

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791774

研究課題名(和文)ガレクチン-3による腫瘍の免疫回避

研究課題名(英文)Tumor immune evasion by Galectin-3

研究代表者

花本 敦 (Hanamoto, Atsushi)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：20625917

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：頭頸部扁平上皮癌の細胞株(FaDu, Detroit562, BICR6, BICR18)を入手し、安定して培養できる環境を整えた。細胞増殖アッセイ、タンパク定量、免疫染色、ウェスタンブロッティング、フローサイトメトリーが当科にて簡潔出来るように、器具や試薬を調達した。増殖能は他の細胞株と比してFaDuにおいて強い傾向であった。これらの細胞株においてのガレクチン3の発現をウェスタンブロッティングにて確認をした。その結果3つの細胞株においてガレクチン3の高発現を認めた。

研究成果の概要(英文)：We obtained cell lines of head and neck squamous carcinomas (FaDu, Detroit562, BICR6, BICR18). They were cultured in DMEM supplemented with 10% FBS and 1% penicillin-streptomycin. We obtained reagents and instruments to perform proliferation assay, DC protein assay, immunocytochemistry stain and flow cytometry. Proliferation assay was performed. Cells were plated in 96-well plates (1,000 cells per well) were grown in their respective media for 24, 48, or 72 hours. FaDu proliferated faster than the other cell lines. DC protein assay was performed to detect the concentration of the protein in lysate of the cell lines. We performed SDS-PAGE and Western blot analysis. Western blotting revealed that FaDu, Detroit562 and BICR6 had high expression of Galectin-3.

研究分野：外科系臨床医学

科研費の分科・細目：耳鼻咽喉科学

キーワード：ガレクチン3

1. 研究開始当初の背景

ガレクチンはガラクトースをもつ糖鎖を認識するタンパク質であり、様々な組織、病変で発現していることが知られている。その中の一つガレクチン-3は炎症や癌の進展に関わっていることが知られている。ガレクチン-3は頭頸部癌、甲状腺癌など多くの癌で高発現しており、その発現の程度と予後は負の相関を示すことが知られている。ガレクチン-3は細胞内、細胞外のいずれでも、機能することが知られている。申請者らのグループの研究により、細胞内でのガレクチン-3はそのリン酸化やBcl-2ファミリーのタンパク質との作用を通じて、様々な刺激による腫瘍細胞のアポトーシスを防ぐことが示された(Takenaka Y, et al. Mol Cell Biol. 2004, 24:4395-406)。また、細胞外でのガレクチン-3は糖鎖認識を介した細胞凝集作用による転移の促進や腫瘍組織における血管新生と関与している(Takenaka Y, et al. Glycoconj J. 2004;19:543-9)。

宿主のリンパ球は腫瘍細胞を攻撃し、腫瘍を排除しようとする。それゆえ、腫瘍組織におけるリンパ球浸潤は予後良好因子であることが知られている。しかし、腫瘍細胞は様々な機構により免疫細胞からの攻撃を防いでいる。その一つの候補としてガレクチン-3による免疫回避がある。申請者らのグループは、高濃度のガレクチン-3はガレクチン-3を発現しないリンパ球細胞株のアポトーシスを誘導することを明らかにした(Fukumori T, et al. Cancer Res. 2003 63:8302-11)。また、ガレクチン-3は腫瘍浸潤リンパ球に結合し、その機能を阻害することが報告されている(Demotte et al. Cancer Res. 2010: 7476-88)。すなわちガレクチン-3はリンパ球を排除する、あるいは、機能を阻害することにより腫瘍の免疫回避に寄与していると考えられる。

いくつかの物質がガレクチン-3の阻害

物質として知られている。そのほとんどはガラクトースを含む糖鎖を無数に持っており、ガレクチン-3とリガンドの糖鎖依存性の結合を競合阻害する。ガレクチン-3の阻害物質である modified citrus pectin や GCS-100 は動物実験において腫瘍増殖や転移巣の形成を阻害することが知られている。その結果を踏まえてこれらの物質を用いた第I相、第II相臨床試験が様々な癌種を対象として行われている。

