

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K16342

研究課題名(和文)肝細胞癌、膵癌に対する新規Galectin-3阻害薬を用いた治療戦略

研究課題名(英文)The treatment strategy using a new Galectin-3 inhibitor for hepatocellular carcinoma and pancreatic cancer

研究代表者

五十嵐 隆通(Igarashi, Takamichi)

富山大学・学術研究部医学系・助教

研究者番号：20648472

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：新規Gal-3阻害薬(tw544)は、複数の肝細胞癌・膵癌細胞株の増殖能・浸潤能を容量依存性に有意に抑制し、正常肝細胞への毒性はなかった。In vitroで肝細胞癌・膵癌細胞株の増殖能を検証し、優れた薬効を確認した。In vivoではGalectin-3阻害薬の腹腔内連日投与により膵癌マウス皮下腫瘍の増大が抑制され、かつ良好な忍容性であった。またCAGE解析で、Galectin-3阻害剤は核内で作用しDNA複製や細胞周期に關与する要素を抑制することが示された。加えてIPMCおよび転移性肝癌症例において患者腫瘍組織移植Patient-derived xenograftモデルの樹立に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果により肝胆膵癌のみならず、他の消化器癌に対しても新規Gal-3阻害薬を用いた治療戦略の可能性に迫ることができる。また、動物実験で有効な結果が得られれば、ヒトへの応用(臨床試験や創薬)に繋がる可能性がある。加えて、他の消化器癌バイオマーカーとの関連を探索・検証することにより、消化器癌における外科学、分子細胞生物学および薬理学を繋ぐ新たな概念が生まれる。

研究成果の概要(英文)：A novel Galectin-3 inhibitor significantly suppressed the proliferative and invasive potential of hepatocellular carcinoma and pancreatic cancer cell lines in a volume-dependent manner without toxicity to normal hepatocytes. In vivo studies, intraperitoneal daily administration of Galectin-3 inhibitor suppressed the growth of subcutaneous tumors in mice with pancreatic cancer and was well tolerated. CAGE analysis showed that Galectin-3 inhibitors act in the nucleus and inhibit elements involved in DNA replication and the cell cycle. In addition, a patient-derived xenograft model of tumor tissue transplantation was successfully established in patients with intraductal papillary mucinous carcinoma and metastatic liver carcinoma.

研究分野：肝胆膵外科

キーワード：Galectin-3阻害薬 肝細胞癌 膵癌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肝胆膵癌の主たる治療手段は手術であり、手術手技や周術期管理の向上および他治療との併用による集学的治療の進歩により、その成績は改善してきた。しかしながらその限界も見えつつあり、多くの癌腫の中でも難治性固形癌の代表で、新規治療法の開発が急務である。

図1 Gal-3の細胞内における局在

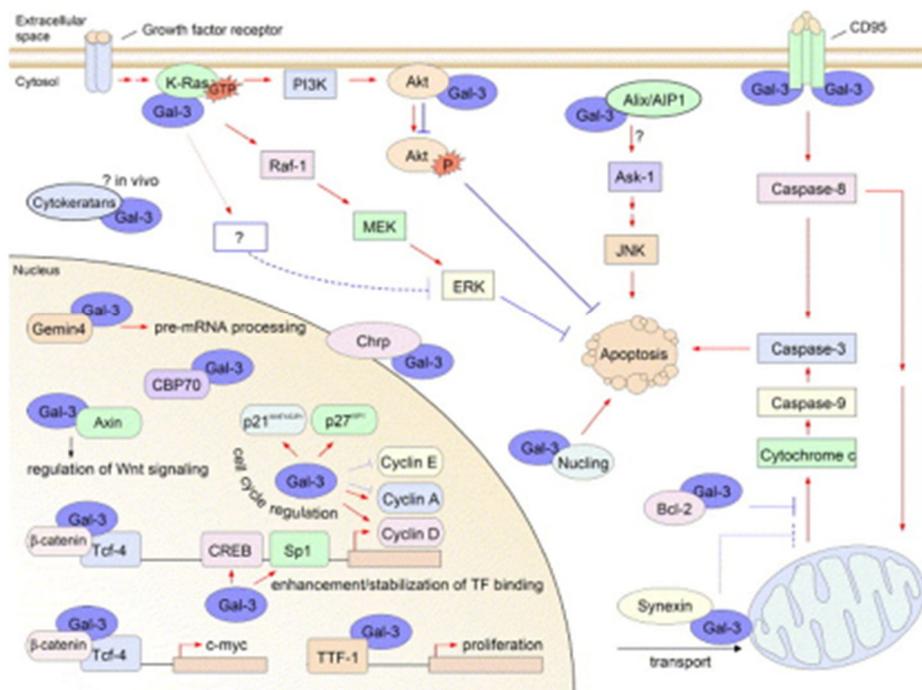


図2 肝細胞癌、膵癌におけるGal-3発現

肝細胞癌

膵癌 (X200)

