

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：14202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19976

研究課題名(和文) 肺がん細胞とがん間質線維芽細胞の相互作用におけるGalectin-3の機能解析

研究課題名(英文) Comprehensive analysis of Galectin-3 involved in the interaction between lung cancer cells and cancer-associated fibroblasts.

研究代表者

片岡 瑛子 (Kataoka, Yoko)

滋賀医科大学・医学部・医員

研究者番号：00746919

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：糖鎖認識結合蛋白であるGalectin-3(Gal3)は、肺がん細胞で高発現し悪性度に関与しているが、がん間質線維芽細胞(CAF)における役割はよくわかっていない。腫瘍微小環境におけるGal3が肺がん細胞株とCAFに及ぼす影響や、肺腺がん組織におけるGal3の発現と病理学的因子および予後との関連性を解析し評価した。CAFより分泌されるGal3は肺がん細胞表面上のEGF受容体の発現の上昇を介して浸潤能の増強に関与している可能性が示された。肺腺がん組織のCAFにおけるGal3の発現は脈管浸潤および予後不良と関連性がみられた。CAFより分泌されるGal3は、間接的ながんの悪性度への関与が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Galectin-3 (Gal3) is a  $\beta$ -galactoside lectin, which is involved in tumor malignancy. However, in cancer-associated fibroblast (CAF), the role of Gal3 remains to be elucidated. We investigated the function of Gal3 involved in interaction between lung cancer cell and CAF. In patients with invasive pulmonary adenocarcinoma who underwent radical surgery, the expression of Gal3 on tumor cells and CAFs was examined by immunohistochemistry. As results, the expression of epidermal growth factor receptor (EGFR) on the surface of lung cancer cells was increased by Gal3 secreted from CAFs. A higher level of Gal3 expression on CAFs was significantly associated with microvessel invasion and tumor recurrence after surgery. These results indicated that Gal3 secreted from CAFs indirectly contributes to tumor recurrence via enhancement of EGFR signaling of tumor cells.

研究分野：医歯薬学

キーワード：肺がん がん間質線維芽細胞 Galectin-3

## 1. 研究開始当初の背景

がん組織は、がん細胞と多種のがん間質細胞から成る複合組織であり、がん細胞の悪性度は、がん間質細胞との相互関係により影響を受けている。最も主要ながん間質細胞であるがん間質線維芽細胞(Cancer-associated fibroblast, CAF) は、新たながん治療の標的として注目を集めている。

糖鎖認識蛋白である Galectin-3 (Gal3) は、がん細胞の増殖、生存、浸潤、転移に關与するだけでなく、正常線維芽細胞に対して  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA)の発現を誘導し、筋線維芽細胞に似た形態を有することが確かめられている。CAF は  $\alpha$ -SMA を発現し筋線維芽細胞に似た形態を有することから、この現象はがん細胞からの影響を受け前駆細胞が CAF へ分化、誘導される過程と酷似している。肺がん細胞において Gal3 が高発現していることから、肺がん細胞が分泌する Gal3 が CAF の前駆細胞からの分化、誘導に關与しているのではないかと考えるに至った。

## 2. 研究の目的

Gal3 は、肺がん細胞において悪性度との関連性が報告されているが、CAF における Gal3 の役割についてはまだ明らかになっていない。本研究は、肺がん組織において腫瘍細胞と CAF に共通して高発現している Gal3 に着目し、肺がん細胞と CAF との相互作用における Gal3 の機能を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1)肺がん細胞および CAF における Gal3 の発現と分泌量との関連性についての解析:

ヒト非小細胞肺がん株 6 種類と外科的切除された肺がん組織から樹立した CAF を用いて、Gal3 の発現を RT-PCR 法と Western blotting 法で、分泌量を ELISA 法で評価した。CAF の樹立に関しては、あらかじめ倫理委員会で承認を得たからに行っている。

(2)外因性の Gal3 がヒト肺がん細胞および CAF に与える影響における検討:

