

平成30年6月18日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15605

研究課題名(和文)糖鎖標的癌治療；癌幹細胞の特異的糖鎖に対するレクチン-トキシンによる新規癌治療

研究課題名(英文) Glycan targeting cancer therapy; targeting cancer cell surface glycan by using a lectin as a drug carrier.

研究代表者

小田 竜也 (ODA, Tatsuya)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：20282353

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：膵癌細胞の最外層に特異的なフコシル化糖鎖が発現していることを見だし、その糖鎖構造にレクチン(rBC2)が特異的に反応する事を同定した。このrBC2レクチンを薬剤(=緑膿菌外毒素：PE)の担体として用い、膵癌の制御実験を行った。In vitroでのrBC2-PEの50%阻害濃度(IC50)は1.04fmolと従来の抗体融合薬に比べ1000倍以上強力であった。in vivoのマウス膵癌モデルに対してrBC2-PEを投与すると、優意に腫瘍を縮小させ、生存も延長した。本レクチンはヒト赤血球 に対して血液凝集活性がないことも確認し、抗体治療に取って変わる新たな標的治療のプラットフォームを提案出来た。

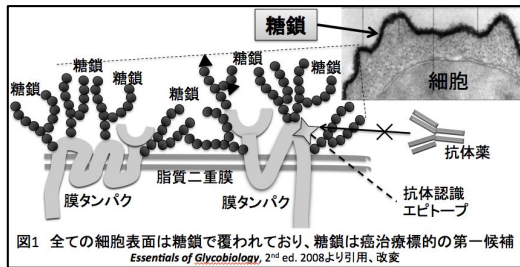
研究成果の概要(英文)： Because the outermost coatings of cancer cells are composed of cell-specific glycan layers (glycocalyx), lectins, proteins with glycan-binding potential, were evaluated for possible use as drug carriers in PDAC treatment. A human PDAC cell line was subjected to lectin microarray analysis to identify specific lectin-glycan pairs. The selected lectin was fused with a bacterial exotoxin for the construction of a lectin-drug conjugate (LDC), and its safety and anti-tumour effects were evaluated. A specific affinity between rBC2LC-N lectin and pancreatic cancer was identified. The IC50 of LDC 1.04 fmol/l was 1/1000 lower than that reported for immunotoxins. The intraperitoneal administration of LDC reduced the tumour weight, and reduced the number of nodules from 48 to 3 (P<0.001) and improved survival from 62 to 105 days. Herein, we show the concept of utilizing lectins as drug carriers to target glycans on the cancer cell surface, highlighting new insights into cancer treatments.

研究分野：がん標的治療

キーワード：膵癌 糖鎖 レクチン 腹膜播種 癌幹細胞 ドラッグデリバリー 薬剤担体 トキシン

1. 研究開始当初の背景

膵癌を初めとする難治性固形癌の癌幹細胞マーカー(CD24, CD44, CD133, CXCR-4等)を標的とする抗体治療薬の開発が進んでいる。しかしそもそも、臨床膵癌検体での既報の癌幹細胞マーカーの特異性は高くなく、標的治療の対象なのか疑問もある(Ohara Y, Oda T, Cancer Sci.2013)。

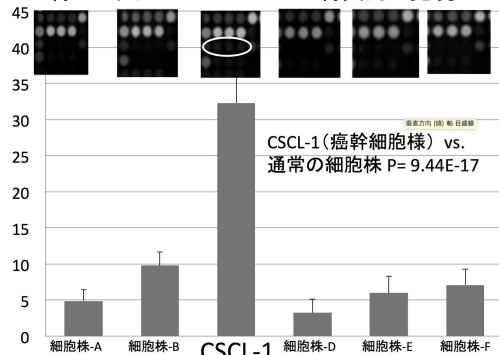


さらに、これらの蛋白質は糖鎖修飾を受けており、癌細胞上では抗体反応エピトープがマスクされ抗体薬の結合が阻止されている事も多い。さらに「数ヶ月の延命に数百万円」と言われる低い費用対効果、国民医療費への負担、という医療経済の問題もあり、抗体医薬にとって代わる標的技術の出現が強く望まれている。