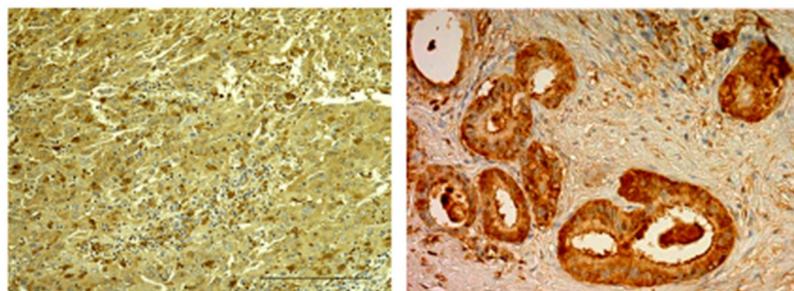
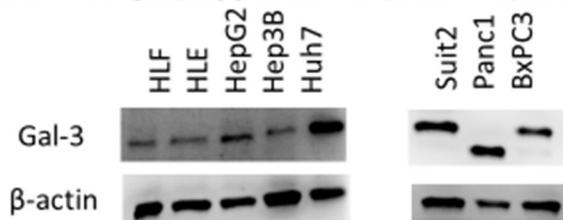


図3 ヒト細胞株におけるGal-3発現



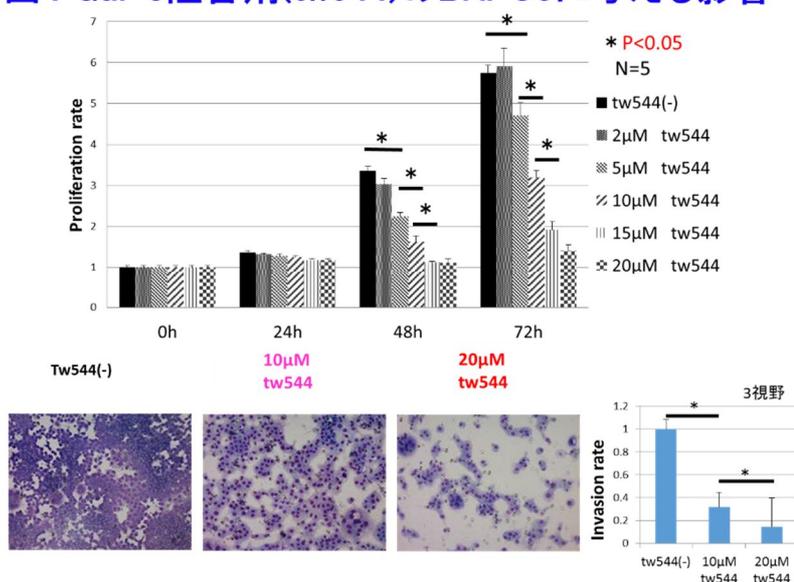
先生より入手し、その膵癌および肝細胞癌に対する有効性を、ヒト細胞株を用いて検討した。まず膵癌・肝細胞癌臨床検体を用いてGal-3の発現について免疫組織化学染色で評価を行ったところ、両者とも腫瘍細胞で高発現していた(図2)。またヒト細胞癌におけるGal-3の蛋白発現をWestern blottingで検討した所、全ての細胞株において発現していることが確認された(図3)。

Gal-3はレクチンファミリーに属する糖結合タンパク質で、種々の細胞内シグナル伝達に関与し、癌の浸潤・転移に重要な働きを示す(図1; Biochim Biophys Acta.2006, Apr ;1760(4):616-35)。Gal-3は多くの癌細胞で強発現が認められ、癌の浸潤・転移に重要なkey proteinであることが示唆されている。今回我々は新規開発された安定的なGal-3阻害薬を北海道大学創薬科学研究教育センターの市川聡

