

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：72690

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08699

研究課題名(和文) ガレクチンを標的として胃癌の腹膜転移を抑制・治療する

研究課題名(英文) Targeting galectins to suppress and treat peritoneal metastasis of gastric cancer

研究代表者

高田 美生 (Takada, Yoshio)

公益財団法人野口研究所・研究部・室長

研究者番号：60867688

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：低分化型胃癌細胞に高発現するガレクチン-4が腹膜播種の進展に関与している可能性が考えられ、このガレクチン-4機能を阻害することが胃癌腹膜播種の治療に繋がることが期待されている。そこで本研究では、ガレクチン-4に対する様々な阻害物を創製して評価を行った。その結果、ガレクチン-4 siRNA、低分子フコイダン誘導体ならびに糖転移酵素B3GALT5遺伝子を用いた際にガレクチン-4を発現する胃癌細胞が有する腹膜播種能を抑制する効果が認められた。今後これら阻害物にさらに磨きをかけてより強力な阻害剤を創製することで、胃癌腹膜播種の新たな治療法として展開するものと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

転移や再発をきたし胃癌の死亡率上昇の大きな原因でもある腹膜播種は、外科的手術で切除することは難しく、また特異的な分子標的治療薬も存在しない。この胃癌腹膜播種の進展に関与するガレクチン-4を標的とした創薬研究は、胃癌の転移に関する新たな進展メカニズムを明らかとすると同時に、全く新しいメカニズムの治療法を提供することに結び付くものと考えられる。本研究で見出したガレクチン-4阻害物は、今後の探索研究ならびに創薬研究を経て画期的な治療薬となり得る可能性があり、特異的な治療法の無い胃癌腹膜播種の患者さんを救うことにも繋がる。

研究成果の概要(英文)：Galectin-4, which is highly expressed in poorly differentiated gastric cancer cells, may be involved in the progression of peritoneal dissemination, and it is expected that inhibition of galectin-4 function will lead to the treatment of gastric cancer peritoneal dissemination. Therefore, in this study, various inhibitors against galectin-4 were created and evaluated. As a result, when galectin-4 siRNA, low-molecular-weight fucoidan derivatives, and glycosyltransferase B3GALT5 genes were used, the effect of suppressing the peritoneal disseminating ability of gastric cancer cells expressing galectin-4 was observed. In the future, by further refining these inhibitors and creating more powerful inhibitors, it is thought that they will be developed as a new treatment for peritoneal dissemination of gastric cancer.

研究分野：糖鎖生物学

キーワード：ガレクチン-4 胃癌 腹膜播種 siRNA フコイダン誘導体 B3GALT5

1. 研究開始当初の背景

胃癌は日本国内で年間罹患数：約 13 万人、年間死亡者数：約 4 万人と癌の中で第 3 位と頻度が高く、その治療は化学療法と外科的な癌組織切除を組み合わせで行われている。特に転移や再発をきたし切除することが難しい場合には非常に予後が悪く、活発に転移し全身に拡散する遠隔転移性の強い癌では 5 年生存率は 3%とも言われている。胃癌の転移としては、腹膜播種、リンパ節転移、血行性転移という 3 つの経路が存在するが、それぞれの転移経路に特異的な診断マーカーや分子標的治療薬は存在しない。その中で腹膜播種は癌細胞が腹膜に散らばるように転移するもので、胃粘膜の下層に広がり増殖するタイプのスキルス性胃癌など悪性度の高い胃癌で特に多く、発見が難しく手術切除が不可能な例が多い。そのため、この様な低分化型で高転移性の癌に関するメカニズムを解明し、新たな癌治療法を開発することが求められている。

ガレクチンは α -ガラクトシド構造を認識して結合あるいは糖鎖同士を架橋するタンパク質であり、哺乳類には 14 種類存在して相同性の高い一次配列を有する。その役割として、発生、分化、形態形成、腫瘍転移、アポトーシスといった様々な生命現象に参与することが知られている。その中の一つガレクチン-4 は 2 つの糖認識ドメイン (CRD; carbohydrate-recognition domain) を持つ tandem-repeat type のガレクチンで、リンカー部分を介して 2 量体化することで生理作用を発揮するものと考えられ、通常消化管に特異的に発現し、他のガレクチンに比べて O 型糖鎖や硫酸化糖脂質に親和性が高い。さてこのガレクチン-4 だが、消化管以外の組織において発現亢進と癌悪性度の変化が報告され、また前立腺癌細胞において樹立した高転移株でガレクチン-4 の発現が上昇することが報告されるなど、癌の悪性化との関係が強く示唆されている。

