

令和 3 年 5 月 3 日現在

機関番号：16201

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16747

研究課題名(和文)食道扁平上皮癌におけるガレクチン9の抗腫瘍作用の解明と標的microRNAの同定

研究課題名(英文)Antitumor effect of galectin-9 in esophageal squamous cell carcinoma and identification of target microRNAs

研究代表者

千代 大翔 (Chiyo, Taiga)

香川大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50769346

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)：ガレクチン-9(Gal-9)は種々の癌にアポトーシスを誘導するが、その機序は明らかでない。今回食道扁平上皮癌への有効性と機序の検討を行った。Gal-9は、食道扁平上皮癌細胞株及び、異種移植マウスモデルにおいて腫瘍増殖を有意に抑制した。Gal-9によりAnnexin 陽性細胞の増加とcaspase-3の活性化を示した。またミトコンドリアの膜電位を消失させ、アポトーシスを誘導した。さらにGal-9はJNKとMAPKp38のリン酸化を誘導し、細胞質内ではcytochrome c, Smac/Diablo, HtrA2/omiの増加を認め、ミトコンドリアを介したアポトーシスを誘導することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ガレクチンは -ガラクトシドへ特異的に結合し、細胞間情報伝達因子として機能する。ガレクチン-9(Gal-9)はT細胞やマクロファージ、樹状細胞の活性化を介し腫瘍免疫を賦活化する。もともと生体内に存在する物質であり、過去の動物実験では毒性が無いことが示されており、抗腫瘍効果が示されれば今後新規の抗癌剤としての応用も期待される。今回の検討でGal-9は食道扁平上皮癌に対し、直接的作用としてミトコンドリアを介するアポトーシスを誘導することが示され、新規抗癌剤の候補となる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Galectin-9 (Gal-9) induces apoptosis in a variety of cancers, however, the mechanism of apoptosis is still unknown, thus this experiment was conducted. Gal-9 significantly inhibited tumor growth in esophageal squamous cell carcinoma cell lines and xenograft mouse models. Gal-9 induced phosphorylation of JNK and MAPKp38, and increased cytochrome c, Smac/Diablo, HtrA2/omi in cytoplasm, and loss of mitochondrial membrane potential, as well as an increase in Annexin V-positive cells and activation of caspase-3, suggesting that Gal-9 induces mitochondria-mediated apoptosis.

研究分野：消化器病学

キーワード：ガレクチン9 食道扁平上皮癌 アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

食道癌は比較的早い段階からリンパ節転移を伴う予後の悪い消化器癌の1つと考えられており、世界的に癌による死亡の第6位である。また食道扁平上皮癌は我が国においては食道癌の約95%を占める。近年、切除不能局所進行食道癌 T4N0-3M0(UICCTNM 第7版 2009年版)に対する標準治療として根治的放射線化学療法が普及してきた。しかし、T4M1 Lym 食道癌に対する標準的な5-FU/CDDP 併用化学放射線療法の治療成績は完全寛解率15%、生存期間中央値10カ月(Jpn J Clin Oncol,34:615-619,2004)と未だ十分な成績とは言えず、新たな抗癌化学療法の開発は急務である。

ガレクチンは α -ガラクトシドを特異的に認識して結合する蛋白で、細胞間情報伝達因子として機能している。Gal-9 は好酸球の遊走、細胞分化、凝集、接着、アポトーシスに関わる等、多くの生理活性を持つとされる(Glycoconj J,19(7-9):593-600,2002)。これまでの報告では Gal-9 は Tim-3 経路を介して Th1 や Th17 細胞のアポトーシスを誘導し(Nat Immunol,6(12):1245-52,2005)(Clin Immunol,127(1):78-88,2008)、4-1BB(CD137)を介して自己免疫反応の抑制や腫瘍免疫の活性化に寄与するとされる(J Exp Med,211(7):1433-48,2014)。実際に関節リウマチ動物モデル(Lab Invest,94(11):1200-11,2014)や喘息動物モデル(J Biol Chem,284(47):32344-52,2009)において病態を改善することが報告されており、今後自己免疫疾患の治療に応用される可能性がある。また Gal-9 が T 細胞やマクロファージ、樹状細胞の活性化を介して腫瘍免疫の亢進させることが報告されており(J Immunol,1;181(11):7660-9,2008)、種々の癌において Gal-9 の発現量とその予後が関連するとされ(Biochim Biophys Acta,1855:235-47,2015)、腫瘍免疫においてもその関与は大きいと考えられる。

