

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

2020 年 3 月

川畑 拓斗

目次

| | |
|--|----|
| 概要 | 5 |
| 第1章：序論 | |
| 1-1 がんとは | 9 |
| 1-2 がんの治療 | 10 |
| 1-3 胃癌と胃癌治療の現状 | 11 |
| 1-4 癌抑制因子 P53 | 16 |
| 1-5 リボソーム蛋白質による P53 の活性化メカニズム | 19 |
| 1-6 抗癌剤 5-Fluorouracil (5-FU) による細胞増殖抑制メカニズム | 21 |
| 1-7 5-FU は RPL11 を介した P53 の活性化を通して、骨肉腫細胞の増殖を抑制する | 23 |
| 1-8 本研究の目的 | 24 |
| 第2章：胃癌患者への 5-FU 投与療法での生存率における RPL11 の | |

発現量の影響

| | |
|--|----|
| 2-1 序 | 26 |
| 2-2 方法 | 28 |
| 2-2-1 Kaplan-Meier plotter を用いた生存解析 | 28 |
| 2-3 結果 | 29 |
| 2-3-1 5-FU をベースとした薬物療法、もしくは手術のみを受けた胃癌患者の生存時間解析 | 29 |

第3章：胃癌細胞株は、5-FU 投与により RPL11 を介した P53 の活性化によって細胞増殖が抑制される

| | |
|--------|----|
| 3-1 序 | 33 |
| 3-2 方法 | 35 |

| | | |
|---|--|----|
| 3-2-1 | 細胞培養と試薬 | 35 |
| 3-2-2 | RNA 干渉 | 35 |
| 3-2-3 | MTT アッセイ | 37 |
| 3-2-4 | 統計解析 | 37 |
| 3-3 | 結果 | 38 |
| 3-3-1 | <i>RPL11</i> と <i>TP53</i> の両方、またはいずれか一方の発現を抑制した胃癌細胞株の細胞増殖アッセイ | 38 |
| 第4章：胃癌細胞株は、5-FU 投与により、RPL11 を介して P53 経路を活性化する | | |
| 4-1 | 序 | 44 |
| 4-2 | 方法 | 46 |
| 4-2-1 | 細胞培養と試薬 | 46 |
| 4-2-2 | RNA 干渉 | 46 |

| | | |
|-------|--|----|
| 4-2-3 | ウェスタンブロット法 | 47 |
| 4-2-4 | 定量的 PCR 法 | 48 |
| 4-2-5 | 統計解析 | 50 |
| 4-3 | 結果 | 51 |
| 4-3-1 | <i>RPL11</i> の発現を抑制した胃癌細胞株における P53 経路関連タンパク質の発現レベル解析 | 51 |
| 4-3-2 | <i>RPL11</i> の発現を抑制した胃癌細胞株における P53 下流因子の mRNA 発現レベルの解析 | 54 |
| | 第 5 章：総括 | 58 |
| | 参考文献 | 63 |
| | 謝辞 | 71 |

概要

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 経路の活性化に参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関与しており、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。

第1章：序論

1-1 がんとは

現在、日本人の内2人に1人が罹ると言われているがんは、遺伝子が何らかの要因で損傷し、変異することで発生する異常な細胞の増殖を伴う病気のことである^[1]。がんは、一般的に悪性腫瘍のことを指し、次の3つの特徴が挙げられる。まず一つ目は、自律性増殖であり、ヒトの正常な新陳代謝とは関係なしに、自律的に増殖し続ける。二つ目は、周囲にしみ出るように広がったり（浸潤）、体内の別の場所に移動する（転移）といった能力を持っている。三つ目は、悪液質であり、他の正常組織が摂取しようとする栄養をがん組織が奪う、炎症性サイトカインの影響などで体を衰弱させる。

悪性腫瘍とは別に、腫瘍には良性腫瘍も存在する。良性腫瘍は上記の自律性増殖の特徴を持つが、浸潤と転移、悪液質は起こさず、増殖のスピードも悪性腫瘍に比べると遅い。良性腫瘍は、外科的に完全に切除することで再発を防ぐことが出来るが、良性腫瘍の中でも脳腫瘍のように発生部位によっては重篤な臨床経過を来すものも存在する。代表的な良性腫瘍としては、子宮筋腫、卵巣嚢腫、そして皮様嚢腫などが挙げられる。

