

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10592

研究課題名(和文) 去勢抵抗性前立腺癌の進展に対するガレクチン-3の腫瘍制御機構の解明と臨床応用

研究課題名(英文) Elucidation of tumor regulation mechanism of galectin-3 against castration-resistant prostate cancer and clinical application

研究代表者

福森 知治 (FUKUMORI, Tomoharu)

徳島大学・病院・講師

研究者番号：10314874

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：去勢抵抗性前立腺癌はホルモン療法や化学療法に抵抗性で、去勢抵抗性前立腺癌に対する治療法の確立は最も重要な課題である。本研究でわれわれは、ガレクチン-3が前立腺癌細胞のアンドロゲン受容体関連遺伝子の発現とPSA転写活性を有意に促進し、抗アンドロゲン剤の抵抗性に関与することを証明した。また、ガレクチン-3発現前立腺癌細胞では血管新生密度が有意に高く、血管新生因子であるVEGFBの発現が有意に上昇することを証明した。以上より、ガレクチン-3は前立腺癌細胞のアンドロゲン受容体と血管新生を制御することで、治療抵抗性に関与し、去勢抵抗性前立腺癌の治療に重要な役割をはたす分子であることを証明した。

研究成果の概要(英文)：Castration-resistant prostate cancer is resistant to hormone therapy and chemotherapy. Therefore, establishing a treatment for castration-resistant prostate cancer is one of the most important task. In this study, we demonstrated that galectin-3 significantly promoted the expression of androgen receptor-related genes and PSA transcriptional activity of prostate cancer cells, resulting that galectin-3 involved in the resistance of antiandrogen agents. In addition, it was proved that the microvessel density was significantly higher in the galectin-3-expressing prostate cancer cells and the expression of the angiogenic factor VEGFB was significantly increased. From the above, it has been proved that galectin-3 is a molecule involved in the resistance to treatment by controlling the androgen receptor and angiogenesis of prostate cancer cells, and it plays an important role in the treatment of castration-resistant prostate cancer.

研究分野：泌尿器腫瘍学

キーワード：ガレクチン-3 前立腺癌 アンドロゲン受容体 血管新生

## 1. 研究開始当初の背景

去勢抵抗性前立腺癌はホルモン治療のみならず抗がん剤による化学療法にも多くの症例で抵抗性であり、去勢抵抗性前立腺癌に対する治療法の確立は、泌尿器科医がブレイクスルーすべき最も重要な課題の1つである。去勢抵抗性前立腺癌においては、アンドロゲン受容体が様々な分子による修飾を受け、テストステロンが去勢レベルにもかかわらず腫瘍細胞の増殖が促進され、腫瘍の浸潤能や遊走能が亢進する現象が生じると考えられている。また一方で、アンドロゲン受容体を介さず腫瘍細胞の増殖、浸潤やアポトーシスを直接制御する分子も同定されつつある。これらの分子を制御し、腫瘍の増殖を抑制すると共に腫瘍細胞の浸潤、転移を阻止し、抗がん剤や放射線あるいは抗アンドロゲン剤の感受性を高めることが去勢抵抗性前立腺癌の治療戦略上きわめて重要である。

研究代表者の福森らは、以前からガラクトース結合レクチンの1つであるガレクチン-3が、免疫細胞や前立腺癌などの腫瘍細胞のアポトーシスを制御するメカニズムを解明してきた。われわれは、この癌の浸潤・転移に重要なキータンパク質の1つであるガレクチン-3が、(1)ホルモン非感受性前立腺癌細胞株(PC-3, DU-145)にのみ強発現する一方で、ホルモン感受性前立腺癌細胞株(LNCaP)に発現していないこと(Fukumori T et.al. Cancer Research 66: 3114-3119, 2006)、(2)PC-3細胞およびLNCaP細胞において、ガレクチン-3の発現が腫瘍細胞の浸潤能と遊走能を亢進させること(第73回日本癌学会学術集会(2014年)で発表)、(3)ガレクチン-3を発現していないLNCaP細胞において、ガレクチン-3はアポトーシスシグナルを調節しシスプラチンやエトポシドなどの抗がん剤耐性に関与すること(Fukumori T et.al. Cancer Research 66: 3114-3119, 2006、Fukumori T et.al. Drug Resistant Updates 10: 101-108, 2007)、(4)

