




学位論文審査の結果の要旨

平成30年 / 月3 / 日

審査委員	主査	中村 隆範 		
	副主査	今井田 克己 		
	副主査	星川 宏史 		
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	13D747	氏名	明石 瑛美子
論文題目	Effects of galectin-9 on apoptosis, cell cycle and autophagy in human esophageal adenocarcinoma cells			
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】近年、食道腺癌は特に欧米諸国において急速に増加しているが、未だ予後は不良である。ガレクチン-9(Gal-9)はタンデムリピート型のβ-ガラクトシド結合蛋白のひとつであり、様々な癌においてアポトーシスを誘導し腫瘍増殖抑制効果を示すことが報告されているが、食道腺癌に対する検討はなされていない。今回、我々は食道腺癌細胞におけるGal-9による増殖抑制効果およびその機構についてin vitroで検討した。

【方法】4種類の食道腺癌細胞株(OE19, OE33, SK-GT4, OACM5.1C)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、MTT assayで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 cytokeratin18の発現の測定、Annexin V-FITC kitを用いた解析、カスパーゼ活性をWestern blotで解析した。Gal-9のオートファジーへの影響を検討するためLC3, SQSTM1/p62をWestern blotで解析した。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投与によるレセプター型チロシンキナーゼ群、血管新生分子群の変化をアレイチップにて解析した。Gal-9の投与で変化するmicroRNAを同定するため、2555分子が搭載されたチップを用いて網羅的に解析した。

【結果】4種類すべての食道腺癌細胞株において、Gal-9の投与により濃度依存的に増殖抑制効果を示した(Fig1)。SK-GT4, OE19, OE33においてcaspase-cleaved cytokeratin18の濃度が上昇しており、アポトーシスが誘導されていた(Fig2A)。Annexin V-FITC kitを用いた解析にてもSK-GT4においてアポトーシスが誘導されていた(Fig2B, C)。SK-GT4においてGal-9の投与により活性型カスパーゼ3, 活性型カスパーゼ9の発現は増加したが(Fig2D)、カスパーゼ阻害薬存在下にGal-9を投与してもアポトーシスの抑制はみられず、カスパーゼ非依存性アポトーシスがより強く関与していると考えられた。(Fig2E)。SK-GT4においてGal-9はオートファジーを阻害していた(Fig2F)。細胞周期の解析では、SK-GT4においてGal-9による変化は認めず、細胞周

期関連蛋白の発現も変化なかった。Gal-9はSK-GT4においてIL-8の血管新生分子を増強させた(Fig3)。レセプター型チロシンキナーゼ群ではSK-GT4においてGal-9投与による変化は認めなかった。Gal-9投与群は非投与群と異なるmicroRNAプロファイルを形成していた(Fig4)。特に有意差を持って31種のmicroRNAがup-regulate, 10種がdown-regulateしていた。

【結論】Gal-9は4種類の食道腺癌細胞株において細胞増殖を抑制した。SK-GT4においては、その抑制機構はカスパーゼ非依存性アポトーシスとオートファジー阻害が関与している可能性がある。実臨床においては、薬剤抵抗性食道腺癌においてオートファジー阻害剤としての相乗効果も期待できる。また、同定されたmiRNAのうち、Gal-9投与によりmiR-200cの発現が抑制されていた。miR-200cの過剰発現は食道腺癌において予後不良となることが報告されており、このmiR-200c発現抑制がGal-9の抗腫瘍効果に関与している可能性が示唆された。

【質疑応答】

Q. Annexin V FITC Kit のフローサイトメトリーの結果からはアポトーシスがメインの細胞増殖抑制経路とは言えないのではないかと？

A. Annexin V FITC Kit の結果ではアポトーシスは約8%程度で、確かにメインの経路とは言い難い結果であったため、文献的に報告のあったオートファジーの実験を追加して検討した。その結果、食道腺癌においてはGal-9はオートファジー機能不全も誘導していた。

Q. オートファジーの実験で、クロロキンのようなインヒビターを追加して実験をしたか？

A. 今回はインヒビターを加えた実験は行えていないので、今後さらに検討していきたい。

Q. miR-200c以外で抗腫瘍効果に関連したものはあったか？

A. miR-21は他の癌腫でも増加していることが多く、抗腫瘍効果に関連している報告はある。

Q. 直接miR-200cを抑制すると腫瘍抑制効果はあるのか？

A. 文献的な報告はあるが、今回の実験では検討できていない。今後検討したい。

Q. 日本では食道癌は扁平上皮癌が多いが、そちらに対しての効果は検討しているか？

A. 現在実験中であるが、in vitroでアポトーシスによる腫瘍増殖抑制効果が確認されている。

Q. Gal-9の胃癌に対するin vivoでの効果はどうか？

A. in vivoで効果を認めている。

Q. 4種のcell lineはどのようにして選択したのか？

A. 分化度の異なるcell lineをそろえるようにし、その時点で手に入れられたものを使用した。OE33は低分化型、OE19は中分化型、SK-GT4は高分化型であった。MTT assayではすべてのcell lineについて腫瘍増殖抑制効果を認めた。また、その後各種実験で使用したSK-GT4は高分化型癌であり、少なくともGal-9は高分化型食道腺癌に対し、アポトーシスとオートファジー機能不全により腫瘍抑制を導くと考えられた。

Q. バレット食道癌についてはどうだったか？

A. OE33とOACM5.1cはバレット食道癌であったので、バレット食道癌についても効果があると考えられた。

Q. ピロリ菌が存在しないことがバレット食道癌のリスクファクターなのか？

A. ピロリ菌が存在しないことは、胃食道逆流症のリスクファクターであり、胃食道逆流症があるとバレット食道を起しやすくなるため、バレット食道癌のリスクファクターと言える。

Q. Gal-9を0.3μMの濃度に設定したのはなぜか？

A. 先行文献や当科でこれまで報告してきた実験を参考に濃度を設定した。

Q. angiogenesisのアレイでIL-8が増加しているが、これだけが増加するというのはあり得るか？

A. 他の経路も影響しているのかもしれないが、今回は検討できていない。

平成30年1月29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、明石瑛美子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 38巻, 第 1号
(公表予定) 掲 載 年 月	2017年7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。