そもそも、多くの膜蛋白質、脂質は糖鎖修飾を受けており、細胞表面は糖鎖で覆われている。そして、同じ蛋白質であっても正常と癌細胞では糖鎖修飾が異なる事が多く、癌特異的糖鎖を直接認識出来る方法があれば有効な標的治療になる。レクチンはまさにその目的を叶える蛋白質である。

2013年より申請者ら筑波大外科グループは、つくば国際特区の枠組みで産総研糖鎖グループと共同研究を開始した。臨床膵癌に特徴的な3次元構造を形作る“形態形成能(morphogenesis)”を癌幹細胞の多分可と定義して研究を進め、産総研で開発した糖鎖発現を網羅的に解析できるレクチンアレイを用いる事で、癌幹細胞様細胞株(CSCL-1)に特異的に表出している糖鎖Xと、それに反応するレクチンAを同定することが出来た(2015年10月 特許申請済み)。

図2. 膵癌細胞における96種類のレクチンの反応性；特にレクチンAがCSCL-1に特異的に発現



2. 研究の目的

申請者は、このレクチンAを直接がん幹細胞を標的とする治療担体として使えないか、と発案した。本研究の目的は、レクチンAに緑膿菌外毒素(Pseudomonas Exotoxin=PE)を結合させた新規の抗腫融合蛋白(=レクチンA-PE)を開発し、膵癌に対する新規治療法を開発する事である。実際、パイロット的に開発を進めているレクチンA-PEは、マウス皮下膵癌移植モデルに対して、劇的な抗腫瘍効果を認めた。また、私達が癌幹細胞様細胞株(CSCL-1)で候補として炙りだしたレクチンAの臨床膵癌検体での反応性を確認し、治療標的としての魅力を確認する。レクチンが持つ赤血球凝集能というマイナス面に影響を受けにくい腹腔内を投与経路とし、膵癌の腹膜播種という、臨床的にはほとんど打つ手が無い病態に対して、レクチン毒素により治療を挑む。マウス腹膜播種モデルにレクチン毒素を腹腔内投与し、腹腔内及び全身への分布、LD50、腫瘍集積性、抗腫瘍効果を包括的に解析して pre-clinical な治療データを蓄積する。

3. 研究の方法

【研究方法の概要】パイロット実験で把握したレクチンAの標的糖鎖としての有効性をヒト患者組織での確認を進める。また、パイロットで作成したレクチンA-PEに勝る安全性、有効性を持つコンストラクトを作成し、*in vitro*, *in vivo* (腹膜播種モデル)での殺細胞性効果を検証していく。a-レクチンAコンストラクトの作製、b-レクチンA-PEの*in vitro*での殺細胞効果の確認、c-レクチン染色によるレクチンAの癌、非癌部における組織的発現分布、d-レクチンA-PE腹腔投与への半数致死量(LD50)の同定、主要臓器、全身への影響の評価、e-薬剤レクチン腹腔内投与における薬物動態の検討、f-レクチンA-PEによる皮下結節モデルでの抗腫瘍効果の確認、g-レクチンA-PEによる腹膜播種抑制の検討を行う。

【a-レクチンA-毒素コンストラクトの作製】

レクチンA含有発現ベクターのレクチンAの5'もしくは3'末端側に毒素遺伝子である緑膿菌由来のDomainI~III(PE38)遺伝子をスパーサーを介して導入し、レクチンA-毒素

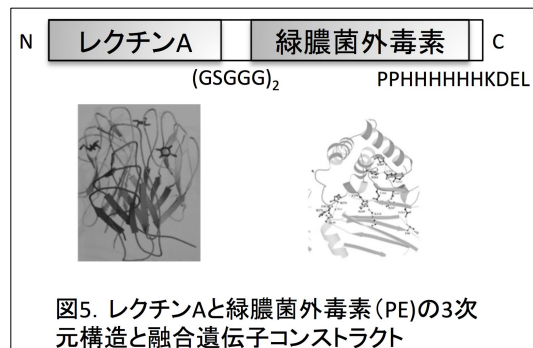


図5. レクチンAと緑膿菌外毒素(PE)の3次元構造と融合遺伝子コンストラクト発現ベクターコンストラクトを構築する。次

に、発現ベクターをコンピテントセルに形質転換する。そして、形質転換した大腸菌宿主を常法により液体培養して、レクチン A-毒素タンパク質を発現誘導する。通常のタンパク質精製方法を適用して精製することもできるが、フコース固定化カラムに供して、アフィニティークロマトグラフィーで精製する事を予定する。得られたレクチン A-毒素の精製度は電気泳動やゲル濾過等で確認する。

