

令和 3 年 6 月 20 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09136

研究課題名(和文) 泌尿器癌の進展におけるガレクチン-3の分子機構の解明と治療応用

研究課題名(英文) Elucidation of the molecular mechanism of galectin-3 in the progression of urological cancer

研究代表者

福森 知治 (FUKUMORI, Tomoharu)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・徳島大学専門研究員

研究者番号：10314874

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)：泌尿器癌における治療抵抗性について様々な視点からガレクチン-3との関連性を評価した。去勢抵抗性前立腺癌におけるガレクチン-3とPARP阻害剤との関連性を検討しガレクチン-3が抗がん剤やPARP阻害薬の抵抗性に関与していた。尿路上皮癌におけるガレクチン-3と癌免疫寛容との関連性を検討し、ガレクチン-3がCD8陽性T細胞に関連している可能性が示唆された。ガレクチン-3ノックアウト 尿路上皮癌モデルの樹立、CRISPR-Cas9法で作成したガレクチン-3ノックアウトMBT-2細胞での癌免疫の微小環境研究の構築を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

泌尿器癌における治療抵抗性について様々な視点からガレクチン-3との関連性を評価した。ガレクチン-3は泌尿器癌全般に治療抵抗性に関与しているが、詳細な機序はわかっていない。今回の我々の研究から、ガレクチン-3がどのように治療抵抗性に関与しているかを解明し治療抵抗性を改善し、今後の癌治療の発展につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：We evaluated the relationship between galectin-3 and resistance to treatment in urological cancers from various perspectives. We investigated the relationship between galectin-3 and PARP inhibitors in castration-resistant prostate cancer and found that galectin-3 was involved in resistance to anticancer drugs and PARP inhibitors. We investigated the relationship between galectin-3 and cancer immune tolerance in urothelial carcinoma, suggesting that galectin-3 may be related to CD8-positive T cells. We established a galectin-3 knockout urothelial carcinoma model and constructed a microenvironmental study of cancer immunity in galectin-3 knockout MBT-2 cells generated by the CRISPR-Cas9 method.

研究分野：泌尿器癌

キーワード：尿路上皮癌 前立腺癌 ガレクチン-3

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

去勢抵抗性前立腺癌および転移性の腎細胞癌、尿路上皮癌は様々な既存治療に抵抗性であり、予後不良な症例が問題となっている。これらの疾患に対する新しい治療法の確立は、泌尿器科医がブレイクスルーすべき最も重要な課題である。去勢抵抗性前立腺癌においては、アンドロゲン受容体を介さず腫瘍細胞の増殖、浸潤やアポトーシスを直接制御する分子が同定されつつあり、これらの分子を制御することで腫瘍の増殖、浸潤、転移を阻止し、化学療法や放射線療法の感受性を高めることが去勢抵抗性前立腺癌に対する新しい治療戦略として重要である。転移性腎細胞癌においては VEGFR 阻害剤による分子標的治療が治療の中心であり、治療抵抗性には血管新生の制御が重要な役割を果たしている。様々な分子が血管新生を制御することで、血管新生阻害剤である VEGFR 阻害剤の感受性を高める可能性が示唆される。転移性尿路上皮癌においてはゲムシタピンおよびシスプラチンによる化学療法耐性が臨床上も最も問題であり、抗がん剤投与時のアポトーシスを制御することで、抗がん剤の感受性を高めることが可能である。ガラクトース結合レクチンの1つであるガレクチン-3は免疫細胞や様々な癌細胞の増殖、浸潤、遊走、血管新生、アポトーシスを制御することが知られており、われわれはそのメカニズムを解明してきた (Cancer Res. 66: 3,114, 2006, Cancer Res. 64: 3376, 2004, Mol Cell Biol. 24: 4395, 2004, Cancer Res. 63: 8302, 2003, J Biol. Chem. 277: 6852, 2002)。われわれは、ガレクチン-3が、(1) ホルモン非感受性前立腺癌、腎細胞癌、尿路上皮癌細胞株で強発現していること、(2) 去勢抵抗性前立腺癌、腎細胞癌、尿路上皮癌の患者血清で強発現していること (J Med Invest. 55: 127, 2008, J Med Invest. 57: 152, 2010)、(3) 前立腺癌細胞のアポトーシスシグナルを調節しシスプラチンやエトポシドなどの抗がん剤耐性に関与すること (Cancer Research 66: 3114, 2006, Drug Resistant Updates 10: 101, 2007)、(4) 尿路上皮癌では Akt のリン酸化に関与して TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) で誘導されるアポトーシスを制御すること (Cancer Res. 65: 7546, 2005)、(5) 前立腺癌と腎細胞癌でガレクチン-3の発現がマウス転移モデルにおける腫瘍の血管新生の促進に関与することを見いだしており、これらの結果は、ガレクチン-3が前立腺癌、腎細胞癌、膀胱癌の腫瘍の進展や、治療抵抗性に関与することを強く示唆するものである。

