

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592394

研究課題名(和文) 前立腺癌の骨転移におけるガレクチン-3の制御機構の解明

研究課題名(英文) The tumor control mechanism of galectin-3 in prostate cancer bone metastasis

研究代表者

福森 知治 (FUKUMORI, Tomoharu)

徳島大学・大学病院・講師

研究者番号：10314874

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：ガレクチン-3が過発現するLNCaP細胞と、発現を低下させたPC-3細胞を使用し、ガレクチン-3がLNCaP、PC-3細胞で浸潤能、遊走能を有意に促進させることが判った。LNCaP細胞ではガレクチン-3が細胞のPSA転写活性を有意に促進し、抗アンドロゲン剤(エンザルタミド、ビカルタミド)によるPSA減少に抵抗性を示した。ガレクチン-3によって破骨細胞マーカーのTRAP陽性細胞が1.7倍と有意に増加しガレクチン-3が破骨細胞の活性化を促進させた。これらの結果はガレクチン-3が前立腺癌細胞の浸潤、転移、アンドロゲンレセプターの転写活性、破骨細胞を調節し、腫瘍の進展に関与していることを示唆した。

研究成果の概要(英文)：We generated continuous galectin-3-overexpressed LNCaP cells and galectin-3-downregulated PC-3 cells using siRNA. Overexpression of galectin-3 in LNCaP cells promoted invasion and migration of tumor cells comparing with control LNCaP cells. Downregulation of galectin-3 in PC-3 cells suppressed invasion and migration comparing with control PC-3 cells. Galectin-3 significantly suppressed anti-androgen effect induced by enzalutamide or bicalutamide in LNCaP comparing with controls by activating androgen transcriptional activity of AR. Galectin-3 has been shown to promote activation of osteoclasts because TRAP-positive cells of the osteoclast was significantly increased 1.7-fold by the addition of recombinant galectin-3. These data indicate that galectin-3 is involved in the tumor progression and anti-androgen drug resistance of CRPC by regulating invasion, migration, transcriptional activity of AR, and osteoclast activity.

研究分野：医歯薬学

キーワード：前立腺癌 ガレクチン-3 破骨細胞 骨芽細胞

## 1. 研究開始当初の背景

前立腺癌は骨に転移しやすく、前立腺癌の骨転移に対する治療法の確立は、泌尿器科医がブレイクスルーすべき最も重要な課題の1つである。前立腺癌の骨転移においては、腫瘍細胞がさまざまなサイトカインや増殖因子を産生して破骨細胞および骨芽細胞を活性化し、その結果、破骨細胞と骨芽細胞から腫瘍細胞への増殖因子が産生される一連の相互作用が重要である。これらの腫瘍と破骨細胞、骨芽細胞の細胞間の相互作用を制御し、腫瘍の増殖を抑制すると共に腫瘍細胞の骨での進展を阻止することが前立腺癌の骨転移に対する治療戦略上きわめて重要である。

われわれは、この癌の浸潤・転移に重要なキータンパク質の1つであるガレクチン-3が、1)ホルモン非感受性前立腺癌細胞株(PC-3, DU-145)に強発現する一方で、ホルモン感受性前立腺癌細胞株(LNCaP)に発現していないこと(Fukumori T et.al. Cancer Research 66: 3114-3119, 2006)、2)ヒト去勢抵抗性前立腺癌細胞の多くでガレクチン-3強発現していること、3)ガレクチン-3を発現していないホルモン感受性前立腺癌細胞(LNCaP)にガレクチン-3を強発現させるとアポトーシスを調節し、抗がん剤に耐性を獲得すること(Fukumori T et.al. Cancer Research 66: 3114-3119, 2006、Fukumori T et.al. Drug Resistant Updates 10: 101-108, 2007)、4)ガレクチン-3が強発現しているPC-3細胞と骨芽細胞を共培養させると、PC-3細胞でCOX2, IL-6などの腫瘍の進展に重要な遺伝子が強発現すること(British Journal of Cancer 104; 505-513, 2011)、5)ガレクチン-3が破骨細胞の活性

化に關与していることを既に見いだしており、これらの結果はガレクチン-3が治療抵抗性前立腺癌の骨転移の進展に關与する可能性を示唆するものである。

## 2. 研究の目的

本研究では、ガレクチン-3の発現の異なる前立腺癌細胞と破骨細胞、骨芽細胞を共培養させることで、破骨細胞、骨芽細胞に及ぼすガレクチン-3の影響を分子生物学的に検討し、さらに、前立腺癌細胞の骨転移の進展にガレクチン-3が及ぼす影響を、in vitroおよびマウス骨転移モデルで検討する。また、ガレクチン-3の発現を制御する最適なブロッキング抗体とsiRNAを構築し、ガレクチン-3をターゲットにした治療抵抗性前立腺癌の骨転移に対する遺伝子治療への応用を最終目標とする。

