

令和 6 年 5 月 12 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07175

研究課題名（和文）DDSが賦与するCpG核酸能を利用した肝細胞癌の治療

研究課題名（英文）Therapy against HCC by potential ability of CpG endowed by DDS

研究代表者

辻村 直人（Tsujimura, Naoto）

大阪大学・大学院医学系研究科・招へい教員

研究者番号：10804198

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：肝細胞癌では5FU、IFN alpha併用療法が著効する例がみられたが、治療法として確立するまでには至らなかった。非メチル化CG配列を含んだCpG核酸は、各種のサイトカインを産生し、感染症や癌の治療への応用が試みられているが、その効果は十分とはいえない。今回、我々は、IL-6やTNFなどの炎症性サイトカインの分泌を促すKタイプ（B型 K3）CpGを独自のドラッグデリバリーシステムに搭載して投与することで、IFN alphaやIFN gammaなどの分泌を促進させることに成功した。本研究の成果は肝細胞癌をはじめとする固形癌の新しい治療法を提供する可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果、CpG核酸を独自のDDSに搭載することで肝細胞癌に対する新規の治療法に繋がる可能性がある。この治療法は核酸医薬に分類され、通常のマウス試験では核酸による治療は、小さな腫瘍にしか適応できないことが多いが、本法によれば4～10倍程度大きなマウス腫瘍にも治療効果がみられた。この結果は、肝細胞癌のみではなく大腸癌のマウス腫瘍モデルでも確認されたことから、強力な抗腫瘍効果を示す核酸を使った治療法となることが期待される。

研究成果の概要（英文）：We had experienced several advanced HCC cases to which 5-FU/IFN alpha therapy gave marked therapeutic efficacy, but the therapy was not approved as a standard therapy at that time. CpG nucleic acids containing non-methylated CG sequences are being used in clinical trials of cancer and infectious diseases, but the efficacy has not been proved thus far. In this study, we have succeeded to induce IFN alpha/gamma at high levels in HCC cells by combination of K type CpG and our unique DDS system. This is particularly important because D type CpG usually induces IFN alpha but clinically available K type CpG does not. This result was also confirmed with colorectal cancer cells. Our findings may open a new avenue to novel therapy against HCC and other solid tumors.

研究分野：消化器外科

キーワード：肝細胞癌 CpG DDS インターフェロナルファ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肝細胞癌は癌関連死亡率が高く、最新治療の創出が求められている。これまでに私達は、5-FU/Interferon(IFN)alpha の併用療法が門脈浸潤を来した高度進行肝細胞癌の予後を改善することを報告してきた。しかし、5-FU/IFN alpha 療法は肝動注に対して優越性を示せず、皮膚潰瘍の副作用の問題もあって、進行肝細胞癌の治療法としての認可には至らなかった。一方、近年、生体免疫の賦活化を誘導する核酸医薬 CpG 核酸が注目されている。通常、樹状細胞や B 細胞には TLR9 が発現しており、細菌やウイルスの非メチル化 CG 配列を認識して炎症性サイトカインを分泌する。CpG 核酸には K タイプ (B 型 K3) と D タイプ (A 型 D35) があり、TLR9 と結合して、K タイプは B 細胞を活性化し IL-6 や TNF などの炎症性サイトカインの分泌を促し、D タイプは樹状細胞から IFN alpha や IFN などの分泌を促進する。しかし、D タイプは凝集しやすいため、臨床では K タイプが好んで用いられるが、IFN を出せないことが課題となっている。私達がこれまで開発してきた生体作動性の DDS であるスーパーアパタイト (sCA) ナノ粒子に K タイプ CpG 核酸を内包化することで、末梢血単核球やマウス樹状細胞に対して IFN alpha、IFN gamma などのサイトカイン誘導を起こすことを示してきた。