【b-レクチン A-PE の *in vitro* での殺細胞効果の確認】

6 種類の膵癌細胞株 (SUIT-2、AsPc-1、BxPc-3、CaPan-1、MiaPaca-2、PSN-1) および申請者が樹立した日本人膵癌由来の細胞株 8 種類におけるレクチン A に反応する糖鎖発現レベルを FACS 及び、マウス移植腫瘍結節のレクチン組織染色にて把握する。これらの細胞に対して作製したレクチン A-PE の殺細胞作用を MTT 法および³H]-leucine uptake assay (protein synthesis inhibition assay) により評価する。具体的には各種細胞 1×10^4 cells を 24 穴プレートに播種し、様々な濃度のレクチン A-PE を添加する。72 時間培養後に MTT 試薬、または³H]-leucine を加えさらに培養する。4 時間後、吸光度または放射性活性を測定し殺細胞効果の評価する。

【c-レクチン染色によるレクチン A の癌、非癌部における組織的発現分布】

臨床膵癌検体 50 例を目処に、レクチン A に HRP をコンジュゲートしたプローブで、組織染色を行う。癌細胞に分泌されたムチンに交差反応を示す可能性があり、PAS 染色、アルシアンブルー染色で粘液部分への染色を差分する。既に、パイロット実験で良好な染色を得ている。

【d-レクチン A-PE 腹腔投与への半数致死量 (LD50) の同定、主要臓器、全身への影響の評価】

レクチン A-PE の腹腔投与による全身への影響を調べるため、野生型マウスで半数致死量 (LD50) を同定する。また、レクチンを投与したマウスの各種臓器を摘出し、病理学的な異常の有無、及び血液検査 (100 μ g/kg、500 μ g/kg 投与群) を施行し、肝機能、腎機能を始めとした主要臓器への影響を検証する。また、薬剤添加していないレクチン A そのものの毒性についてはこれまで投与実験が行われていない為、同様の検証をレクチン単独についても行う。

【e-薬剤レクチン腹腔内投与における薬物動態の検討】

膵癌腹膜播種モデルにおけるレクチン A-PE の腹腔投与後の薬剤の挙動について、HRP 標識したレクチン A による腹腔投与実

験、またはレクチン A 単独投与後の各種臓器を摘出し、凍結切片を作成、抗レクチン A 抗体による免疫染色を行い、腹腔内腫瘍への薬剤送達 (Drug delivery) の有無を確認する。

【f-レクチン A-PE による皮下結節モデルでの抗腫瘍効果の確認】

上記細胞株の動物内での肝転移、腹膜播種製転移の形成能力は異なる。これらの動物ヌードマウス皮下腫瘍モデル、同所移植による腹膜播種モデルに対して複数のレクチン-トキシンによる抗腫瘍効果 (腫瘍径の縮小、生存期間の延命) について検討する。

i) 皮下腫瘍抑制効果: ヌードマウスの皮下にがん細胞 5×10^6 cells 移植し 3 日から数回、腫瘍内または腹腔内にリガンドトキシンを投与し、腫瘍径を計測して腫瘍抑制効果を評価する。

