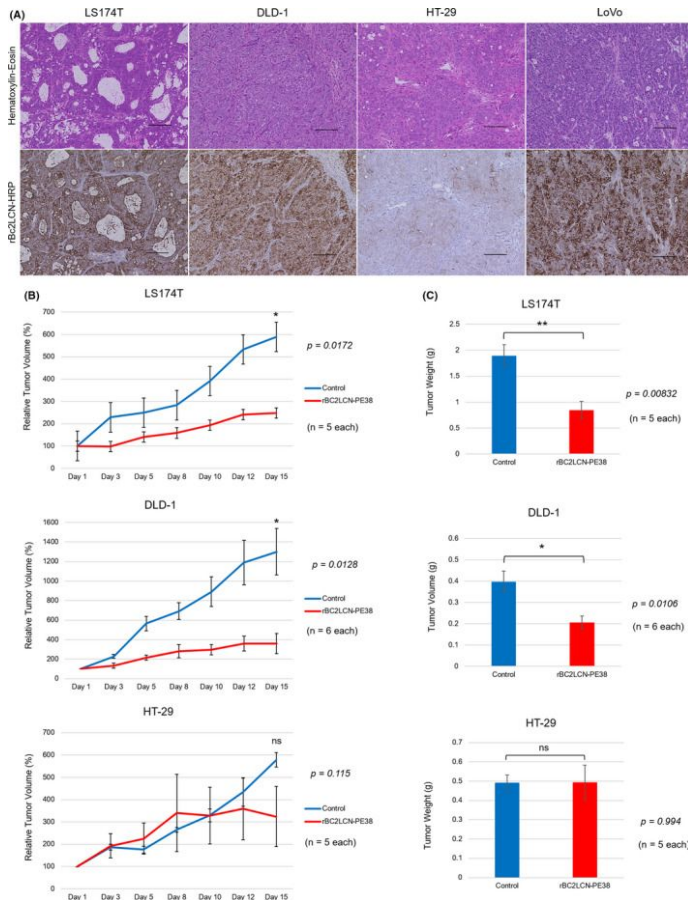


FIGURE 2

Evaluation of the therapeutic efficacy of rBC2LCN PE38 in cell line derived mouse xenograft models in vivo. (A) Findings of histochemical staining for each cell line derived subcutaneous tumor collected from mouse xenograft models (scale bar: 100 μ m). Histological differentiation/rBC2LCN expression were: LS174T, well to moderate/strong; DLD 1, poor/strong; HT 29, poor/weak; and LoVo, poor/strong. (B) Change of relative tumor volume during the experimental period. Tumor size was measured in two dimensions by digital calipers, and the volume was calculated using the following formula: $0.5 \times \text{width}^2 \times \text{length}$. The tumor volume on Day 1 was defined as the standard volume (100%). (C) Excised tumor weight from mouse xenograft models. *P < 0.05, **P < 0.01. ns, not significant

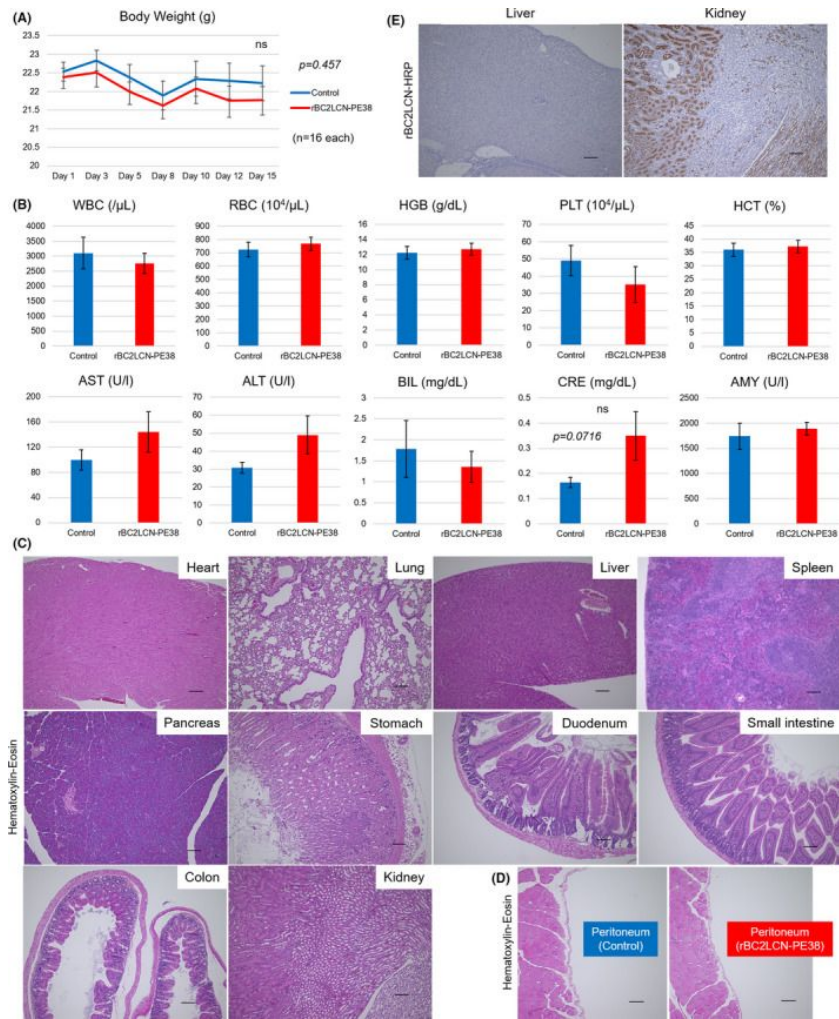


FIGURE 3

Evaluation of toxicity and adverse effects of rBC2LCN PE38 in in vivo mouse xenograft models. A, Body weight change during experimental period. B, Hematological findings on Day 15. The levels of 10 hematological examination parameters, including complete blood count (white blood cells [WBC], red blood cells [RBC], hemoglobin [HGB], platelets [PLT], and hematocrit [HCT]), aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), total bilirubin (BIL), amylase (AMY), and creatinine (CRE) were measured. ns, not significant. C, Histological analysis of major organs, including heart, lung, liver, kidney, spleen, pancreas, stomach, duodenum, small intestine, and colon (scale bar: 100 μm). D, Histological analysis of the peritoneum. E, Histochemical staining for rBC2LCN in the major organs (scale bar: 100 μm)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kitaguchi Daichi, Oda Tatsuya, Enomoto Tsuyoshi, Ohara Yusuke, Owada Yohei, Akashi Yoshimasa, Furuta Tomoaki, Yu Yang, Kimura Sota, Kuroda Yukihito, Kurimori Ko, Miyazaki Yoshihiro, Furuya Kinji, Shimomura Osamu, Tateno Hiroaki	4. 巻 111
2. 論文標題 Lectin drug conjugate therapy for colorectal cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 4548 ~ 4557
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14687	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 古田智章
2. 発表標題 膵癌糖鎖を標的とした新規抗がん治療法の開発 ドキソルピシンプロドラッグを用いたレクチン・薬物複合体
3. 学会等名 第79回日本癌学会
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------