

平成 21 年 4 月 10 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19591854

研究課題名 (和文) 泌尿器癌の集学的治療におけるガレクチン-3 の応用

研究課題名 (英文) Application of galectin-3 in combined therapy of urogenital cancer

研究代表者

福森 知治 ( FUKUMORI TOMOHARU )

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・講師

研究者番号：10314874

研究成果の概要：

ガレクチン-3 は腎細胞癌、膀胱癌の原発腫瘍のみならず腎細胞癌の転移巣でも強発現が認められ、腎細胞癌および膀胱癌患者では血清ガレクチン-3 の強発現が認められた。前立腺癌細胞株 (PC-3)、腎癌細胞株 (KPK-1) および膀胱癌細胞株 (J82) においてガレクチン-3 の発現を約 5 分の 1 以下にノックアウトした細胞株を作成し、腎細胞癌、膀胱癌に対する放射線療法、シスプラチンによる化学療法とガレクチン-3 の発現抑制による治療効果、アポトーシスへの影響を検討したところ、ガレクチン-3 の発現を制御した腎細胞癌細胞株および膀胱癌細胞株では、細胞の増殖能が 12% および 14% 低下し、放射線治療の感受性がそれぞれ 18%、26% 増加し、シスプラチンによる化学療法の感受性が 15%、35% 増加した。特に、ガレクチン-3 ノックアウト細胞では、シスプラチン治療中に細胞質中の cytochrome c の発現が増加し caspase-3 が活性化されアポトーシスが誘導された。さらに、ガレクチン-3 のブロッキング抗体を作成し今後の臨床的意義を検討する予定である。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・腫瘍学

キーワード：泌尿器科癌・ガレクチン-3・集学的治療・転移・アポトーシス

## 1. 研究開始当初の背景

転移を有する腎細胞癌、膀胱癌、ホルモン耐性の前立腺癌に対しては、完治を得る治療法はいまだ確立されておらず、泌尿器科医がブレイクスルーすべき重要な問題の 1 つである。その

大きな理由として、腫瘍細胞が抗がん剤、免疫療法、放射線療法への抵抗性を獲得することが挙げられる。われわれは癌の浸潤・転移に重要なキータンパクの 1 つであり、腫瘍細胞に血管

新生を誘導し、アポトーシスを制御するガラクトース結合レクチンの1つであるガレクチン-3が前立腺癌等のさまざまな癌細胞に強発現し、抗がん剤耐性に関与していることに注目し (Fukumori T et. al. Cancer Research 66: 3114-3119, 2006)、腎細胞癌転に対する免疫療法、放射線療法、および前立腺癌、膀胱癌に対する化学療法、放射線療法へのガレクチン-3の影響をマウスモデルで検討する。さらにガレクチン-3の発現を制御するブロッキング抗体を構築し、転移巣をターゲットにした遺伝子治療への応用を最終目標とする。

## 2. 研究の目的

下記の項目を研究の目的とする。

- 1) ヒト臨床検体を利用し、泌尿器科癌 (腎細胞癌、膀胱癌、前立腺癌) 細胞株および組織検体の原発巣および転移巣におけるガレクチン-3の発現を real-time PCR 法で定量的に測定し、ガレクチン-3発現の臨床的意義を検討する。
- 2) siRNA を使用してガレクチン-3 をノックアウトし、血管新生およびアポトーシスへの影響を in vitro で検討する。さらに、放射線療法、免疫療法、抗がん剤による化学療法の効果に及ぼすガレクチン-3 影響と作用機序を検討する。
- 3) マウスの腎細胞癌および前立腺癌、膀胱癌の転移モデルを利用し、腎細胞癌での放射線療法、免疫療法、前立腺癌および膀胱癌での放射線療法、化学療法の効果に及ぼすガレクチン-3 の効果を in vivo で検討する。
- 4) われわれが既に作成しているガレクチン-3 のリコンビナントプロテインをマウスに免疫することでガレクチン-3 の発現を抑えるブロッキング抗体を抽出し、マウスの腎細胞癌および前立腺癌の転移モデルで効果を検討する。

