

学位論文の要旨

氏名

川畑 拓斗

学位論文題目

リボソーム蛋白質L11の発現は胃癌の5-FUに対する感受性に関与する

代謝拮抗剤5-fluorouracil (5-FU) は、多くの癌種の治療薬として用いられている。本論文は、5-FUを添加した胃癌細胞では、リボソーム蛋白質L11 (RPL11) を介したP53経路の活性化による細胞増殖の抑制が起こることを明らかにした。また、RPL11は胃癌の5-FUに対する感受性を決定するバイオマーカーになり得ることを示した。

第1章は序章として、がんや、その治療法、胃癌と胃癌治療の現状、癌抑制因子P53、これまでに報告されているリボソーム蛋白質による細胞増殖抑制メカニズム、及び骨肉腫細胞に対する5-FUの細胞増殖抑制メカニズムについてまとめ、本研究の必要性とその意義について述べている。

第2章では、Kaplan-Meier plotterを用いた生存時間解析を行うことで、*RPL11*の発現が5-FUをベースとした化学療法を受けた胃癌患者の予後に関与するかについて検討した。5-FUをベースとした化学療法を受けた胃癌患者において、*RPL11*の発現が高い患者は、*RPL11*の発現が低い患者に比べて、予後が良好であることが示された。一方、手術のみを受けた胃癌患者においては、*RPL11*の発現が高い患者と低い患者の間に有意な差は認められなかった。これらの結果から、*RPL11*の発現は胃癌の5-FUに対する感受性を上昇させ、治療効果を高めていると考えられた。

第3章では、胃癌細胞株に対する5-FUの効果が*RPL11*のノックダウンによってどのように変わるかを検討した。胃癌細胞株は、MKN45細胞株 (*TP53*野生型)、NUGC4細胞株 (*TP53*野生型)、MKN7細胞株 (*TP53*変異型)、KE39細胞株 (*TP53*変異型) の4種を用いて、*RPL11*のノックダウンについてはsiRNA法を用いた。結果として、野生型*TP53*を持つ胃癌細胞株であるMKN45細胞株とNUGC4細胞株は、*RPL11*のノックダウンによって5-FUに対する耐性を示した。一方、変異型*TP53*を持つ胃癌細胞株であるMKN7細胞株とKE39細胞株においては、*RPL11*のノックダウンによって5-FUに対する感受性の変化はみられなかった。さらに、野生型*TP53*を持つMKN45細胞株とNUGC4細胞株において、

*RPL11*と*TP53*を両方同時にノックダウンした細胞株は、*RPL11*もしくは*TP53*どちらか一方のみをノックダウンした細胞株に比べて、さらなる5-FU耐性を示さないことを明らかにした。これらのことから、5-FUを投与した胃癌細胞株は*RPL11*を介した*P53*の活性化によって増殖が抑制されることが示された。

第4章では、5-FUを投与した胃癌細胞株において、*RPL11*の発現が*P53*経路の活性化に關与しているかをタンパク質レベル及びmRNAレベルで検討した。

まず、ウェスタンブロット法を用いたタンパク質レベルでの実験により、野生型*TP53*を持つMKN45細胞株とNUGC4細胞株において、5-FUの投与により*P53*および*P53*の下流因子である*P21*のタンパク質発現量が増加した。また、これらのタンパク質発現量は、*RPL11*のノックダウンによって減弱した。この結果から、5-FUを投与した胃癌細胞株において、*RPL11*は*P53*-*P21*経路を活性化させることによって、細胞の増殖を抑制していると考えられる。一方、変異型*TP53*を持つMKN7細胞株とKE39細胞株においては、*RPL11*のノックダウンの有無で*P53*および*P21*のタンパク質発現量に変化はみられない。

次に、定量的PCR法を用いて、*P53*の標的遺伝子の発現をmRNAレベルで検討した。野生型*TP53*を持つMKN45細胞株とNUGC4細胞株において、5-FUは*P53*の標的遺伝子である*P21*および*FAS*の発現量を増加させた。また、これらの増加したmRNA発現量は、*RPL11*のノックダウンによって減弱した。一方、変異型*TP53*を持つMKN7細胞株とKE39細胞株においては、5-FUの添加や*RPL11* siRNAの有無によって*P21*および*FAS*の発現量にほとんど差はみられなかった。このことから、mRNAレベルからも5-FUを投与した胃癌細胞株において、*RPL11*は*P53*経路を活性化させることによって、細胞の増殖を抑制していることを証明した。