2. 研究の目的

本研究では治療に難治性の泌尿器科癌、すなわち去勢抵抗性前立腺癌、転移性腎細胞癌、転移性尿路上皮癌におけるガレクチン-3の治療応用を念頭に置き、われわれが既に確立しているマウス転移モデルを用いて、ガレクチン-3の腫瘍の増殖、浸潤・転移への関与と、既存の治療抵抗性の機序を解明することを目的とする。最終的に治療抵抗性泌尿器科癌の臨床治療への応用を目指すものである。

3. 研究の方法

- (1) 去勢抵抗性前立腺癌におけるガレクチン-3と PARP 阻害剤との関連性
前立腺癌細胞に対するタキサン系抗がん剤および PARP 阻害剤の薬剤耐性に及ぼすガレクチン-3の作用とそのメカニズムを解明するため、LNCaP 細胞およびガレクチン-3が強発現した LNCaP-Gal-3 細胞に 1 nM のドセタキセルあるいは 10 μM のオラパリブ (PARP 阻害薬) を投与し、治療効果の差を細胞のアポトーシスの程度で検討する。
- (2) 尿路上皮癌におけるガレクチン-3と癌免疫寛容との関連性
当院での膀胱全摘症例の切除組織についてガレクチン-3の免疫染色解析、CD8 陽性 T 細胞について免疫染色解析した。癌周囲の CD8 陽性 T 細胞の状況を評価した。
- (3) ガレクチン-3 ノックアウト 尿路上皮癌モデルの樹立
CRISPR-Cas9 法で作成したガレクチン3 ノックアウト MBT-2 細胞での癌免疫の微小環境研究の構築を行った。MBT-2(コントロール)と MBT-2(ガレクチン-3 ノックアウト)をマウスに移植して腫瘍移植が可能かどうか検討した。