2. 研究の目的

本研究ではスーパーアパタイト (sCA) によって新たに賦与された CpG 核酸のサイトカイン誘導能を評価し、それらがもたらす抗腫瘍効果を利用して、進行肝細胞癌に対する効果的な治療戦略の確立に繋げることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 細胞株：マウス樹状細胞 DC2.4、マウスマクロファージ J774a.1、ヒト肝細胞癌 PLC、Huh7、肝芽腫細胞 HepG2、大腸癌細胞 HCT116、(2) CpG 核酸：sCA-NC CpG (CpG ODN K3 control, ナティアス社) 0 化、sCA-CpG (CpG ODN K3, ナティアス社) S 化処理。(3) RT-PCR による各種 messenger RNA の測定：IFN alpha, gamma, IL6, GAPDH。(4) WST8 法による細胞増殖活性の評価、(5) ノードマウスを用いた治療実験

4. 研究成果

(1) マウス樹状細胞 DC2.4 に CpG 核酸を導入し、INF-alpha の発現誘導がみられるかを検討した。マウス INF-alpha はヒトとは異なり、全てのサブタイプを検出可能なマウス用のプライマーを設計した。Sense 5' -ATGGCTAGRCTCTGTGCTTTCCT-3' , Antisense 5' -AGGGCTCTCCAGAYTTCTGCTCTG-3' 。ヒト単核球を用いた既報を参考に、最終の CpG 濃度を 0.8 ug/mL に調整し、親株と sCA-NC CpG, または sCA-CpG を作用させた細胞群で、24 時間後に INF-alpha mRNA と IL6 mRNA を RT-PCR 法で測定した。内因性コントロールには GAPDH mRNA を用いた。その結果、sCA-CpG を作用させた群において、親株、NC 群と比較して、INF-alpha の有意な発現誘導がみられた (図 1)。同時に測定した INF-gamma はいずれの群でも検出できなかった。

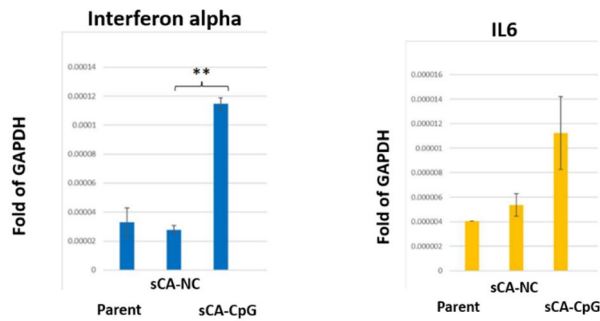


図 1. sCA-CpG はマウス樹状細胞 DC2.4 において、IFN alpha を誘導した (24h, ** $P < 0.01$, $n=2$)。IL6 は sCA-CpG によって増加したが有意差には至らなかった。

細胞の写真を経時的に撮影して各群で細胞障害が起きていないことを確認した。但し、別の NC として採用した S 化したランダム配列は毒性を示したため、このコントロールは利用しなかった。

(2) 次にマウスマクロファージ J774a.1 を用いて同様の実験を行った。この細胞は、sCA-CpG によって経時的に細胞数が減少してゆき、結果の解釈は慎重であるべきであるが、24 時間では INF-alpha は sCA-CpG 投与群では NC と比べて 2 倍に増加し、48h では有意差をもって NC よりも増加した ($P < 0.01$)。一方、IL-6、IFN- γ に関しては sCA-CpG による増幅はみられなかった。

ここまでの実験は、単核球や樹状細胞の反応についてマウス細胞を用いて、各種のパラメーターを決定し、確認実験を行ったものである。樹状細胞のエンドソーム内に TLR9 が存在し、そのリガンドである CpG が sCA によって効率よく細胞に導入されることで IFN alpha などのサイトカインが産生されることは想定される。しかし、肝細胞癌に対して sCA-CpG が直接 IFN alpha 誘導を示すのかどうかはこれまで分かっていない。

(3) 次に肝細胞癌 PLC について同様の実験を行った。

sCA-CpG は IFN-alpha、IL6、IFN-gamma の全てのサイトカインを大きく増強させた(図 2)。これらのサイトカインの増強は 48 時間後に PLC の細胞数を大きく減少させた(図 3)。