我々は、ガレクチン-4 の発現と胃癌転移性との関係を明らかとすべく各種胃癌細胞株におけるガレクチン-4 の発現を検討した結果、高転移性低分化型のスキルス性胃癌細胞株にガレクチン-4 が高発現していることが確認された。そこで、その中で最もガレクチン-4 を高発現する NUGC4 細胞を用いてガレクチン-4 の発現をノックアウトした KO 株を樹立し、ヌードマウスの腹腔に移植して腹膜播種の発生状況を解析した。その結果、ガレクチン-4 を発現する NUGC4 細胞を移植すると腹膜播種が起こるものの、KO 株の移植では腹膜播種は認められなかった。さらに、この KO 株にガレクチン-4 遺伝子を導入してガレクチン-4 を再度発現するようにした Res 株の移植では腹膜播種の形成が一部回復したことから、この NUGC4 細胞が有する腹膜播種能にガレクチン-4 が何らかの役割を果たしているものと考えられた。

2. 研究の目的

ガレクチン-4 の発現と腹膜播種の形成が相関することから、胃癌の転移においてガレクチン-4 が何らかの役割を果たしている可能性が考えられる。本研究の目的は、ガレクチン-4 の機能を阻害することでガレクチン-4 が関与する胃癌の転移を抑制する新しいメカニズム

ムの胃癌治療法と特異的な阻害剤を提供することである。

3. 方法ならびに結果・考察

1) ガレクチン-4 機能を測る評価系の整備

ガレクチン-4 機能の阻害を評価するために、細胞増殖評価系、結合評価系、表面プラズモン共鳴法 (SPR 法) といった一連の評価系整備を行った。

2) 候補阻害物の調製とその評価結果

ガレクチン-4 機能を阻害して胃癌腹膜播種を抑制することを検討するために様々なガレクチン-4 阻害物を調製し、上記各評価系に加えてガレクチン-4 を発現するヒト胃癌細胞株 (NUGC4 ならびに MKN45) に対してその効果を検討した。

ガレクチン-4 CRD : ガレクチン-4 は2つの CRD を介して糖鎖と結合することでその生理作用を発揮する。つまり、このガレクチン-4 CRD を1つのみ有するタンパク質は糖鎖と結合してもガレクチン-4 の生理作用は有さずに、ガレクチン-4 の阻害物として働く可能性が考えられる。そこで、各種ガレクチン-4 CRD 遺伝子 (N 端側 CRD、C 端側 CRD) をトランスフェクションあるいはアデノ随伴ウィルスベクターを用いて胃癌細胞株へ導入して発現する方法、または別途発現して精製した組換えガレクチン-4 CRD タンパク質 (N 端側 CRD、C 端側 CRD) を胃癌細胞株に添加する方法で、ガレクチン-4 に対する阻害作用を評価した。しかし、ガレクチン-4 CRD の発現あるいは組換えタンパク質添加による阻害効果は確認されなかった。今回検討した条件では、ガレクチン-4 と糖鎖の結合を阻害することができないものと考えられた。

ガレクチン-4 siRNA : 腹膜播種能を有するヒト胃癌細胞株で発現するガレクチン-4 をノックアウトすることで細胞の腹膜播種能を減弱させることが確認されていることから、ガレクチン-4 の発現低下が胃癌腹膜播種を抑制させることに繋がることが考えられる。そこでガレクチン-4 に対する特異的な siRNA を創製し、ガレクチン-4 の発現をノックダウンしてその効果を検討した。胃癌細胞株にガレクチン-4 siRNA を導入すると、ガレクチン-4

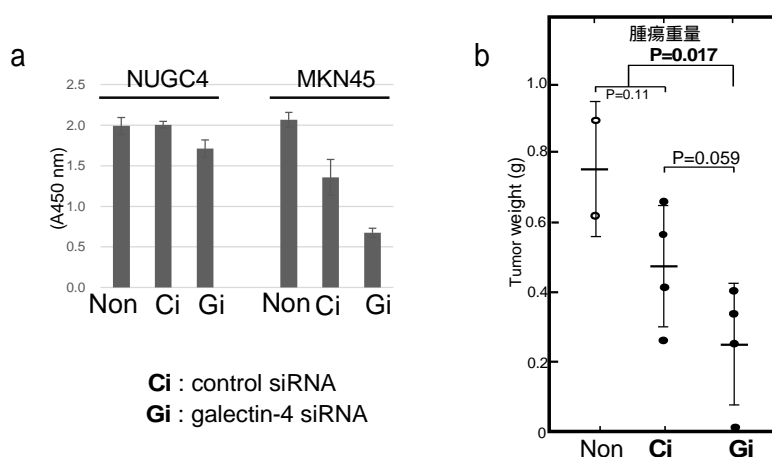


図1

の発現が抑制され、さらに細胞増殖が阻害されること(図1a) また MKN45 細胞を移植して胃癌腹膜播種を誘導したモデルマウスにガレクチン-4 siRNA を投与すると腫瘍重量が抑制される傾向が認められた(図1b)。このガレクチン-4 siRNA を胃癌腹膜播種治療薬として展開するためには、今後 siRNA について生体内で安定かつ最大限の効果を出すための設計や剤形などに関する検討の他、胃癌腹膜播種の進展においてどのタイミングで siRNA 投与による治療が可能なのかなどを検討する必要がある。

