




学位論文審査の結果の要旨

平成 27 年 8 月 21 日

審査委員	主査	中村 隆 範		
	副主査	徳田 雅 明		
	副主査	料 脇 則 光		
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	11D735	氏名	小林 聖幸
論 文 題 目	Galectin-9 suppresses cholangiocarcinoma cell proliferation by inducing apoptosis but not cell cycle arrest.			
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 〕

【目的】

胆管癌は、胆管原発では最も多く、肝原発悪性腫瘍としては肝細胞癌に次いで多い悪性腫瘍である。ガレクチン9(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、胆管癌においてGal-9による増殖抑制効果についての報告はみられていない。胆管癌においてGal-9による増殖抑制効果とその抑制機構について検討し、Gal-9の抗腫瘍効果を示すターゲットmiRNAを同定することを目的とした。

【方法】

2種の胆管癌細胞株(TFK-1、HuH28)を採用した。それらに対し、種々の濃度のGal-9量を投与し、増殖抑制効果をMTT assayで検討した。Gal-9によるapoptosisの誘導をcaspase-cleaved keratin18を測定することにより検討した。TFK-1において、Gal-9投与による細胞内の細胞周期関連蛋白質群をWestern blot法を用いて検討し、フローサイトメトリーでGal-9投与による細胞周期の変化を解析した。Gal-9投与による、アポトーシス関連蛋白質群、レセプター型チロシンキナーゼ群、血管新生分子群を蛋白アレイチップで解析した。Gal-9の細胞増殖抑制に関連するマイクロRNAを同定するために2555分子が搭載されたチップを用いて網羅的に解析した。ヌードマウスを用いてGal-9の胆管癌腫瘍に対する抗腫瘍効果を検討した。

【結果】

2種の胆管癌細胞株(TFK-1、HuH28)共にGal-9投与によって濃度依存的に細胞増殖抑制がみられた(Fig. 1)。また両細胞共にGal-9投与でapoptosisが引き起こされていた(Fig. 2)。TFK-1において検討を加えると、Western blot解析及びフローサイトメトリーの結果から細胞周期関連分子と細胞周期に変化はみられなかった(Fig. 3)。アポトーシス関連蛋白質群ではcytochrome cがGal-9を投与することによって増強していた(Fig. 4)。レセプター型チロシンキナーゼ群では、EGF R、HGF R、FGF R3、IGF-1Rの減弱を認めた(Fig. 5)。血管新生分子群では明らかな変

化はみられなかった (Fig. 6)。さらにTFK-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 (Fig. 7)。投与群で有意差 ($p < 0.05$) をもって上昇したmiRNAが22分子、減少したmiRNAは26分子であった。そして、TFK-1をヌードマウスに皮下移植し、Gal-9投与による抗腫瘍効果を検討するとGal-9 30 μ gと90 μ g共に非投与群と比較して有意差をもって増殖を抑制していた (Fig. 8)。

【考察・結語】

Gal-9はTFK-1及びHuH28において細胞増殖抑制効果を示し、apoptosisを引き起こしていた。TFK-1についての抑制機構は主にapoptosisの誘導であると考えられた。apoptosisの誘導にはcytochrome cの増加とそれに伴うcaspaseの活性化が関連していると考えられた。また同定されたmiRNAのうち、miR-198が増加しており、miR-198が胆管癌細胞においてGal-9のapoptosisや抗腫瘍効果に関連している可能性がある。

【質疑応答】

Q. 胆管癌の臨床的特徴はどうか? またなぜ有効な化学療法が少ないのか?

A. 胆管癌は初期に自覚症状が乏しい。肝内胆管癌と肝外胆管癌に分けられるが、特に肝内胆管癌であれば黄疸や疼痛などの症状も出現しにくく、他の癌に比較して症状が出現した際には進行していることが少なくない。胆道癌に対する化学療法のRCTは他の癌に比べると少なく、診断時の進行度も悪いことから有効な薬剤が少ないと考える。

Q. ガレクチン9の採用機序は肝癌と同じようにアポトーシスを誘導することで間違いないか?

A. 同様と思われる。我々のグループでの実験では、肝細胞癌に対してガレクチン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するという結果が得られている。さらに腫瘍細胞において、in vitroのみではあるが、ガレクチン9を投与することで、アポトーシスにより増殖抑制効果を示すことがわかっている。

Q. in vivoでガレクチン9の投与量をどのように決定したか?

A. 過去の論文でガレクチン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0.01-0.3 μ M、in vivoでは、30 μ g、90 μ gとし実験を行った。

Q. ガレクチン9の臨床応用への可能性はどうか?

A. 乳癌においてガレクチン9の発現量が多い方の予後が良く、遠隔転移が少なく、結果、発現量によって予後が違うという報告がある。胆管癌においても、手術摘出標本でのガレクチン9の発現を調べ、その後の予後について発現量の違いで予後が変化するかどうか、さらに血清中のガレクチン9の濃度を測定することで予後規定因子となりうるかなど検討していきたい。

Q. in vivoで生存率は検討しているか?

A. 今回の実験では、実験中、副作用によると思われる体重減少やその他の明らかな変化はみられず、途中での死亡したマウスはみられなかった。

Q. マイクロRNAデータはin vivo、あるいはin vitroでの検討か?

A. in vivoでの検討である。in vivoにおいては、このようにアポトーシスに関連するマイクロRNAを認めている。in vitroでのマイクロRNAの検討も複数回行ったが、これまでのところでは、明らかなアポトーシスに関連するマイクロRNAの存在や、in vivoでみられたマイクロRNAと一致するものがみられなかった。さらに今後の臨床への応用などの観点から、今回はin vivoでのマイクロRNAの検討のみを提示することとした。

平成27年8月20日に学位論文公開審査会が開催され、論文の内容や発表・質疑応答を通して、審査員一同、小林聖幸氏が医学博士の学位に値すると判断した。

掲載誌名	Oncology Reports		第 巻, 第 号
(公表予定) 掲載年月	2015年6月2日 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。