## 3. 研究の方法

### 1) Real-time PCR 法を用いた泌尿器科癌原発巣、転移巣のガレクチン-3 発現の検討

われわれは、すでに腎細胞癌および膀胱癌でガレクチン-3 の発現が上がることを見出しているが、さまざまな臨床病期における原発巣での発現と転移巣の評価は十分できていない。われわれは real-time PCR を利用してヒト検体より、原発巣および転移巣でのガレクチンファミリーの発現を定量的に測定する。さらに、免疫組織学的検討もあわせて施行する。

### 2) ガレクチン-3 に対する siRNA の作成とノックアウト細胞株の樹立

近年、短い2本鎖 RNA (siRNA) の導入により特異的な遺伝子発現抑制が誘導可能になった。われわれはこの siRNA を使用してガレクチン-3 をノックアウトし、腎細胞癌、前立腺癌、膀胱癌でのガレクチン-3 の有無による血管新生、アポトーシスへの影響を評価する。平成 19 年度は、まずガレクチン-3 のノックアウト細胞株を腎細胞癌と前立腺癌で構築する。

### 3) ガレクチン-3 ノックアウト細胞株に対する放射線、免疫、化学療法の影響と作用機序の解析

siRNA を利用した泌尿器科癌のガレクチン-3 ノックアウト細胞株を使用し、放射線照射、インターフェロンによる免疫療法、シスプラチン、タキサン系抗がん剤による化学療法の際の、血管新生、アポトーシスへのガレクチン-3 の有無による影響を in vitro で評価し、カスパーゼ、ミトコンドリア膜、MAPキナーゼへの影響について解析する。

#### 4. 研究成果

ガレクチン-3は多くの癌細胞の細胞内で強発現が認められ、細胞の増殖、血管新生、アポトーシス調節等に関与し、癌の浸潤・転移に重要なキータンパクの1つであることが示唆されている (Fukumori T et. al. *Cancer Research* 66: 3114-3119, 2006)。われわれは以前、腎細胞癌においてガレクチン-3が有意に高発現していることを見いだしているが、今回3例の淡明型腎細胞癌の転移組織(肺転移2例、副腎転移1例)から、total RNAを抽出し、ガレクチン-3の発現をreal-time PCR法で検討した。転移巣では、原発巣と同程度以上にガレクチン-3が高発現しており、腎細胞癌の転移の治療としてガレクチン-3が重要なターゲット遺伝子になることが示唆された。さらに、ヒト膀胱癌でもガレクチン-3は正常膀胱粘膜と比較して有意に高発現していることを見だし、43例の膀胱患者群の血清ガレクチン-3の発現は24例のコントロール群のそれより有意に高いことも発見した(1068 vs 584 pg/ml,  $p=0.0005$ ) (*J Med Invest.* 55, 127-132, 2008)。以上の結果は、ガレクチン-3が治療のターゲット分子のみならず、診断分子としても有効であることを示唆している。

さらに、前立腺癌細胞株(PC-3)、腎癌細胞株(KPK-1)および膀胱癌細胞株(J82)においてガレクチン-3の発現を約5分の1以下にノックアウトした細胞株を作成し、これらの細胞を利用して腎細胞癌、膀胱癌に対する放射線療法、シスプラチンによる化学療法とガレクチン-3の発現抑制による治療効果、アポトーシスへの影響を検討した。その結果、ガレクチン-3の発現を制御した腎細胞癌細胞株および膀胱癌細胞株では、細胞の増殖能が12%および14%低下し、放射線治療の感受性がそれぞれ18%、26%増加し、シス

