

学位論文の内容の要旨

専攻	分子情報制御医学	部門	病態制御医学
学籍番号	11D741	氏名	藤田 浩二
論文題目	Galectin-9 suppresses the growth of hepatocellular carcinoma via apoptosis in vitro and in vivo		
<p>(論文要旨)</p> <p>【背景・目的】 ガレクチン-9 (Gal-9) は β-galactoside 結合蛋白質の1つである。近年、骨髄腫細胞及び悪性黒色腫細胞においてアポトーシスを誘導し、癌細胞の増殖抑制効果を示すことが報告された。本研究においては、Gal-9の肝細胞癌に対する増殖抑制効果を in vitro 及び in vivo で評価する。</p> <p>【方法】 肝癌細胞株に 0.01~1.0 μM の Gal-9 を投与し、細胞増殖抑制効果を WST-8 assay で検討した。Gal-9 によるアポトーシスの誘導効果を Flow cytometry と Caspase-cleaved keratin 18 の ELISA で評価した。ヌードマウスの皮下に Li-7 の腫瘍片を移植し、Gal-9 の皮下注射による腫瘍の増殖抑制効果を検討した。切り出した Xenograft において、Tunel 法にて癌細胞のアポトーシスの有無を評価した。肝癌細胞株及び Xenograft において、Caspase-4, -8, 及び-9 の活性を Colorimeter で評価し、アポトーシスの経路を推測した。Total RNA を抽出し、2019 分子が搭載されたチップを用いてマイクロ RNA を網羅的に解析し、Gal-9 の作用に関連するマイクロ RNA を同定した。</p> <p>【結果・考察】 Gal-9 は HLE 及び Li-7 の増殖を濃度依存的に抑制した (Figure 1A, B)。Gal-9 を投与された HLE 及び Li-7 の表面には Annexin-5 が発現しており、アポトーシスが誘導されていた (Figure 2A, B)。HLE 及び Li-7 の培養上清において、Caspase-cleaved keratin 18 の濃度が上昇しており、アポトーシスを確認した (Figure 2C)。 ヌードマウスによる Li-7 の Xenograft モデルにおいて、治療群は対照群と比較し優位に増殖が抑制されており (Figure 4A)、アポトーシスが誘導されていた (Figure 4B)。 In vitro 及び in vivo において Caspase profiling を行った結果、Caspase-4, -9 の活性が増加しており (Figure 4C)、アポトーシスの経路として小胞体ストレスとミトコンドリアが想定された。miRNA の網羅的解析からは、細胞株及び Xenograft に共通の変動を示す miRNA として、miR-1246 が抽出された (Figure 5)。 Gal-9 により誘導されるアポトーシスにおいて、miR-1246 が関与しているか否かさらに調べた。In vitro において miR-1246 の transfection を行ったところ、Gal-9 の存在下では細胞増殖が抑制され (Figure 6A)、アポトーシスが誘導されていた (Figure 6B)。miR-1246 の標的遺伝子の一つである癌遺伝子 DYRK1A の発現を Western Blot で評価した結果、治療群において DYRK1A の発現が抑制されていた (Figure 6D)。このことから、ミトコンドリアのアポトーシスのメカニズムとして、miR-1246-DYRK1A-Caspase-9 経路が想定された (Figure 7B)。</p> <p>【結論】 Gal-9 は in vitro 及び in vivo において肝細胞癌のアポトーシスを誘導し、増殖を抑制した。アポトーシス誘導の機序として、小胞体ストレスとミトコンドリアが想定された。miR-1246 がガレクチン-9 依存性にアポトーシスを誘導すること、癌遺伝子 DYRK1A の発現を抑制することが示された。</p>			

Figure 1

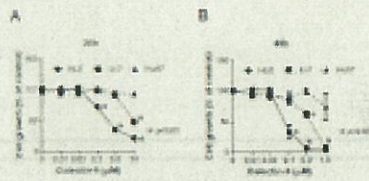


Figure 2

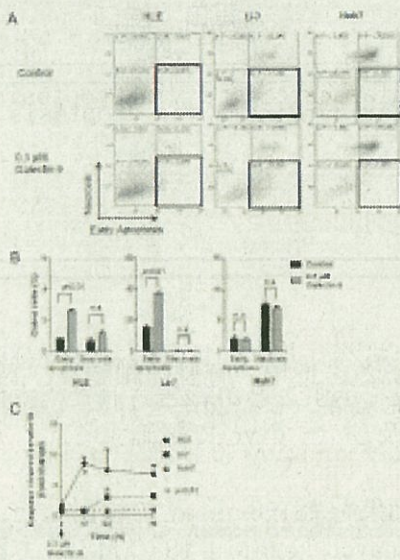


Figure 4

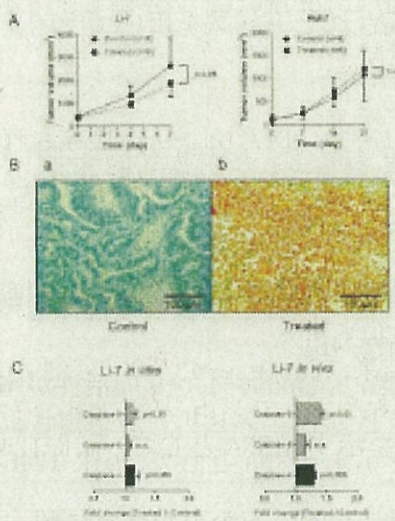


Figure 5

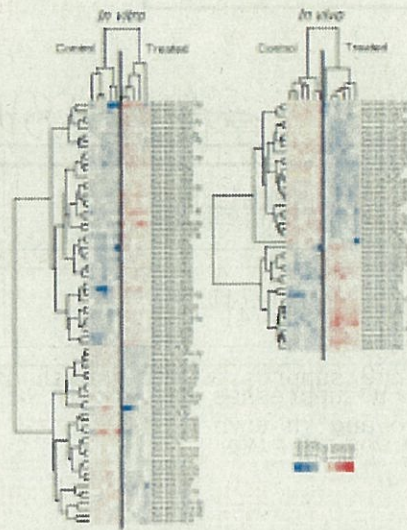


Figure 6

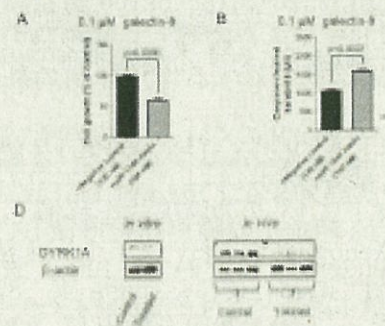
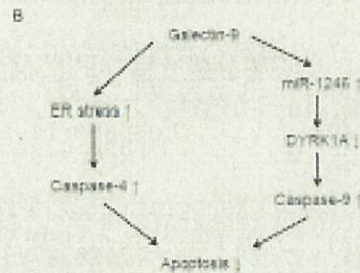


Figure 7



掲載誌名

INTERNATIONAL JOURNAL OF ONCOLOGY

第 卷, 第 号

(公表予定)
掲載年月

平成27年3月掲載受理

出版社(等)名

Spandidos-publications

Peer Review

有

無

(備考) 論文要旨は、日本語で1,500字以内にまとめてください。