がんは、発生部位によって次の2つに分類される。一つ目は、上皮細胞から発

生する「癌（上皮性腫瘍）」であり、代表的なものには、肺癌、乳癌、胃癌、大腸癌、子宮癌、卵巣癌、頭頸部の癌（喉頭癌、咽頭癌、舌癌など）が存在する。

2つ目は、非上皮性細胞から発生する「肉腫」である。肉腫は、骨や筋肉、骨髄、リンパ節などの非上皮性細胞から発生するがんであり、代表的な肉腫としては、骨肉腫、軟骨肉腫、横紋筋肉腫、平滑筋肉腫、線維肉腫、脂肪肉腫、血管肉腫、白血病、悪性リンパ腫、骨髄腫などが挙げられる。

1-2 がんの治療

がんの治療では、治療の効果を最大限に得ることと同時に、体への負担を最小限にすることが重要である。現時点で得られている科学的な根拠に基づいた最もよいがんの治療のことを「標準治療」という。標準治療には、手術、薬物療法、放射線治療があり、それぞれ単独、あるいはいくつかを組み合わせられた方法で行われる。手術では、がんを外科的に切除する。切除する範囲を小さくしたり、手術方法を工夫したりすることによって体への負担を少なくし、治療後の合併症を最小限にするよう手術の方針が決められている。薬物療法は、薬物を使ってがん細胞の増殖を抑える治療法であり、化学療法（抗癌剤治療）、ホルモン療法（内分泌療法）、分子標的治療、分化誘導療法などが含まれる。放射線治療は、放射線を照射することによって、がん細胞の増殖を抑える治療法であり、利点として、

手術で体に傷を付けることなく、がんを小さくする効果が期待できる。しかし、がんの種類によって放射線治療の効果や回復の程度は大きく異なる。

1-3 胃癌と胃癌治療の現状

胃癌は、胃の壁の内側を覆う粘膜の細胞が喫煙や感染などの原因で癌細胞となり、無秩序に増えていくことにより発生する。癌が大きくなるにつれて、徐々に粘膜下層、固有筋層、漿膜へと外側に深く進んでいき、更に深く進むと、漿膜の外側まで達し、近くにある大腸や膵臓にも広がっていく（浸潤）。また、胃癌では、癌細胞がリンパ液や血液の流れに乗って、離れた臓器でとどまって増える「転移」が起きたり、漿膜の外側を越えて、腹膜に癌細胞が散らばる「腹膜播種」が起こることもある。更に胃癌の中には、胃の壁を硬く厚くさせながら広がっていくスキルス胃癌というタイプもある。早期のスキルス胃癌は内視鏡検査で見つけることが難しいことから、症状が現れ見つかったときには進行していることが多い癌である。

癌細胞の組織型分類では、胃癌のほとんどを腺癌が占めている。腺癌は、細胞の特徴から、進行が緩やかな分化型と進行が速い未分化型に分けられる。一般的に、スキルス胃癌では未分化型が多い。