プラチンによる化学療法の感受性が15%、35%増加した。特に、ガレクチン-3ノックアウト細胞では、シスプラチン治療中に細胞質中のcytochrome cの発現が増加しcaspase-3が活性化されアポトーシスが誘導された。さらに、われわれが既に作成しているガレクチン-3のリコンビナント蛋白質をマウスに免疫することでガレクチン-3の発現を抑えるブロッキング抗体を抽出し、腎癌細胞株(KPK-1)および前立腺癌細胞株(PC-3)で培養上澄中のガレクチン-3の発現を約40%抑える抗体を得た。これらのガレクチン-3ブロッキング抗体は、転移巣をターゲットにした遺伝子治療に応用が可能で、臨床的意義は極めて高いと思われる。今後、さらに泌尿器科癌における臨床的意義を検討する予定である。

#### 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 16 件)

- ① Takashashi M, Kurokawa Y, Nakanishi R, Nakatsuji H, Izaki H, Oka N, Fukumori T, Kanayama H  
Laparoscopic findings of transverse testicular ectopia.  
*Urology*, 71・3, 547.e3-5, 2008  
(査読有)
- ② Nakatsuji H, Noriyuki Nishimura, Rie Yamamura, Hiro-omi Kanayama, Takuya Sasaki  
Involvement of actinin-4 in the recruitment of JRAB/MICAL-L2 to cell-cell junctions and the formation of functional tight junctions.  
*Mol Cell Biol*, 28・10, 3324-35, 2008  
(査読有)
- ③ Y amamura R, Noriyuki Nishimura, Hiroyoshi Nakatsuji, Seiji Arase, Takuya Sasaki  
The Interaction of JRAB/MICAL-L2 with Rab8 and Rab13 Coordinates the Assembly of Tight Junctions and Adherens Junctions.  
*Mol Biol Cell*, 19・3, 971-83, 2008

(査読有)

- ④ Kanda I, N Nishimura, H Nakatsuji, R Yamamura, H Nakanishi T Sasaki  
Involvement of Rab13 and JRAB/MICAL-L2 in epithelial cell scattering.  
Oncogene, 27 · 12, 1687-95, 2008  
(査読有)
- ⑤ Essam Elsamman, Ashraf A. Ewis, Nermin Ali, Mohamed D. Saleem, Mohamed Gadelmoula, Yoshinobu Baba, Hiro-omi Kanayama  
Molecular Analysis of Transitional Cell Carcinoma of Upper Urinary Tract Using cDNA Microarray.  
ARAB Journal of Urology, 6 · 1, 48-55, 2008  
(査読有)
- ⑥ Katto K, Masayuki Takahashi, Ryuichi Taue, Hiroyoshi Nakatsuji, Tomoteru Kishimoto, Hirofumi Izaki, Natsuo Oka, Tomoharu Fukumori, Masa-Aki Nishitani, Hiro-Omi Kanayama  
Strategy for repeat prostate biopsy: predictors of positive biopsy and additional biopsy location.  
Urol Int 81, 173-178, 2008  
(査読有)
- ⑦ Sakaki M, Oka N, Nakanishi R, Yamaguchi K, Fukumori T, Kanayama H  
Bladder Cancer Cell Invasion Is Enhanced by Cross-Talk with Fibroblasts Through Hepatocyte Growth Factor.  
The Journal of Medical Investigation, 55, 127-132, 2008 (査読有)
- ⑧ Tanimoto S, Fukumori T, Gad El-Moula, Shiiirevnyamba A, Kinouchi S, Koizumi T, Nakanishi R, Yamamoto Y, Taue R, Yamaguchi K, Nakatsuji H, Kishimoto T, Izaki H, Oka N. Takahashi M, Kanayama H  
Prognostic significance of serum hepatocyte growth factor in clear cell renal cell carcinoma: comparison with serum vascular endothelial growth factor.  
The Journal of Medical Investigation, 55, 106-111, 2008 (査読有)
- ⑨ Wang P, Nishitani M, Tanimoto S, Kishimoto T, Fukumori T, Takahashi M, Kanayama H  
Bladder Cancer Cell Invasion Is Enhanced by Cross-Talk with Fibroblasts Through Hepatocyte Growth Factor.  
UROLOGY, 69 · 4, 780-784, 2007  
(査読有)
- ⑩ Ashiraf A, El-Samman E, Ali N, Kajimoto K, Shinohara Y, Ishikawa M, Kanayama H, Baba Y  
Gene expression profile in squamous cell carcinoma of the urinary bladder using complementary deoxyribonucleic acid microarray.  
Urologic Oncology, 25, 120-127, 2007  
(査読有)
- ⑪ Marumo K, Kanayama H, Niyao N, Nakazawa H, Ozono S, Horie S, Nagamori S, Igarashi T, Hasegawa M, Kimura G, Nakao M, Nakamoto T, Naito S,  
Prevalence of renal cell carcinoma: A nation-wide survey in Japan, 2002.  
International Journal of Urology, 14, 479-482, 2007 (査読有)
- ⑫ Taue R, Izaki H, Nakanishi R, Yamaguchi K, Nakatsuji H, Kishimoto T, Oka N, Fukumori T, Takahashi M, Nishitani M, Kanayama H  
Massive Leiomyosarcoma of the spermatic cord.  
Acta Urol. Jpn, 53, 497-500, 2007  
(査読有)
- ⑬ Fukumori T, Kanayama H, Raz A  
The role of galectin-3 in cancer drug resistance.  
Drug Resistance Updates, 10, 101-108, 2007 (査読有)
- ⑭ Yang XJ, M Takahashi, K T Schafernak, M S Tretiakova, J Sugimura, N J Vogelzang, B T Teh  
Does `granular cell` renal cell carcinoma exist? Molecular and histological reclassification.  
Histopathology, 50 · 5, 678-680, 2007  
(査読有)
- ⑮ 福森知治、岡夏生、中西良一、楠原義人、山口邦久、田上隆一、中達弘能、岸本大輝、井崎博文、高橋正幸、西谷真明、金山博臣  
前立腺癌の抗がん剤耐性とアポトーシス調節機構  
西日本泌尿器科 69 巻 4 号、176-182、2007、  
(査読有)
- ⑯ 福森知治、金山博臣  
尿路性器癌における抗がん剤耐性機序(総説)  
西日本泌尿器科 69 巻 12 号、693-697、2007、  
(査読有)

