

**岩手医科大学
学位審査報告**

氏 名 かま だ ひとし
鎌 田 仁
学位の種類 博士（歯学）
学位授与番号 岩医大院歯博第 237 号
学位授与の日付 平成 20 年 3 月 11 日
学位論文題目 Galectin-1 はヒト口腔扁平上皮癌細胞のアノキスを抑制する

論文内容の要旨**I 研究目的**

上皮細胞は、インテグリンなどを介する細胞外マトリックスとの接着が欠如すると、足場に依存したアポトーシスであるアノキスを生じる。上皮由来の腫瘍細胞が転移を起こすには、アノキスの機構から逃れる必要がある。しかしながら、口腔扁平上皮癌（OSCC）におけるアノキスの研究はあまり進んでおらず、その機序は明らかにされていない。本研究では、OSCC 由来の転移能のない HSC-2 細胞と転移能を有する HSC-3 細胞を用いて、OSCC におけるアノキス関連分子の検索とその分子の機能解析を目的とした。

II 研究方法

HSC-2 ならびに HSC-3 細胞のアノキスの測定は、細胞接着を防ぐ poly-2-hydroxyethyl methacrylate (poly-HEMA) でコートしたディッシュで培養した細胞を、トリパンブルーで染色し、染色された死細胞数を計測することにより行った。細胞のアポトーシスの確認は、TUNEL 染色により行った。既知のアノキス関連因子については、RT-PCR 法で mRNA の発現量を調べた。また細胞タンパク質の発現については、両細胞のプロテオーム解析を二次元電気泳動法とイオントラップ型質量分析計（LC-MS/MS）を用いて行い、発現量の異なるタンパク質の同定を行った。

III 研究成績**1. HSC 細胞のアノキス**

Poly-HEMA コートディッシュを用いて HSC-2 および HSC-3 細胞のアノキスを検討した。その結果、培養 48 時間後に HSC-2 細胞は HSC-3 細胞と比較して死細胞の割合が有意に高く、この細胞死はアポトーシスによるものであることが TUNEL 染色により確認された。

2. アノキス関連因子の検討

HSC-2 および HSC-3 細胞における TrkB, caveolin-1, および galectin-3 の発現量を RT-PCR 法を用いて mRNA レベルで比較した。その結果、TrkB および galectin-3 は両細胞でほとんど発現が認められず、caveolin-1 については発現は認められたものの、細胞間における有意差は認められなかった。

3. HSC 細胞のプロテオーム解析

HSC-2 と HSC-3 細胞の細胞タンパク質を抽出し、プロテオーム解析を行った。その結果、両細胞間で発現量の異なるいくつかのタンパク質スポットが確認された。このうち、等電点 (pI) 5.0, 分子量 15 kDa 付近で、HSC-2 細胞と比較して HSC-3 細胞で強く発現しているタンパク質を見出した。LC-MS/MS による解析の結果、このタンパク質は galectin-1 と同定された。

4. Galectin-1 の mRNA レベルでの発現

HSC-2 と HSC-3 細胞における galectin-1 の発現量の相異を確認するため、mRNA レベルでの発現量を RT-PCR 法により調べた。その結果、HSC-3 細胞と比べて HSC-2 細胞の発現量は有意に低いことが確認された。

5. ラクトース添加による galectin-1 のアノイクスへの影響

Galectin-1 が β -ガラクトシド構造に特異的に結合する性質を利用し、HSC-3 細胞の細胞培養液中にラクトースを添加し、細胞膜上の galectin-1 を除去した場合での細胞死の割合の変化を調べた。その結果、ラクトースを添加した細胞では有意な死細胞数の増加を認めた。

6. Galectin-1 のアノイクスへの影響

HSC 細胞のアノイクスに galectin-1 が直接作用するかを調べるために、HSC-2 細胞の細胞培養液中に組換え galectin-1 を添加して細胞死の割合の変化を調べた。その結果、細胞死の割合は添加した galectin-1 の濃度依存的に有意に減少した。

IV 考察及び結論

1. 転移能のない HSC-2 細胞は、転移能を有する HSC-3 細胞と比較して、アノイクスのレベルが有意に高いことがわかった。
2. プロテオーム解析の結果、HSC-2 細胞と比較して HSC-3 細胞で強く発現しているタンパク質として galectin-1 を見出した。
3. ラクトースの添加による galectin-1 の細胞結合阻害により、HSC-3 細胞は強くアノイクスを生じた。
4. 組換え galectin-1 タンパク質を HSC-2 細胞の培養液中に添加したところ、細胞のアノイクスのレベルは濃度依存的に低下した。

以上の結果から、galectin-1 が OSCC 細胞において、細胞のアノイクスを抑制する因子であることが示された。

論文審査の結果の要旨

論文審査担当者

- 主査 教授 佐藤 詔子 (口腔生化学講座)
副査 教授 木村 重信 (口腔微生物学講座)
副査 教授 杉山 芳樹 (口腔外科学第二講座)

上皮細胞は細胞外マトリックスとの接着が欠如すると、足場依存性のアポトーシスであるアノイクスを生じるが、上皮由来の腫瘍細胞の転移はこのアノイクスを回避することにより起こると考えられている。しかしながら、ヒト口腔扁平上皮癌 (OSCC) におけるアノイクスの制御機構は明らかにされていない。

本研究では OSCC 由来細胞である転移能のない HSC-2 ならびに転移能を有する HSC-3 を用いて、アノイクスに関与する分子の探索とその分子の機能を解析した。その結果、i) HSC-2 は HSC-3 に較べアノイクスが有意に高かった。ii) アノイクス関連因子として知られている TrkB mRNA と galectin-3 mRNA は両細胞でほとんど発現していなかった。一方、発現が認められた caveolin-1 mRNA は細胞間で有意な差はなかった。そこで iii) HSC-2 ならびに HSC-3 のプロテオーム解析を行い、HSC-3 で高発現するレクチン様分子、galectin-1 を同定した。iv) HSC-3 へのラクトース添加はアノイクスを生じた。一方、galectin-1 の発現が低い HSC-2 へのリコンビナント galectin-1 の添加はアノイクスを低下させた。

以上のことより galectin-1 が OSCC 細胞においてアノイクスの抑制に関わる因子の一つであることを明らかにした。

本研究で得られた知見は galectin-1 が口腔扁平上皮癌の転移機構を考える上で分子的基盤を与えるものであり、論文は学位に値するものと評価した。

試験・試問の結果の要旨

本研究の内容ならびに関連事項について試問を行ったところ、適切な回答が得られた。また、生化学・口腔生化学全般に対する知識を有している点などから、学位に値する学識と研究能力を有するものと判定した。