## 3. 研究の方法

(1)われわれが既に構築しているリコンビナントガレクチン-3蛋白質を、破骨細胞株(MC3T3-E1)および骨芽細胞株(hFOB 1.19)に添加し、破骨細胞および骨芽細胞の増殖マーカーおよびアポトーシスを定量し、ガレクチン-3が破骨細胞と骨芽細胞におよぼす影響を検討する。

(2)ホルモン感受性前立腺癌細胞株(LNCaP)と、われわれが構築したガレクチン-3発現細胞株(LNCaP-Gal3)および、ホルモン非感受性前立腺癌細胞株(PC-3)とガレクチン-3ノックアウト細胞株(PC-3-nGal3)を、破骨細胞株(MC3T3-E1)および骨芽細胞株(hFOB 1.19)と混合して共培養させ、それぞれの細胞をFACSでsortingして分離し、腫瘍細胞のガレクチン

-3 の発現の違いによる他の分子の発現変化をマイクロアレイで網羅的に解析する。

(3) マウスの骨転移モデルを利用し、ガレクチン-3 の発現の異なる LNCaP、LNCaP-Gal3、PC-3、PC-3-nGal3 をそれぞれ骨に移植し、小動物用 CT を用いて増殖速度の差を *in vivo* で検討する。さらに、腫瘍細胞で、ガレクチン-3 の発現の違いによる細胞接着因子、増殖関連因子、アポトーシス関連因子など、他の分子の発現の変化をマイクロアレイで網羅的に解析する。

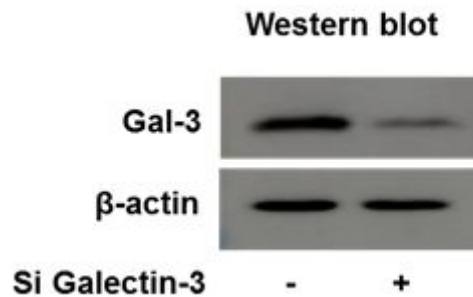
(4) ガレクチン-3 ブロッキング抗体とガレクチン-3 の発現を抑える siRNA を投与し、前立腺癌の骨転移に対する有用性と、ビスフォスフォネート製剤との相乗効果を、マウス前立腺癌転移モデルで検討する。

#### 4. 研究成果

(1) ガレクチン-3 が破骨細胞および骨芽細胞におよぼす影響の検討：われわれは、リコンビナントガレクチン-3 蛋白質を作成し、破骨細胞株 (MC3T3-E1) および骨芽細胞株 (hFOB 1.19) にそれぞれ添加し、破骨細胞および骨芽細胞の増殖マーカーを定量し、ガレクチン-3 が破骨細胞と骨芽細胞におよぼす影響を検討した。その結果、破骨細胞においてガレクチン-3 蛋白質を添加することで TRAP 陽性細胞が 1.7 倍と有意に増加し、ガレクチン-3 が破骨細胞の活性化を促進させることが示唆された。

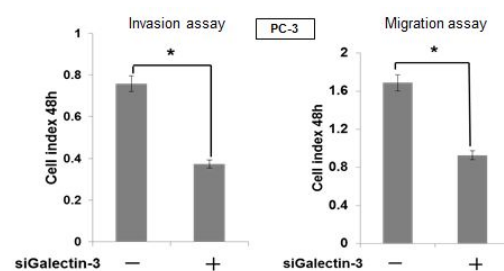
(2) ガレクチン-3 の siRNA の作成と評価：ガレクチン-3 の発現を抑える siRNA を網羅的に作成し、前立腺癌細胞株 (PC-3) でのガレクチン-3 の発現抑制効果と腫瘍の増殖への影響を検討した。その結果、前立腺癌細胞

株 (PC-3) におけるガレクチン-3 の発現を約 50% 低下させる PC-3 細胞を構築した。

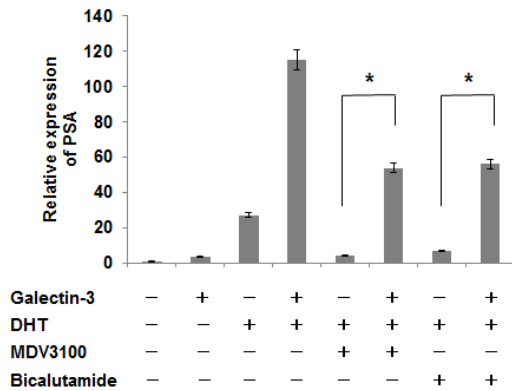


(3) 前立腺癌細胞株におけるガレクチン-3 の浸潤能の検討：ホルモン感受性前立腺癌細胞株 (LNCaP) とガレクチン-3 強発現細胞株 (LNCaP-Gal3) および、ガレクチン-3 強発現ホルモン非感受性前立腺癌細胞 (PC-3) とガレクチン-3 ノックダウン細胞株