2. 研究の目的

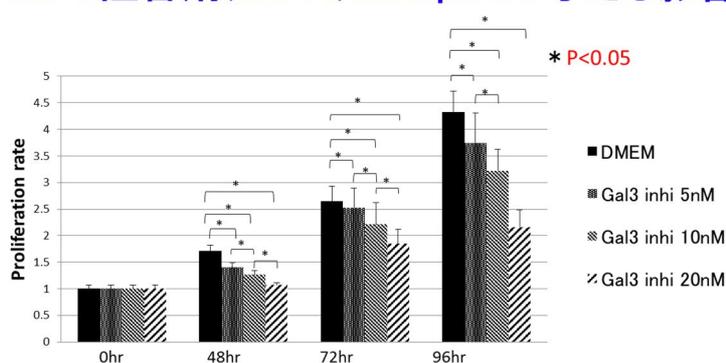
これまで細胞外の Gal-3 阻害薬は開発されてきたが、癌に対する薬効は示されず、薬剤化には至らなかった。我々は代謝的に安定で、十分な薬剤活性と膜透過性を有する新規 Gal-3 阻害薬を入手した。既報告の Gal-3 阻害薬は細胞外で work するもののみであり、今回癌で薬剤活性が得られるよう細胞内外で work する阻害薬を開発した。細胞内外で work するためには、細胞膜を通過する機能（疎水性）が必要だが、Gal-3 の構造は疎水基と親水基を持つため、Gal-3 阻害薬は疎水基・親水基の両方を併せ持つ必要があった。従って、あらゆる有機合成の技術を用いてより良好な親和性が得られるよう置換基を増やす試みを行った。まず新規化合物の側鎖に、親水基であるアミノ基、疎水基である芳香環を付け Gal-3 に親和性の高い化合物を合成した。その後 X 線構造解析を使って、実際に化合物と Gal-3 がうまく fit するかを評価した。X 線構造解析結果から、さらに親和性が高くなるようメチル基を追加し、最終的に Gal-3 に対し従来の阻害薬の約 5000 倍の親和性を持つ競合阻害剤を開発した。

図4 Gal-3阻害剤(tw544)のBXP3に与える影響



ヒト肝細胞癌細胞株のうち HepG2 を、膵癌細胞株のうち BXP3 を用いて同薬剤の効果を検討した。その結果、新規 Gal-3 阻害薬 (tw544) は、HepG2 の増殖能および BxPC3 の増殖能・浸潤能を容量依存性にいずれも有意に抑制した(図 4,5)。特に溶解可能な最大の濃度 20nM では著明に癌細胞の増殖を抑制した。以上を基に、「肝細胞癌、膵癌に対する新規 Galectin-3 阻害薬を用いた治療戦略の確立」を目的に研究を計画した。

図5 Gal-3阻害剤(tw544)のHepG2に与える影響



3. 研究の方法

以下の 4 課題を遂行した。

- (1) In vitro における 肝細胞癌および膵癌に対する Gal-3 阻害薬の有効性の検証
- (2) In vivo マウス皮下腫瘍モデルにおける検証
- (3) Galectin-3 阻害薬の細胞内における作用機序の解明
- (4) 肝癌・膵癌における患者腫瘍組織移植 Patient-derived xenograft モデルの樹立

4. 研究成果

新規 Gal-3 阻害薬 (tw544) は、Huh7・Panc1・Sui t2 の増殖能を、Huh7・Panc1・Sui t2・BxPC3・ASPC1 の浸潤能を容量依存性にいずれも有意に抑制した。

新規 Gal-3 阻害薬は、ヒト正常肝細胞 (PXB-Cell) への毒性を認めなかった。

複数の肝胆膵癌細

表1 7種類のGal-3阻害薬の効果

胞株を用いた検討で、有望な Gal-3 阻害薬として7種類中3種類を同定した(表1, Drug1・5・6)。研究協力機関である北海道大学薬学部と協議し、Drug1 (tw544) を大量精製し検討に用いた。

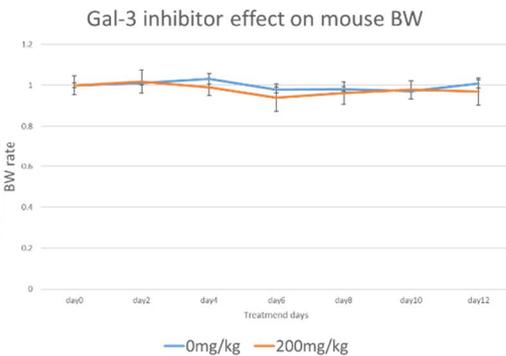
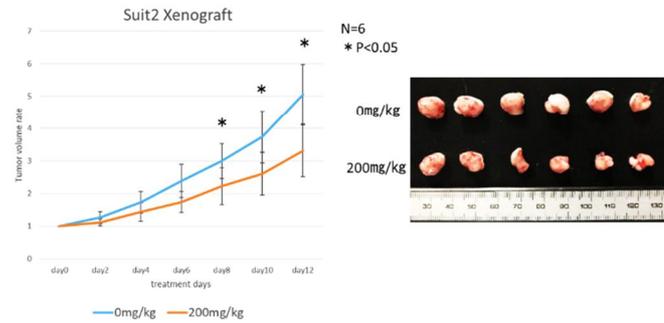
No	Galectin3 阻害剤	膵癌増殖の抑制	膵癌浸潤の抑制	肝癌増殖の抑制	肝癌浸潤の抑制	胆管癌の増殖	胆管癌の浸潤	正常細胞への毒性
1	tw544	○	○	○	○	○	△	(-)
2	tw224	△	/	×	/	/	/	/
3	tw659	×	/	×	/	/	/	/
4	tw749	△	×	△	○	/	/	/
5	tw755	○	○	○	○	○	△	(-)
6	tw462	○	○	○	○	○	○	(-)
7	tw457	×	/	×	/	/	/	/

