

氏 名	吉 田 修 平
(ふ り が な)	(よ し だ し ゅ う へ い)
学 位 の 種 類	博士 (医学)
学 位 授 与 番 号	甲 第 号
学 位 審 査 年 月 日	平成 26 年 7 月 30 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学 位 論 文 題 名	Gene amplification of ribosomal protein S6 kinase-1 and -2 in gastric cancer (胃癌におけるリボソームタンパク質 S6 キナーゼ 1 とキナーゼ 2 の遺伝子増幅の検討)
論 文 審 査 委 員	(主) 教授 内 山 和 久 教授 樋 口 和 秀 教授 廣 瀬 善 信

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

《背景と目的》

セリン/スレオニンキナーゼである哺乳類ラパマイシン標的タンパク質 (mTOR) は、mRNA の翻訳や細胞の成長・増殖・生存などを調節しており、mTORC1 と mTORC2 の 2 つの複合体を形成している。リボソームタンパク質 S6 キナーゼ (S6K) は、mTORC1 の重要な標的分子であり S6K1 と S6K2 の 2 種類が存在する。S6K1 は、翻訳開始、タンパク合成、細胞生存などを調節しており、mTORC1-S6K1 シグナル伝達経路は細胞生理学的に重要な機能を担っている。また、この経路は癌細胞の生存・増殖に重要な役割があると考えられており、現在、mTOR 阻害薬が開発され、癌に対する分子標的薬として臨床で使用されている。

進行胃癌については、現在までに様々な治療法が探究されてきたが、未だにその予後は

不良である。そこで、進行胃癌の新たな治療法として、分子標的薬が開発されているが、そのためには臨床検体の遺伝子解析が不可欠である。しかし、胃癌において *S6K1* と *S6K2* の遺伝子増幅の有無やその臨床的意義に関しては、ほとんど報告されていない。

本研究では、胃癌細胞株および食道癌細胞株を用いた検討に加え、外科手術により摘出された臨床検体（胃癌組織）のパラフィン包埋ホルマリン固定サンプル（FFPE サンプル）を使用し、*S6K1* と *S6K2* の遺伝子増幅を後ろ向きに評価し、その臨床的意義を検討した。

《対象と方法》

1) 癌細胞株を用いた検討

胃癌細胞株 5 株（44As3、58As1、HSC43、IM95、OKAJIMA）と食道癌細胞株 4 株（KYSE50、KYSE150、KYSE170、KYSE180）を用いた。*S6K1* と *S6K2* の遺伝子増幅の評価を、array-based comparative genomic hybridization（アレイ CGH）による解析と、TaqMan® Copy Number Assays を用いた DNA コピー数変化の測定による二つの方法で行った。また、mRNA 発現量の評価をリアルタイム逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（Real-time RT-PCR）で行い、タンパク質発現量の評価を Western blot 法で行った。

2) 臨床検体を用いた検討

1996 年から 2006 年までの間に、国立がん研究センターにて外科的切除術を受けた胃癌患者 213 名の FFPE サンプルを用いた。マクロダイセクション後に DNA を抽出し、TaqMan® Copy Number Assays で DNA コピー数の変化を測定し、*S6K1* および *S6K2* 遺伝子増幅の有無を評価した。

《結 果》

1) 癌細胞株を用いた検討

① アレイ CGH 解析の結果、*S6K1* 遺伝子増幅は 44As3 細胞株で認められ、*S6K2* 遺伝子増幅は OKAJIMA、KYSE170、KYSE180 細胞株で認められた。TaqMan® Copy Number Assays を用いた DNA コピー数変化の測定でも、アレイ CGH 解析と同様の結

果が得られ、胃癌細胞株・食道癌細胞株の一部の細胞株に *S6K1*、*S6K2* 遺伝子増幅が認められた。

② *S6K1* の mRNA は OKAJIMA 細胞株で高発現が認められ、*S6K2* の mRNA は OKAJIMA、KYSE180 細胞株で高発現が認められた。またタンパク発現の評価では、*S6K1* タンパクはほとんどの細胞株で発現しており、細胞株間の差が少なかった。*S6K2* タンパクは、OKAJIMA、KYSE180 細胞株で高発現が認められた。*S6K1* 遺伝子の増幅が認められた細胞株と、mRNA とタンパクの高発現が認められた細胞株は一致しなかったが、*S6K2* 遺伝子の増幅が認められた細胞株 (OKAJIMA、KYSE170、KYSE180) と、mRNA とタンパクの高発現が認められた細胞株 (OKAJIMA、KYSE180) の間には関連性が見られた。

