

令和 2 年 5 月 28 日現在

機関番号：14202

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16415

研究課題名（和文）低酸素環境における肺がん浸潤のメカニズムの解明

研究課題名（英文）The mechanism by which hypoxia promotes tumor progression in lung cancer

研究代表者

片岡 瑛子（Kataoka, Yoko）

滋賀医科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：00746919

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、低酸素環境における肺がんの浸潤の機序を解明するために、低酸素応答により誘導されるGalectin-3の発現に焦点をおき、肺がん浸潤のメカニズムとその臨床的意義に関して解析を行った。結果、低酸素応答により肺がん細胞でGalectin-3の発現は増強し、RhoAの活性化を介して、遊走能・浸潤能の促進に関与していることを明らかにした。肺がん手術症例において、腫瘍細胞におけるGalectin-3の発現は、脈管浸潤と関連し、独立した予後因子であった。以上より、肺がん細胞において低酸素応答で誘導されるGalectin-3は、浸潤・転移に関与し、術後再発に寄与している可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

非小細胞肺がんにおいて、低酸素応答により腫瘍細胞のGalectin-3の発現が増強することを見出した。低酸素により誘導されたGalectin-3は、RhoAを活性化し、腫瘍細胞の遊走に関わっていることから、肺がんの浸潤において重要な役割を果たしていると考えられた。臨床的意義としては、非小細胞肺がん組織において、低酸素領域の腫瘍細胞で、Galectin-3の発現がみられ、独立した術後再発予測因子であることが明らかとなった。以上より、非小細胞肺がん細胞におけるGalectin-3の発現は、浸潤・転移の誘導に関与し、手術後の再発を予測する有用なバイオマーカーとなる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：In this study, to clarify the mechanism by lung cancer invasion in hypoxic condition, we focused on galectin-3 in hypoxia in non-small cell lung cancer (NSCLC). We examined the function and prognostic significance of hypoxia-inducible galectin-3 in NSCLC. We revealed that hypoxia-inducible galectin-3 enhances tumor cell motility via RhoA activation in NSCLC. Galectin-3 expression in tumor cells is significantly correlated with recurrence after surgery and an independent predictive marker in NSCLC. These findings suggest that hypoxia-inducible galectin-3 could contribute to tumor progression and serve as a prognostic factor for tumor recurrence in NSCLC.

研究分野：肺がん

キーワード：低酸素 肺がん Galectin-3

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

低酸素はがんの浸潤・転移や治療抵抗性と関連しており、がんの低酸素応答は新たな治療戦略として注目されている。低酸素で誘導される Hypoxia-inducible factor (HIF) (Semenza GL. Nat Rev Cancer 2003) は、さまざまな遺伝子の発現を調整する転写因子であり、低酸素応答の標的として研究されているが、まだ治療薬の開発には至っていない。その理由の一つとして、HIF 以外のがんの低酸素応答の経路が報告されていることが挙げられる。そこで、HIF 以外の観点から低酸素応答による浸潤のメカニズムを明らかにすることは、新しい概念に基づく、新規抗がん剤治療法の開発に必要である。

私たちは、MUC-1 を標的としたがん免疫治療を高度先進医療で行ってきた。MUC-1 の他、肺がん細胞株における MUC-4 の発現の解析を行っていたところ、分泌糖蛋白である Mac-2 binding protein (M2BP) を同定した。M2BP は、ヒト肺がん組織に高発現し、肺がんにおける腫瘍マーカーとして有用であることを見出した (Ozaki Y. Cancer 2002)。この背景をもとに、私たちは、M2BP に特異的に結合する糖鎖認識蛋白である Galectin-3 に着目するに至った。

Galectin-3 は、がん細胞の増殖、生存、浸潤、転移に関与することが報告されており、その機能は多岐にわたる (Califice S. Oncogene 2004)。私たちも、これまでに、非小細胞肺がん症例において、Galectin-3 の発現が脈管浸潤に関連し、術後再発予測因子として有用であることを報告してきた。さらに、非小細胞肺がん患者の組織において、壊死および瘢痕周囲のがん細胞に Galectin-3 が発現していることに着目した。最近、ヒト乳がん細胞株において、低酸素刺激により Galectin-3 の発現が誘導されることが報告されており (de Oliveira JT. PLoS One 2015)、肺がん細胞においても低酸素環境下で発現が誘導され、浸潤・転移に関与しているのではないかと考えるに至った。実際に、肺腺がん細胞株を低酸素環境下で培養すると、1) Galectin-3 の発現が誘導され、腫瘍細胞の移動の増強に関与していること、2) 細胞運動に重要な役割を担う蛋白である RhoA の活性化と関連していることを見出した。