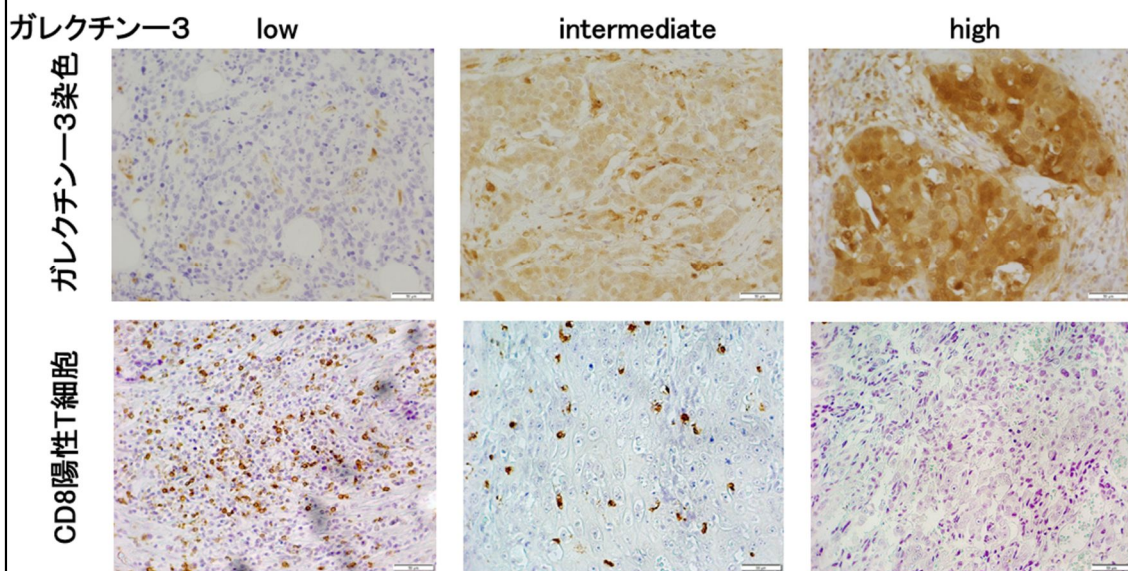
4. 研究成果

前立腺癌細胞に対するタキサン系抗がん剤および PARP 阻害剤の薬剤耐性に及ぼすガレクチン-3の作用とそのメカニズムを解明するため、LNCaP 細胞およびガレクチン-3が強発現した LNCaP-Gal-3 細胞に 1 nM のドセタキセルあるいは 10 μM のオラパリブを投与し、治療効果の差を細胞のアポトーシスの程度で検討した。その結果、ドセタキセル投与群では、LNCaP 細胞のアポトーシス細胞の割合は 17.4%に対して LNCaP-Gal-3 細胞では 6.8%と有意にアポトーシスが抑制された。オラパリブ投与群でも同様に、LNCaP 細胞のアポトーシス細胞の割合が 24.2%であったのに対して LNCaP-Gal-3 細胞では 8.9%と有意にアポトーシスが抑制された。以上の結果より、タキサン系抗がん剤および PARP 阻害剤の薬剤耐性にガレクチン-3が関与することが証明された。薬剤耐性に関与する分子メカニズムを解明するため、microarray を用いた最新のバイオインフォマティクス解析した結果、LNCaP-Gal-3 細胞では PI3K - Akt シグナルが増強し、Akt のリン酸化が促進された。また細胞増殖に関与する TGF-beta シグナルも増強し EGF や TGF-beta の発現が増強していた。さらに PARP 関連因子でアポトーシスに関与する PARP14 の発現も増強していた。この研究で、去勢抵抗性前立腺癌での重要な治療の1つであるタキサン系抗がん剤と、将来的に臨床応用が期待される PARP 阻害剤の薬剤耐性にガレクチン-3が関与することが示さ

れ、ガレクチン - 3 の発現に関連する候補分子が同定された。この結果からガレクチン - 3 をターゲットにした治療の有用性が示され、今後、去勢抵抗性前立腺癌治療薬の感受性を高める治療法開発が期待される結果となった。「治療抵抗性におけるガレクチン - 3 の関与と分子メカニズムの解明」の前立腺癌の項目のうち、前立腺癌細胞に対するタキサン系抗がん剤による化学療法および PARP 阻害剤耐性にガレクチン - 3 が関与することが証明された。またガレクチン - 3 の治療抵抗性のメカニズムを microarray で網羅的に遺伝子解析を行い、様々なキーマーカー分子を同定した。これらの成果は 2019 年米国泌尿器科学会で発表し、研究はおおむね順調に進んだ。

2019 年度は治療抵抗性におけるガレクチン - 3 の関与と分子メカニズムの解明について、特に尿路上皮癌について研究を行った。当院での膀胱全摘症例の切除組織について HE 染色及びガレクチン - 3 の免疫染色解析をしたところ、ガレクチン - 3 高発現組織ではリンパ球数が少ないことがわかった。さらに詳細に検討するため、CD8 陽性 T 細胞について免疫染色解析した。ガレクチン - 3 発現と CD8 陽性 T 細胞数と逆相関していることがわかった。

尿路上皮癌手術検体



ガレクチン - 3 による CD8 陽性 T 細胞への影響が示唆されたので、ガレクチン - 3 タンパク質を CD8 陽性 T 細胞にどのように影響するかを検討した。ガレクチン - 3 タンパク質による処理後、CD8 陽性 T 細胞数をフローサイトメトリー法で解析した結果、明らかな変化を認めなかった。またアネキシン V によるアポトーシス変化を確認したが、CD8 陽性 T 細胞への影響は明らかではなかった。また膀胱癌のガレクチン - 3 発現と CD8 陽性 T 細胞の関連をマウスモデルで確認するために、マウス由来の膀胱癌細胞株 MBT-2 のガレクチン - 3 ノックアウト細胞を作製した。

