



## Nagoya City University Academic Repository

|         |   |
|---------|---|
| 学位の種類   | 博士（医学）  |
| 学位記番号   | 第 997 号   |
| 氏名      | 柴田 孝弥   |
| 授与年月日   | 平成 25 年 7 月 30 日  |
| 学位論文の題名 | <p>Girdin, a regulator of cell motility, is a potential prognostic marker for esophageal squamous cell carcinoma<br/>(細胞の移動の調節因子である Girdin は食道扁平上皮癌の予後マーカーとなりうる)</p> <p>ONCOLOGY REPORTS Vol. 29: 2127-2132, 2013</p> |
| 論文審査担当者 | 主査：稲垣 宏                      副査：城 卓志, 竹山 廣光   |

## 論文内容の要旨

Girdin は細胞骨格の actin 線維に結合する Akt の基質タンパクである。線維芽細胞や乳癌の細胞株において、Akt 依存性に actin 線維を再構築することで細胞の移動に関与していると報告されている。当教室では食道癌手術を年間 30 例以上行っており、今回、食道扁平上皮癌における Girdin の役割について検討した。

最初にヒト食道扁平上皮癌細胞株である KYSE series とヒト正常食道扁平上皮細胞株である Het-1A より RNA を抽出して real-time PCR を施行した。すべての細胞株で Girdin の発現がみられ、比較的 Girdin の発現が高い KYSE-270, KYSE-450, KYSE-510 を以降の実験に使用した。

食道扁平上皮癌細胞の移動における Girdin の働きを視覚的に捉える目的で、KYSE-270 の蛍光免疫染色を施行した。epidermal growth factor (EGF) で刺激していない状態では、Girdin も filamentous actin も細胞質内にびまん性に分布していた。これに対して、EGF 刺激下では、細胞は lamellipodia (葉状仮足) を形成し、Girdin と filamentous actin の集積が lamellipodia の先端にみられた。

続いて cell migration assay を行った。KYSE-270, KYSE-450, KYSE-510 に negative control siRNA または Girdin siRNA を導入。導入効率は real-time PCR と Western blot で確認した。これらの細胞を Boyden chamber assay の insert に播いて培養し、24 時間後に matrigel でコーティングされた membrane を通過した細胞数を比較した。結果は、EGF 刺激下では Girdin を knockdown した細胞は、control に比べて有意に細胞の移動能が低下した。

以上、Girdin が食道扁平上皮癌細胞の移動に関与している可能性が *in vitro* の実験で示唆された。

続いて食道扁平上皮癌の手術標本を用いた研究を行った。

手術標本の腫瘍と正常粘膜から RNA を抽出して real-time PCR を行ったところ、腫瘍部では正常粘膜と比較して有意に高い Girdin の RNA 量が認められた。

Girdin の抗体を用いた腫瘍標本の免疫染色も行った。臨床学的特徴については T-factor のみ有意差がみられた。Girdin の強陽性群は弱陽性群と比較して腫瘍の深達度が深かったが、リンパ節転移、遠隔転移などに関しては有意差はみられなかった。Log-rank test で生存率を比較したところ、Girdin 強陽性群の方が生存率が低いという結果が得られた。

以上、今回の研究より、Girdin は食道扁平上皮癌細胞の運動に関与しており、臨床面では Girdin の発現が高いほど腫瘍の浸潤能が増加し、生存率が低下する傾向があるという結果が示唆された。食道扁平上皮癌の手術を受けた患者の生存率と Girdin の発現量の間に関係がみられたことから、Girdin は食道扁平上皮癌の予後マーカーとなりうると考えられた。また、食道扁平上皮癌の術前化学療法時に、Girdin をターゲットとする薬剤をあわせて使用することで、治療成績の向上が期待できると考えられた。

## 論文審査結果の要旨

### 【研究内容の概要】

Girdin は細胞骨格の actin 線維に結合する Akt の基質タンパクである。線維芽細胞や乳癌の細胞株において、Akt 依存性に actin 線維を再構築することで細胞の移動に関与していると報告されている。今回、著者らは食道扁平上皮癌における Girdin の役割について検討した。

最初にヒト食道扁平上皮癌細胞株である KYSE series とヒト正常食道扁平上皮細胞株である Het-1A より RNA を抽出して real-time PCR を施行した。すべての細胞株で Girdin の発現がみられ、比較的 Girdin の発現が高い KYSE-270, KYSE-450, KYSE-510 を以降の実験に使用した。食道扁平上皮癌細胞の移動における Girdin の働きを視覚的に捉える目的で、KYSE-270 の蛍光免疫染色を施行した。epidermal growth factor (EGF) で刺激していない状態では、Girdin も filamentous actin も細胞質内にびまん性に分布していた。EGF 刺激下では、細胞は葉状仮足を形成し、Girdin と filamentous actin の集積が葉状仮足の先端にみられた。

続いて cell migration assay を行った。KYSE-270, KYSE-450, KYSE-510 に negative control siRNA または Girdin siRNA を導入した。導入効率は real-time PCR と Western blot で確認した。これらの細胞を Boyden chamber assay の insert に播いて培養し、24 時間後に matrigel でコーティングされた membrane を通過した細胞数を比較した。結果は、EGF 刺激下では Girdin を knock-down した細胞は、control に比べて有意に細胞の移動能が低下した。以上より、Girdin が食道扁平上皮癌細胞の移動に関与している可能性が in vitro の実験で示唆された。

次に食道扁平上皮癌の手術標本から腫瘍と正常粘膜から RNA を抽出して real-time PCR を行ったところ、腫瘍部では正常粘膜と比較して有意に高い Girdin の RNA 量が認められた。Girdin の抗体を用いた腫瘍標本の免疫染色を行った。臨床学的特徴については T-factor のみ有意差がみられた。Girdin の強陽性群は弱陽性群と比較して腫瘍の深達度が深かったが、リンパ節転移、遠隔転移などに関しては有意差はみられなかった。Log-rank test で生存率を比較したところ、Girdin 強陽性群の方が生存率が低いという結果が得られた。

以上から、Girdin は食道扁平上皮癌細胞の運動に関与しており、臨床面では Girdin の発現が高いほど腫瘍の浸潤能が増加し、生存率が低下する傾向があるという結果が示唆された。

### 【審査の概要】

上記の論文内容が申請者より発表された後、主査の稲垣より Girdin 発現と腫瘍組織型との関連や腫瘍深達度との関連についてなど10項目、第1副査の城教授より運動能の他に Girdin の持つ機能や Girdin 抑制により変化する遺伝子についてなど10項目の質問があった。最後に第2副査の竹山教授より専門領域に関連して” 転移性肝癌に対する治療” についての質問があった。いずれの質問に対してもほぼ的確な回答があり、論文内容を良く把握するとともに、専門領域においても十分な知識を持ち得ているものと判断した。

本研究は、食道扁平上皮癌における Girdin の機能・役割を in vitro の実験と臨床検体を用いた実験で検討し、この分子が食道扁平上皮癌の予後マーカーとなりうること、また治療ターゲットとなる可能性を示したものである。よって本論文の著者には博士(医学)の学位を授与するに値すると判断した。