

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592017

研究課題名(和文) GalectinおよびAMFによる膵癌新規治療法の開発

研究課題名(英文) Innovation of novel therapeutic approach to pancreatic cancer using galectin-3 and AMF

研究代表者

志村 龍男 (SHIMURA, Tatsuo)

福島県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00282393

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：galectin-3 (gal-3) は -ガラクトシド結合蛋白質で細胞表面の糖蛋白や糖脂質と結合する。gal-3に関する生命現象としては、発生・分化・形態形成・腫瘍増殖転移・細胞死など多岐にわたるが機能発現の機構・関連は多くが未解決である。われわれは、膵癌細胞株を使用し、1) 増殖能、移動能、浸潤能を解析し、2) 抗癌剤を使用してgal-3が膵癌細胞死のどの部分に関わっているのかを検討した。gal-3の抑制で運動能、浸潤能ともに低下した。gal-3の抑制による抗癌剤耐性の変化では、gal-3抑制で細胞死の割合が有意に増加した。つまりgal-3を抑制することにより、抗癌剤感受性の上昇が認められた。

研究成果の概要(英文)：Galectin-3 (Gal-3) is beta-galactoside-binding protein, having binding capacity with glycoprotein and glycolipid on a cell surface. Gal-3 engages in cell differentiation, organ formation, tumor progression, apoptosis and so on, however, precise mechanisms of them have not yet been clarified. We investigated the relationship between Gal-3 and pancreatic cancer, especially on cell proliferation, migration and invasion using pancreatic cancer cell lines. We also analyzed changes of tolerance toward anti-cancer drugs when expression level of Gal-3 was inhibited in the cell lines. Inhibition of Gal-3 expression led to inhibition of migration and invasion of the cells. It also augmented their susceptibility to anti-cancer agents, like gemcitabine and cisplatin.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：galectin-3 膵癌 AMF

1. 研究開始当初の背景

(1) galectin-3 (gal-3) は 31kDa の α -ガラクトシド結合蛋白質で細胞表面の糖蛋白や糖脂質と結合する。発現場所は細胞質内・核内・細胞外マトリックスと多彩で、細胞の種類・組織・時期によって異なる。gal-3 に関する生命現象としては、発生・分化・形態形成・腫瘍増殖転移・細胞死など多岐にわたるが機能発現の機構・関連は多くが未解決である。

(2) gal-3 は 250 個のアミノ酸からなり、N末の Ser6 は casein kinase-1 によるリン酸化部位を持ち、proline-glycin rich domain は MMP-2/9 による切断認識部位となっている。carbohydrate binding domain には gsk-3 α -consensus domain を持っている。これは β -catenin と共通の特徴であり、研究を始める契機となるものであった。これまでわれわれは、gal-3 と乳癌細胞株、大腸癌細胞株との関係を報告してきた。

(3) 膵癌に関しては、臨床との関連で 2002 年 Shimomura らの gal-3 高発現群は低発現群に比して予後良好との報告があり、膵癌と gal-3 の関連を研究する契機となった。gal-3 は抗癌剤耐性にも関与しているとされ、apoptosis pathway において Akt のリン酸化や Bad のリン酸化に関与すると報告されている。膵癌では Akt は apoptosis に重要な働きをしていることが報告されている。今回われわれは、gal-3 が膵癌においてどのような役割を演じているか、また、抗癌剤耐性にも関与するのか解析し、新たな治療の標的因子になり得るのか検討した。

2. 研究の目的

膵管癌は現在でもなお難治性癌のトップであり、従来からの手術療法、化学療法、放射線療法あるいはそれらの集学的治療によっても 5 年生存を得るのが困難な状況である。膵管癌の治療のためにはこれまでとは異なる切り口での研究が必要であると考え本研究を立案した。膵管癌は小さくても周囲臓器への浸潤をきたしやすく、容易に遠隔転移を引き起こす。この浸潤、転移を制御する方法を開発することが急務である。

