

平成 30 年 6 月 2 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08959

研究課題名(和文) 胃癌におけるガレクチン-3の機能解明と増殖制御療法への応用

研究課題名(英文) Galectin-3 Promotes Cell Proliferation and Attenuates Cytotoxic Effect of Paclitaxel via ERK Signaling Pathway in Gastric Cancer Cells.

研究代表者

芹澤 信子 (SERIZAWA, Nobuko)

順天堂大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：00445545

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：ガレクチン-3を抑制したMKN45(ヒト胃癌細胞)では細胞増殖が有意に抑えられ、リン酸化ERK(Extracellular Signal-regulated Kinase)の発現が減少したことから、ガレクチン-3はERKシグナル伝達系を介して細胞増殖を調節している事を証明した。更に同様の実験においてパクリタキセル(TXL)を投与したところ、TXL単独投与群に比較して細胞増殖が抑制され、リン酸化ERKの発現が減少した。以上から、胃癌細胞においてガレクチン-3の発現を抑えると、ERKシグナル伝達系の抑制を介して細胞増殖が抑えられ、TXL投与により更に細胞増殖抑制効果が増強する事が証明された。

研究成果の概要(英文)：Our aim in this study is to assess whether silencing of galectin-3 contributes to the inhibition of gastric cancer cell proliferation and enhances the effect of paclitaxel through ERK (Extracellular Signal-regulated Kinase) signaling pathway. The proliferating cells were decreased in galectin-3 siRNA transfected cells compared to control cells. Western blot showed that phosphorylation of ERK was reduced in galectin-3 siRNA transfected cells. Cell proliferation in galectin-3 siRNA transfected cells was decreased compared to control cells in the presence of paclitaxel (TXL). Western blot showed that phosphorylation of ERK was reduced in galectin-3 siRNA/TXL combination compared to scrambled siRNA/TXL combination. These results indicate that silencing of galectin-3 downregulates ERK signaling pathway and enhances the effect of TXL, leading to synergistic inhibition of cell proliferation in gastric cancer.

研究分野：消化器内科学

キーワード：ガレクチン-3 胃癌 パクリタキセル ERKシグナル伝達系

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 胃X線検査を用いた胃癌検診や、ヘリコバクターピロリ除菌の普及によりその死亡率は低下してきているものの、日本において胃癌は依然として死亡率の高い癌である。早期診断のために必要な胃癌の特異的な腫瘍マーカーは存在せず、進行胃癌で見つかった場合、効果を有する抗癌剤は限られており、現時点でその治療効果は満足のものではない。

(2) ガレクチン-3は -ガラクトシダーゼに結合する、分子量 30kDa のキメラ型ガレクチンで、細胞増殖、血管新生、アポトーシスなど様々な生物学的役割を有する。また、ある種の癌において、その発現と悪性度との間に正の相関が認められていることで注目されている。現在までに悪性リンパ腫、乳癌、大腸癌、腎癌、舌癌などの進展にガレクチン-3が関与していると報告されている。胃癌細胞においてはガレクチン-3が多く発現しているが、正常細胞には発現がほとんどなく、発現が多いほど転移しやすいとの報告があり、また臨床研究で、胃癌患者において、ガレクチン-3の血中濃度が高いほどリンパ節転移や遠隔転移が多いと報告されている。これらのことからガレクチン-3が胃癌の進展に関与していることは間違いないと考えられる。また、ガレクチン-3の作用発現において、様々なシグナル伝達系の関与が報告されており、ガレクチン-3が Mitogen-activated Protein Kinase (MAPK) シグナル伝達系を介して細胞増殖を調節しているとの研究報告がある。

