

氏 名 片岡 瑛子

学位の種類 博士 (医学)

学位記番号 博士甲博士第 840 号

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項

学位授与年月日 平成 31 年 3 月 8 日

学位論文題目 Hypoxia-induced galectin-3 enhances RhoA function to activate the motility of tumor cells in non-small cell lung cancer

(非小細胞肺癌において低酸素で誘導されるガレクチン 3 は RhoA の活性化を介して腫瘍細胞の運動能を亢進する)

審査委員 主査 教授 醍醐 弥太郎

副査 教授 平田 多佳子

副査 教授 谷 眞至

論文内容要旨

※整理番号	847	(ふりがな) 氏名	かたおか ようこ 片岡 瑛子
学位論文題目	Hypoxia-induced galectin-3 enhances RhoA function to activate the motility of tumor cells in non-small cell lung cancer (非小細胞肺癌において低酸素で誘導されるガレクチン 3 は RhoA の活性化を介して腫瘍細胞の運動能を亢進する)		
【目的】 ガレクチン 3 は腫瘍細胞の増殖、浸潤、転移、抗アポトーシスを促進し腫瘍の進展に重要な役割を担っており、予後との関連を示す報告が多く存在する。バイオマーカーや治療標的として関心を集めているが、非小細胞肺癌においてガレクチン 3 の発現意義は未だ明らかになっていない。ガレクチン 3 発現を誘導する要因の一つとして低酸素が報告されており、低酸素環境は、元来、がん組織における特徴的な腫瘍微小環境で浸潤や転移に関連している。そこで、我々は、非小細胞肺癌細胞において、低酸素下でガレクチン 3 の発現が誘導され、腫瘍細胞の遊走および浸潤を促進し、術後再発に寄与しているのではないかと仮説を立てた。本研究では、低酸素状態における非小細胞肺癌細胞のガレクチン 3 の発現意義と、肺腺がんにおけるガレクチン 3 発現の臨床病理学的意義を明らかにすることを目的とした。			
【方法】			
① 低酸素環境下での非小細胞肺癌細胞におけるガレクチン 3 発現の解析： 非小細胞肺癌細胞株 (A549, LK-2) を、通常酸素または低酸素 (2%酸素) で 72 時間培養を行い、ガレクチン 3 の発現を RT-PCR 法、ウェスタンブロット法で、ガレクチン 3 の分泌量を ELISA 法で評価した。			
② 低酸素環境下においてガレクチン 3 が非小細胞肺癌細胞に与える影響の検討： ガレクチン 3 を発現している非小細胞肺癌細胞株 (A549, LK-2) と、shRNA によりガレクチン 3 発現抑制した安定細胞株、コントロールの shRNA を遺伝子導入した安定細胞株を、通常酸素または低酸素 (1%酸素) で 24 時間または 48 時間培養を行い、MTT assay で増殖能、wound healing assay で遊走能、invasion assay で浸潤能を評価した。			
③ 低酸素環境下でガレクチン 3 が RhoA 活性化に及ぼす影響の検討： 低酸素で誘導されるガレクチン 3 が非小細胞肺癌細胞の運動能を促進する機序を調べるため、細胞運動を制御する RhoA に着目した。ガレクチン 3 発現抑制ならびにコントロール非小細胞肺癌細胞株を、通常酸素または低酸素 (1%酸素) で 48 時間培養を行い、細胞質蛋白と細胞膜蛋白をそれぞれ抽出し、RhoA の発現をウェス			

(備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2千字程度でタイプ等を用いて印字すること。

2. ※印の欄には記入しないこと。

別紙様式3の2（課程博士・論文博士共用）

（続紙）

タンブロット法で、活性化型 RhoA (RhoA GTP) の発現を ELISA 法で評価した。

④ 浸潤性肺腺がんにおけるガレクチン3の発現と臨床病理学的意義の検討：

2008年から2012年に滋賀医科大学医学部附属病院・呼吸器外科で根治術を施行した pN0M0 浸潤性肺腺がん 57 症例の切除組織検体を用いてガレクチン3の免疫組織化学染色を施行し、臨床病理学的因子および予後との関連性を検討した。腫瘍細胞の10%以上に染色陽性細胞が存在する場合を高発現症例と評価した。本研究は滋賀医科大学倫理審査委員会の承認を受けた。