われわれはこれまでに、galectin-3 が apoptosis 耐性能の獲得や抗癌剤耐性をつかさどる重要な役割を演じていること、AMF が cell motility を増強することによる浸潤、転移能に重要な役割を演じていることを解明してきた。難治性癌である膵管癌におけるこれらの因子の役割を解明するとともに、新たな膵管癌治療法の開発を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 使用細胞株 : PanC-1、AsPC-1、BxPC-3 を使用した。まず siRNA により Gal-3 を knock down、また plasmid で強制発現させた。次に Gal-3 抑制の細胞への影響を増殖、運動、浸潤能の変化で検討した。差が認められた項目に対して、詳細な検討を追加した。

(2) Gal-3 抑制の運動能への影響は、Boyden

chamber 法で行い、膜を通過する細胞を固定し、HE 染色して count し、評価した。膜を通過した細胞を 200 倍 5 視野の平均で count した。運動能を PanC-1 cell において、Wound healing assay でも確認した。Confluent になった細胞に、同じ細さの傷をつけ、創閉鎖速度の変化を確認した。

(3) Gal-3 抑制の浸潤能への影響は、マトリゲルをコートした膜を通過する細胞の数で評価した。

(4) Gal-3 抑制の影響を検討するため、他の細胞で示されている β -catenin の影響を蛋白発現レベルで検討するため、Western blot 法および PCR 法で検討した。

(5) 膵癌患者 50 名および膵管内粘液乳頭腺腫 (IPMN) 67 名、膵管内乳頭粘液腺腫由来癌 (IPMC) 21 名の摘出標本において Gal-3 の発現を免疫染色法にて検討し、予後との関連を検討した。

4. 研究成果

(1) siRNA にて gal-3 が抑制されることを western blot にて確認した。全ての細胞株で 80%以上抑制された。また over expression も試みましたが、全ての細胞で gal-3 は強く発現しており、モデルとして適さず、抑制系のみで評価した。Gal-3 抑制が、増殖に関与するのかを確認したが、影響は認められなかった。よって gal-3 は増殖には関与していないことが判明した。

(2) 運動能の検討では、gal-3 抑制株で、膜を通過する細胞数が減少していることが分かった。すべての細胞株で有意差をもって運動能が低下していた。抑制株で創閉鎖速度の低下を認めます。PanC-1 cell において、Wound healing assay で形態変化を見るために、ファロイジンで actin fiber を染色したところ、抑制株での仮足の減少を認めた。これにより、細胞運動の低下が肉眼でも確認できた。

(3) 浸潤能の検討において、Gal-3 抑制株では運動能と同様に有意な減少を認めた。

(4) β -catenin の変化を western blot, PCR で確認したところ、gal-3 抑制株にて蛋白レベルでは低下しているものの、RNA レベルでは低下していなかった。つまり β -catenin の蛋白レベルでの分解が示唆された。また、gal-3 抑制株で、 β -catenin の上流にある、Akt のリン酸化と GSK のリン酸化を調べたところ、Akt のリン酸化の低下と GSK のリン酸化の低下を認めた。GSK の不活性化の低下を表しており、 β -catenin の蛋白レベルでの分解を誘導するものと思われた。経時的に観察すると、Akt のリン酸化低下に続いて GSK のリン酸化の低下、 β -catenin の分解が生じていた。そこで、局在の変化を蛍光染色で確認した。Gal-3 抑制株では、 β -catenin の発現低下と核移行の減少が認められ、転写活性低下が示唆された。実際 β -catenin が浸潤能に関与するかを検討した結果、抑制株にて増殖能、浸潤能の低下