【g-レクチン A-PE による腹膜播種抑制の検討】

SCID マウス (免疫不全マウス) の膵臓にヒト膵癌細胞 (SUIT-2、Capan-1、Aspc-1) を 1×10^6 個を同所移植する。腫瘍は膵局所に増殖するのみでなく、腹膜播種を来し、無治療群は約 4-6 週で死亡する。精製したレクチン A-PE 蛋白を連日投与し腫瘍細胞移植時に腹腔内投与し、局所腫瘍増殖、播種抑制、転移抑制効果、生存期間を解析する。レクチン A-PE 治療効果が認められるかを検討する。
ii) 延命治療効果: ヌードマウスの膵臓にがん細胞 2×10^5 cells 移植し数回、腹腔内にレクチン A-PE を投与し、延命治療効果を評価する。

4. 研究成果

まず、上記方法までレクチン A と記載していた当結合タンパクは、rBC2LC-N (a recombinant bacterial C-type lectin) である。rBC2 - PE38 (緑膿菌外毒素) を本実験に使用するのに安定的に供給できるシステムを構築する事に成功した。次に 6 種類のヒト膵癌細胞株に対する rBC2 の反応性を調べ、同じ膵癌細胞株でも臨床膵癌に近い組織形態をマウス腫瘍で再現する細胞株で強い反応性が確認した。さらに、膵臓がんの手術検体を使用し、約 70 検体の臨床膵癌の切片への rBC2 の反応性を免疫組織学的に確認した。すなわち、膵癌上のフコシル化糖鎖 (H-type 1/3/4) を標的とする、rBC2 レクチンを薬剤キャリアとして利用する新規治療法が十分可能であるというエビデンスを得た。In vitro での IC50 は 1.04 fMol と従来の抗体融合薬に比べ 1000 倍以上強力な殺細胞効果であった。

続いて、in vivo での rBC2 - PE38 の抗腫瘍効果、毒性について検討した。膵癌細胞株をマウス皮下に移植した Cell Xenograft モデルで局所投与により、投与量依存的な抗腫瘍効果を認めた。また、腹腔内に膵癌細胞株を播種

させた腹膜播種モデルを作成し、rBC2 - PE38を腹腔投与した所、有意に播種個数を減少し、生存も優位に改善した。さらに、rBC2 - PE38の経静脈的に血中投与したモデルにおいても、マウスの生存を有意に改善することに成功した(生食群 MST:62日、腹腔投与群: 105 日 (P < 0.0001)、血中投与群:90 日(P < 0.0001))。レクチンは血液凝集活性が懸念されるが、本レクチン単独ではヒト赤血球 において血液凝集活性がないことも確認し、マウスに安全に投与する事が出来た。

本研究成果は、主な発表論文 1 .Molecular cancer therapeuticsに詳細に報告した。

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4件)

1. Shimomura O., Oda T., Tateno H., Ozawa Y., Kimura S., Sakashita S., Noguchi M., Hirabayashi J., Asashima M.,Ohkohchi N. A Novel Therapeutic Strategy for Pancreatic Cancer: Targeting Cell Surface Glycan Using rBC2LC-N Lectin-Drug Conjugate (LDC). Molecular cancer therapeutics vol.17, pp183-195, 2018

2. Miyamoto R., Oda T., Hashimoto S., Kurokawa T., Kohno K., Akashi Y., Ohara Y., Yamada K., Enomoto T.,Ohkohchi N. Platelet x CRP Multiplier Value as an Indicator of Poor Prognosis in Patients With Resectable Pancreatic Cancer. Pancreas vol.46, pp35-41, 2017

3. Ohara Y., Oda T., Hashimoto S., Akashi Y., Miyamoto R., Enomoto T., Satomi K., Morishita Y.,Ohkohchi N. Pancreatic neuroendocrine tumor and solid-pseudopapillary neoplasm: Key immunohistochemical profiles for differential diagnosis. World J Gastroenterol vol.22, pp8596-8604, 2016

4. Miyamoto R., Oda T., Hashimoto S., Kurokawa T., Inagaki Y., Shimomura O., Ohara Y., Yamada K., Akashi Y., Enomoto T., Kishimoto M., Yanagihara H., Kita E.,Ohkohchi N. Cetuximab delivery and antitumor effects are enhanced by mild hyperthermia in a xenograft mouse model of pancreatic cancer. Cancer Sci vol.107, pp514-520, 2016,

[学会発表](計9件)