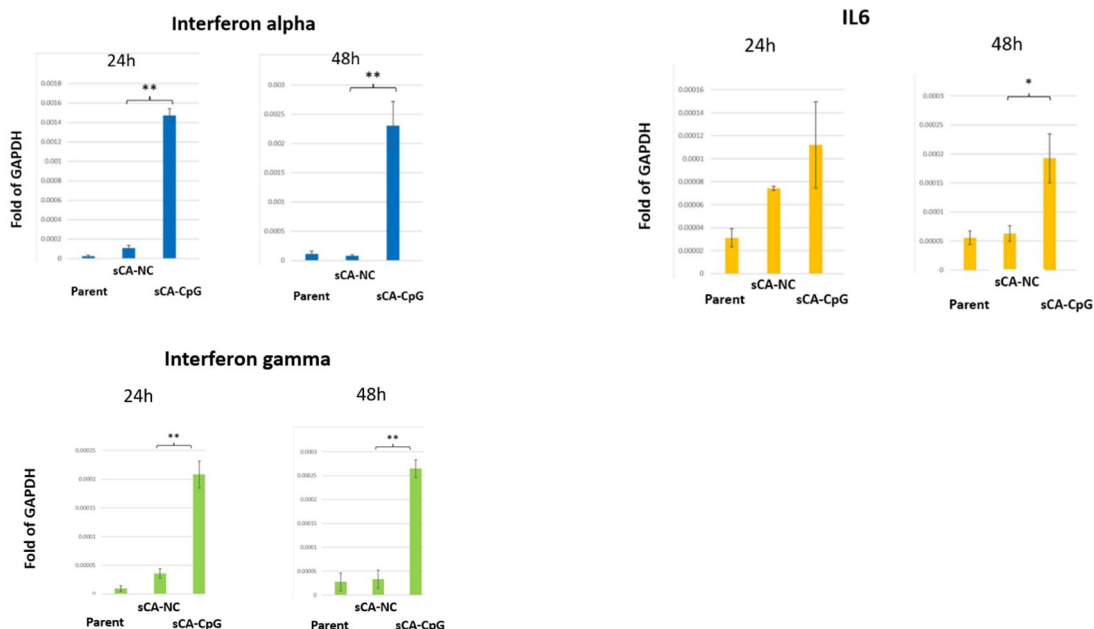


図 2 . sCA-CpG は PLC 細胞の IFN-alpha, IL6, IFN-gamma の発現を有意に増強した。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

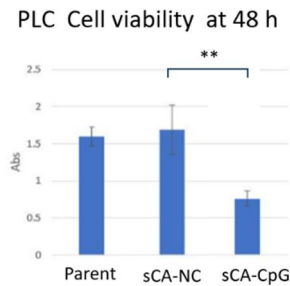


図 3. Transfection 後 48 時間で sCA-CpG は PLC の増殖活性を有意に低下させた。** $P < 0.01$ 。

(4) 上記の実験で使用した CpG は K タイプなので、CpG 単独の作用で IL6 は誘導しても IFN-alpha は誘導しないといわれている。sCA による CpG の高い細胞導入効果が新たな生理作用をもたらしたことが推察される。この事を調べるために、lipofection でも同様のサイトカイン誘導が起きるかどうかについて PLC を用いて比較実験を行った。その結果、lipofection でも transfection 後 48 時間には若干の IFN 誘導が起きたが、sCA-CpG は liposome-CpG の 3 倍以上の IFN alpha および IFN gamma 誘導を引き起こした (図 4)。一方、IL6 も sCA-CpG, Liposome-CpG によってそれぞれの Negative Control CpG に比べて有意に増加したが、そのレベルは 2.4 倍と 1.3 倍程度に留まった。