(3) 本研究代表者はこれまでに、ガレクチン-3 ノックアウトマウスと野生型マウスに発癌物質 diethylnitrosamine (DEN) を投与しマウス肝癌モデルを作成し、腫瘍径を比較したところ、野生型マウスの腫瘍径はガレクチン-3 ノックアウトマウスに比べて著明に大きく、組織学的にも、野生型マウスの肝癌組織はガレクチン-3 ノックアウトマウスと比較して、低分化型で浸潤傾向強かったということを証明している。また、invitroの実験において、ガレクチン-3 siRNA をトランスフェクションし、ガレクチン-3 の発現を抑えた Hepa1-6 (マウス肝癌細胞) において、Wound Closure Assay にて細胞の遊走性が低下していることを確認し、さらに、それに関わるシグナル伝達系タンパクとして、低分子量 G タンパク質の一種で、主に細胞骨格の制御に関わる、RhoA とその下流の myosin light chain 2 (MLC2) が関与しているということを証明した。これらの結果から、ガレクチン-3 は RhoA/MLC2 シグナル伝達系を介して肝細胞癌の遊走性を亢進することにより、転移や浸潤に関与しているということを明らかにした。

(4) 一方、切除不能の進行胃癌患者において、フッ化ピリミジン系抗癌剤 + プラチナ系抗癌剤 (±トラツズマブ) 併用療法が1次化学療法として広く受け入れられている。しかし多くの患者が1次治療に不応であるか、もしくは治療を継続していくうちに、病勢の増悪により更なる治療が必要となる。最近、進行胃癌における2次化学療法の有効性が報告されており、日本においては、WJOG 4007 試験の結果に基づき、パクリタキセルが2次治療に広く用いられている。パクリタキセルの作用機序は、微小管の脱重合を阻害することで、細胞の正常な有糸分裂を妨げるというものであるが、いくつかの研究において、パクリタキセルは MAPK を含む、様々なチロシンキナーゼ活性を調節していると報告されている。

## 2. 研究の目的

そこで、胃癌細胞にガレクチン-3 siRNA をトランスフェクションし、ガレクチン-3 の発現を抑えた場合、MAPK シグナル伝達系が抑えられ、細胞増殖が抑制されること、更に、ガレクチン-3 の発現を抑制した胃癌細胞にパクリタキセルを投与した場合、同様のメカニズムを介して、細胞増殖抑制効果が増強することを検証することとした。本研究はガレクチン-3 が胃癌の増殖・浸潤に重要な役割を果たしていることを証明し、腫瘍マーカーとしての有用性を確立すること、さらにガレクチン-3 を抑制することで抗癌剤の効果が高まることを証明し、抗癌剤の併用薬として臨床応用へと展開するための研究基盤を確立することが目的である。

## 3. 研究の方法

### (1) 細胞培養

ヒト胃癌細胞 (MKN45) を 37 °C、5%CO<sub>2</sub> 通気下で 10% fetal bovine serum +RPMI1640 培地にて継代培養した。

### (2) RNA 干渉

ガレクチン-3 siRNA もしくはネガティブコントロールとして、scrambled siRNA を MKN45 に Lipofectamine RNAiMAX を用いてトランスフェクションした。具体的には、Lipofectamine RNAiMAX にガレクチン-3 siRNA もしくは scrambled siRNA を加え、さらに Opti-MEM と混合した後、室温にて 20 分間インキュベートし、80%コンフルエントになるまで継代培養した MKN45 に投与し、37 °C で 48 時間インキュベートした。

### (3) 細胞増殖アッセイ

MKN45 を用い、ガレクチン-3 siRNA もしくはネガティブコントロールとして、scrambled siRNA をトランスフェクションし、48 時間後に Epidermal Growth Factor (EGF) もしくはパクリタキセルを加え、それぞれ 10 分後と 48 時間後に各ウェルに CCK-8 を加え、37 °C