1. AACR(米国癌学会総会) 2018 Osamu Shimomura, Tatsuya Oda, Hiroaki Tateno, Yusuke Ozawa, Sota Kimura, Shigo Sakashita, Jun Hirabayashi, Masayuki Noguchi, Makoto Asashima, Nobuhiro Ohkohchi Novel therapeutic strategy for pancreatic cancer with lectin drug conjugate (LDC) ~ the Efficacy and pilot Safety test, 2018 Chicago

2. 第118回日本外科学会定期学術集会 下村 治、小田 竜也、舘野浩章、小澤祐介、木村 壮大、坂下信悟、野口雅之、平林 淳、浅島 誠、大河内信弘 レクチン薬剤複合体を用いた膵癌細胞表面糖鎖をターゲットにした新規癌治療 2018年 東京

3. 第72回日本消化器外科学会総会 下村 治、小田 竜也、舘野浩章、平林 淳、鄭 允文、大河内信弘 糖結合タンパク「レクチン」をキャリアーとした新規癌治療法の開発 2017年7月 金沢

4. AACR(米国癌学会総会) 2017 Tatsuya Oda, Osamu Shimomura, Hiroaki Tateno, Yusuke Ozawa, Jun Hirabayashi and Nobuhiro Ohkohchi. Application of a lectin as a drug carrier for glycan-targeting cancer therapy 2017-Apr Washington DC

5. AACR(米国癌学会総会) 2017 Yusuke Ozawa, Tatsuya Oda, Osamu Shimomura, Hiroaki Tateno, Jun Hirabayashi Nobuhiro Ohkohchi Pancreatic cancer specific glycosylation survey by a panel of lectin staining; Tn antigen exposure as a result of o-glycan truncation. 2017-Apr Washington DC

6. 第75回日本癌学会学術総会 小田 竜也、下村 治、舘野浩章、平林 淳、野口雅之、浅島 誠、大河内信弘 ポスト抗体医薬としてのがん糖鎖標的レクチン-トキシン：膵癌の播種性転移治療を実用化する新規治療戦略 2016年10月 横浜

7. 第75回日本癌学会学術総会 下村 治、小田 竜也、舘野浩章、小澤祐介、野口雅之、浅島 誠、大河内信弘 高密度レクチンマイクロアレイを用いた膵癌幹細胞の糖鎖発現解析、未分化iPS細胞との偶然一致 2016年10月 横浜

8. 第35回日本糖質学会年会 小田 竜也、舘野浩章、山本一夫変貌するレクチン科学と医療応用 2016年09 高知

9. 第71回日本消化器外科学会総会 下村 治、小田 竜也、舘野浩章、小澤祐介、稲垣勇紀、鄭 允文、平林 淳、浅島 誠、大河内信弘 膵癌幹細胞とiPS細胞の類似性：網羅的糖鎖発現解析から偶然に炙りだされた共通性, 2016年07月 徳島

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：がん細胞の検出方法、がん細胞内に物質を導入するための試薬、及びがん治療用組成物

発明者：舘野浩章，平林淳，浅島誠，小田竜也，大河内信弘，下村治

権利者：同上

種類：国際出願

番号：PCT/JP2016/079577

出願年月日：2016年10月5日

国内外の別：外国

種類：各国移行

番号：米国：US 15/759288

出願年月日：2018年3月12日

国内外の別：外国

種類：各国移行

番号：欧州：16853603.5

出願年月日：2018年3月13日

国内外の別：外国

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.md.tsukuba.ac.jp/clinical-med/ge-surg/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

小田 竜也 (ODA Tatsuya)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：20282353

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

舘野 浩章 (TATENNO Hiroaki)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・創薬基盤研究部門・主任研究員

研究者番号：30450670

平林 淳 (HIRABAYASHI Jun)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・幹細胞工学研究センター・糖鎖レクチン工学研究チーム・首席研究員・研究チーム長

研究者番号：40156691

大河内 信弘 (OHKOHCHI Nobuhiro)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：40213673

橋本 真治 (HASHIMOTO Shinji)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：60624666

(4)研究協力者

なし