近年では我々は肝細胞癌をはじめとする種々の癌に対し、Gal-9 の直接的な作用としてアポトーシスを誘導することを見出し報告している(Int J Oncol,46(6):2419-30,2015.)。またこの際、抗腫瘍効果に関連する microRNA(miRNA) のクラスター解析及び機能解析に成功し、Gal-9 が miRNA を介して抗腫瘍効果を発揮している可能性を初めて報告した。miRNA は、長さが 21~30 ヌクレオチドの小さな内在性の non-coding RNA で、転写後および翻訳レベルで様々な標的遺伝子の発現を調節している。しかし、これまで扁平上皮癌に対する Gal-9 の有効性や miRNA の関与については明らかにされていない。以上のように Gal-9 は腫瘍免疫を賦活化するとともに、腫瘍に直接的に働きかけ抗腫瘍効果を発揮する、新規の抗癌剤として利用できる可能性があるが、その作用機序や生理活性については未解明の部分も多く、臨床応用を目指した更なる検討が必要である。

2. 研究の目的

本研究では Gal-9 の食道扁平上皮癌への抗腫瘍効果を *in vitro*, *in vivo* で検討を行い、作用機序を明らかにすることを目的とする。種々の癌に対し、Gal-9 の直接的な作用としてアポトーシスを誘導することを見出し報告したが、扁平上皮癌については未だ検討されていない。またその作用機序については十分明かされておらず、分子学的レベルにおいてその機序を解明することが本研究の第一の目的である。

また我々はこれまで肝細胞癌における抗腫瘍効果に関連する miRNA のクラスター解析及び機能解析に成功し、Gal-9 が miRNA を介して抗腫瘍効果を発揮している可能性を初めて報告した。しかし、Gal-9 により miRNA の発現変化は、一部に共通した miRNA の変化が見られるものの、癌種によりそのプロファイルは異なっている。これまで Gal-9 による扁平上皮癌の miRNA 変化や機能については報告されておらず、キーとなる miRNA を同定することが第2の目的である。

3. 研究の方法

A) *in vitro* の系

1.細胞増殖アッセイ

ヒト食道扁平上皮癌細胞株 KYSE-150 および KYSE-180 に対する培養系に 0nM, 30nM, 100nM, 300nM の Gal-9 を添加し 24, 48 時間後に MTT assay を行う。

2.アポトーシスとカスパーゼ活性の解析

Gal-9 を添加した食道扁平上皮癌細胞株に annexin- V によるフローサイトメトリーを用いアポトーシスが誘導されているか評価する。また比色分析法及び Western blot によりカスパーゼ(-3, -4, -7, -8, -9) 活性を評価する。

3. アポトーシス関連分子の動態とシグナル伝達経路についての検討

Western blot で上記カスパーゼの他、PARP, JNK, p38 の活性化、細胞質分画において Smac/Diablo, HtrA2/omi, cytochrome c 量の変化等、アポトーシスに関連するシグナル伝達経路を解析する。