In vivo において Galectin-3 阻害薬の 200ng/day 腹腔内連日投与により膵癌マウス皮下腫瘍の増大が抑制され(図6)、且つマウスの体重には影響は及ばず、良好な忍容性を確認した(図7)。

図6: 膵癌マウス皮下腫瘍に対するGal-3阻害剤の影響

図7: Gal-3阻害剤のマウスの体重への影響

※Gal-3 inhibitor : intraperitoneal (I.P.) injection every day



また、ヒト膵癌細胞株 Sui t2 を用いた CAGE 解析(表2)により、DNA 複製や cell cycle に関与するオントロジーが抑制されていることが明らかとなり、Galectin-3 阻害剤は核内で作用し DNA 複製や細胞周期に関与する要素が抑制されていることが明らかとなった。

表2: CAGE analysis of Gal-3 inhibitor effect on Sui t2

Gal-3阻害剤により抑制されたオントロジーリスト

ID	Description	GeneRatio	BgRatio	pvalue	p.adjust	qvalue
GO:0071103	DNA conformation change	15/50	214/9954	6.87E-14	6.24E-11	5.74E-11
GO:0006260	DNA replication	15/50	260/9954	1.20E-12	5.43E-10	4.99E-10
GO:0065004	protein-DNA complex assembly	11/50	183/9954	1.20E-09	2.53E-07	2.33E-07
GO:0031497	chromatin assembly	9/50	107/9954	2.37E-09	3.07E-07	2.83E-07
GO:0071824	protein-DNA complex subunit organization	11/50	207/9954	4.43E-09	4.47E-07	4.11E-07
GO:0044772	mitotic cell cycle phase transition	13/50	475/9954	3.96E-07	1.89E-05	1.74E-05
GO:0090656	t-circle formation	3/50	13/9954	3.29E-05	0.001107217	0.001019
GO:0090737	telomere maintenance via telomere trimming	3/50	13/9954	3.29E-05	0.001107217	0.001019
GO:0031570	DNA integrity checkpoint	6/50	159/9954	0.0001344	0.004066596	0.003743
GO:0000083	regulation of transcription involved in G1/S transition of mitotic cell cycle	3/50	25/9954	0.0002538	0.006982262	0.006427
GO:0000079	regulation of cyclin-dependent protein serine/threonine kinase activity	4/50	69/9954	0.000383	0.009935999	0.009146
GO:0009314	response to radiation	7/50	305/9954	0.0007625	0.018219902	0.016771
GO:0031572	G2 DNA damage checkpoint	3/50	37/9954	0.0008217	0.019130505	0.017609
GO:0072331	signal transduction by p53 class mediator	6/50	235/9954	0.0010825	0.023972973	0.022066
GO:0051782	negative regulation of cell division	2/50	12/9954	0.0015805	0.032615598	0.030022
GO:0097329	response to antimetabolite	2/50	12/9954	0.0015805	0.032615598	0.030022
GO:0010948	negative regulation of cell cycle process	6/50	290/9954	0.003141	0.059416404	0.054691
GO:0007095	mitotic G2 DNA damage checkpoint	2/50	22/9954	0.0053572	0.091780501	0.084481

膵管内乳頭粘液性腺癌 (IPMC) および転移性肝癌症例において、患者腫瘍組織移植 Patient-derived xenograft モデルの樹立に成功した。

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
研究協力者	山中 崇弘 (Yamanaka Takahiro)		
研究協力者	萩原 慶 (Hagiwara Kei)		
研究協力者	星野 弘毅 (Hoshino Kouki)		
研究協力者	村主 遼 (Muranushi Ryo)		

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