また、Galectin-3 は、RhoA と同じ低分子量 G 蛋白である K-Ras に結合し、細胞膜に K-Ras を固定させることで活性化型 K-Ras である K-Ras GTP の発現が促進され、がん細胞の悪性化に関与していることが確かめられている (Song S. PLoS One 2015)。さらに、Galectin-3 と K-Ras が結合する部位のアミノ酸配列および立体構造は、RhoA と相同性を持つことが報告されている (Shalom-Feuerstein R. Cancer Res 2008)。

上記の背景をもとに、私たちは、肺がん細胞において、低酸素環境により発現が誘導される Galectin-3 が RhoA と結合し、細胞膜に RhoA が固定されることにより、RhoA の活性化が促進され、浸潤・転移を引き起こすのではないかと仮説を立てた。本研究で、肺がんの低酸素応答に対して Galectin-3 と RhoA の相互作用が明らかにされれば、肺がんの浸潤・転移の機序の解明に大きな前進をもたらすだけでなく、Galectin-3 を標的とした新たな低酸素応答に対する治療戦略をもたらすと考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、低酸素環境下において、肺がん細胞で発現が増強する Galectin-3 を介して RhoA が活性化される機序を解明することで、ヒト肺がんの低酸素応答における浸潤メカニズムを明らかにし、Galectin-3 を標的とした新たな治療法の開発への足掛かりとなるかを確かめることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 低酸素環境下で、肺がん細胞における Galectin-3 の機能に関する研究

ヒト非小細胞肺癌において、低酸素刺激によりGalectin-3の発現が誘導されるかを調べる。

低酸素刺激により誘導されるGalectin-3がヒト非小細胞肺癌の悪性度に及ぼす影響を調べる。

低酸素環境下で、RhoAの活性化とGalectin-3の相互作用について明らかにする。

(2) 低酸素領域における非小細胞肺癌細胞の特性と臨床的意義に関する研究

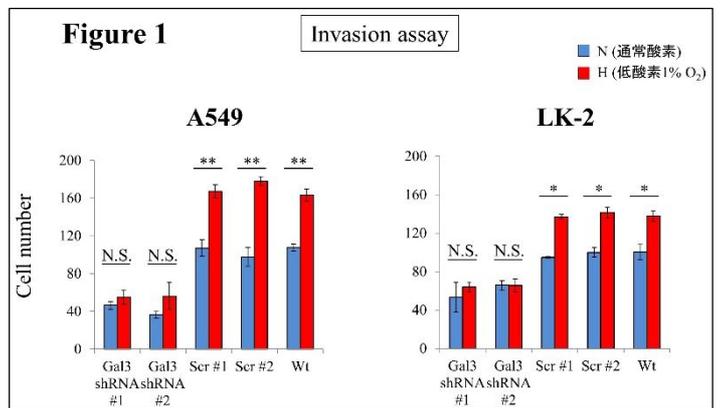
ヒト非小細胞肺癌組織を用いて、低酸素領域における腫瘍細胞のGalectin-3の発現と臨床病理学的因子および予後との関連性について調査する。