(PC-3si) を構築し、前立腺癌細胞の浸潤、遊走能に及ぼすガレクチン-3 発現の影響を検討した。その結果、ガレクチン-3 は LNCaP 細胞、PC-3 細胞のいずれの細胞においても浸潤能、遊走能を有意に促進させた (第 23 回泌尿器科分子・細胞研究会 (2014 年) 第 73 回日本癌学会学術集会 (2014 年) で発表)。



(4) 抗アンドロゲン剤耐性とガレクチン-3 の関与：LNCaP 細胞ではガレクチン-3 の発現が細胞の PSA 転写活性を有意に促進し、抗アンドロゲン剤 (ピカルタミド、エンザルタミド) 投与時の PSA 低下に抵抗性を示し、薬剤耐性に関与することを見出した (第 23 回泌尿器科分子・細胞研究会 (2015 年) で発表)。



(5) 前立腺癌患者における血清ガレクチン-3の発現：血清 PSA 値が 4.0 ng/mL 以上のコントロール群（前立腺生検施行群）と未治療前立腺癌群、去勢抵抗性前立腺癌患者群で血清ガレクチン-3 濃度を比較検討した。その結果、去勢抵抗性前立腺癌患者では未治療前立腺癌群およびコントロール群と比較して有意に血清ガレクチン-3 濃度が高かった（去勢抵抗性前立腺癌患者血清 6178 pg/mL、前立腺癌患者血清 3021 pg/mL、 $p=0.008$ 、非前立腺癌患者血清 1671 pg/mL、 $p<0.001$ ）（第 73 回日本癌学会学術集会（2014 年）で発表）

#### 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 4 件）

1. TOMOTERU KISHIMOTO, TOMOYA FUKAWA, KUNIHISA YAMAGUCHI, YASUYO YAMAMOTO, HIROYOSHI NAKATSUJI, HIROFUMI IZAKI, MASAYUKI TAKAHASHI, TOMO HARU FUKUMORI, and HIRO-OMI KANAYAMA  
Mineralocorticoid receptor expression in human penile corpus cavernosum  
The Journal of Medical Investigation  
60 21-26 2013 年 21-26 (査読有)  
<http://dx.doi.org/10.2152/jmi.60.21>

#### Originals

2. MASAYUKI TAKAHASHI, RUMI KAWABATA, AKIRA KAWANO, TOSHIHIDE MURAKAMI, YASUSHI SUTOU, TOHRU INAI, SEIJI AKAZAWA, TAKUMI HAMAO, HIDEKI HAYASHI, TOMOYA FUKAWA, MASAHIKO TAKEMURA, YASUYO YAMAMOTO, KUNIHISA YAMAGUCHI, HIROFUMI IZAKI, TOMO HARU FUKUMORI and HIRO-OMI KANAYAMA  
Substitution of anti-androgens and tegafur-uracil combination therapy for castration-resistant prostate cancer: Result of a multi-center randomized phase study  
INTERNATIONAL JOURNAL OF ONCOLOGY  
43 713-720 2013 年 (査読有)  
DOI 10.3892/ijo.2013.1997
3. 福森知治, 金山博臣  
第 部 治療における最近の新薬の位置付け 薬効別 ~新薬の広場~ 膀胱癌・前立腺治療薬医薬ジャーナル新薬展望  
48・S-1 185-191 (389-395) 2012 年 (査読有)  
[https://www.iyaku-j.com/iyaku-j/system/M2-1/summary\\_viewer.php?trgid=24490](https://www.iyaku-j.com/iyaku-j/system/M2-1/summary_viewer.php?trgid=24490)
4. 福森知治, 古谷俊介, 中達弘能, 仙崎智一, 布川朋也, 武村政彦, 山本恭代, 山口邦久, 井崎博文, 高橋正幸, 生島仁史, 金山博臣  
限局性前立腺癌に対する密封小線源療法 のリスク分類別治療成績 neoadjuvant combined androgen blockade (CAB) の有用性の検討 泌尿器外科 25(8) 1651 ~ 1654 2012 年 (査読有)