低分子フコイダン誘導体：新たな阻害剤候補としてフコイダンに着目した。フコイダンは海藻由来の多糖類で、様々な研究で抗腫瘍作用などの生理作用が報告されている。過去の研究でフコイダンがガレクチン-4 に作用することが示されており、フコイダンの有する抗腫瘍作用がガレクチン-4 を介して発揮している可能性が考えられた。そこで、NUGC4 細胞 Wild 株とそのガレクチン-4 KO 株にフコイダンを添加して細胞増殖への影響を調べたところ、KO 株に比べて Wild 株は増殖が強く阻害されることが明らかとなった(図2)。

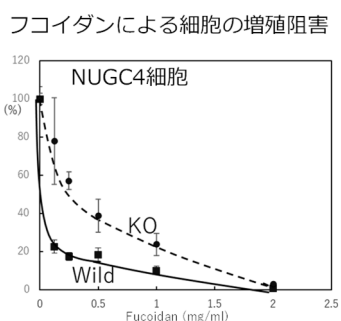


図2

からガレクチン-4 に対する阻害作用において構造活性相関などの考察も行うことができる。当該研究グループとの共同研究によりライブラリーを入手して細胞増殖評価を行ったところ、ライブラリー15 種類のうち 4 種類において活性が認められ、結合評価系と SPR 法を用いた評価でも同じ化合物において用量依存的な活性が確認された(図3)。

この活性のあるフコイダン誘導体は、NUGC4 細胞の増殖阻害や癌転移関連分子である pMET の発現低下が確認され、ガレクチン-4 を介した腹膜播種を抑制する可能性が示唆された。さらに活性を強くすることができれば、in vivo 試験による薬理作用を確認することも可能となることが期待される。

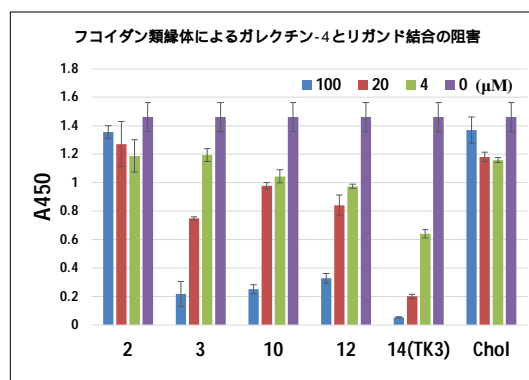


図3

低分子化合物：低分子化合物としての阻害剤に関する検討を開始した。ヒトガレクチン-4 の共結晶構造から、計算科学的手法により特定のガレクチン-4 アミノ酸残基と相互作用を増強する可能性のある修飾を見出した。さらに、リガンド結合部位に存在するガレクチン-4 特異的なアミノ酸残基に着目し、ガレクチン-4 と α -ラクトースの結晶構造から最も近

接位に存在するグルコース 2 位に相互作用を指向した官能基を有する誘導体の合成を行った。合成した計 6 種の化合物について SPR 法で評価を行い、ガレクチン-4 に対する結合量ならびに結合親和性が向上した化合物が認められたが、活性が強いものを見出すことはできなかった。

B3GALT5 遺伝子：ガレクチン-4 が関与する胃癌腹膜播種の進展メカニズムを解明する過程で、ガレクチン-4 KO 株など腹膜播種能の無い細胞において発現亢進する中性糖脂質の存在が明らかとなった。この糖脂質の糖鎖を合成する糖転移酵素を検索したところ、B3GALT5 (β 1,3-galactosyltransferase 5) という酵素が同定された。そこで本酵素遺伝子を導入発現させた NUGC4 細胞を樹立して糖鎖構造の変化を解析すると、KO 株で確認されたものと同様の糖脂質パターンが認められ、さらに動物試験で腹膜播種能がほぼ完全に抑制されることが明らかとなった (図 4)。この B3GALT5 遺伝子導入法は in vivo での効果も強く、新たな高転移性癌治療法となることが期待される。