4. ミトコンドリア膜電位の検討

KYSE-150 細胞へ 100nM の Gal-9 を投与し、JC-1 色素で染色し、蛍光顕微鏡観察し、ミトコンドリア膜電位の変化を確認する。

B) in vivo の系

ヌードマウス移植食道扁平上皮癌における Gal-9 の腫瘍増殖抑制効果

ヌードマウスの皮下に食道扁平上皮癌細胞株(KYSE150)を皮下移植したモデルを作成し、これに Gal-9 を腹腔内投与し、腫瘍の増殖状態を定量的に解析する。

C). Gal-9 の癌細胞抑制過程に関連する miRNA の同定

1. アレイを用いた miRNA の網羅的解析

細胞株、動物モデルの組織から miRNA を抽出し、アレイチップに、標識したサンプルをハイブリダイゼーション後、アレイ用スキャナーでスキャンし、その後、解析ソフトウェア Array-Pro Analyzer Ver4.5 を用い、各スポットにおける蛍光強度値の定量化を行い、Gal-9 の癌細胞抑制に関連する特異的な miRNA を同定する。

4. 研究成果

1. 細胞増殖アッセイ

Gal-9(30, 100, 300nM)で処理し、24 および 48 時間後に Cell Counting Kit-8 を用いて細胞生存率を測定したところ、腫瘍細胞の増殖は時間および濃度依存的に有意に抑制された(図1A)。KYSE-150 および KYSE-180 の両細胞において、48 時間後に Gal-9 の効果は 30mM のラクトースによって拮抗されたことから、Gal-9 の活性には α -ガラクトシド結合性が必須であることが示唆された(図1B)。

2. アポトーシスとカスパーゼ活性の解析

KYSE-150 細胞に 100nM の Gal-9 の投与を行い、1, 6, 12, 48 時間の時点で、アネキシン V-FITC/PI 染色分析をフローサイトメトリーで行った(図2A)。右下の象限の示す早期アポトーシス細胞の出現が確認された。

アネキシン V に陽性の細胞の数は、6 時間後に最も増加した(図2B)。比色法により 6 時間後にカスパーゼ 3 が活性化されることが確認された。カスパーゼ-4、-7、-8、-9 の活性の上昇は検出されなかった(図 2C)。