本研究で、実験計画の「治療抵抗性におけるガレクチン - 3 の関与と分子メカニズムの解明」の膀胱癌の項目のうち、膀胱癌に対する CD8 陽性 T 細胞の影響をガレクチン - 3 が関与することで免疫による腫瘍抑制を妨げている可能性が示唆された。マウス由来の膀胱癌細胞株 MBT-2 のガレクチン - 3 ノックアウト細胞を作製し、ガレクチン - 3 発現のあるコントロールと比較して、腫瘍自体への CD8 陽性 T 細胞の浸潤度の違いを検討した。

膀胱癌に対する CD8 陽性 T 細胞の影響をガレクチン - 3 が関与することで免疫による腫瘍抑制を妨げている可能性が示唆された。この結果から、膀胱癌に対する PD1 抗体の阻害時の抗腫瘍効果がガレクチン - 3 の有無によって異なる可能性が示唆される。

最終年度に実施した研究成果は前年度に CRISPR-Cas9 法で作成したガレクチン 3 ノックアウト MBT-2 細胞での癌免疫の微小環境研究の構築を行った。MBT-2(コントロール)と MBT-2(ガレクチン - 3 ノックアウト)をマウスに移植して腫瘍移植が可能かどうか検討した。MBT-2(コントロール)については通常の免疫を有する C3H/HeN mice について移植可能であったのに対して、MBT-2(ガレクチン - 3 ノックアウト)は移植することができなかった。MBT-2(コントロール)については腫瘍内に免疫細胞の浸潤を認めなかった。仮説として CD8 陽性 T 細胞の影響をガレクチン - 3 が関与することで免疫による腫瘍抑制を妨げている可能性が示唆された。本研究を通じて、ガレクチン - 3 の癌免疫寛容機構を研究するための基盤が整った。本研究の重要性としては抗 PD1 抗体による治療抵抗性腫瘍においてガレクチン - 3 が重要な免疫治療抵抗性機構に関与していることが示され、新たな治療ストラテジーにつながると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Daizumoto Kei, Yoshimaru Tetsuro, Matsushita Yosuke, Fukawa Tomoya, Uehara Hisanori, Ono Masaya, Komatsu Masato, Kanayama Hiro-omi, Katagiri Toyomasa	4. 巻 78
2. 論文標題 A DDX31/Mutant-p53/EGFR Axis Promotes Multistep Progression of Muscle-Invasive Bladder Cancer	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Research	6. 最初と最後の頁 2233 ~ 2247
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/0008-5472.CAN-17-2528	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 -

1. 著者名 KUSUHARA YOSHITO, DAIZUMOTO KEI, KAWAI KAICHI, HIRAYAMA KENTO, KOWADA MINORU, SHINTANI TERUMICHI, FUKUHARA YAYOI, DONDOO TSOGT-OCHIR, OZAKI KEISUKE, TSUDA MEGUMI, FUKAWA TOMOYA, NAKATSUJI HIROYOSHI, BANDO YOSHIMI, UEHARA HISANORI, FUKUMORI TOMOHARU, TAKAHASHI MASAYUKI, KANAYAMA HIRO-OMI	4. 巻 39
2. 論文標題 Low Expression of Toll-like Receptor 4 Is Associated With Poor Prognosis in Bladder Cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 703 ~ 711
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancerres.13166	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13件（うち招待講演 0件／うち国際学会 5件）

