




学位論文審査の結果の要旨

平成 28 年 1 月 14 日

審査委員	主査	河野 尚		
	副主査	河野 雅和		
	副主査	徳田 雅明		
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	05D734	氏名	高野 実子
論文題目	Galectin-9 suppresses the proliferation of gastric cancer cells in vitro.			
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。)	
<p>[要 旨]</p> <p>[目的]</p> <p>胃がんは、日本で最も罹患率が高い悪性腫瘍である。2011年の統計では、男性で最多、女性で乳がん、大腸がんについて多い。近年、上部消化管内視鏡検査による早期発見、内視鏡的切除など低侵襲治療法の開発がすすめられている。一方進行がんに対する化学療法の成績はいまだ十分ではない。</p> <p>ガレクチン9 (以下Gal-9) は、βガラクトシド結合蛋白質の1つである。さまざまな種類の癌細胞のアポトーシスを誘導し、増殖抑制効果が報告されている。今回、我々はGal-9の胃癌細胞に対する抗がん作用をin vitroで検討し報告する。</p> <p>[方法]</p> <p>胃癌細胞株(MKN1, MKN7, MKN45, MKN74)に0.01~0.3μMのGal-9を投与し、MTT assayを用いて細胞増殖抑制効果を検討した。Gal-9のアポトーシス誘導効果を調べるため、Caspase-cleaved keratin 18をELISA法で測定した。Gal-9投与によるレセプターチロシンキナーゼ群、血管新生分子群の変化を蛋白アレイチップで解析した。Gal-9により誘導される胃癌細胞内のmicroRNAを2555分子が搭載されたチップを用いて網羅的に解析した。</p> <p>[結果]</p> <p>MKN74, MKN45の増殖がGal-9により濃度依存的に抑制された。この増殖抑制効果はlactoseの投与により阻害された。MKN74においてCaspase-cleaved keratin 18の濃度が上昇しており、アポトーシスがひきおこされていた。レセプター型チロシンキナーゼ群では、MKN74においてVEGFR-3、IGF-1Rの減弱がみられた。またGal-9はMKN74においてIL-8, TIMP-1, TIMP-2, GRO, RANTESの血管新生分子を増強させた。さらにMKN74においてGal-9投与群は非投与群と比較し、異なるmicroRNAプロファイルを形成していた。Gal-9投与24時間後のmicroRNAを比較すると、投与群で有意差(p<0.05)をもって上昇したmicroRNAが153分子、減少したmicroRNAが18分子であった。</p>				

[考察・結語]

Gal-9はMKN45, MKN74において細胞増殖を抑制した。その抑制機構はアポトーシス誘導である可能性が示された。またMKN1, MKN7はGal-9の効果に対して抵抗性であった。MKN45, MKN74は胃癌の肝転移巣由来であり、MKN1, MKN7はリンパ節巣由来である。そのためGal-9はより進行した胃癌に対する効果がある可能性がある。

また同定されたmiRNAのうち、Gal-9投与によりmiR-204, miR-1246が増加していた。miR-204はフィブロネクチン、Bcl-2, SIRT1などを標的とし、肝細胞癌、胃癌、子宮癌、甲状腺乳頭がんなどにおいてアポトーシス、細胞周期のアレストを引き起こすとの報告がある。miR-1246はGal-9投与により、肝細胞癌、胆管癌でも増加してみられた。胃癌細胞においてこれらのmiRの発現増加がGal-9の抗腫瘍効果に関係している可能性がある。

平成28年1月14日に行われた学位審査委員会において、以下に示す質疑応答が行われた。

- 1) 血管新生分子がGal-9投与で増強していた理由は？→Gal-9投与によるアポトーシスをまぬがれた腫瘍細胞が、血管新生分子を増強し抵抗性を持った可能性を考えた。
- 2) Gal-9投与による細胞周期に対する影響は？→フローサイトメトリーで検討した結果、胃癌細胞、肝細胞がん、胆管細胞がんで細胞周期の関与はみられなかった。
- 3) Gal-9投与の濃度の設定はどのように？→過去の論文でGal-9の抗ウイルス効果の動物実験で10~90 μ gで投与していたこと、10 μ g皮下注で血中濃度が0.08 μ Mであったことを参考に、in vitro実験では0.01~0.3 μ Mの投与とした。
- 4) 胃がん細胞自体にGal-9の発現はあるか？→Western blotting法でGal-9の効果のあったMKN74, MKN45でGal-9の発現がみられた。
- 5) 肝転移巣由来の胃がん細胞とリンパ節転移由来の細胞で効果の違いが出たのはなぜ？例えばGal-9受容体の違いがあるのではないかと？→今回の実験で受容体の検索はできていない。今後検討していきたい。
- 6) Gal-9は転移に関係しているとの報告がある。肝転移巣由来(MKN74, MKN45)の胃がん細胞にGal-9が発現していたのはその影響も考えられるのではないかと？
- 7) MTT assayでより高濃度で行った実験はあるか？→海外で大腸がん細胞でGal-9を0.6 μ Mまで投与した実験があり、濃度依存性に細胞増殖抑制がみられるとの報告があった。
- 8) 実験で使用した安定型のGal-9とwild typeのGal-9の活性の違いは？今回安定型を使用した理由→Gal-9の作用はガラクトシド結合を介してのものなのでおそらく活性の違いはないと考えられる。実験を行った時点で使用可能なGal-9が安定型のものだった。また今回使用したGal-9はこれまで抗ウイルス効果、抗腫瘍効果を持っていることが報告済みである。
- 9) 以前のGal-9実験での報告と今回の実験でメンブレンアレイ、microRNAで共通点は？→メンブレンアレイで胆管細胞がんとは異なった結果だった。microRNAでは共通しているものがあり、例えばmiR-1246が肝細胞がん、胆管細胞がんと共通してup regulationされていた。
- 10) Gal-9投与がアポトーシスをおこす経路は？→Gal-9がターゲット遺伝子を分解し、それによってミトコンドリアのアポトーシス経路が誘導されたり、細胞生存経路のPI3K/Akt経路が抑制されたことによると考えている。
- 11) 化学療法とGal-9の併用を行っている実験はあるか？→Gal-9の固型癌に対する実験が少なく、まだ行われていない。
- 12) in vivoでマウスへのGal-9の投与方法は？腫瘍の近くに投与すると効果に違いがでるのではないかと？→実験を行っていないためわからないが、今後検討していきたい。

掲載誌名	Oncology Reports	第	巻, 第	号
(公表予定) 掲載年月	2015年10月27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。