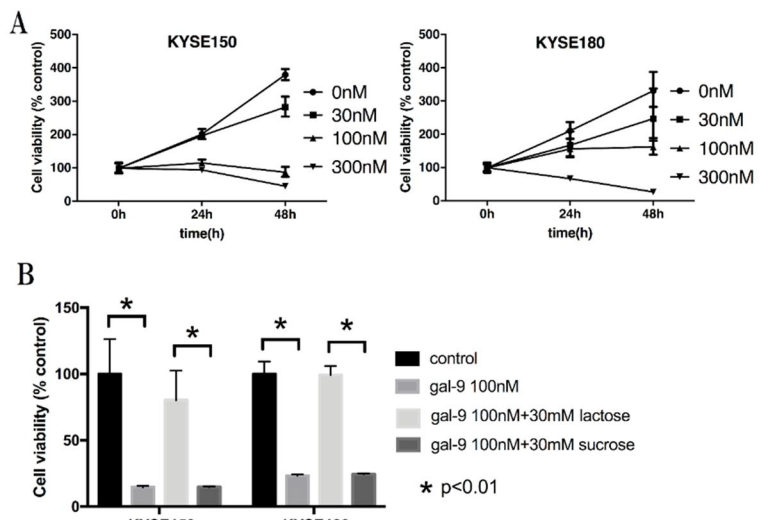


図1 ガレクチン-9 (Gal-9) 細胞増殖アッセイ

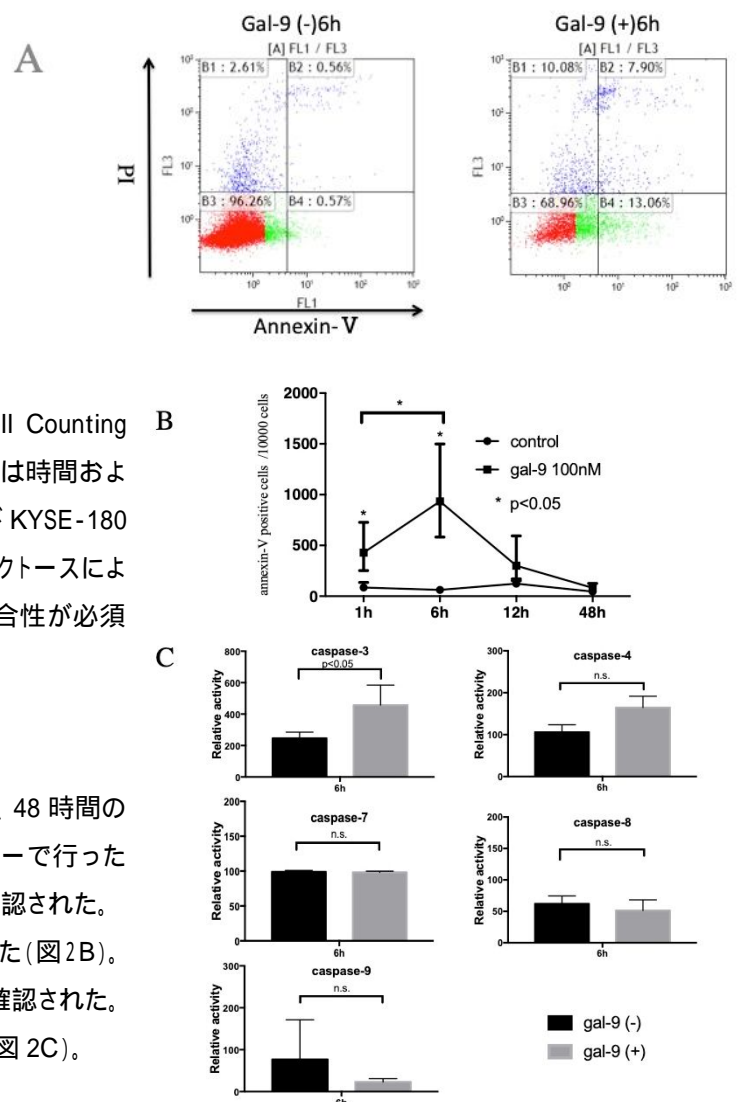


図2 アポトーシスの解析

3. アポトーシス関連分子の動態とシグナル伝達経路についての検討

ウェスタンブロット解析では、比色法による測定結果と同様に 6 時間後には cleaved caspase-3 のレベルが上昇していることが確認された(図 3A)。caspase-3、-7、-9、cleaved caspase-9 と PARP のレベルには差が見られなかった。

続いてアポトーシスの制御に重要な役割を果たす経路である SAPK/JNK (JNK) と p38 MAPK (p38) の活性化をウェスタンブロット解析した(図 3B)。JNK と p38 のレベルには差がなく、phospho-SAPK/JNK (p-JNK) の発現は 6 時間後に増加し、phospho-p38 MAPK (p-p38) の発現は 6 時間後と 24 時間後に増加した。

細胞画分のみ抽出し、ミトコンドリアから細胞質へのシトクロム c, Smac/Diablo (Smac), HtrA2/omi (HtrA2) の放出が起こっているかを検討した(図 3C)。その結果、24 時間後の細胞質画分では、シトクロム c、Smac、HtrA2 の量が増加を認めた。しかし、細胞膜分画(ミトコンドリアを含む)ではこれらのタンパク質の量の変化は検出されなかった。