ヒト去勢抵抗性前立腺癌細胞とその血清中にガレクチン-3が強発現していること(第73回日本癌学会学術集会(2014年)で発表)、(5)LNCaP細胞ではガレクチン-3の発現がピカルタミドやエンザルタミドなどの抗アンドロゲン剤耐性に関与すること(第73回日本癌学会学術集会(2014年)で発表)、(6)LNCaP細胞ではガレクチン-3の発現がマウス転移モデルにおける腫瘍の血管新生の促進に関与することを既に見いだしており、これらの結果は、ガレクチン-3が前立腺癌の進展や、ホルモン治療、抗がん剤治療抵抗性に深く関与することを示唆するものである。

## 2. 研究の目的

ガラクトース結合レクチンの1つであるガレクチン-3が、去勢抵抗性前立腺癌のホルモン治療抵抗性および抗がん剤、放射線治療抵抗性の獲得にいかに関与するかを *in vitro* および *in vivo* (前立腺癌マウス転移モデル)で検討し、その分子メカニズムについて解明する。さらに我々が作成している数種類のガレクチン-3のブロッキング抗体と siRNA の治療効果をマウスモデルで検証し、ガレクチン-3を標的とした分子標的治療の臨床応用を最終目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) 去勢抵抗性前立腺癌のヒト臨床検体におけるガレクチン-3発現の検討：ガレクチン-3はホルモン非感受性前立腺癌細胞株(PC-3, DU-145)にのみ強発現する一方で、ホルモン感受性前立腺癌細胞株(LNCaP)に発現していないが(Fukumori T et.al. Cancer Research 66: 3114-3119, 2006)、ヒト臨床検体におけるガレクチン-3の発現の評価は十分にできていない。われわれは未治療の前立腺癌と去勢抵抗性前立腺癌のガレクチン-3の組織検体での発現を

real-time PCR と免疫染色で検討した。また、血清中のガレクチン - 3 の発現を ELISA 法で定量的に測定し、前立腺重量や転移の有無を加味したガレクチン - 3 発現の臨床的意義を検討する。

(2) 前立腺癌細胞株におけるガレクチン - 3 の機能解析：ホルモン感受性前立腺癌細胞株 (LNCaP) にガレクチン - 3 を強発現させた細胞株と、ホルモン非感受性前立腺癌細胞株 (PC-3) に siRNA を使用してガレクチン - 3 をノックアウトした細胞株を構築し、さらにホルモン非感受性前立腺癌細胞株の DU-145 細胞でガレクチン - 3 をノックアウトした細胞株を構築した。これらの細胞株から、ガレクチン - 3 のアンドロゲンレセプターへの作用、グルココルチコイドレセプターへの作用、浸潤および遊走能、血管新生、アポトーシスへの影響を *in vitro* で評価する。

(3) アンドロゲンレセプターに対するガレクチン - 3 の関与：われわれはガレクチン - 3 を強発現させた LNCaP 細胞では、ガレクチン - 3 の発現を認めない LNCaP 細胞と比較して、DHT の存在下で腫瘍の PSA の発現が有意に亢進することを見出している。ルシフェラーゼアッセイを利用して PSA の転写活性におけるガレクチン - 3 の影響を検討し、マイクロアレイによりガレクチン - 3 とアンドロゲンレセプター関連遺伝子の相互作用を検討する。

(4) 去勢抵抗性前立腺癌細胞へのホルモン療法、放射線療法、化学療法に対するガレクチン - 3 の影響と作用機序の解析：ガレクチン - 3 を発現していないホルモン感受性前立腺癌細胞株 (LNCaP) とガレクチン - 3 強発現 LNCaP 細胞を DHT 除去培地で処理し、ピカルタミドやエンザルタミドによる抗アンドロゲン剤の治

