

学位論文審査の結果の要旨

平成 27 年 5 月 13 日

審査委員	主 査	中村 隆範 (印)		
	副主査	辻 晃仁 (印)		
	副主査	森 利之 (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	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			
学位論文の審査結果	(合格)	不合格	(該当するものを○で囲むこと。)	

〔 要 旨 〕

【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。

【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。

【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)。

【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。

【質疑応答】

- Q. 肝細胞癌株のガレクチン-9感受性は、細胞の分化度の差によるものか？
 A. HLEは低分化型、Li-7は中分化型、Huh7は高分化型である。ガレクチン-9に対する感受性が分化度の違いによる可能性はあると考えている。
- Q. 動物実験において、ガレクチン-9に対し感受性の高いHLEを用いなかったのはなぜか？
 A. HLEの担癌マウスモデルの作成を試みたが、HLEはマウスには生着しなかった。Nude mouse, SCID mouse, NOD/SCID mouseに対して移植を試したが生着せず、HLEの細胞懸濁液に基底膜マトリックス溶液を添加してみたが、やはり生着しなかった。
- Q. In vivoにおいて、in vitroに比べて低いガレクチン-9濃度で腫瘍の増殖抑制効果が得られているが、これはガレクチン-9の間接的な作用も寄与しているのではないか？
 A. 詳細な検討はしていないが、間接的作用はあると考えている。ガレクチン-9による自然免疫の活性化とBリンパ球の関与が考えられる。
- Q. 細胞株のHBV感染の有無、AFP産生性とガレクチン-9の感受性の関連はどうか？
 A. HLE, Li-7, Huh-7はいずれもHBV陰性かつAFP産生性もないとされており、HBV感染の有無、AFP産生性とガレクチン-9感受性との関連は明らかには指摘できない。またHBV感染のある細胞株Alexanderはガレクチン-9に対する感受性を示さなかった。AFP産生性のあるHepG2もガレクチン-9感受性は示さなかった。
- Q. ガレクチン-9の血中濃度で肝疾患患者の予後が分かるか？
 A. 肝臓組織におけるガレクチン-9の発現が予後と相関するとの報告はある。Zhang, et al. Asian Pac J Cancer Prev. 2012;13(6):2503-9, あるいは Li, et al. Hepatology. 2012;56(4):1342-51である。血清ガレクチン-9が肝疾患のバイオマーカーとなる可能性については、今後の検討課題である。
- Q. 動物実験において、ガレクチン-9を皮下注で使用しているが、静注は試したか？
 A. 実験の便宜を考えて、今回は皮下注を採用した。静注は試していない。
- Q. TUNEL染色の画像においてアポトーシスが激しすぎる。アポトーシスはもっとばらばらと散在するものではないか？
 A. 提示した写真はアポトーシスした細胞が集塊を成している部分を提示している。実際の組織標本においては、この写真で提示した組織の周囲にアポトーシスしていない細胞からなる組織が存在する。
- Q. miR-1246はバイオマーカーとしては知られているか？
 A. 疾患のバイオマーカーとしての活用はまだされていないと思われる。乳癌細胞がmiR-1246を能動的に分泌することが知られており、乳癌のバイオマーカーとしての可能性はあるのではないかと考えている。肝疾患のバイオマーカーとして確立できるか否かは、検討課題である。
- Q. 肝臓のマーカーとして臨床例で変動するmiRNAは、今回の研究結果に含まれていたか？
 A. 肝臓のマーカーとしてmiR-211/212がある。また肝細胞に特異的なmiRNAとしてmiR-122がある。今回のmiRNAの網羅的解析からは、これらのmiRNAは抽出されていない。
- Q. ガレクチン-9のバイオマーカーとしての臨床的な意味合いは何か？
 A. ガレクチン-9は炎症反応を反映する。肝疾患は肝臓の急性慢性の炎症を背景としているので、ガレクチン-9は肝疾患のバイオマーカーとして、早期診断、重症度判定、予後予測等に寄与する可能性を持っている。

平成 27 年 5 月 7 日に開催された学位論文公開審査会において、口頭発表の後、指定討論者及び審査委員による質疑応答が実施され、上記の例のように数多くの質問に対して適切な回答が得られた。従って、審査員一同は一致して本論文が学位授与に値すると判断した。尚、本論文は既に受理され印刷中である。

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	

(備考) 要旨は、1, 500字以内にまとめてください。