を認めた。Gal-3 により制御され、浸潤に関与する因子を PCR で検索すると、MMP2、IL-8 が同定され、beta-catenin 分解の下流で制御される因子はこのうち MMP2 であることが分かった。Hepatocyte、endothelial cell の場合、IL-8 は beta-cat の下流にあるとの報告があるが、今回は beta-catenin の下流にはなかった。IL-8 に関しては、Gal-3 抑制株で real time PCR で IL-8 の発現を確認すると低下しており、medium 中の IL-8 を測定すると gal-3 抑制株で有意に低下していた。浸潤 assay で IL-8 の中和抗体を添加すると浸潤が低下することも確認し、IL-8 が膵癌の浸潤に関与することが判明した。細胞の motility に関しては従来より AMF (autocrine motility factor) が同定されており、melanoma cell line では IL-8 との関連が報告されている。今回、AMF と IL-8 の関連を膵癌細胞株で検討したが、有意な関連は認められなかった。

(5) 膵管癌患者 50 人における Gal-3 の発現と予後との関連では発現の高低による予後に差は認められなかった。IPMC と予後因子との関連では単変量解析において stage III もしくは IV ($p = 0.020$)、T3+4 ($p = 0.015$)、ly 陽性 ($p = 0.010$)、v 陽性 ($p < 0.0001$)、n 陽性 ($p = 0.040$)、Gal-3 高陽性 ($p = 0.032$) が予後不良因子であった。Cox 比例ハザードモデルによる多変量解析では Gal-3 高発現が予後不良因子であった。研究の契機となった論文では、膵管癌では Gal-3 高発現が予後良好との結果であった。本研究では膵管癌では予後との関連が認められなかった。IPMC では Gal-3 高発現群は予後不良であり、本研究での cell line での Gal-3 発現抑制が抗癌剤耐性を減少させる結果が将来予後改善の一つの改善策となりうることを示されたと考えている。

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 10 件)

Kobashi T, Shimura T, Yajima T, Kubo N, Araki K, Tsutsumi S, Suzuki H, Kuwano H, Raz A, Transient gene silencing of galectin-3 suppresses pancreatic cancer cell migration and invasion through degradation of beta-catenin. *Int J Cancer*, 査読有、129 巻、2011、2775-2786
DOI:10.1002/ijc.25946.

Kobayashi T, Shimura T, Yajima T, Kubo N, Araki K, Wada W, Tsutsumi S, Suzuki H, Kuwano H, Raz A, Transient silencing of galectin-3 expression promotes both in vitro and in vivo drug-induced apoptosis of human pancreatic carcinoma cells. *Clin Exp Metastasis*, 査読有、28 巻、2011、367-376
DOI:10.1007/s10585-011-9376-x.

Araki K, Shimura T, Kobayashi T, Saito K, Wada W, Sasaki S, Suzuki H, Kashiwabara

K, Nakajima T, Kuwano H, Mixed ductal-endocrine carcinoma of the pancreas occurring as a double cancer: report of a case. *Int Surg*, 査読有、96 巻、2011、153-158

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22026308>

Araki K, Shimura T, Suzuki H, Tsutsumi S, Wada W, Yajima T, Kobayashi T, Kubo N, Kuwano H, E/N-cadherin switch mediates cancer progression via TGF-beta-induced epithelial-to-mesenchymal transition in extrahepatic cholangiocarcinoma. *Br J Cancer*, 査読有、105 巻、2011、1885-1893
DOI:10.1038/bjc.2011.452.

Ohki S, Shibata M, Gonda K, Machida T, Shimura T, Nakamura I, Ohtake T, Koyama Y, Suzuki S, Ohto H, Takenoshita S, Circulating myeloid-derived suppressor cells are increased and correlate to immune suppression, inflammation and hypoproteinemia in patients with cancer. *Oncology Report*, 査読有、28 巻、2012、453-458
DOI:10.3892/or.2012.1812.

