

学位論文内容の要旨

論文提出者氏名	論文審査担当者
田中 覚	主査 教授 谷 川 允 彦 副査 教授 樋 口 和 秀 副査 教授 林 秀 行 副査 教授 芝 山 雄 老 副査 教授 朝 日 通 雄
主論文題名 Proteomic analysis of the basic proteins in 5-fluorouracil resistance of human colon cancer cell line using the radical-free and highly reducing method of two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (RFHR 二次元電気泳動法を用いた、大腸癌細胞株における 5-FU 耐性に関連する塩基性蛋白のプロテオーム解析)	
学位論文内容の要旨	
<p>《背景と目的》</p> <p>5-fluorouracil (5-FU)は、進行大腸癌患者に対する抗癌剤治療で広く使用されており、今なおその主軸を担っている。しかし、5-FU に対する耐性獲得は、治療成果を妨げる大きな原因の一つである。従って、癌細胞における 5-FU 感受性に関する新たな分子マーカーを検索する事は、適正な治療を行う上で最も重要な手段の一つと考えられる。近年 DNA マイクロアレイを用いて、新たな分子マーカーを検索する報告が散見される。しかし、薬剤感受性に関わる機序の把握に有用なマーカーを見出すには、遺伝子の最終産物である蛋白質を調べる事が必須であると考えられる。</p> <p>一方、5-FU の活性体は、最終的に DNA、RNA に損傷を与え、アポトーシスを起こさせて抗腫瘍効果を発揮すると考えられている。さらに、核酸に直接結合し、その働きを制御する蛋白質の多くは、正電荷を持つ塩基性蛋白である。</p> <p>以上より本研究は、本学物理学教室の和田が考案した塩基性蛋白の分離および翻訳後修飾の定量性に優れた radical-free and highly reducing (RFHR) 二次元電気泳動法を用いて、大腸癌細胞株における 5-FU 耐性に関連する塩基性蛋白を解析する事を目的とした。</p> <p>《材料と方法》</p> <p>材料は、大腸癌細胞株 (DLD-1、以下親株)、5-FU 耐性株として確立された細胞株 (DLD-1/5-FU、以下耐性株)を用いた。</p> <p>方法は、各々の細胞株から酢酸法により可溶性蛋白を抽出し、RFHR 二次元電気泳動法にて蛋白質を分離した。得られたゲルを Coomassie Brilliant Blue で染色、脱色を行い、デンストメトリーによって両者間での発現する塩基性蛋白スポットを定量し、2 倍以上発現量に差のあるスポットを有意とみなした (再現性を得るために、各々の細胞株から 3 回ずつサンプル調製を行い、1 回のサンプルで 2 枚ずつのゲルを解析した)。両者の細胞株に発現の違いが認められた蛋白質スポットをゲルからくり抜き、ゲル内消化を行い質量分析器 (MALDI-TOF MS/MS) を用いて蛋白質を同定した。</p> <p>《結 果》</p> <p>親株、耐性株における 5-FU に対する用量反応曲線を MTT アッセイにて作成した。IC₅₀ は親株では $7.02 \pm 1.0 \mu\text{M}$、耐性株では $74.1 \pm 4.7 \mu\text{M}$ と 10.6 倍の差であった ($P < 0.3 \times 10^{-6}$)。</p>	

電気泳動で分離された塩基性蛋白のうち、有意に発現量の異なるスポットを 6 個認め、いずれも耐性株において発現が亢進していた。これらのスポットから質量分析器にて以下の 5 個の蛋白質が同定された〔heterogeneous nuclear ribonucleoprotein G (hnRNP G)、mitochondrial transcription factor A(TFAM)、histone H2B、histone H4、ribosomal protein L3〕。尚、同定されたスポットのうち 2 個は、いずれも histone H4 であった。