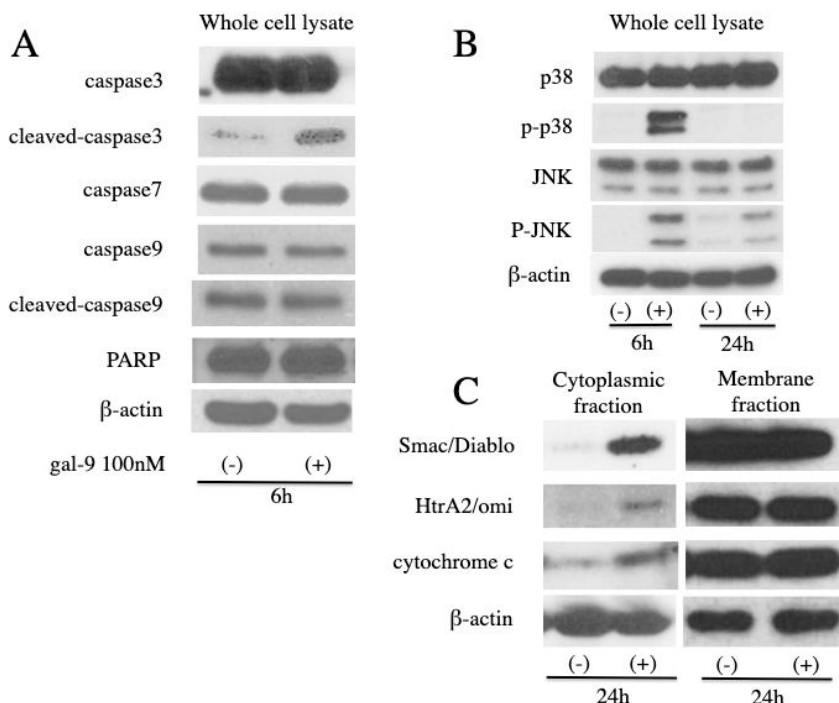


図 3. アポトーシス関連制御因子のウェスタンブロット

4. ミトコンドリア膜電位の検討

KYSE-150 細胞へ 100nM の Gal-9 を投与し、JC-1 色素で染色し、蛍光顕微鏡観察。膜電位が低下したアポトーシス細胞では、JC-1 色素はモノマーとして残り、485/535 nm で緑色を呈する。健常細胞では緑色の蛍光は観察されなかったが、Gal-9 を処理した細胞では、処理後 3 時間で緑色の染色が見られたことから、Gal-9 が KYSE-150 細胞においてミトコンドリアの電位の崩壊を誘導し、ミトコンドリアのアポトーシス経路を促進したことが示唆された(図 4)。

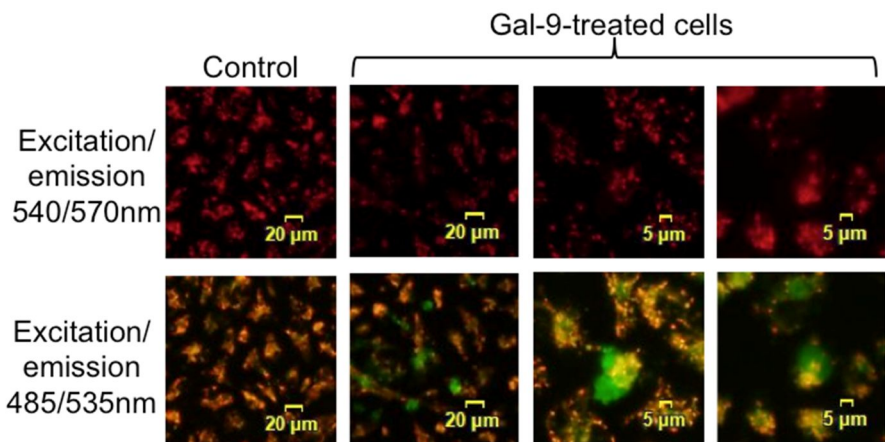


図 4. Gal-9 は、KYSE-150 細胞のミトコンドリア膜電位の低下を誘導する

B) in vivo の系

ヌードマウス移植食道扁平上皮癌における Gal-9 の腫瘍増殖抑制効果

KYSE-150 細胞をヌードマウスに皮下移植し、4 日後、腫瘍は 3mm の認識可能なサイズに達した。マウスの一群に Gal-9 (90 µg/body) を週 3 回腹腔内注射し、コントロールマウスと比較して、Gal-9 を投与したマウスでは、腫瘍の成長が有意に抑制された(図 5A,B)。期間中マウスの死亡はなく、コントロールマウスと比較して