で 20 分間インキュベートした後、マイクロプレートリーダーで 450 nm の吸光度を測定し、細胞増殖を評価した。

#### (4) Western Blotting

前述の通り、MKN45 にガレクチン-3 siRNA もしくはネガティブコントロールとして、scrambled siRNA をトランスフェクションし、37 で 48 時間インキュベートした後、Western Blot にてガレクチン-3 抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) を用いてガレクチン-3 の発現を確認した。さらに、細胞増殖に関わるシグナル伝達系タンパクを評価するために、トランスフェクションから 48 時間後に EGF もしくはパクリタキセルを加え、それぞれ 10 分後と 48 時間後に lysis buffer を用いてタンパク質を抽出した。その後、BCA プロテインアッセイキットを用いてタンパク質濃度を計測し、SDS 電気泳動ゲルの各ウェルに 50  $\mu$ g のタンパク質をアプライし泳動した。電気泳動後に分離したタンパク質をゲルからメンブレンにトランスファーし、一次抗体として Extracellular Signal-regulated Kinase (ERK) 抗体、Phospho-ERK 抗体 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA) を用い、またコントロールとして Anti-GAPDH 抗体 (Santa Cruz Biotechnology) を 4、overnight でそれぞれ反応させ洗浄後、二次抗体を反応させ化学発光法により検出した。

#### 4. 研究成果

(1) 胃癌細胞におけるガレクチン-3 の発現  
胃癌細胞における、ガレクチン-3 の発現を確認するために、ガレクチン-3 siRNA もしくはネガティブコントロールとして、scrambled siRNA を MKN45 にトランスフェクションし、48 時間後に Western Blot にてガレクチン-3 の発現を評価したところ、Figure 1 に示すように、ガレクチン-3 siRNA をトランスフェクションした細胞においてはガレクチン-3 の発現はほとんど認められなかったが、ネガティブコントロールにおいてガレクチン-3 の発現が強く認められた。このことから、胃癌細胞ではガレクチン-3 が多く存在していることが証明された。

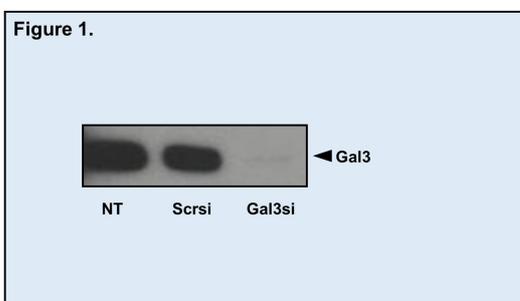


Figure 1.胃癌細胞におけるガレクチン-3 の発現

#### (2) ガレクチン-3 siRNA トランスフェクション胃癌細胞における細胞増殖

ある種の癌において、ガレクチン-3 は細胞増殖に影響を与えると報告されていることから、次に我々はガレクチン-3 の胃癌細胞の増殖に与える影響についての検討を行った。ガレクチン-3 siRNA、もしくはネガティブコントロールとして scrambled siRNA を MKN45 にトランスフェクションし、37 で 48 時間インキュベートした後、EGF を投与し 10 分後に CCK-8 細胞増殖アッセイにて各群の細胞増殖を評価した。

その結果、Figure 2 に示すように、ガレクチン-3 siRNA をトランスフェクションし発現を抑えた細胞においては、コントロール群に比べて有意に細胞増殖が抑制されていた。この結果から、ガレクチン-3 は胃癌における細胞増殖を調節しているということが証明された。

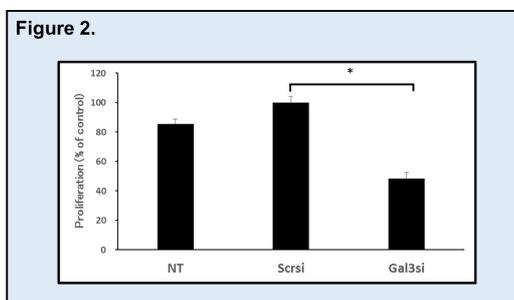


Figure 2.ガレクチン-3 siRNA トランスフェクション胃癌細胞における細胞増殖

#### (3) ガレクチン-3 siRNA トランスフェクション胃癌細胞におけるリン酸化 ERK の発現

MAPK シグナル伝達系は細胞増殖において重要な役割を果たすと言われている。いくつかの研究においてガレクチン-3 の発現を抑えると ERK リン酸化が抑制され、細胞増殖が低下すると報告されていることから、次に我々はガレクチン-3 の ERK シグナル伝達系への関与を検討することとした。ガレクチン-3 siRNA もしくはネガティブコントロールとして、scrambled siRNA を MKN45 にトランスフェクションし、37 で 48 時間インキュベートした後、EGF を投与し 10 分後に Western Blot にて ERK のリン酸化を評価したところ、Figure 3A に示すように、ガレクチン-3 siRNA トランスフェクション細胞におけるリン酸化 ERK は、コントロール群に比較して発現が抑えられていることがわかった。