<http://www.igakutosho.co.jp/magazine/urinary/2012/zh2508.html>

[学会発表](計14件)

1. Dondoo Tsogt-Ochir, 福森知治, 中達弘能, 高橋正幸, 金山博臣, 他3名  
去勢抵抗性前立腺癌における Galectin-3 の関与  
泌尿器科分子・細胞研究会  
2015年2月28日  
JPタワー ホール&カンファレンス  
(東京都千代田区)
2. 楠原義人, 福森知治, 高橋正幸, 金山博臣, 他11名  
ロボット支援腹腔鏡下腎部分切除術の初期経験  
中国四国前立腺疾患研究会  
2015年2月21日  
Junko Fukutake Hall 岡山大学鹿田キャンパス内(岡山県岡山市)
3. 福森知治  
ロボット支援手術システムの安全性の検討  
日本泌尿器科内視鏡学会総会  
2014年11月28日  
ヒルトン福岡シーホーク(福岡県福岡市)
4. ドンドオツクトーオチル, 福森知治, 中達弘能, 高橋正幸, 金山博臣, 他2名  
The significance of galectin-3 as a candidate marker of tumor progression in prostate cancer. (前立腺癌の腫瘍進展の指標としてのガレクチン3の重要性)  
日本癌学会学術総会  
2014年9月25日  
パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
5. 福森知治, 高橋正幸, 金山博臣, 他5名  
高齢者(75歳以上)に対するI-125前立腺癌密封小線源療法 of 臨床的検討  
日本癌治療学会学術集会

2014年8月30日

パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

6. 福森知治, 高橋正幸, 金山博臣, 他10名  
徳島県における前立腺癌の地域連携に現状・課題・展望～地域連携促進のために何が必要か～ 日本泌尿器科学会  
2014年4月27日  
神戸国際センター(兵庫県神戸市)
7. Dondoo Tsogt-Ochir, 福森知治, 高橋正幸, 金山博臣, 他6名  
前立腺癌における Galectin-3 in prostate cancer  
泌尿器科分子・細胞研究会  
2014年3月15日  
ホテルメトロポリタン山形・霞城セントラル(山形県山形市)
8. 大豆本圭, 中達弘能, 高橋正幸, 福森知治, 金山博臣, 他1名  
膀胱癌浸潤における HGF の役割とその分子機構の解明  
日本癌学会学術総会  
2013年10月4日  
パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
9. Tomoharu F, Takahashi M, Kanayama H, 他7名  
Long-Term Outcomes of Tri-Modality Therapy with Radical Transurethral Resection of the Bladder Tumor (TUR-Bt), Intra-Arterial Chemotherapy, and Concurrent Radiotherapy for Locally Advanced Bladder Cancer.  
SIU 2013年9月9日 Vancouver Convention Centre  
(VANCOUVER, Washington DC USA)
10. Tomoya Fukawa, Masayuki

Takahashi, Tomoharu Fukumori, Hiro-omi

Kanayama, 他 7 名

DDX31 regulates p53 tumor suppressor activity through its interaction with NPM1 in renal cell carcinomas. AUA

2013 年 5 月 5 日 SanDiego Convention Center (SAN DIEGO, USA)

11. 高橋久弥, 高橋正幸, 中達弘能, 福森知治, 金山博臣, 他 8 名

膀胱癌における Plakophilin-2 と

Plakophilin-3 の関与 日本泌尿器科学

会総会 2013 年 4 月 28 日

ロイトン札幌・札幌市教育文化会館・札幌プリンスホテル国際館パミール (北海道札幌市)

12. 布川朋也, 金山博臣, 他 4 名

腎細胞癌新規治療標的候補分子による

NPM1 を介した p53 および rRNA 転写の制御の解明

泌尿器科分子・細胞研究会

2013 年 3 月 9 日

ホテル日航高知旭ロイヤル(高知県高知市)

13. 福森知治, 中達弘能, 高橋正幸, 金山博臣, 他 6 名

前立腺癌密封小線源療法後の排尿障害予測因子の検討

日本泌尿器科学会総会 2012 年 4 月 22 日

パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

14. 福森知治, 高橋正幸, 金山博臣, 他 7 名

Efficacy and safety of dose escalation in I-125 prostate brachytherapy 前立腺 I-125 密封小線源療法における線量増加の有効性と安全性

日本泌尿器科内視鏡学会総会

2012 年 11 月 24 日

仙台国際センター (宮城県仙台市)

[ 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

福森 知治 ( FUKUMORI, Tomoharu )

徳島大学・病院・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・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・准教授

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・非常勤講師

研究者番号 : 50437638

### (3) 連携研究者

なし