1. 発表者名 大豆本圭、福原弥生、尾崎啓介、津田恵、楠原義人、森英恭、布川朋也、山本恭代、山口邦久、福森知治、高橋正幸、金山博臣、上原久典
2. 発表標題 当科における患者腫瘍組織移植PDX (patient-derived xenograft)モデル作製の取り組みとMicropapillary urothelial carcinomaのPDX modelの樹立
3. 学会等名 日本泌尿器科学学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福原弥生、大豆本圭、布川朋也、上原久典、小和田実、福森知治、高橋正幸、金山博臣
2. 発表標題 淡明細胞型腎細胞癌のPDC (Patient-Derived Cell)の樹立
3. 学会等名 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大豆本圭、福原弥生、上原久典、宇都義浩、小和田実、布川朋也、福森知治、高橋正幸、金山博臣
2. 発表標題 徳島大学病院におけるPDXモデルの確立と微小乳頭状尿路上皮癌における有効な治療法の開発
3. 学会等名 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福森知治、森英恭、楠原義人、布川朋也、山本恭代、山口邦久、高橋正幸、久保亜貴子、川中崇、古谷俊介、生島仁史、湊淳、木内慎一郎、金山博臣
2. 発表標題 限局性前立腺癌に対する ¹²⁵ I-125密封小線源療法 ¹²⁵ Iの10年の長期成績
3. 学会等名 日本癌治療学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomoharu Fukumori, Kei Daizumoto, Megumi Tsuda, Keisuke Ozaki, Yoshito Kusahara, Hidehisa Mori, Tomoya Fukawa, Yasuyo Yamamoto, Kuniyoshi Yamaguchi, Masayuki Takahashi, Hiro-omi Kanayama,
2. 発表標題 Galectin-3 is involved in the tumor progression and drug resistance induced by taxane chemotherapy and poly(adenosine diphosphate [ADP]-ribose) polymerase (PARP) inhibitor in castration-resistant prostate cancer
3. 学会等名 AUA (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masayuki Takahashi, Kei Daizumoto, Yayoi Yamago, Keisuke Ozaki, Megumi Tsuda, Yoshito Kusahara, Hidehisa Mori, Tomoya Fukawa, Yasuyo Yamamoto, Kuniyoshi Yamaguchi, Tomoharu Fukumori, Hiro-omi Kanayama
2. 発表標題 Correlation of the insulin receptor expression changes by the administration of VEGFR-TKI and the resistance to the VEGFR-TKI in clear cell renal cell carcinoma
3. 学会等名 日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大豆本圭、山子弥生、尾崎啓介、楠原義人、森英恭、布川朋也、山本恭代、山口邦久、福森知治、高橋正幸、金山博臣
2. 発表標題 前立腺肥大症におけるGalectin-3の機能解析
3. 学会等名 日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hidehisa Mori, Tomoharu Fukumori, Kei Daizumoto, Keisuke Ozaki, Yoshito Kusahara, Tomoya Fukawa, Yasuyo Yamamoto, Kunihisa Yamaguchi, Masayuki Takahashi, Hiro-omi Kanayama
2. 発表標題 What is an appropriate definition of IPSS resolution that correlates closely with QOL recovery after prostate brachytherapy?
3. 学会等名 AUA (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kei Daizumoto, Yayoi Fukuhara, Keisuke Ozaki, Yoshito Kusahara, Hidehisa Mori, Tomoya Fukawa, Yasuyo Yamamoto, Kunihisa Yamaguchi, Tomoharu Fukumori, Masayuki Takahashi, Hiro-omi Kanayama
2. 発表標題 Galectin-3 plays critical roles for the growth of benign prostatic hyperplasia.
3. 学会等名 AUA (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tomoya Fukawa, Kei Daizumoto, Hiroyoshi Nakatsuji, Tomoharu Fukumori, Masayuki Takahashi, Hiro-omi Kanayama
2. 発表標題 The contribution of HGF-MET-MMP1 signaling in bladder cancer invasion, and MET inhibitor as a potential therapeutic option for invasive bladder cancer.
3. 学会等名 AUA (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masayuki Takahashi, Kei Daizumoto, Yayoi Fukuhara, Keisuke Ozaki, Megumi Tsuda, Yoshito Kusahara, Hidehisa Mori, Tomoya Fukawa, Yasuyo Yamamoto, Kunihisa Yamaguchi, Tomoharu Fukumori, Hiroomi Kanayama
2. 発表標題 Correlation of the insulin receptor expression and the resistance to vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in advanced clear cell renal cell carcinoma
3. 学会等名 AUA (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 福原弥生、大豆本圭、小和田実、布川朋也、中達弘能、福森知治、高橋正幸、金山博臣
2. 発表標題 微小乳頭型尿路上皮癌のPDXモデルの樹立とリン酸化解析
3. 学会等名 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masayuki Takahashi, Kei Daizumoto, Yayoi Fukuhara, Minoru Kowada, Yoshimi Bando, Tomoya Fukawa, Tomoharu Fukumori, Hiroomi Kanayama
2. 発表標題 The significance of insulin receptor expression in vascular endothelial cells of clear cell renal cell carcinoma
3. 学会等名 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018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
研究分担者	金山 博臣 (KANAYAMA Hiroomi) (10214446)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・教授 (16101)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	高橋 正幸 (TAKAHASHI Masayuki) (50325255)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部（医学域）・准教授 (16101)	
研究分担者	布川 朋也 (FUKAWA Tomoya) (70564342)	徳島大学・病院・講師 (16101)	

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