我々は更に、細胞周期と細胞分裂を調節することにより、細胞増殖に関与するシグナル伝達系タンパクの一つである、Akt についても検討を行ったが (Figure 3B)、その発現は各群で違いが認められなかった。

これらの結果から、ガレクチン-3 を抑制すると ERK シグナル伝達系が抑えられ、結果として細胞増殖が抑制されることが示された。

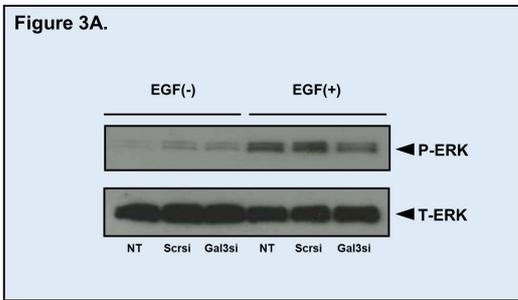


Figure 3A. ガレクチン-3 siRNA トランスフェクション胃癌細胞におけるリン酸化 ERK の発現

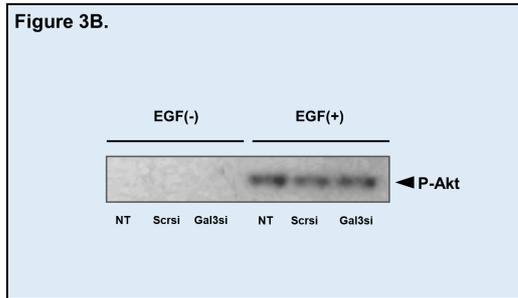


Figure 3B. ガレクチン-3 siRNA トランスフェクション胃癌細胞におけるリン酸化 Akt の発現

**(4) ガレクチン-3 siRNA トランスフェクション胃癌細胞にパクリタキセルを投与した際の細胞増殖**

パクリタキセルは細胞増殖を抑制する作用があることはいくつかの研究で示されている。これまでの研究で、ガレクチン-3 siRNA をトランスフェクションした胃癌細胞において細胞増殖が抑制されたことから、ガレクチン-3 siRNA をトランスフェクションし、ガレクチン-3 の発現を抑制した胃癌細胞にパクリタキセルを投与すると、パクリタキセルの細胞増殖抑制効果がさらに増強すると仮定し、ガレクチン-3 siRNA もしくはネガティブコントロールとして、scrambled siRNA を MKN45 にトランスフェクションし、37 で 48 時間インキュベートした後、パクリタキセルを投与し 48 時間後に CCK-8 細胞増殖アッセイにて各群の細胞増殖を計測した。その結果、Figure 4 に示すようにガレクチン-3 siRNA / パクリタキセル投与群における細胞増殖は scrambled siRNA / パクリタキセル投与群と比較して著明に抑制されていた。この結果から、ガレクチン-3 を抑制すると、パクリタキセルの抗腫瘍効果が増強し、胃癌細胞における細胞増殖抑制効果が高まることが示された。

