

学位論文審査の結果の要旨

平成 28 年 5 月 19日

| | | | | | | | |
|-----------|---|----------|----|--------|---------|--|--|
| 審査委員 | 主 査 | 徳田 雅明 | | | 徳田 雅明 印 | | |
| | 副主査 | 日下 玲 | | | 日下 玲 印 | | |
| | 副主査 | 飯東 結二 | | | 飯東 結二 印 | | |
| 願 出 者 | 専攻 | 分子情報制御医学 | 部門 | 病態制御医学 | | | |
| | 学籍 番号 | 11D732 | 氏名 | 大倉 亮一 | | | |
| 論 文 題 目 | MicroRNA profiles during galectin-9-induced apoptosis of pancreatic cancer cells | | | | | | |
| 学位論文の審査結果 | <input checked="" type="radio"/> 合格 <input type="radio"/> 不合格 (該当するものを○で囲むこと。) | | | | | | |

〔 要 旨 〕

平成28年5月9日に学位論文公開審査会が開催された。要旨は以下の通りである。

【目的】膵癌は、化学療法に抵抗性を示す進行性の予後不良な疾患であり、様々な抗癌剤治療法やアジュバント治療が試みられている。Galectin-9(以下Gal-9)は、 β -ガラクトシド結合蛋白質の1つであり、さまざまな癌種に対する増殖抑制効果が報告されている。しかし、Gal-9による膵癌の増殖抑制効果についての報告はない。今回、我々はGal-9の膵癌細胞に対する抗腫瘍作用をin vitroで検討した。

【方法】2種類の膵癌細胞株(PK-1、PK-9)を用い、種々の濃度(0, 0.1, 0.3, 1 μ M)のGal-9を投与し、その増殖抑制効果をMTT assayで検討した。PK-1において、Gal-9によるアポトーシス誘導効果をcaspase-cleaved cytokeratin 18(CCK-18)をELIZA法にて測定した。また、Gal-9投与による細胞周期と細胞周期関連蛋白質の影響をWestern blot法とフローサイトメトリーを用い解析した。Gal-9投与による、アポトーシス関連蛋白質、レセプター型チロシンキナーゼ受容体について蛋白アレイを用いて解析した。さらにGal-9の細胞増殖抑制に関連するマイクロRNAを同定するため、2555分子が搭載されたチップを用いて網羅的に解析した。

【結果】Gal-9投与により、2種の膵癌細胞株(PK-1、PK-9)は共に濃度依存的に細胞増殖抑制がみられた。またPK-1細胞株において、0.3 μ M Gal-9投与によりCCK-18増加がみられ、アポトーシス誘導作用が示唆された。その一方、細胞周期についてWestern blot法では細胞周期関連分子であるCyclinEとCdk4の発現量低下を認めたが、フローサイトメトリーではG0/G1, G2/M, S期での影響はみられなかった。Gal-9投与によりアポトーシス関連蛋白質であるcytochrome cの増加がみられた。レセプター型チロシンキナーゼ受容体では、p-EGFR, p-Tie-2, p-TrKC, p-MuSK, p-ALK, p-EphA10, p-PYKなど様々な受容体のリン酸化の減弱を認めた。さらにPK-1において、Gal-9投与群は非投与群と比較して異なるmiRNAプロファイルを形成していた。投与群で有意差(p<0.05)をもって上昇したmiRNAが13分子、減少したmiRNAは6分子であった。

【考察・結語】Gal-9はPK-1及びPK-9において細胞増殖抑制効果を示した。その抑制機構はGal-9によるアポトーシス誘導によるもので細胞周期への影響は少ないと考えられた。Gal-9によるアポトーシス誘導にはcytochrome cとそれに関連するcaspaseの活性化が関連していると推測された。Gal-9投与により増減するmiRNAの中でmiR-301aの低下がみられ、miR-301aは膵癌細胞においてGal-9のアポトーシスや抗腫瘍効果に関連している可能性が示唆された。

【質疑応答】

Q. Gal-9の投与量をどのように決定したか？

A. 過去の論文でGal-9の抗ウイルス効果の実験での投与量が10-90 μ gであったことを参考とした。さらに担癌マウスモデルにおけるガレクチン9の血中濃度の解析で、10 μ gの皮下注で最高血中濃度が0.08 μ Mと推測されたことも参考とし、in vitroでは、投与量を0.1-1.0 μ M、とし実験を行った。また当研究室においての他の癌腫でのGal-9の報告も参考にした。

Q. 膵癌とこれまで報告のあった他の癌種でのGal-9投与によるmicroRNAでの共通点はあるか？

A. 膵癌においては他の癌種とはmicroRNAの共通点はなかった。しかし、胃癌・肝細胞癌・胆管癌では共通して、miR-1246がup regulationされていた。

Q. 膵癌とこれまで報告のあった他の癌種で、レセプター型チロシンキナーゼ受容体での共通点は？またEGFR以外のものについてもすべて、アポトーシスや癌増殖等に関与するののか。

A. 膵癌・胆管癌において、共にEGFRの減弱が認められた。また今回、PK-1においてEGFR以外に変化したレセプター型チロシンキナーゼ受容体については、検討した範囲内では、直接アポトーシスに関与するものはなかった。

Q. なぜGal-9を使用したのか？

A. Gal-9はこれまでの研究で抗ウイルス効果、抗腫瘍効果を持っていることが報告されており、早期発見が困難かつ予後不良である膵癌に対しての抗腫瘍効果とその作用機序を検討する目的で行った。

Q. Gal-9の抗腫瘍効果の主な採用機序はアポトーシスの誘導であると考えてよいのか？

A. 当研究室での実験では、膵癌以外に、胃癌・肝細胞癌・胆管癌に対して、Gal-9を投与することでin vitro、in vivoにてアポトーシスの誘導を来すことで増殖抑制を示す結果が得られており、Gal-9の主な作用機序としてはアポトーシス誘導の可能性が高いと考えられる。

Q. PK-1で増減したmicroRNAの中で、miR-301a以外に抗腫瘍効果に関係するものはあったか？

A. 今回検討した範囲では、PK-1で増減したmicroRNAのうち、miR-301a以外にアポトーシスに関係するものはなかった。

Q. 抗癌剤において細胞周期に関連するものは？ またアポトーシスを誘導する他の抗癌剤は？

A. 膵癌においては、GEM等が細胞周期を抑制する抗癌剤である。アポトーシスを誘導する抗癌剤については、現在の所はないと思われ、Gal-9の今後の臨床応用等についてさらに検討が必要と思われる。

Q. Gal-9→EGFR↓、miR-301a↓→PTEN↑の間の詳しいメカニズムについて報告はあるか。Gal-9のアポトーシス誘導効果は他のinducerと比較してどうか？またアポトーシスアレイにおいては、Bcl-2、Cleaved caspase-3の明らかな変化はないが、これらについてはどうか？

A. 今回の研究の中では、まだ十分な検討ができていなかったため、今後の実験等を通してさらに検討していきたい。

論文の内容や発表内容もよく、その後の質疑応答においても適切な回答が得られたことから、審査員一同、大倉亮一氏が医学博士の学位に値すると判断した。

| 掲 載 誌 名 | Oncology Letters | 第 | 巻, 第 | 号 |
|---------|------------------|-----------|------------------------|---|
| (公表予定) | 2016年1月16日 | | | |
| 掲 載 年 月 | 掲載受理 | 出版社 (等) 名 | Spandidos Publications | |

(備考) 要旨は、1, 500字以内にまとめてください。