療効果を腫瘍の PSA の発現で比較検討する。また、ホルモン非感受性前立腺癌 (PC-3) のガレクチン - 3 ノックアウト PC-3 細胞を使用し、放射線照射および、シスプラチン、ジェムシタピン、ドセタキセル、カバジタキセルによる化学療法の際のガレクチン - 3 のアポトーシスに及ぼす影響を *in vitro* で評価する。

(5) マウス前立腺癌転移モデルによる去勢抵抗性前立腺癌細胞へのホルモン療法、放射線療法、化学療法に対するガレクチン - 3 の影響と作用機序の解析：マウスの前立腺癌モデルを利用し、LNCaP 細胞とガレクチン - 3 強発現 LNCaP 細胞を使用し、抗アンドロゲン剤 (ピカルタミド、エンザルタミド) の効果の差を検討する。さらに腫瘍を摘出し、血管新生因子、アポトーシス関連因子を分子生物学的に解析すると共にマイクロアレイによる遺伝子プロファイルも検討する。

#### 4. 研究成果

(1) 前立腺癌細胞へのホルモン療法に対するガレクチン - 3 の影響と作用機序の解析：ホルモン感受性 LNCaP 細胞とガレクチン - 3 強発現 LNCaP 細胞 (LNCaP-Gal-3) を使用して、抗アンドロゲン剤であるピカルタミドやエンザルタミドの効果の差を検討した。その結果、LNCaP では有意に PSA の発現が抑制されたが、LNCaP-Gal-3 では PSA の発現抑制効果が制限され、抗アンドロゲン剤に抵抗性を示すことを見出した。また、LNCaP と LNCaP-Gal-3 の遺伝子発現の差をマイクロアレイアッセイで網羅的に解析したところ、LNCaP-Gal-3 細胞では、*KLK3* や *TMPRSS2* などのアンドロゲンレセプター (AR) 関連遺伝子の発現が有意に高く、抗アンドロゲン剤であるピカルタミドやエンザルタミド投与でこれらの遺伝子発現は十分に抑制されなかった。また、LNCaP-Gal-3 細胞ではジヒドロテス

トステロン (DHT) 投与で PSA 転写活性と PSA の発現が有意に促進され、抗アンドロゲン剤投与時の PSA 発現および転写活性抑制に抵抗性を示し、抗アンドロゲン剤耐性にガレクチン-3 が関与することを証明した。これらの成果は英文論文で報告した ( Anticancer Res. 2017 Jan;37(1):125-134 )。

(2) マウス前立腺癌モデルによるホルモン療法に対するガレクチン-3 の影響と作用機序の解析: ホルモン感受性 LNCaP 細胞とガレクチン-3 強発現細胞株 (LNCaP-Gal-3) をヌードマウスの皮下に移植し、腫瘍が定着後に去勢術を施行したところ、LNCaP 細胞では腫瘍は縮小したのに対して LNCaP-Gal-3 細胞では縮小することなく増大傾向を示した。これらの腫瘍を摘出しマイクロアレイで網羅的に解析したところ、LNCaP-Gal-3 細胞では VEGF 関連遺伝子、特に *VEGFB* の発現が有意に上昇し、ビカルタミドとエンザルタミド投与でこれらの遺伝子発現は十分に抑制されないことを見出した。さらに LNCaP-Gal-3 細胞では血管新生密度が有意に高いことも証明され、ガレクチン-3 が血管新生を調節することでホルモン抵抗性に関与することを証明した。

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 2 件)

Shintani T, Kusuhara Y, Daizumoto K, Dondoo TO, Yamamoto H, Mori H, Fukawa T, Nakatsuji H, Fukumori T, Takahashi M, Kanayama H. The Involvement of Hepatocyte Growth Factor-MET-Matrix Metalloproteinase 1 Signaling in Bladder Cancer Invasiveness and Proliferation. Effect of the MET Inhibitor, Cabozantinib (XL184), on Bladder Cancer Cells. *Urology*. 2017 Mar;101:169.e7-169.e13. (査読有)  
DOI: 10.1016/j.urology.2016.12.006.

Dondoo TO, Fukumori T, Daizumoto K, Fukawa T, Kohzaki M, Kowada M, Kusuhara Y, Mori H, Nakatsuji H, Takahashi M, Kanayama H.