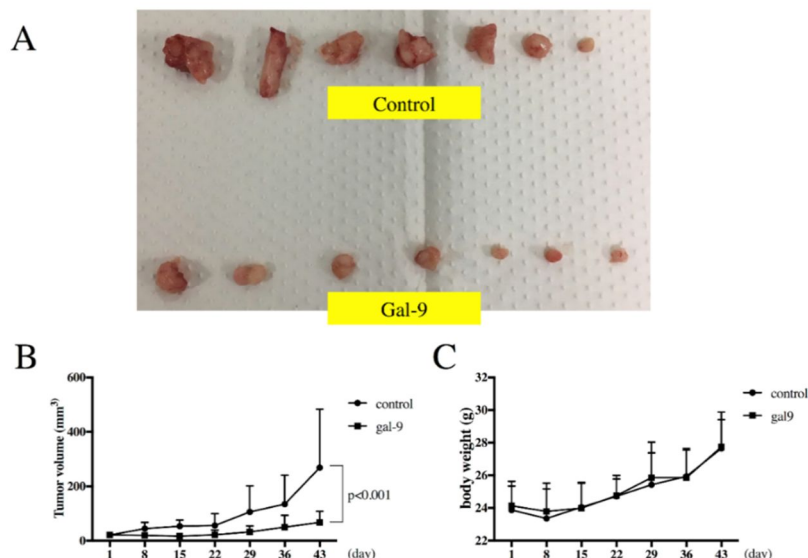


図 5. 異種移植マウスでの検討

Gal-9 を投与したマウスに行動の変化、体重の減少 (図5C)は観察されなかった。

アレイを用いた miRNA の網羅的解析

KYSE-150 細胞を Gal-9 で処理し miRNA の変化を miRNA アレイを用いて解析した。その結果、miR-222-5p、miR582-5p、miR-6131、miR-4639-5p の有意な変化を認めた。クラスター解析では異なったクラスターを形成した(図6)。

総括

以上の実験の結果より Gal-9 は Annexin 陽性細胞の増加と caspase-3 の活性化を示し、ミトコンドリアの膜電位を消失させ、食道扁平上皮癌細胞のアポトーシスを誘導した。想定されるパスウェイとしては JNK と MAPKp38 のリン酸化を誘導し、細胞質内では cytochrome c, Smac/Diablo, HtrA2/omi の増加させ、ミトコンドリアを介するアポトーシスを誘導することが示唆された(図7)。