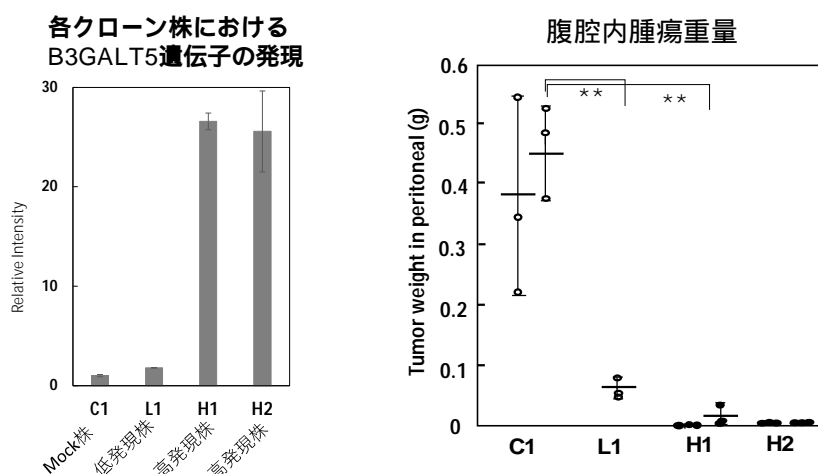


図 4

4. まとめ

ガレクチン-4 を介した胃癌腹膜播種に対する新たな治療法として、ガレクチン-4 機能を阻害する様々な阻害物を創製して検討を行った。平行して進めていたガレクチン-4 による胃癌腹膜播種の進展に関するメカニズム解明の結果、ガレクチン-4 はマスターレギュレーターとして多くの癌関連分子の制御を行っていることが示され、このガレクチン-4 を標的とする治療法はより強い効果のあるがん治療法を提供できる可能性が高い。今回のガレクチン-4 阻害剤の検討を通して、少なくともガレクチン-4 siRNA、低分子フコイダン誘導体、B3GALT5 遺伝子といった候補阻害物について可能性を示すことができた。特に B3GALT5 遺伝子は動物実験でもその効果は非常に強いことが示され、今後の検討結果次第では有用な治療法へ展開する可能性がある。まずはこの B3GALT5 遺伝子投与による癌抑制メカニズムの解明を行いながら投与タイミングや胃癌以外の癌腫への展開などについて検討を進めていき、新たな治療法として確立すべく可能性を追求していきたい。

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 1件）

1. 著者名 Ideo Hiroko, Tsuchida Akiko, Takada Yoshio, Kinoshita Jun, Inaki Noriyuki, Minamoto Toshinari	4. 巻 26
2. 論文標題 Suppression of galectin-4 attenuates peritoneal metastasis of poorly differentiated gastric cancer cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Gastric Cancer	6. 最初と最後の頁 352 ~ 363
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10120-023-01366-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hachisu Kazuko, Tsuchida Akiko, Takada Yoshio, Mizuno Mamoru, Ideo Hiroko	4. 巻 24
2. 論文標題 Galectin-4 is involved in the structural changes of glycosphingolipid glycans in poorly differentiated gastric cancer cells with high metastatic potential	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 12305 ~ 12305
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms241512305	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7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 井手尾浩子、土田明子、八須和子、高田美生
2. 発表標題 ガレクチン-4による低分化型胃癌細胞の腹膜播種の制御
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 井手尾浩子、土田明子、八須和子、高田美生
2. 発表標題 ガレクチン-4は低分化型胃癌細胞の腹膜播種を制御する
3. 学会等名 第95回日本胃癌学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 井手尾浩子、土田明子、八須和子、高田美生、木下淳、稲木紀幸、源利成
2. 発表標題 低分化型胃癌細胞の腹膜播種転移に糖鎖結合分子ガレクチン-4が関与する
3. 学会等名 第32回日本がん転移学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Hiroko Ideo, Akiko Tsuchida, Yoshio Takada, Jun Kinoshita, Noriyuki Inaki, Toshinari Minamoto
2. 発表標題 Galectin-4 plays a vital role in the peritoneal dissemination of poorly differentiated gastric cancer cell
3. 学会等名 Glyco26 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 井手尾浩子、土田明子、八須和子、高田美生
2. 発表標題 腹膜播種能の異なる低分化型胃癌細胞の糖鎖とガレクチン-4による制御機構
3. 学会等名 第42回日本糖質学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 土田明子、八須和子、井手尾浩子、高田美生
2. 発表標題 ガレクチン-4が関与する未分化胃癌細胞の腹膜播種メカニズムの解明
3. 学会等名 第82回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 井手尾浩子、土田明子、八須和子、高田美生
2. 発表標題 低分化型胃癌細胞の腹膜播種における糖鎖変化と、糖鎖結合分子ガレクチンによる制御
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 ガレクチン - 4 陽性胃癌治療用医薬組成物	発明者 井手尾浩子、土肥明子、高田美生	権利者 公益財団法人野口研究所
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-122649	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 腫瘍の治療または転移抑制用医薬組成物	発明者 土肥明子、井手尾浩子、高田美生	権利者 公益財団法人野口研究所
産業財産権の種類、番号 特許、特願2024-7757	出願年 2024年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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	井手尾 浩子 (Ideo Hiroko) (90180322)	公益財団法人野口研究所・研究部・研究員 (72690)	

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