Galectin-3 Is Implicated in Tumor Progression and Resistance to Anti-androgen Drug Through Regulation of Androgen Receptor Signaling in Prostate Cancer.

*Anticancer Res.* 2017 Jan;37(1):125-134. (査読有)  
DOI: 10.21873/anticancer.11297

[学会発表](計 8 件)

Tomoya Fukawa, Terumichi Shintani, Kei Daizumoto, Tomoharu Fukumori, Masayuki Takahashi, Hiro-omi Kanayama

The role of Toll-like receptor 4 in bladder cancer progression.

AUA 2017 年 5 月 16 日 The Boston Convention and Exhibition Center (Boston, MA)

Tomoharu Fukumori, Dondoo T-O, Daizumoto K, Fukawa T, Yamamoto Y, Yamaguchi K, Takahashi M, Kanayama H-O  
Galectin-3 is involved in the progression of castration-resistant prostate cancer through the regulation of tumor invasion, angiogenesis and androgen receptor signaling. EAU 2017 年 3 月 24 日 ExCel London (London)

大豆本圭、福森知治、ドンドオ ツオクトーオチル、小和田実、新谷晃理、布川朋也、中達弘能、高橋正幸、金山博臣  
Galectin-3 は前立腺癌細胞においてチロシンキナーゼ受容体および TGF- $\beta$  シグナルを介してアンドロゲン非依存性癌進展を調節する

日本癌学会学術総会 2016 年 10 月 6 日  
パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

Tomoharu Fukumori, Kei Daizumoto, Dondoo Tsogt-Ochir, Yasuyo Yamamoto, Kuniyoshi Yamaguchi, Masayuki Takahashi, Hiro-omi Kanayama

Galectin-3 is implicated in the progression of castration-resistant prostate cancer through the regulation of angiogenesis and androgen receptor signaling

AUA 2016 年 5 月 10 日 San Diego Convention Center (San Diego)

ドンドオ ツオクトーオチル、福森知治、大豆本圭、上月美穂、新谷晃理、布川朋也、中達弘能、高橋正幸、金山博臣  
Galectin-3 による前立腺癌進展機構の解明

泌尿器科分子・細胞研究会 2016 年 2 月 27 日 ハイアットリージェンシー大

阪&ATC コンベンションルーム（大阪府  
大阪市）  
ドンドォ ツォクトーオチル、大豆本主、  
福森知治、上月美穂、津田恵、楠原義人、  
森英恭、新谷晃理、香川純一郎、山本恭  
代、山口邦久、高橋正幸、金山博臣  
Galectin-3 の前立腺癌におけるホルモ  
ン治療抵抗性メカニズムの解明  
西日本泌尿器科学会総会 2015 年 11 月  
7 日 福岡国際会議場（福岡県福岡市）  
ドンドォ ツォクトーオチル、大豆本主、  
福森知治、布川朋也、中達弘能、高橋正  
幸、金山博臣  
ガレクチン 3 は前立腺癌細胞において  
VFGF-B の発現上昇を介して血管新生を  
活性化する  
日本癌学会学術総会 2015 年 10 月 10  
日 名古屋国際会議場（愛知県名古屋  
市）  
Tomoharu Fukumori, Tsogt-Ochir Dondoo,  
Kei Daizumoto, Tomoya Fukawa, Yasuyo  
Yamamoto, Kunihiisa Yamaguchi,  
Masayuki Takahashi, Hiro-omi Kanayama  
Galectin-3 is a therapeutic target for  
castration-resistant prostate cancer  
AUA 2015 年 5 月 17 日  
NewOrleansMorialConventionCenter  
（NewOrleans, LA）

〔図書〕（計 件）

〔産業財産権〕

出願状況（計 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福森 知治（FUKUMORI, Tomoharu）

徳島大学・病院・講師

研究者番号：10314874

(2) 研究分担者

金山 博臣（KANAYAMA, Hiro-omi）

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・教授

研究者番号：10214446

高橋 正幸（TAKAHASHI, Masayuki）

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・准教  
授

研究者番号：50325255

(3) 研究協力者

なし