《考 察》

これまでの 5-FU 耐性に関する研究は、thymidylate synthase、dihydropyrimidine dehydrogenase、orotate phosphoribosyl transferase (OPRT)等の 5-FU 代謝酵素に関する報告が主で、今回用いた耐性株において、OPRT の活性が低下し RNA 損傷を来す代謝経路が抑制され、5-FU 耐性を示すとの報告がある。従って、耐性株における 5-FU の細胞毒性は、DNA 損傷によるものが大きいと考えられる。本研究では、耐性株において hnRNP G および TFAM の発現が亢進していた。hnRNP G は、p53 の存在下に DNA の二重螺旋損傷に起因して起こる非相同末端再結合の際に発現が促進され、DNA 修復に関わる蛋白質複合体を形成する事が報告されている。一方 TFAM は、ミトコンドリア DNA と結合し、その転写促進および保護する蛋白質とされている。さらに、大腸癌細胞株 (HCT116)において、エトポシド、5-FU により起こるアポトーシスの際に、TFAM のミトコンドリア内での発現が増加したという報告や、HeLa 細胞に TFAM を強発現させると、エトポシド、カンプトテシン、シスプラチンに対する細胞障害が軽減されたといった報告がある。以上より、本耐性株では、hnRNP G、TFAM を高発現させる事で、5-FU による DNA のみならずミトコンドリア DNA 損傷から細胞を保護している可能性が示唆された。

さらに、近年 histone の翻訳後修飾がクロマチンのリモデリングを起こし、遺伝子発現を制御する事が明らかになってきた。本研究では、耐性株において、histone H2B、H4 の一部が酸性側にシフトしたスポットとして高発現しており、これらは翻訳後修飾を受けた histone H2B、H4 と考えられる。この結果より、5-FU 耐性に関する遺伝子が、恒常的に転写制御されている可能性が示唆された。

今回の結果は、大腸癌細胞における複雑な 5-FU 耐性機序に対し、新たな耐性克服の機序解明に繋がるばかりではなく、大腸癌に対する新規抗癌剤での治療戦略の一助になりうる事が期待される。

審査結果の要旨および担当者

報告番号	甲 第 号	氏 名	田 中 覚
論文審査担当者		主 査 教 授 谷 川 允 彦	
		副 査 教 授 樋 口 和 秀	
		副 査 教 授 林 秀 行	
		副 査 教 授 芝 山 雄 老	
		副 査 教 授 朝 日 通 雄	
主論文題名			
<p>Proteomic analysis of the basic proteins in 5-fluorouracil resistance of human colon cancer cell line using the radical-free and highly reducing method of two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis</p> <p>(RFHR 二次元電気泳動法を用いた、大腸癌細胞株における 5-FU 耐性に関連する塩基性蛋白のプロテオーム解析)</p>			
論文審査結果の要旨			
<p>5-fluorouracil (5-FU)が使用され始めて 40 年以上経過するが、今なお抗癌剤の中心的存在である。しかし、抗癌剤に対する効果は症例により様々で、さらに癌細胞が抗癌剤耐性を獲得する事により、治療の選択が制限される。従って、5-FU 耐性の機序を解明する事は、適正な抗癌剤治療を行う上で必須である。これまでの 5-FU 感受性に関する研究は、5-FU の代謝酵素に対するものが主であった。実際、5-FU の異化酵素である dihydropyrimidine dehydrogenase を選択的に阻害する成分が含まれた TS-1 は、これらの研究の成果に伴うものである。</p> <p>本研究は、RFHR 二次元電気泳動法の持つ塩基性蛋白に対する優れた分離能力に注目し、5-FU が DNA および RNA 損傷を与え、癌細胞にアポトーシスを起させる事、さらに核酸に直接結合してその働きを制御する蛋白質の多くは塩基性であるという事から、大腸癌細胞株を用いて 5-FU 耐性に関連する塩基性蛋白を初めて解析した。その結果、5-FU 耐性株において、heterogeneous nuclear ribonucleoprotein G, mitochondrial transcription factor A が高発現しており、5-FU による DNA、ミトコンドリア DNA 損傷から細胞を保護している可能性が示唆された。さらに、耐性株において二次元ゲル上で histone H2B, H4 の一部が翻訳後修飾を受けたと考えられ、5-FU 耐性に関する遺伝子が、恒常的に転写制御されている可能性が示唆された。</p> <p>これらの結果は、大腸癌細胞における 5-FU 耐性の機序解明に繋がるばかりでなく、新規抗癌剤の開発の一助になりうる可能性がある。</p> <p>以上により、本論文は本学大学院学則第 11 条に定めるところの博士(医学)の学位を授与するに値するものと認める。</p>			
(主論文公表誌)			
International Journal of Oncology 33(2): 361-370, 2008			