2. 研究の目的

ガレクチン-3はガラクトースを認識するレクチンであり、様々な種類の癌細胞で強発現している。ガレクチン-3の癌細胞における役割は多岐にわたる。近年の研究によりガレクチン-3は腫瘍の免疫回避に寄与することが示唆されている。申請者らのグループの研究によりガレクチン-3は特定のリンパ球のアポトーシスを誘導することが示された。また、他のグループからはガレクチン-3による腫瘍浸潤リンパ球の阻害が報告されている。本研究はガレクチン-3の腫瘍浸潤リンパ球への作用およびそのメカニズムを解明することを目的とする。具体的には、1、ガレクチン-3がどのような条件下でリンパ球のアポトーシス誘導作用をもつのか、2、腫瘍組織におけるガレクチン-3の発現と浸潤リンパ球の関係、3、ガレクチン-3のリンパ球への結合がリンパ球機能をどのように変化させるか、について明らかにする。

3. 研究の方法

(1) ガレクチン-3がリンパ球のアポトーシスを誘導するか否かに関する検討。

様々なガレクチン-3を高発現する癌細胞株の培養上清中のガレクチン-3濃度を測定する。これによって生理的に存在するガレクチン-3濃度を推測する。

次に、様々な濃度のガレクチン-3を末梢血から採取したリンパ球と反応させて、生理的にありうる濃度のガレクチン-3がリンパ球のアポトーシスを誘導するか否かを確認する。また、ガレクチン-3を発現していない細胞株、その細胞株にガレクチン-3を強制発現させたトランスフェクタントをリンパ球と共培養し、リンパ球のアポトーシス誘導が起こるか否か解析する。

また、ガレクチン-3によって誘導されるリンパ球のアポトーシスが糖鎖認識を介したものであるかどうかの確認のため、lactoseによりアポトーシスが阻害されるかどうか確認する。

アポトーシスの解析に関しては、フローサイトメトリーを用いて sub G1fraction の比率で判断する。また、表面マーカーによってリンパ球を分類し、サブセットごとの感受性についても検討する。

(2) 腫瘍組織におけるガレクチン-3と腫瘍浸潤リンパ球の検討。

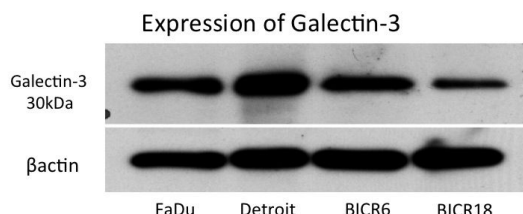
従来の報告では、腫瘍浸潤リンパ球の存在は予後良好因子であることが知られている。また、申請者らのグループは頭頸部癌における手術検体を用いて、ガレクチン-3の発現程度と予後に負の相関があることを示した (Honjo Y, et al. Clin Cancer Res. 2000 (12):4635-40)。また、少なくとも高濃度のガレクチン-3はリンパ球のアポトーシスを誘導する。そこで、今回我々は、頭頸部癌の手術検体からのパラフィン包埋標本を対象として、免疫染色を用いて癌細胞のガレクチン-3発現と腫瘍浸潤リンパ球の相関を検討する。合わせてガレクチン-3発現と腫瘍浸潤リンパ球のアポトーシスの関連についても in situ nick translation を用いて検討する。また、ガレクチン-3発現、腫瘍浸潤リンパ球の程度と予後の関係についても検討する。