[学会発表] (計 6 件)

- ① Nakatsuji H, Laparoscopic nephropexy for symptomatic nephroptosis. World Congress of Endourology & SWL, 2008. 12. 1, Shanghai
- ② Fukumori T, Galectin-3 is overexpressed in renal cell carcinoma and it regulates immune suppression through the induction of apoptosis of T cells. AUA Annual Meeting, 2008. 5. 18, Frolida
- ③ 岡 夏生, 膀胱癌細胞における uPA inhibitor による TRAIL 誘導アポトーシスの増強効果について  
日本泌尿器科学会総会, 2008. 4. 26  
パシフィコ横浜
- ④ 岡 夏生, Interaction between IGF-1, HGF and uPA/uPAR in migration and invasion of bladder cancer cells  
日本癌学会学術総会, 2007. 10. 4, パシフィコ横浜
- ⑤ Kanayama H, The expression of claudin-7 in transitional cell carcinoma of the urinary bladder : a quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis. SIU, 2007. 9. 2-6, Paris
- ⑥ Fukumori T, Galectin-3 overexpressed in renal cell carcinoma and it regulates immune suppression through the induction of apoptosis of cytotoxic T cells. SIU, 2007. 9. 2-6, Paris

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

福森 知治 (FUKUMORI TOMOHARU)  
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・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・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授  
研究者番号 : 10214446

高橋 正幸 (TAKAHASHI MASAYUKI)  
徳島大学・医学部・歯学部附属病院・講師  
研究者番号 : 50325255

中達 弘能 (NAKATSUJI HIROYOSHI)  
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教  
研究者番号 : 50437638

岡 夏生 (OKA NATSUO)  
徳島大学・医学部・歯学部附属病院・助教  
研究者番号 : 40335790