レコンビナントの Gal3 をヒト肺がん細胞株および CAF に添加し、それぞれの Gal3 と  $\alpha$ -SMA の発現を Western blotting 法で、上皮間葉転換マーカーである Snail, Slug, Vimentin の発現を RT-PCR 法で評価した。また、悪性度を調べるために、細胞増殖能を Proliferation assay で、浸潤能を Invasion assay で評価した。

(3)CAF が分泌している Gal3 がヒト肺がん細胞に及ぼす影響についての検討:

CAF の培養上清を用いてヒト肺がん細胞株を培養し、Gal3 の発現、増殖能、浸潤能を評価した。また、浸潤に關与する TGF- $\beta$  受容体や EGF 受容体の発現を調べた。

(4)ヒト肺がん細胞が分泌している Gal3 が CAF に及ぼす影響についての検討:

ヒト肺がん細胞株 (A549, LK-2) と Gal3 をノックダウンした安定細胞株を用いて、培養上清および共培養による CAF の Gal3 および  $\alpha$ -SMA の発現、増殖能、浸潤能をそれぞれ評価した。

(5)ヒト肺がん組織における Gal3 の発現と臨床的意義に関する解析:

倫理審査委員会で承認を得たのちに、根治術を施行したヒト肺腺がん組織標本を用いて、Gal3 の免疫組織学的染色を行った。腫瘍細胞および CAF における Gal3 の発現と両者の相関性、また臨床病理学的因子および予後との関連性を検討した。

## 4. 研究成果

(1) 肺がん細胞および CAF における Gal3 の発現と分泌量との関連性についての解析:

ヒト非小細胞肺がん株 6 種類 (A549, H1650, H1975, LK-2, QG56, EBC-1) と外科的切除された肺がん組織から樹立した CAF 3 種類における mRNA および蛋白レベルの Gal3 の発現と分泌量を評価した。CAF において Gal3 の発現は、肺がん細胞と同程度に高発現していたが、分泌量に関しては肺がん細胞 (0.1 ~ 4 ng/ml) と比較

してCAFで4~20倍多く、腫瘍微小環境においてCAFがGal3の主要な供給源である可能性が示唆された。

(2) 外因性のGal3がヒト肺がん細胞およびCAFに与える影響における検討:

レコンビナントのGal3を添加してもヒト肺がん細胞およびCAFいずれもGal3、 $\alpha$ -SMA、上皮間葉転換マーカー(Snail, Slug, Vimentin)の発現に変化はみられなかった。増殖能および浸潤能に関してもGal3添加により有意な変化は認めなかった。以上の結果より、外因性のGal3が直接的には肺がん細胞およびCAFの機能に影響を及ぼさないことがわかった。

(3) CAFが分泌しているGal3がヒト肺がん細胞に及ぼす影響についての検討:

Gal3を高濃度に分泌しているCAFの培養上清を用いてA549を培養すると、増殖能に変化はみられなかったが、浸潤能は有意に増強した。また、Gal3阻害物質を添加すると浸潤能は有意に抑制された。さらに、A549にレコンビナントのGal3を添加し、浸潤に関与するTGF- $\beta$ 受容体やEGF受容体の発現を調べると、細胞表面上のTGF- $\beta$ 受容体は変化がみられなかったが、EGF受容体は有意な発現上昇を認めた。さらにEGF刺激を行うことで、EGFRシグナルの有意な増強を認めた。このことから、CAFが分泌するGal3が肺がん細胞表面上のEGF受容体の発現を上昇し、浸潤能の増強に関与している可能性が考えられた。

(4) ヒト肺がん細胞が分泌しているGal3がCAFに及ぼす影響についての検討:

ヒト肺がん細胞株(A549, LK-2)の培養上清および共培養により増殖能に関しては変化がみられなかったが、CAFのGal3や $\alpha$ -SMAの発現の上昇および浸潤能の増強が認められた。しかしながら、Gal3の発現をノックダウンすることで、Gal3や $\alpha$ -SMAの発現および浸潤能に関して抑制効果はみられなかった。これらの結果より、肺がん細胞からの分泌されるGal3自体がCAFの悪性度に直接的に関与しているのではないこ

とが明らかになった。

(5) ヒト肺がん組織におけるGal3の発現と臨床的意義に関する解析:

上記のin vitroでの結果を受け、ヒト肺がん組織においてGal3の発現がどのような臨床学的意義を持つのか検討するために、根治術を施行した病理病期I期浸潤性肺腺がん57症例を対象にGal3の免疫組織学的染色を行い、腫瘍細胞およびCAFにおける発現を評価した。腫瘍細胞およびCAFともにGal3高発現群において、術後再発率は有意に高く、無再発生存率に関しても有意な低下を認めた。Gal3の発現における腫瘍細胞とCAFとに相関性はみられなかった。腫瘍細胞におけるGal3の発現は脈管浸潤と有意な関連性を認めた。これらの結果より、Gal3は術後再発予測因子として有用であり、Gal3は腫瘍細胞の脈管浸潤と関連し、術後再発に寄与している可能性が示唆された。

(6) 結果のまとめと今後の展望について:

肺がん細胞から分泌されているGal3がCAFの悪性度に影響を与えていると当初考えていたが、肺がん細胞よりもCAFにおいてGal3の分泌量が圧倒的に多く、肺がん細胞から分泌しているGal3をノックダウンにより抑制してもCAFの機能には影響を及ぼさなかった。外因性のGal3が直接的に肺がん細胞の悪性度に影響は及ぼさなかったが、肺がん細胞表面上のEGF受容体の増加を認め、EGFの刺激に伴いEGFRシグナルの増強がみられた。実際にGal3の高濃度に分泌しているCAFにより肺がん細胞の浸潤能の有意な増強を認めた。ヒト肺腺がん組織においても、腫瘍細胞とCAFにおけるGal3の発現は、術後再発および脈管浸潤との有意な関連性を示した。

以上より、腫瘍微小環境においてCAFからの分泌されるGal3が肺がん細胞の浸潤能の増強に関与し術後再発に寄与している可能性が示唆された。

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 0 件)

[学会発表] (計 6 件)

片岡瑛子、他、浸潤性肺腺がんにおけるがん間質線維芽細胞の役割、第 69 回日本胸部外科学会定期学術集会、平成 28 年 9 月 28 日 - 10 月 1 日、岡山

片岡瑛子、他、ヒト肺腺がんにおける galectin-3 の役割、第 75 回日本癌学会学術総会、平成 28 年 10 月 6 - 8 日、横浜

片岡瑛子、他、肺腺がんの腫瘍間質内における Galectin-3 の発現意義、第 117 回日本外科学会定期学術集会、平成 29 年 4 月 27 - 29 日、横浜

片岡瑛子、他、低酸素環境において肺がんの浸潤能は galectin-3 の発現上昇を介して亢進する、第 76 回日本癌学会学術総会 平成 29 年 9 月 28 - 30 日、横浜

Kataoka Y, et al, Tissue and Serum Levels of Galectin-3 in NSCLC Patients, 18<sup>th</sup> World Conference on Lung Cancer, 平成 29 年 10 月 15 - 18 日、横浜

Kataoka Y, et al, BIOLOGICAL AND CLINICOPATHOLOGICAL SIGNIFICANCE OF GALECTIN-3 EXPRESSION IN HUMAN LUNG ADENOCARCINOMA., 22<sup>nd</sup> Asian Pacific Society of Respiriology, 平成 29 年 11 月 23 - 26 日、シドニー

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 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 0 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

片岡瑛子 (Kataoka, Yoko)  
滋賀医科大学・医学部・医員  
研究者番号: 00746919

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号:

### (4) 研究協力者

( )