2) 臨床検体を用いた検討

① 胃癌の臨床検体 213 検体では、*S6K1* 遺伝子増幅は認められなかったが、*S6K2* 遺伝子増幅は 10 検体 (4.7%) で認められた。

② stage IV の 108 人の検体において、*S6K2* 遺伝子増幅を有する群 (n=4) と有さない群 (n=104) の全生存期間を比較すると、*S6K2* 遺伝子増幅を有する群は全生存期間が有意に短く、予後不良であった。

《考 察》

免疫組織化学を用いた解析により、リン酸化 *S6K1* タンパク質が様々な癌腫 (乳癌、肺癌、黒色腫、肝細胞癌、神経膠腫) で高発現しており、予後不良と関連していることが多数報告されている。*S6K1* 遺伝子増幅に関しては、乳癌で 6~14% の頻度で認められており、乳癌における *S6K1* 遺伝子増幅の存在は広く認識されている。また、髄芽腫、びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫でも *S6K1* 遺伝子増幅の報告がある。本研究において、胃癌細胞株の 44As3 細胞株において *S6K1* 遺伝子増幅が認められたが、臨床検体では認められず、胃癌において *S6K1* 遺伝子増幅は稀であることが示唆された。

一方、*S6K2* に関しては、その分子学的機能、生物学的機能や、癌との関連に関する研

究報告は非常に少ない。本研究は、胃癌の臨床検体を用いて *S6K2* 遺伝子増幅を評価した。その結果、4.7%に *S6K2* 遺伝子増幅が認められ、subgroup 解析ではあるが *S6K2* 遺伝子増幅が予後不良と関連する可能性が示唆された。mTOR シグナル伝達経路を理解し、分子標的薬の開発を目指すためには、さらなる *S6K2* の解析が期待される。

《結 語》

胃癌の臨床検体において *S6K2* 遺伝子増幅が 4.7%の例で認められた。また、*S6K2* 遺伝子増幅の存在が予後不良因子となる可能性が示唆された。*S6K2* 遺伝子は、胃癌において mTOR シグナル経路の分子標的薬のターゲットになる可能性がある。

論文審査結果の要旨

セリン/スレオニンキナーゼである哺乳類ラパマイシン標的タンパク質 (mTOR) は、mRNA の翻訳や細胞の成長・増殖・生存などを調節している。その標的分子であるリボソームタンパク質 S6 キナーゼ (S6K) とのシグナル伝達経路は、癌細胞の生存・増殖に重要な役割を果たしていると考えられており、現在、mTOR 阻害薬は癌に対する分子標的薬として使用されている。進行胃癌は予後不良であり、新たな治療法として分子標的薬が開発されているが、そのためには臨床検体の遺伝子解析が不可欠である。しかし、胃癌において S6K (S6K1 と S6K2) の遺伝子増幅の有無やその臨床的意義に関しては、ほとんど報告されていない。申請者は、胃癌細胞株および食道癌細胞株を用いた検討に加え、外科手術により摘出された胃癌の臨床検体のパラフィン包埋ホルマリン固定サンプル (FFPE サンプル) を使用し、*S6K1* と *S6K2* の遺伝子増幅を後ろ向きに評価し、その臨床的意義を検討した。

その結果、胃癌細胞株および食道癌細胞株には、*S6K1* 遺伝子および *S6K2* 遺伝子の増幅を認める細胞株を認めた。しかし、胃癌の臨床検体では *S6K1* 遺伝子増幅は認められず、胃癌において *S6K1* 遺伝子増幅は稀であると考えられた。一方 *S6K2* に関しては、胃癌の臨床検体の 4.7% に *S6K2* 遺伝子増幅が認められ、subgroup 解析ではあるが増幅の認められた症例の予後が有意に不良であった。以上より、申請者は、*S6K2* 遺伝子が、胃癌において mTOR シグナル経路の分子標的薬のターゲットになる可能性を示唆している。本研究は、胃癌における mTOR シグナル経路、とりわけ *S6K2* に関する新知見を提供するもので、今後の分子標的薬の開発にその有用性が期待される。

以上により、本論文は本学大学院学則第 11 条第 1 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)

Anticancer Research 33(2): 469-475, 2013