

学位論文内容の要旨

論文提出者氏名	論文審査担当者
木村光誠	主査 教授 樋口 和秀 副査 教授 瀧内 比呂也 副査 教授 林 秀行 副査 教授 田窪 孝行
<p>主論文題名</p> <p>Comparative proteomic analysis of the ribosomes in 5-fluorouracil resistance of a 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、ヒト大腸癌細胞株 5-FU 耐性におけるリボソームの比較プロテオーム解析)</p>	
学位論文内容の要旨	
<p>《背景と目的》</p> <p>リボソームはタンパク合成において重要な装置であり、ヒトの場合、約 80 個のリボソームタンパクと 4 種類の RNA で構成されている。従来、これら各成分の発現は協調的に制御されていると考えられてきたが、最近になり従来考えられているよりその制御は弱いものであるとの報告があり、リボソームタンパクの変化と細胞状況との関係に関心が集まっている。薬剤耐性とリボソームタンパクとの関係を示唆する報告も散見されるが、リボソームタンパクの強い塩基性のため、現在主に用いられている Immobilized pH gradient (IPG) 二次元電気泳動法では十分に分離できず、プロテオミクスの手法を用いた網羅的な解析はほとんどおこなわれていない。</p> <p>今回、ヒト大腸癌細胞株 (DLD-1、以下親株)、5-fluorouracil (5-FU) 耐性株 (DLD-1/5-FU、以下耐性株) に対し、塩基性タンパクの解析に優れる radical-free and highly reducing (RFHR) 二次元電気泳動法を用いて、リボソームタンパク</p>	

のプロテオーム解析をおこない、5-FU 耐性とリボソームタンパクとの関連について考察した。

《方 法》

親株と耐性株のリボソームを分画した後、タンパク質を RFHR 二次元電気泳動法にて分離し、デンストメトリー解析にて各スポットを定量し、変動のあるスポットを、質量分析器 (MALDI-TOF MS/MS) を用いて同定した。解析は独立した 6 セットの検体についておこなった。

《結 果》

親株と比較し耐性株において、2 つのタンパクの減少と 1 つのタンパクの増加が認められた。それらのトリプシン消化物の質量分析器 MS/MS 解析により、それぞれ L15、L37 およびプロヒビチンと同定された。

《考 察》

今回耐性株において、2 つのリボソームタンパク (L15、L37) の減少がみられた。このことは、L15 と L37 を構成成分として含まないリボソームが親株と比較し耐性株に多く存在することを示す。薬剤耐性とこの変化との関連として、以下の二つの仮説が考えられる。

一つ目は、2 つのリボソームタンパクを失うことによるリボソームの構造変化が 5-FU 耐性と関連していることも考えられる。例えば、リボソームタンパク L5 の低下は L11 の増加につながり、細胞のアポトーシスを引き起こすように、あるリボソームタンパクを失うことは他のリボソームタンパクが過剰になることを意味し、このことがアポトーシスや腫瘍化と関連している可能性があると報告されている。今回のリボソームの変化が細胞分化やアポトーシスを制御し、薬剤感受性に影響している可能性がある。

二つ目は L15 と L37 の extraribosomal functions が考えられる。通常リボソームタンパクはリボソーム構成に携わるが、リボソームから離れ、リボソーム以外の細胞構成成分と共に働くことがある。この機能は extraribosomal functions と呼ばれ、様々な例が報告されている。今回、耐性株でリボソーム構成に携わる L15 と L37 の減少が示されたが、以前我々がおこなった細胞内に含まれる全塩基性タンパクの検討では、これら 2 つのタンパクに有意な変動は見られなかった。これらを合わせて考えると、リボソーム構成に携わらない、すなわち extraribosomal functions を示す L15 と L37 が耐性株において増加していることが示唆される。これら 2 つのタンパクと薬剤耐性との関連に関する報告はないが、共に腫瘍化の関連が報告されている。また細胞内シグナル伝達の一つ PI3K/AKT/mTOR シグナルは腫瘍化を促進するだけでなく、薬剤耐性獲得に関与することが報告されている。L37 は S6 キナーゼと関連し、アポトーシスを制御する可能性も報告されている。L15、L37 の extraribosomal functions が 5-FU 薬剤耐性に関与している可能性がある。

また今回 5-FU 耐性株においてプロヒビチンの増加がみられた。プロヒビチンはミトコンドリア DNA を維持しミトコンドリア安定に関与すると報告されており、この働きには同じくミトコンドリアに存在するタンパクである mitochondrial transcription factor A (TFAM) が関与していることが知られている。TFAM は薬剤誘導性アポトーシスを制御することが知られており、以前我々がおこなった DLD-1 全塩基性タンパクの検討でも耐性株で TFAM の増加が示されている。プロヒビチンは TFAM と共にミトコンドリア DNA を安定化し 5-FU 耐性を維持していることを示唆する。

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なく、新たな治療戦略の一助になりうることが期待される。しかし、今回これら 3 つのタンパクの 5-FU 耐性に対する影響を直接検討しておらず、さらなる研究が必要である。

審査結果の要旨および担当者

報告番号	甲第	号	氏名	木村光誠
論文審査担当者			主査教授 樋口 和秀	
			副査教授 瀧内 比呂也	
			副査教授 林 秀行	
			副査教授 田窪 孝行	
主論文題名				
<p>Comparative proteomic analysis of the ribosomes in 5-fluorouracil resistance of a 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、ヒト大腸癌細胞株 5-FU 耐性におけるリボソームの比較プロテオーム解析)</p>				
論文審査結果の要旨				
<p>5-fluorouracil (5-FU)が使用され始めて 50 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、薬剤感受性は症例によって様々で、さらに癌細胞が治療継続に伴い、薬剤耐性を獲得することもあり、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ことは、適正な抗癌剤治療を行う上で必須のことである。</p> <p>近年、リボソームタンパクの多機能性が報告され、薬剤耐性との関連の報告も散見される。しかし、リボソームタンパクの持つ強塩基性のため、十分な解析がされていないのが現状である。</p> <p>本研究は、radical-free and highly reducing (RFHR)二次元電気泳動法の持つ塩基性タンパクに対する優れた分解能力に注目し、大腸癌細胞株を用いて 5-FU 耐性に関連するリボソームタンパクを初めて解析した。その結果、5-FU 耐性株ではリボソームタンパク L15、L37 を構成成分として欠損したリボソームが増加していることが示された。このことより 5-FU 耐性とリボソームの構造変化や L15、L37 の</p>				

extraribosomal functions との関連が示唆された。またプロヒビチンが増加しており、5-FU によるミトコンドリア DNA 損傷から細胞を保護している可能性が示唆された。

これらの結果は、大腸癌細胞における 5-FU 耐性の機序解明につながるばかりでなく、新規抗癌剤の開発の一助になりうる可能性がある。

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。

(主論文公表誌)

International Journal of Oncology 37(5): 1271-1278, 2010