




### 学位論文審査の結果の要旨

平成 29 年 1 月 13 日

審査委員	主査	合井田 克己 		
	副主査	辻 晃仁 		
	副主査	鈴木 康之 		
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	13D744	氏名	田所 智子
論文題目	Galectin-9: An anticancer molecule for gallbladder carcinoma			
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; ガレクチン-9(Gal-9)はβ-ガラクトシド結合蛋白の1つであり、各種癌において腫瘍増殖抑制効果が報告されている。しかし、胆嚢癌に対する検討は未だされていない。今回我々は胆嚢癌細胞においてGal-9による増殖抑制効果及び抑制機構についてin vitro, in vivoの系で検討した。</p> <p>方法; In vitroの検討: 4種類の胆嚢癌細胞株(NOZ, G-415, TGBC24TKB, OCUG-1)を使用した。これらの細胞株に対してGal-9(0.1μM~1μM)を投与し、細胞増殖抑制効果をCell proliferation assayで検討した。Gal-9によるアポトーシスの誘導をcaspase-cleaved cytokeratin18を測定し検討した。アポトーシス関連蛋白およびレセプター型チロシンキナーゼ群をアレイチップにて網羅的に解析した。Gal-9が細胞周期に与える効果をフローサイトメトリーで検討し、細胞周期関連蛋白群をWestern blotで解析した。Gal-9の投与で変化するマイクロ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。In vivoの検討: NOZ細胞をヌードマウスに皮下移植し、Gal-9投与による癌細胞増殖抑制効果を検討した。</p> <p>結果; in vitroの検討ではOCUG-1以外の胆嚢癌細胞株において、Gal-9の投与により濃度依存的に増殖抑制効果を示した。caspase-cleaved cytokeratin18をELISA法にて測定した検討では、NOZにおいてGal-9は有意にアポトーシスを誘導していたが、OCUG-1では認められなかった。フローサイトメトリーによる細胞周期の解析では、NOZ, OCUG-1ともにGal-9投与による変化は認めず、細胞周期関連蛋白の発現も変化がなかった。更にNOZではphospho-p53の発現が亢進することによりアポトーシス誘導効果が生じている可能性が示唆された。NOZにおいては更にレセプターチロシンキナーゼリン酸化抗体アレイにて、Gal-9投与群でEphrin B2, B3 受容体が活性化されていた。Gal-9投与群は非投与群と異なるマイクロRNAプロファイリングを形成し、Gal-9の癌細胞増殖抑制効果に関連し変化するマイクロRNA群を同定した。特に有意差を持って37種のmicroRNAがup-regulate、29種がdown-regulateしていた。in vivoの検討ではGal-9投与によりヌードマウスに皮下移植された癌細胞増殖が顕著に抑制された。</p>				

結論；Gal-9が3種類の胆嚢癌細胞株に対し癌細胞増殖抑制作用を持つことをin vitro、in vivoの系で証明した。効果が乏しかったOCUG-1と比較すると、効果の認められたNOZではアポトーシスの誘導効果が認められた。特にNOZではphospho-p53の発現が亢進しており、p-53を介したアポトーシスの誘導の可能性が考えられた。一方、細胞周期に及ぼす影響は少なく、実臨床においては、細胞周期にも影響を及ぼす他の抗癌剤などの併用が有効かもしれない。また、microRNAはGal-9によるアポトーシスのメカニズムと関連しており、microRNAの解析はGal-9の作用の新たなメカニズムを解明し、胆嚢癌治療における新しいターゲットとなり得る分子を発見するための強力なツールとなる可能性が示唆された。

平成29年1月6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) OCUG-1を選んだ理由は？増殖能そのものが弱いため効果がなかったのではないか？  
→7種類の胆嚢癌細胞株を準備し、増殖能がある程度そろったものを使用した。特にOCUG-1を選んだわけではない。増殖能は確かに結果に作用する可能性があると思われる。
- 2) p53の発現はOCUG-1ではもともと強いのではないか？  
→確かにOCUG-1では元々発現が強いためGal-9が効果を及ぼしにくかった可能性がある。しかし効果のあった別な細胞株でp53の下流の分子も増強していたので、p53は腫瘍増殖抑制に関わる分子であると推測される。
- 3) 各種細胞株の分化度は？抗腫瘍効果との関連は？  
→効果があった3種類は未～中分化腺癌で、効果がないOCUG-1は低分化腺癌だった。分化度自体の影響は乏しいと思われる。一方OCUG-1は腺癌から予後の悪い扁平上皮癌への移行がみられる特殊な細胞株であり、そのことが効果の違いとなっている可能性がある。
- 4) Gal-9の投与量はどのように決めたか？  
→先行文献および我々のグループで使用している投与量を用いた。In vivoの系では、今までの投与方法ではin vitroの量よりもかなり少ない血中濃度になるため、今回は皮下注ではなく腹腔内投与とし、vitroで効果があったと思われる血中濃度を確保した。
- 5) Gal-9の副作用は？  
→Gal-9投与により死亡や体重減少例はなかった。また、我々はGal-9単剤投与では、マウスの血液データや臓器に明らかな副作用をもたらさないことを証明している。
- 6) エフリン受容体の変化が著しいが、作用は？  
→一般的には細胞増殖に働く動きではあるが、癌における働きは未だ議論されている段階。胆嚢癌患者ではエフリンB受容体の発現が生存率の向上に寄与しているという報告もある。
- 7) 以前のGal-9実験での報告と今回でmicroRNAの共通点は？  
→microRNAでは共通の動きを示したものが合計37分子/66分子中あった。逆の動きのものは3分子あった。どのmiRNAが最も効果に関与するかは検討できていないが多くの分子が共通した動きがあった。
- 8) In vivoの系で最後に増殖が大きくなるのは耐性の獲得が原因か？  
→その可能性はある。これ以上腫瘍が大きくなるのは望ましくないためこれ以上の期間延長はしていない。Gal-9のアポトーシスは特に早期に起こるといわれており、長期間では効果が乏しくなる可能性はある。

平成29年1月6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発行されている。

掲載誌名	International Journal of Oncology 第48巻, 第3号		
(公表予定) 掲載年月	2016年 1 月	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。