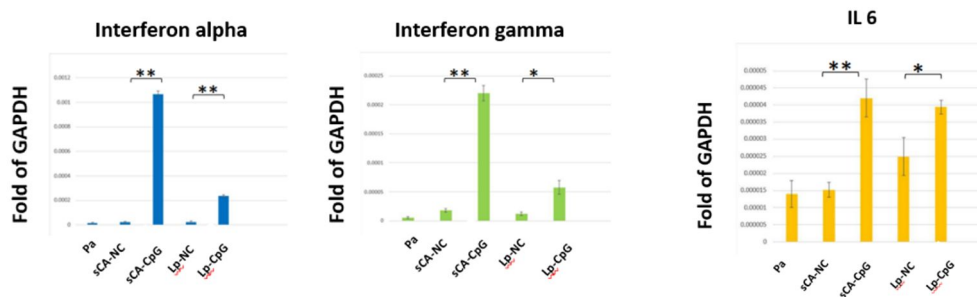


図 4 . PLC 細胞に transfection 後、48 時間で RT-PCR 法で、各群のサイトカインレベルを測定した。sCA-CpG は liposome-CpG よりも強い IFN alpha, IFN gamma 誘導を示した。IL6 の誘導は sCA と lipofection 共に NC の 2.4 倍、1.3 倍程度にみられた。Lp: lipofection 3000 による transfection。NC は S 化していない CpG 配列。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

(5) 同様のことが他の癌細胞でも起きるかどうかを調べるために肝芽腫細胞 HepG2 を用いて検討した結果、IFN alpha, IFN gamma 誘導に関して PLC とほぼ同様の結果が得られた (図 5)。IL6 は検出限界以下であった。大腸癌細胞 HCT116 では liposome-CpG でもある程度の IFN-alpha が誘導され、sCA-CpG はそれを上回ったが肝細胞癌ほどの大きな差はみられなかった。IFN-gamma も両方で同程度の誘導がみられた。

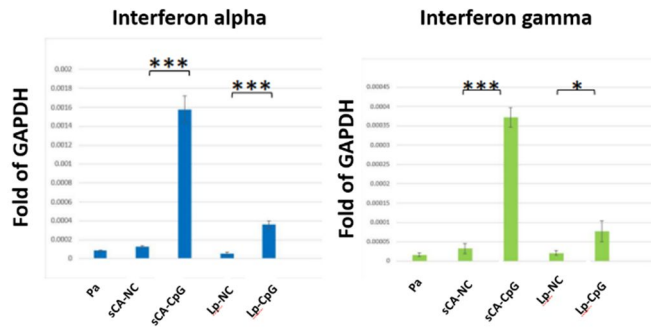


図5. 肝芽腫 HepG2 における実験結果。sCA-CpG による IFN の誘導が顕著であった。* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ 。

(6) 肝細胞癌 HuH7 を 6 週齢ヌードマウスの皮下に移植し、500 mm³まで成長させてから 2-3 日に 1 回 50 microgram の CpG を sCA に搭載して 6 回静注した。2 週間後にコントロール群は 3000 mm³にまで達したが、治療群は 500 mm³のままであった。大腸癌 HCT116 による皮下腫瘍を 200 mm³まで成長させ同様の治療を行ったところ、コントロール群は 1000 mm³成長したが、治療群は 200 mm³のまま成長しなかった。通常、核酸の全身投与によるマウスの治療実験では 50mm³ 程度の腫瘍サイズから治療を開始しないと期待通りの効果が得られないことを考えると、sCA-CpG の治療効果は極めて優れているといえる。

(考察) 免疫細胞に比べて発現量は少ないが、PLC, HepG2, HCT116 などの癌細胞も TLR9 を発現している。Lipofection でも若干の IFN, IL6 誘導がみられることから、sCA が特別な生理活性があるためとは考えにくく、sCA による CpG の細胞内エンドゾームへの導入効率が格段によいために IFN-alpha や IFN-gamma を強力に誘導すると考えられる。マウスの肝細胞癌、大腸癌を皮下移植した治療実験でも通常は 50mm³程度までの腫瘍サイズでないと治療効果がみられないが、200 500 という大きな腫瘍に対しても明らかな抗腫瘍効果を示した。更に、CpG 核酸は脳腫瘍細胞にも高い効果があり、単独投与よりも sCA に搭載することで、多くの腫瘍に対する高い治療効果が期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	柴田 理志 (Shibata Satoshi) (00423153)	大阪大学・大学院医学系研究科・特任講師(常勤) (14401)	
研究分担者	山本 浩文 (Yamamoto Hirofumi) (30322184)	大阪大学・大学院医学系研究科・教授 (14401)	
研究分担者	横山 雄起 (Yokoyama Yuhki) (60615714)	大阪大学・大学院医学系研究科・助教 (14401)	

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