

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

論 文 提 出 者 氏 名	論 文 審 査 担 当 者
尾 方 章 人	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>Proteomic Analysis Regarding Resistance to Anticancer Drugs Using a 5-Fluorouracil-Resistant Human Gastric Cancer Cell Line and The Radical-Free and Highly Reducing Method of Two-Dimensional Electrophoresis</p> <p>(5-fluorouracil 耐性ヒト胃癌細胞株を用いた抗がん剤耐性にかかわるプロテオーム解析－radical-free and highly reducing 二次元電気泳動法による検討－)</p>	
学 位 論 文 内 容 の 要 旨	
<p>《背景と目的》</p> <p>抗癌剤の長期使用による耐性獲得は、その治療効果を大きく妨げる原因となっている。今回、タンパク質分解能に優れた radical-free and highly reducing 二次元電気泳動法 (RFHR 法)により、胃癌細胞株とその 5-FU 耐性株におけるタンパク質の発現の違いを検索した。これにより 5-FU 耐性に関連する新たなタンパク質を同定し、抗がん剤耐性の機序を検討することにより、耐性を克服するための新たな知見を得ることが期待できる。</p> <p>《方 法》</p> <p>今回の研究では、ヒト胃癌細胞株 : NUGC-3と、その5-FU耐性株 : NUGC-3/5-FUを使用した。NUGC-3、NUGC-3/5-FUともに、細胞を核および細胞膜を含む分画 (分画A) と、ミトコンドリアやリボソームを含むそれ以外の分画 (分画B) に分離し、酢酸法を用いてタンパク質の抽出を行った。抽出された核および細胞膜のタンパク質を、RFHR法による泳動の後、ゲル上のスポットの濃度を比較し、2つの</p>	

細胞株の間で発現量に差を認めたスポットをゲル上から切り抜き、タンパク質を抽出した。タンパク質の同定には、マトリックス支援レーザー脱離イオン化—飛行時間型—質量分析計(Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight-Mass Spectrometry: MALDI-TOF-MS)を用いた。

《結 果》

NUGC-3 および NUGC-3/5-FU より抽出した核および細胞膜のタンパク質を RFHR 法で泳動した結果、高い分解能と再現性をもって、それぞれの泳動パターンが得られた。2つの細胞株のタンパク質の泳動パターンを比較したところ、7個のスポットに発現量の差を認め、6個のスポットでは NUGC-3 と比較し NUGC-3/5-FU で発現量が増加し、1個のスポットでは減少していた。この7個のスポットにつき、ゲルを消化後、MALDI-TOF-MS 法にて質量分析を行った結果、発現量の増加を認めた6個のスポットのうち同定可能であったスポットは4個であり、それぞれ S6、S8、S15、S20 リボソームタンパク質であった。また発現量の減少を認めた1個のスポットは、High Motility Group I(Y) (HMG-I(Y))タンパク質であった。

《考 察》

今回研究に使用した RFHR 法は、Immobilized pH gradient 法ならびに Klastschmidt-Wittmann (K-W) 法の弱点を補い克服するために、K-W 法を改良し開発された。電荷を持ったラジカルスカベンジャーをプレランしてフリーラジカルを完全に除去し、同時に電荷を持った還元剤をタンパク質と泳動して S-S 架橋の形成を阻止した。また二次元ゲルの pH を、K-W 法の pH4.5 から pH3.6 に下げることで、すべてのタンパク質が陰極へ向かい泳動するようにした。さらに一次元泳動の前にサンプルを濃縮する目的で零次元泳動を導入した。以上のような

改良を加えた結果、RFHR 法はタンパク質の分離能と定量性を著しく向上させた二次元電気泳動法であり、プロテオーム解析に有用な方法となった。

HMG-I(Y)は DNA の構造維持や遺伝子の転写を制御している非ヒストン DNA 結合タンパク質である。大腸癌や膵癌、腎癌において、その過剰発現が発癌機構に深く関与していることが報告されているが、発現減少と薬剤耐性との関連を示唆する文献は認められていない。今後、今回行わなかった核および細胞膜以外のタンパク質のプロテオーム解析を含め検討が必要である。