4. 研究成果

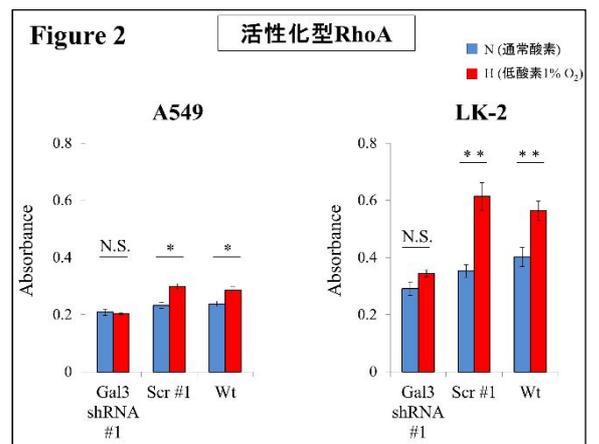
(1) 低酸素環境下で、肺癌細胞におけるGalectin-3の機能に関する研究

2種類のヒト非小細胞肺癌細胞株 (A549, LK-2) を用いて低酸素培養を行うと、mRNA・蛋白レベルでGalectin-3の発現の有意な増加を認めた。

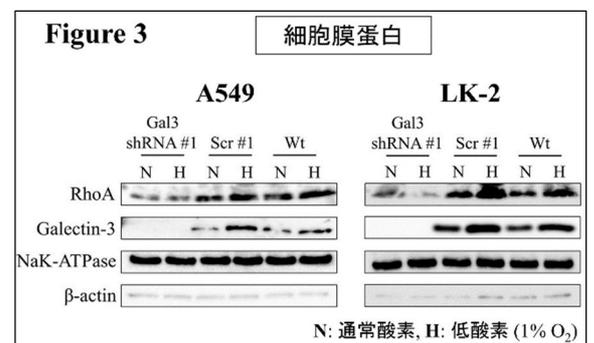
低酸素刺激により誘導されるGalectin-3がヒト非小細胞肺癌に及ぼす影響を明らかにするために、Galectin-3を発現している非小細胞肺癌細胞株と、shRNAによりGalectin-3をノックダウンした安定細胞株を、それぞれ低酸素培養を行い、増殖能、遊走能、浸潤能を評価した。その結果、低酸素環境下で、肺癌細胞の遊走能・浸潤能は有意な増強がみられるのに対して、Galectin-3の発現を抑制すると、遊走能・浸潤能の有意な抑制を認めた (Figure 1)。一方で、増殖能に関しては低酸素培養およびGalectin-3の発現抑制により変化がみられなかった。これらにより、低酸素で誘導されるGalectin-3は、非小細胞肺癌細胞の遊走および浸潤の促進に重要な役割を担っていると考えられた。



Galectin-3がどのような機序で遊走および浸潤に関与しているかを調べるために、細胞運動の促進に関与している低分子量G蛋白であるRhoAに着目した。低酸素培養により、非小細胞肺癌細胞のRhoAの活性化が促進されるのに対して、Galectin-3の発現をノックダウンするとRhoAの活性化が有意に抑制された (Figure 2)。さらに細胞内のRhoAの分布をみると、低酸素により細胞膜のRhoAの発現が増強し、Galectin-3の発現を抑制することで細胞膜のRhoAの発現が有意に減少することから、Galectin-3はRhoAの細胞膜への移動または固定に関与している可能性が示唆された (Figure 3)。共免疫沈降法を用いて、Galectin-3とRhoAの相互作用を評価したが、直接的な作用は認めなかった。これらの結果より、Galectin-3はRhoAの活性化に間接的に作用している可能性が考えられた。



(2) 低酸素領域における非小細胞肺癌細胞の特性と臨床的意義に関する研究



N: 通常酸素, H: 低酸素 (1% O₂)

非小細胞肺癌手術症例において、肺癌組織に対して Galectin-3 の免疫組織化学染色を行い、Galectin-3 を発現する腫瘍細胞と、臨床病理学的因子および予後との関連性に関して調査した。その結果、腫瘍細胞における Galectin-3 の発現は、脈管浸潤と有意な関連性を認めた。また、Galectin-3 を高発現した腫瘍細胞の群において、低発現の群と比較して、有意に術後無再発生存率が低く、独立した予後因子であった。以上より、腫瘍細胞における Galectin-3 の発現は、腫瘍の浸潤に関連し、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

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kataoka Y, Ohshio Y, Teramoto K, Igarashi T, Asai T, Hanaoka J.	4. 巻 41
2. 論文標題 Hypoxia-induced galectin-3 enhances RhoA function to activate the motility of tumor cells in non-small cell lung cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Oncology Reports	6. 最初と最後の頁 853-862
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/or.2018.6915	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kataoka Y, Igarashi T, Ohshio Y, Fujita T, Hanaoka J.	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Predictive importance of galectin-3 for recurrence of non-small cell lung cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 General Thoracic and Cardiovascular Surgery	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11748-019-01074-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 片岡 瑛子、大塩 恭彦、林 一喜、岡本 圭伍、賀来 良輔、五十嵐 知之、寺本 晃治、花岡 淳
2. 発表標題 1.肺がんの低酸素応答における浸潤のメカニズム
3. 学会等名 第35回日本呼吸器外科学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kataoka Y, Ohshio Y, Igarashi T, Teramoto K, Hanaoka J.
2. 発表標題 2.OVEREXPRESSION OF GALECTIN-3 IN CANCER-ASSOCIATED FIBROBLASTS SERVES AS A PROGNOSTIC FACTOR IN INVASIVE PULMONARY ADENOCARCINOMA
3. 学会等名 26th Meeting of the European Society of Thoracic Surgeons（国際学会）
4. 発表年 2018年

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----