



Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士 (医学)
報告番号	甲第1992号
学位記番号	第1403号
氏名	林 祐一
授与年月日	令和5年9月25日
学位論文の題名	Girdin regulates both migration and angiogenesis in pancreatic cancer cell lines (Girdin は膵癌細胞株において遊走と血管新生の両方を制御する) Oncology Reports. 2023 Sep;50(3):169. Epub 2023 Jul 28.
論文審査担当者	主査： 片岡 洋望 副査： 稲垣 宏, 高橋 智

論文内容の要旨

【背景・目的】膵癌は悪性度が高い。その理由として隣接する組織や神経などに浸潤しやすく、早期に遠隔転移をきたすことが挙げられる。我々はこれらに血管新生能の亢進が関与していることを報告してきた。膵癌浸潤および血管新生の分子生物学的機序の解明と、それを標的とする新たな治療薬の開発は喫緊の課題である。Girdin は, Akt の基質として発見されたタンパクであり、細胞骨格を形成するアクチン線維を再構成し、細胞運動に重要な葉状仮足の形成に関与している。近年では、一部の癌腫における浸潤や血管新生への関与が報告されている。一方、最近、フラボノイドの一種であるスクテラリンが、STAT3/Girdin シグナル伝達を阻害し、腫瘍浸潤・転移を抑制することが報告された。スクテラリンは、抗腫瘍効果や神経保護作用などで知られ、古来中国では脳血管治療にも用いられてきた天然化合物である。今回我々は、膵癌遊走および血管新生における Girdin の役割を検討し、さらに、スクテラリンの Girdin 抑制効果ならびに腫瘍抑制効果について検証した。

【方法】①膵癌における Girdin の臨床的意義について、膵癌切除検体における Girdin の免疫染色を行い、予後や臨床組織学的背景との関連について検討した。②膵癌細胞株における Girdin の発現を検証し、ノックダウン株を作成した。③Girdin ノックダウン株における遊走能の変化を検証した。また、細胞遊走における p-Girdin の発現変化を蛍光免疫染色で検証した。④スクテラリンの膵癌細胞株に対する毒性を WST-1 assay で検証し投与濃度を決定した。スクテラリン処理による p-Girdin の変化を蛍光免疫染色および Western blotting で検証した。また、スクテラリン処理による遊走能の変化を検証した。⑤Girdin ノックダウン株における血管新生因子 VEGF-A の発現および分泌の変化を検証した。⑥Girdin ノックダウン株の上清を用いた On Matrigel tube formation assay にて、不死化ヒト内皮細胞の管腔形成能の変化を検証した。⑦スクテラリン処理による VEGF-A の発現・産生変化も検証した。

【結果】①膵癌組織免疫染色の結果、Girdin は癌細胞の細胞質に一致して染色がみられ、その強度によって強染色群、弱染色群に分類した。Girdin 強染色群では OS および RFS が有意に不良であった。また、Girdin 染色度と癌の T 因子およびステージは有意に相関がみられた。②qRT-PCR および Western blotting の結果、すべての膵癌細胞株で Girdin の発現を認めた。発現の高い MIA PaCa-2, AsPC-1, PANC-1 細胞株を用いて siRNA 法で Girdin をノックダウンした。③1ng/mL の EGF 刺激下で膵癌細胞株は遊走能が亢進するのに対し、Girdin ノックダウン株では EGF 刺激下においても遊走能が有意に抑制された。蛍光免疫染色では、EGF 刺激で p-Girdin の発現亢進とともに葉状仮足の形成を確認した。④スクテラリンはいかなる濃度でも膵癌細胞株に毒性を認めず、以降の実験濃度を 100 μ M と設定した。蛍光免疫染色の結果、スクテラリン処理により p-Girdin の発現が抑制されると同様に葉状仮足の形成が抑制された、また、Western blotting の結果、EGF 刺激により亢進した p-Girdin の発現は、スクテラリン処理下では抑制されることを確認した。⑤qRT-PCR および ELISA では、Girdin ノックダウン株における VEGF-A の発現および分泌は有意に抑制された。⑥コントロール群と比べ、膵癌細胞株の上清を用いた場合、不死化ヒト内皮細胞の管腔形成能は亢進したが、Girdin ノックダウン株の上清では、その管腔形成能は有意に抑制された。⑦qRT-PCR および ELISA の結果、スクテラリン処理による VEGF-A の発現および分泌は、EGF の投与の有無に関わらず変化がみられなかった。