なお、申請者らのグループは頭頸部癌の手術検体のパラフィン包埋標本を多数保存しており、研究に使用できるよう患者からの包括同意書も取得している。

4. 研究成果

頭頸部扁平上皮癌の細胞株 (FaDu、Detroit562、BICR6、BICR18) を入手し、in vitro で DMEM に 10%FBS を追加し、培養液下に安定して培養できる環境を作成した。また当科においては一時的に実験系が中断されていたため、基本的な実験ができるように環境整備を行った。細胞増殖アッセイ、タンパク定量、免疫染色、ウェスタンブロッティングが当科にて簡潔出来るように、器具や試薬を調達した。細胞株におけるガレクチン-3の発現をウェスタンブロッティングにて確認をした。その結果3つの細胞株においてガレクチン-3の高発現を認めた。また、頭頸部癌の臨床サンプルから間質を取り除いて、癌細胞のみを抽出するために検討を行った。頭頸部癌の手術余剰検体を用いて、コラゲナーゼ等を用いて、組織を単離細胞とし、それをフローサイトメトリーにかけて、癌細胞のみを抽出する方法を検討した。当初頭頸部癌に特異的に発現しているとされていた MUC-1 を用いて positive selection を検討した。頭頸部扁平上皮癌の細胞株においては MUC-1 の発現をウェスタンブロッティングやフローサイトメトリーで確認したが、MUC-1 はこれらの細胞株で高発現を呈していた。次に実際の癌組織を用いて検討を行ったが、単離細胞にする際に、gentle max を用いて組織を細切する行程が困難であった。これはおそらく扁平上皮癌の細胞が強固に接着しているため、簡単には単離できないと思われた。次に癌組織を NOD/SCID マウスに移植し、増殖した組織を単離化できないかの検討を行った。癌組織をマウス背部の皮下に異種間移植を行い増殖を待った。下咽頭癌の移植組織

は順調に増殖をしたが、その他の部位の腫瘍は増殖しないものが多かった。十分に増殖した後細胞の単離化を試みたが、これも手術の余剰組織と同様の結果であり、単離化することは困難であった。



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1件)

Limitation of 2-deoxy-2-[F-18]fluoro-D-glucose positron emission tomography (FDG-PET) to detect early synchronous primary cancers in patients with untreated head and neck squamous cell cancer.

Hanamoto A, Takenaka Y, Shimosegawa E, Yamamoto Y, Yoshii T, Nakahara S, Hatazawa J, Inohara H.
Ann Nucl Med. 2013 Aug 25.

[学会発表](計6件)

花本 敦

18F-FDG PET/CT より得られる腫瘍代謝容積の検討

第24回 日本頭頸部外科学会 平成26年1月30日-31日、高松

Hanamoto A, Tatsumi M, Kato H, Shimosegawa E, Inohara H, Hatazawa J
“PERCIST1.0 and RECIST1.1 in evaluating treatment response to chemoradiotherapy in primary and metastatic lymph node

lesions of hypopharyngeal carcinoma”
60th Annual meeting Society of Nuclear Medicine June 8-12 2013, Vancouver, Canada.

Hanamoto A, Tatsumi M, Watabe T, Kato H, Shimosegawa E, Inohara H, Hatazawa J.

“Metabolic tumor volume on pretreatment FDG-PET predicts clinical outcome in head and neck squamous cell carcinoma receiving chemoradiotherapy”

59th Annual meeting Society of Nuclear Medicine June 9-13 2012, Miami Beach, U.S.A.

Hanamoto A, Tatsumi M, Watabe T, Kato H, Shimosegawa E, Inohara H, Hatazawa J.

“Metabolic Tumor Volume is the best predictor of larynx preservation in patients with hypopharyngeal carcinoma receiving chemoradiotherapy”

59th Annual meeting Society of Nuclear Medicine June 9-13 2012, Miami Beach, U.S.A.

花本 敦, 山本佳史, 喜井正士, 竹中幸則, 中原 晋, 安井俊道, 福角隆仁, 猪原秀典.
「下咽頭癌の化学放射線療法の予後予測のための容積測定に関する検討」

第36回 日本頭頸部癌学会 平成24年6月7日-8日、松江

花本 敦, 山本佳史, 喜井正士, 竹中幸則, 中原 晋, 安井俊道, 福角隆仁, 猪原秀典.
「化学放射線療法前のFDG-PETより得られる定量的な数値の検討」

第36回 日本頭頸部癌学会 平成24年6月7日-8日、松江

6 . 研究組織

(1)研究代表者 花本 敦(HANAMOTO Atsushi)

大阪大学・医学部附属病院 医員

研究者番号 : 20625917