Shimura T, Morinaga N, Suzuki H, Araki K, Kobayashi T, Koyama Y, Yashima R, Shibata M, Takenoshita S, Kuwano H, Description of pylorus-preserving pancreaticoduodenectomy in elderly patients. *Hepatogastroenterology*, 査読有、59 巻、2012、903-906
DOI:10.5754/hge10735

Nakamura I, Kanazawa M, Sato Y, Irisawa A, Takagi T, Ogata T, Kashimura S, Kenjo A, Suzuki H, Shibata M, Shimura T, Ohira H, Goto M, Takenoshita S, Ohto H, Clinical evaluation of dendritic cells vaccination for advanced cancer patients at Fukushima Medical University. *Fukushima J Med Sci*, 査読有、58 巻、2012、40-48

https://www.jstage.jst.go.jp/article/fms/58/1/58_40/article

Nakamura I, Shibata M, Gonda K, Yazawa T, Shimura T, Anazawa T, Suzuki S, Sakurai K, Koyama Y, Ohto H, Tomita R, Gotoh M, Takenoshita S, Serum levels of vascular endothelial growth factor are increased and correlate with malnutrition, immunosuppression involving MDSCs and systemic inflammation in patients with cancer of the digestive system. *Oncology Letters*, 査読有、5 巻、2013、1682-1688

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/article/PMC3678612/>

Yazawa T, Shibata M, Gonda K, Machida T, Suzuki S, Kenjo A, Nakamura I, Tsuchiya T, Koyama Y, Sakurai K, Shimura T, Tomita R, Ohto H, Gotoh M, Takenoshita S, Increased IL-17 production correlates with immunosuppression involving

myeloid-derived suppressor cells and nutritional impairment in patients with various gastrointestinal cancers. Mol Clin Oncol、査読有、1巻、2013、675-679
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/article/PMC3916208/>

Watanabe A, Suzuki H, Kubo N, Kobayashi T, Araki K, Sasaki S, Shimura T, Oyama T, Kuwano H、A case of mesenteric cystic lymphangioma in an adult which caused duodenal stenosis after resection. Int J Surg Case Rep、査読有、4巻、2013、212-215
DOI:10.1016/j.ijscr.2012.10.023.

〔学会発表〕(計 6 件)

志村龍男、他、IPMN をめぐる諸問題 切除例における検討、第 111 回日本外科学会定期学術集会、平成 23 年 5 月 26 日 - 28 日、東京

志村龍男、他、PPPD 術後再建方法の工夫：膵液瘻の完全克服を目指して、第 23 回日本肝胆膵外科学会学術集会、平成 23 年 6 月 10 日、東京

志村龍男、他、幽門輪温存膵頭十二指腸切除術における合併症対策と入院期間短縮への挑戦、第 66 回日本消化器外科学会、名古屋

Shimura T, et al、Appraisal of antecolic vertical duodenojejunoscopy with internal stent and omental wrapping in pylorus-preserving

pancreaticoduodenectomy.、International Surgical Week、平成 23 年 8 月 30 日、横浜

Shibata M, Shimura T, Gonda K, Suzuki S, Nakamura I, Ohki S, Takenoshita S、Myeloid-derived suppressor cells (MDSC) is increased and correlated to immune suppression and inflammatory markers in patients with gastrointestinal cancer.、2012 ASCO Gastrointestinal Cancer Symposium、平成 24 年 1 月 19 日 - 21 日、サンフランシスコ

Gonda K, Shibata M, Shimura T, Nakamura I, Ohki T, Ohtake S, Suzuki S, Ohto S, Takenoshita S、Myeloid-derived suppressor cells (MDSC) are increased and correlated with immune suppression and chronic inflammation in patients with cancer.、American Association for Cancer Research annual meeting 2012、平成 25 年 3 月 30 日 - 4 月 1 日、シカゴ

〔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

志村龍男 (SHIMURA, Tatsuo)
福島県立医科大学・医学部・准教授
研究者番号：00282393

(2) 研究分担者

柴田昌彦 (SHIBATA, Masahiko)
福島県立医科大学・医学部・教授
研究者番号：10226178

竹之下誠一 (TAKENOSHITA, Seiichi)
福島県立医科大学・医学部・教授
研究者番号：10167489

(3) 連携研究者

()

研究者番号：