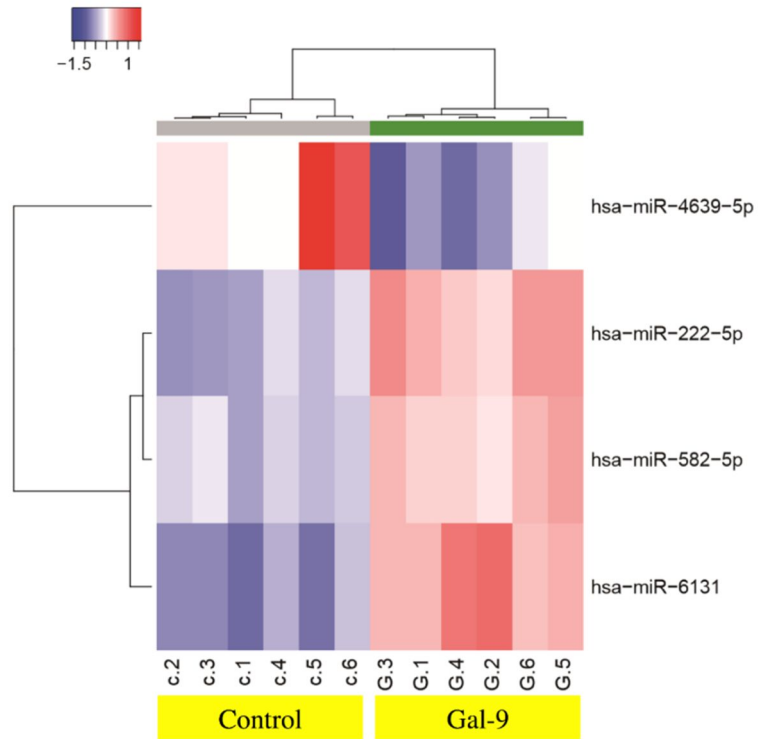


図6. KYSE-150 への Gal-9 投与の有無による miRNA 発現の階層的クラスター解析

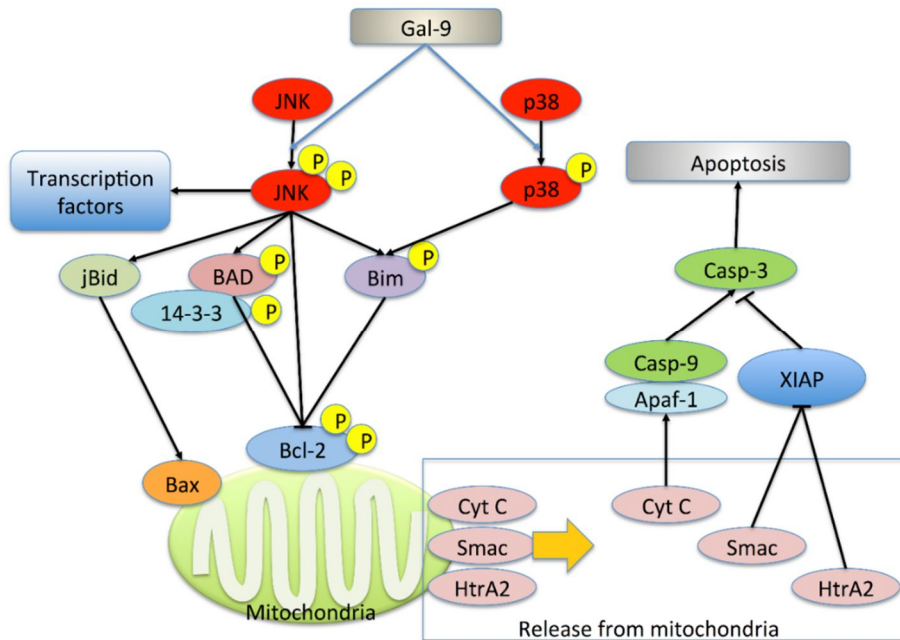


図7. 想定される JNK と p38 によるミトコンドリアを介したアポトーシスシグナル伝達経路

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Chiyo T, Fujita K, Iwama H, Fujihara S, Tadokoro T, Ohura K, Matsui T, Goda Y, Kobayashi N, Nishiyama N, Yachida T, Morishita A, Kobara H, Mori H, Niki T, Hirashima M, Himoto T, Masaki T	4. 巻 20
2. 論文標題 Galectin-9 Induces Mitochondria-Mediated Apoptosis of Esophageal Cancer In Vitro and In Vivo in a Xenograft Mouse Model.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 2634
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms20112634	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 千代大翔 明石瑛美子 藤田浩二 中谷夏帆 小塚和博 藤森絢子 松井崇矩 合田康宏 小林伸也 西山典子 藤原新太郎 谷内田達夫 森下朝洋 小原英幹 森宏仁 正木勉
2. 発表標題 食道扁平上皮癌・腺癌に対するガレクチン - 9の抗腫瘍効果のin vitro, in vivoでの検討
3. 学会等名 日本消化管学会総会学術集会
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------