【結果】

非小細胞肺がん細胞におけるガレクチン3の発現は、低酸素培養により、mRNA および蛋白レベルともに発現増強が認められたのに対し、分泌量には有意な変化は認められなかった。非小細胞肺がん細胞の遊走能および浸潤能は、低酸素刺激により促進され、ガレクチン3発現抑制により、低酸素下で誘導される遊走能および浸潤能は有意に抑制された。一方で、低酸素培養およびガレクチン3発現抑制により、増殖能に有意な変化は認められなかった。低酸素培養により、RhoA 発現は、細胞質で変化しなかったが、細胞膜で発現の増強が認められた。ガレクチン3発現抑制非小細胞肺がん細胞では、細胞膜における RhoA 発現は有意に抑制された。細胞膜の RhoA 発現と同様に、RhoA の活性型である RhoA GTP の発現も低酸素培養により増強し、ガレクチン3発現抑制により有意に低下した。pN0M0 浸潤性肺腺がん 57 症例において、ガレクチン3は壊死および癒痕周囲の腫瘍細胞に多く発現が確認された。ガレクチン3高発現症例は、術後再発および脈管浸潤との有意な関連性が認められた。

【考察】

ガレクチン3は、非小細胞肺がん細胞での発現抑制により、低酸素で誘導される遊走能および浸潤能を有意に抑制した。このことから、ガレクチン3は低酸素で誘導される運動能に強く関与する可能性が示唆された。運動能に関わる機序の一つとして、ガレクチン3は細胞膜の RhoA 発現を増強させ、RhoA を活性化することで、運動能の促進に寄与していると考えられた。in vitro の結果と同様に、ガレクチン3を発現している腫瘍細胞は、低酸素状態と考えられる領域に多く確認され、脈管浸潤および再発と関連しており、ガレクチン3はバイオマーカーとして有用であると考えられた。今回の検討は in vitro での検討であることと肺がん症例数が少ないことから、in vivo での検討や症例数の蓄積を今後加える必要がある。

【結論】

非小細胞肺がんにおいて、低酸素により誘導されるガレクチン3は、細胞膜の RhoA 発現の増強を介して RhoA を活性化し腫瘍細胞の遊走能および浸潤能の促進に寄与していると考えられた。早期浸潤性肺腺がん症例において、腫瘍細胞のガレクチン3発現は、術後再発予測因子として有用である可能性がある。

学位論文審査の結果の要旨

整理番号	847	氏名	片岡 瑛子
論文審査委員			
<p>(学位論文審査の結果の要旨) ※明朝体 11ポイント、600字以内で作成のこと</p> <p>本論文では、低酸素状態の非小細胞肺癌細胞における galectin-3 の発現の意義と肺腺がん組織における galectin-3 発現の臨床病理学的意義を明らかにすることを目的として研究を行った。そのため、2 種類の非小細胞肺癌細胞株を用いて低酸素環境の有無で galectin-3 の発現阻害実験を行い、細胞増殖、遊走、浸潤能およびその RhoA 活性化との関連を検討し、さらに早期肺腺がん組織における galectin-3 の発現と臨床病理学的因子との相関について検討を行い、以下の点を明らかにした。</p> <ol style="list-style-type: none">1) 非小細胞肺癌において、低酸素下で誘導される細胞内の galectin-3 は細胞の増殖能には関与せず、遊走能と浸潤能の増強に関与している。2) 非小細胞肺癌において、低酸素下で誘導される細胞内の galectin-3 は RhoA を活性化する。3) 早期の肺腺がん症例において galectin-3 の発現は術後再発及び脈管浸潤と有意に相関する。 <p>本論文は、低酸素下の非小細胞肺癌細胞における galectin-3 の細胞運動能への関与と肺腺がん症例における galectin-3 発現の臨床病理学的意義の一端を明らかとし、これらの情報を用いた今後の研究と臨床展開について新たな知見を与えたものであり、また最終試験として論文内容に関連した試問を実施したところ合格と判断されたので、博士(医学)の学位論文に値するものと認められた。</p> <p style="text-align: right;">(総字数 598 字)</p> <p style="text-align: right;">(平成 31 年 1 月 28 日)</p>			