ヒトリボソームは約 80 個のリボソームタンパク質と 4 種類の rRNA からなっており、タンパク質合成において重要な役割を担っている。近年、リボソームタンパク質はこのようリボソームを構成する役割とは別に、リボソームから離れ、核内や細胞質内において、DNA 合成、アポトーシス等と関連していることが報告され、extraribosomal function として注目されている。今回の研究では、核および細胞膜を含む分画を対象としており、リボソームは除外している。そのため、今回みられた 4 個のリボソームタンパク質 (S6、S8、S15、S20) の変化は extraribosomal なものであると考察される。

S6、S8、S15、S20 リボソームタンパク質と薬剤耐性との分子生物学的な関係は不明であるが、S6 リボソームタンパク質遺伝子の欠失が p53 による細胞周期の停止やアポトーシスを誘導するという報告や、大腸癌や大腸ポリープにおいて S6、S8 リボソームタンパク質をコードしている mRNA が増加しているという報告が認められている。これらのことから、本研究は RNA からタンパク質を合成するリボソームタンパク質の発現量の変化と薬剤耐性の関係が、extraribosomal function を解析する上でも重要な知見と考えられる。

《結 語》

RFHR 法は、網羅的解析を目的とするプロテオミクスにおいて、タンパク質を分離純化する有用な方法であると考えられた。

本研究で同定された HMG-I(Y)や S6、S8 などのリボソームタンパク質の機能解析研究を通じて癌細胞の 5-FU に対する薬剤耐性メカニズムを解析することが必要であり、薬剤耐性の克服が期待される。

審査結果の要旨および担当者

報告番号	乙第 号	氏 名	尾 方 章 人
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>Proteomic Analysis Regarding Resistance to Anticancer Drugs Using a 5-Fluorouracil-Resistant Human Gastric Cancer Cell Line and The Radical-Free and Highly Reducing Method of Two-Dimensional Electrophoresis</p> <p>(5-fluorouracil 耐性ヒト胃癌細胞株を用いた抗がん剤耐性にかかわるプロテオーム解析—radical-free and highly reducing 二次元電気泳動法による検討—)</p>			
論文審査結果の要旨			
<p>5-fluorouracil (5-FU)は、癌患者に対する化学療法で広く使用され、その主軸を担っている。しかし臨床の現場において、5-FU に対する耐性獲得により、抗癌剤の変更を余儀なくされる場面が多く認められる。従って、5-FU の耐性機序を解明することは、適正な抗癌剤治療を行う上で重要である。</p> <p>本研究は、タンパク質の分解能に優れた radical-free and highly reducing 二次元電気泳動法 (RFHR 法)を用い、胃癌細胞株において 5-FU 耐性に関連するタンパク質を初めて解析した。RFHR 法は従来の電気泳動法の弱点であるタンパク質同定率の低さを改善し、タンパク質の分離能と定量性を著しく向上させた方法であり、プロテオーム解析に有用である。</p> <p>5-FU 耐性株において、High Motility Group I(Y) (HMG-I(Y))タンパク質の発現量が減少しており、S6、S8、S15、S20 リボソームタンパク質の発現量が増加していた。HMG-I(Y)は DNA の構造維持や遺伝子の転写を制御している非ヒストン</p>			

DNA 結合タンパク質であり、その過剰発現や異所性発現が発癌機構や癌転移に関与しているという報告は散見される。しかし HMG-I(Y)の発現減少と薬剤耐性の関連を示唆する文献は認められておらず、胃癌細胞株における核および細胞膜での HMG-I(Y)の発現減少が、5-FU 耐性に寄与している可能性が示唆された。またリボソームタンパク質は、タンパク質合成を担うリボソームを構成するタンパク質であるが、それとは別に、リボソームから離れ種々の細胞内機能との関連が報告され、extraribosomal function として注目されている。本研究では、核および細胞膜を含む分画を対象としており、リボソームは基本的に除外されている。従って本研究で 5-FU 耐性との関連が示唆されたリボソームタンパク質の変化は、extraribosomal なものであると考察される。

これらの結果は、胃癌細胞における 5-FU 耐性の機序解明に繋がり、新規抗癌剤の開発の一助になりうる可能性がある。またリボソームタンパク質の extraribosomal function を解析する上でも重要な知見と考えられる。

以上より、本論文は本学学位規程第 3 条第 2 項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): 31-38, 2011