【結語】Girdin の発現は膵癌予後と相関し、新たなバイオマーカーにもなりうることが考えられた。一方、Girdin は膵癌において EGF シグナルを介した遊走能に関与し、それをスクテラリンが阻害することで癌浸潤を抑制しうる可能性が示唆された。また、Girdin は膵癌からの VEGF-A

産生を制御し、血管新生能に関与することも示唆された。膵癌遊走能の制御において、スクテラリンは **Girdin** を標的する新規薬剤として予後の改善につながる可能性が考えられた。

(注) 和文で2,000字以内でまとめる

論文審査の結果の要旨

【背景・目的】膵癌は悪性度が高く、その理由として局所浸潤能が高く早期に遠隔転移をきたすことが挙げられ、これまで我々は転移能は血管新生能と相関することを報告してきた。膵癌における浸潤および血管新生の分子生物学的機序の解明とそれを標的とする新たな治療薬の開発は喫緊の課題である。Girdin は Akt によりリン酸化され細胞骨格を形成するアクチン線維を再構成し、細胞運動に重要な葉状仮足の形成に関与している。近年、一部の癌腫における浸潤や血管新生への関与が報告されてきた。一方、フラボノイドのスクテラリンが STAT3/Girdin シグナル伝達を阻害し腫瘍浸潤・転移を抑制することが報告された。本研究では、膵癌細胞の遊走および血管新生における Girdin の役割を検討し、さらに、スクテラリンの Girdin 抑制効果ならびに腫瘍抑制効果について検証した。

【方法・結果】①膵癌臨床検体の免疫組織染色の結果、Girdin は癌細胞の細胞質に一致して染色がみられ、その強度により強染色群、弱染色群に分類した。Girdin 強染色群では OS および RFS が有意に不良であった。また、Girdin 染色度と癌の T 因子およびステージには有意な相関がみられた。② qRT-PCR および Western blotting の結果、すべての膵癌細胞株で Girdin の発現を認め、高発現株に対し siRNA 法で Girdin をノックダウンし siGirdin 株を樹立した。③ Transwell assay では、0.1ng/mL の EGF 刺激下で膵癌細胞株の遊走能が亢進するのに対し、siGirdin 株では EGF 刺激下でも遊走能が有意に抑制された。蛍光免疫染色では EGF 刺激で p-Girdin(Y-1764) の発現亢進とともに葉状仮足の形成を確認した。④ WST-1 assay により、スクテラリンの実験濃度を膵癌細胞株に毒性を認めない 100 μ M と設定した。蛍光免疫染色の結果、スクテラリン処理により p-Girdin の発現が抑制されると同時に葉状仮足の形成が抑制された。Western blotting の結果、EGF 刺激により亢進した p-Girdin の発現はスクテラリン処理下では抑制されることを確認した。⑤ qRT-PCR および ELISA では、siGirdin 株における VEGF-A の発現および分泌は有意に抑制された。⑥ コントロール群と比べ、膵癌細胞株の上清では不死化ヒト内皮細胞の管腔形成能は亢進したが、siGirdin 株の上清では管腔形成能は有意に抑制された。⑦ qRT-PCR および ELISA の結果、VEGF-A の発現および分泌は、EGF またはスクテラリンの投与の有無に関わらず変化がみられなかった。

【結語】 Girdin の発現は膵癌予後と相関し新たなバイオマーカーにもなりうると考えられた。一方、Girdin は膵癌において EGF シグナルを介した遊走能に関与し、それをスクテラリンが阻害することで癌浸潤を抑制しうる可能性が示唆された。また、Girdin は膵癌からの VEGF-A 産生を制御し、血管新生能に関与することも示唆された。

【審査内容】 主査の片岡洋望教授からは①Girdin の発現機序について、②ノックダウンによる細胞形態の変化、③スクテラリンの生体での濃度についてなど計 8 項目の質問がなされた。第 1 副査の稲垣宏教授からは①免疫染色でランゲルハンス島を基準した理由、②膵癌組織型と Girdin 発現の相関についてなど計 9 項目の質問がなされた。第 2 副査の高橋智教授からは①Western blotting における Girdin の二重バンドの理由、②Girdin リン酸化部位の違いによる作用の違いなど計 16 項目の質問がなされた。これらの質問に対し、一部返答に窮することもあったがおおむね満足すべき回答が得られ、学位論文の主旨を十分理解していると判断した。本研究は、Girdin が膵癌遊走と血管新生を制御することを示唆し、今後の発展も期待できると考えられた。よって、これらの新知見を報告した本論文の筆頭著者は博士(医学)の学位を授与するに相応しいと判断した。

論文審査担当者 主査 片岡 洋望

副査 稲垣 宏, 高橋 智