

学位論文内容の要旨

論文提出者氏名	論文審査担当者
伏谷英朗	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 大道 正英
<p>主論文題名</p> <p>Differential display of the basic protein in 5-fluorouracil resistance of human colon cancer cell line using the radical-free and highly reducing method of two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (RFHR2 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解析)</p>	
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である。そのような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>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。DNA、RNA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質であることから、とりわけ塩基性蛋白質が分子マーカーの検索対象として注目される。</p> <p>本研究は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>	

## 《材料と方法》

材料は、大腸癌細胞株（HT-29、以下親株）、5-FU 耐性株として確立された細胞株（HT-29/5-FU、以下耐性株）を用いた。各々の細胞株から酢酸法により可溶性蛋白質を抽出し、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塩基性蛋白質スポットを定量し、親株と耐性株の間で2 倍以上発現量に差のあるスポットを有意とみなした。それらのスポットをゲルから切り出し、ゲル内消化を行ったのちに飛行時間型質量分析器（MALDI-TOF MS/MS）を用いて蛋白質を同定した。

## 《結 果》

親株と比較し耐性株において、3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解析により、それぞれ ribosomal protein L5、L9、L10、mitochondrial transcription factor A(TFAM) と同定された。

## 《考 察》

本研究では、耐性株においてTFAM の発現が亢進していた。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とあわせると、本耐性株においてTFAM がアポトーシスを抑制するように働いていることが示唆される。耐性株において発現低下のみられたL5,L9,L10 は、近年の研究で、アポトーシスと癌化に関連するとの報告があり、5-FU耐性との関連の可能性が示唆される。以上の結果は、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、新たな治療戦略の一助になりうることを期待される。

## 審査結果の要旨および担当者

報告番号	甲第	号	氏名	伏谷英朗
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 大道 正英	
主論文題名				
<p>Differential display of the basic protein 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>(RFHR2 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、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 S-1 は、これらの研究の成果に伴うものである。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過程において、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。本研究は、Radical-free and highly reducing method (RFHR)2 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、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、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</p>				

している可能性が示唆された。さらに、耐性株において 2 次元ゲル上で ribosomalprotein L5、L9、L10 が減弱していたが、これらは、近年の研究で、p53 蛋白の活性化を担っていると考えられている。以上の結果は、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。

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)

Bulletin of the Osaka Medical College 57(1): 39-48, 2011