第5章は、総括である。*RPL11*は胃癌の5-FUに対する感受性に密接に關与しており、*P53*及びその下流因子である*P21*や*Fas*を活性化させることによって腫瘍の増殖を抑制していると結論した。この結果は、*RPL11*が胃癌患者の5-FU感受性を予測するためのバイオマーカーになり得ることを示している。*RPL11*のバイオマーカーとしての開発は、患者を層別することで、5-FU耐性を持つ胃癌患者が5-FUによる副作用を被るリスクを回避させるのに役立つと考えられる。また、5-FUと*RPL11*の発現を高める薬剤を組み合わせた治療法は、野生型*TP53*を持つ胃癌患者において、5-FUに対する治療感受性を向上させ、5-FU耐性を克服させることが期待できる。以上を、胃癌における*RPL11*の治療感受性マーカーの同定と、臨床応用への展望として総括した。

Summary of Doctoral Dissertation

Title of Doctoral Dissertation:

Ribosomal protein L11 expression is involved in sensitivity of gastric cancer against 5-FU

Name: Takuto Kawahata

This thesis mainly comprises 5 Chapters. The antimetabolite agent 5-fluorouracil (5-FU) is widely used in the treatment of many cancer types. In this thesis, it was showed that ribosomal protein L11 (RPL11) suppresses tumor progression via activation of the P53 pathway in gastric cancer treated with 5-FU. This result implies that RPL11 is a potential biomarker for predicting sensitivity of gastric cancer against 5-FU.

Chapter 1 is an introduction. Cancer, cancer therapy, gastric cancer, gastric cancer therapy, the role of P53 in tumor suppression, the mechanism of ribosomal protein-induced cell growth suppression, and the well-known mechanism of 5-FU-induced cell growth suppression were reviewed.

In Chapter 2, it was examined the relationship between *RPL11* expression and the effect of 5-FU on gastric cancers by survival analysis using a Kaplan-Meier plotter. 5-FU based adjuvant therapy-treated gastric cancer patients in the *RPL11*-high expression group showed better prognosis than those in *RPL11*-low expression group. The results suggest that *RPL11* expression alters the sensitivity of gastric cancer against 5-FU.

In Chapter 3, it was investigated whether the growth inhibitory effect of 5-FU in gastric cancer involves regulation of P53 via RPL11 by MTT assay using gastric cancer cell lines, MKN45 (wild-type *TP53*), NUGC4 (wild-type), MKN7 (mutated), and KE39 (mutated) cells. siRPL11-transfected *TP53* wild-type cells, MKN45 and NUGC4 cells, showed more resistant to 5-FU than their corresponding non-specific control siRNA-transfected cells. In contrast, in *TP53*-mutant cell lines, MKN7 and KE39 cells, there was no significant difference in growth suppressive effect of 5-FU between siRPL11-transfected cells and non-specific control siRNA-transfected cells. These observations suggested that cell proliferation is suppressed by RPL11-mediated P53 activation in 5-FU treated gastric cancer cell lines.

In Chapter 4, it was investigated whether RPL11 is involved in regulation of the P53 pathway in 5-FU treated gastric cancer cells by immunoblot assay. As a result, 5-FU increased protein expression levels of P53 and a P53 downstream target, P21 in MKN45 and NUGC4 cells, and they were markedly reduced by siRNA knockdown of *RPL11*. Conversely, MKN7 and KE39 cells did not have any significant effects on P53 and P21 protein expression. Next, 5-FU treatment increased mRNA levels of P53 target genes, *P21* and *FAS*, which were determined using the quantitative real-time PCR assay. In MKN45 and NUGC4 cells, knockdown of *RPL11* markedly reduced the increased mRNA levels of *P21* and *FAS* by 5-FU treatment. However, in MKN7 and KE39 cells treated with 5-FU, there was little difference in mRNA levels of *P21* and *FAS* between siRPL11-transfected cell lines and non-specific control siRNA-transfected cell lines. These results demonstrate that *RPL11* expression is involved in regulating the P53 pathway in 5-FU-treated gastric cancer cell lines.

In Chapter 5, the results of this study were summarized.