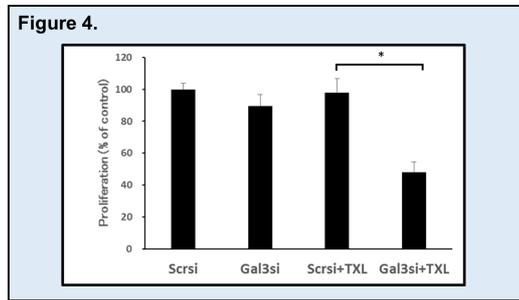


Figure 4. ガレクチン-3 siRNA / パクリタキセル投与胃癌細胞における細胞増殖

**(5) ガレクチン-3 siRNA/パクリタキセル投与胃癌細胞におけるリン酸化 ERK の発現**

パクリタキセルは MAPK シグナル伝達系を含むチロシンキナーゼ活性の調節に参与しているという報告がある。また、これまでの実験で我々は、ガレクチン-3 の発現を抑制した胃癌細胞にパクリタキセルを投与すると、パクリタキセルの抗腫瘍効果が増強し、細胞増殖抑制効果が高まることが示されてきた。そこで、ガレクチン-3 siRNA にてガレクチン-3 の発現を抑制した胃癌細胞に、パクリタキセルを投与した際の、シグナル伝達系タンパクの関与を調べるため、ERK のリン酸化を評価することとした。

前述の実験と同様に、ガレクチン-3 siRNA もしくはネガティブコントロールとして、scrambled siRNA をトランスフェクションし、ガレクチン-3 の発現を抑制した MKN45 に、パクリタキセルを投与し 48 時間後に Western Blot にてリン酸化 ERK の発現を検討した。その結果、Figure 5 に示すように、ガレクチン-3 siRNA / パクリタキセル投与群におけるリン酸化 ERK はコントロール群と比較して、発現が抑えられていることがわかった。以上の実験結果から、胃癌細胞ではガレクチン-3 が強く発現しており、その発現を抑えることで、ERK シグナル伝達系の抑制を介して、細胞増殖が抑えられ、また同細胞にパクリタキセルを投与すると、パクリタキセルの抗腫瘍効果が増強し、細胞増殖抑制効果が高まることが示された。今後の胃癌治療において、ガレクチン-3 が重要な役割を果たす可能性が示唆された。

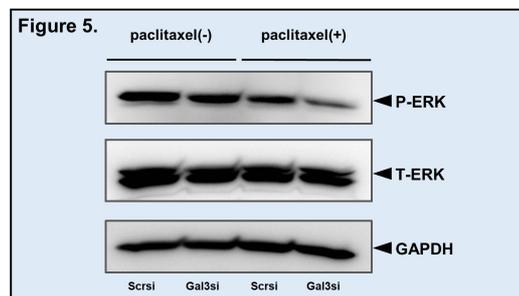


Figure 5. ガレクチン-3 siRNA/パクリタキセル投与胃癌細胞におけるリン酸化 ERK の発現

<引用文献>

Randomized, open-label, phase III study comparing irinotecan with paclitaxel in patients with advanced gastric cancer without severe peritoneal metastasis after failure of prior combination chemotherapy using fluoropyrimidine plus platinum: WJOG 4007 trial. J Clin Oncol. 2013 Dec 10;31(35):4438-44.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Galectin 3 regulates HCC cell invasion by RhoA and MLCK activation. Nobuko Serizawa, Jijing Tian, Hiroo Fukada, Kornelia Baghy, Fiona Scott, Xiangling Chen, Zsafia Kiss, Kristin Olson, Dan Hsu, Fu-Tong Liu, Natalie J Török, Bin Zhao & Joy X Jiang.

Lab Invest. 2015 Oct; 95(10):1145-56.

<https://www.nature.com/articles/labinvest201577> 査読あり

〔学会発表〕(計2件)

Galectin-3 promotes cell proliferation and attenuates cytotoxic effect of paclitaxel via ERK signaling pathway in gastric cancer cells.

Nobuko Serizawa, Akihito Nagahara, Shunhei Yamashina, Yoshihiro Inami, Sumio Watanabe.ESMO asia 2017.

胃癌におけるガレクチン-3の細胞増殖効果と機能解明

芹澤信子, 永原章仁, 山科俊平, 稲見義宏, 渡辺純夫

第103回消化器病学会総会 2017年

6. 研究組織

(1)研究代表者

芹澤 信子 (SERIZAWA, Nobuko)

順天堂大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：00445545

(2)研究分担者

永原 章仁 (NAGAHARA, Akihito)

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号：00266040

北條 麻理子 (HOJO, Mariko)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：60372934