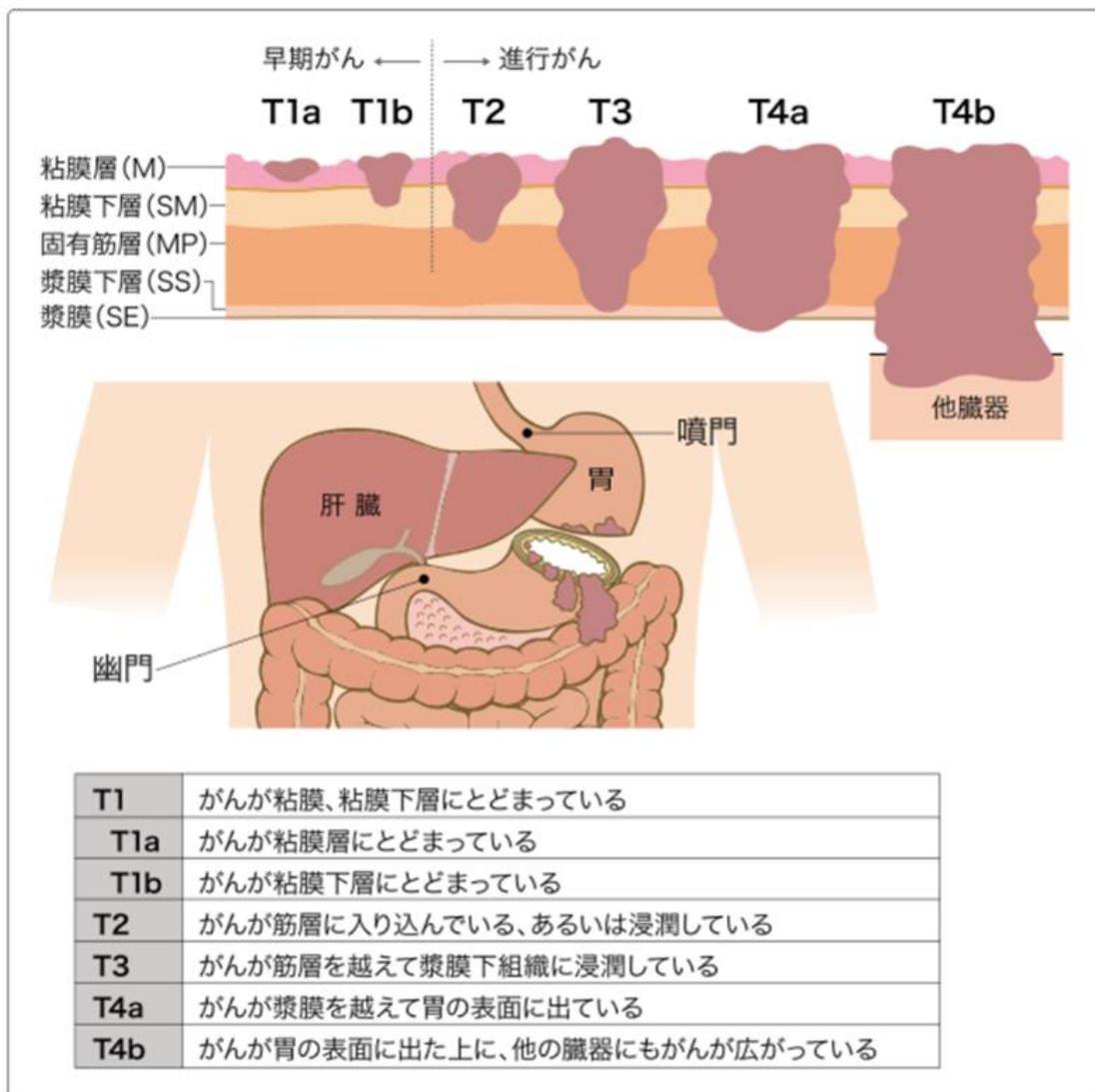
胃癌の発生要因としては、ヘリコバクター・ピロリ（ピロリ菌）の感染、喫煙

が挙げられる。その他に、食塩・高塩分食品の摂取が、発生する危険性を高めることが報告されている^[2]。

胃癌の検査には、癌を確定するための検査と癌の進行度を診断する検査がある。癌を確定するための検査においては、内視鏡検査やX線検査などを行い、病変の有無や場所を特定する。内視鏡検査で胃の内部を見て、癌が疑われるところがある場合、その部分を採取し、病理検査で胃癌かどうかを確定する。癌の進行度を診断する検査においては、治療の方針を決めるために、癌の深さや膵臓・肝臓・腸などの胃に隣り合った臓器への広がり、離れた臓器やリンパ節などへの転移を調べて胃癌の進行度を診断する。そのため、さらに、CT 検査や MRI 検査、PET 検査などを行う。また、腹膜播種の可能性が強く疑われる場合には審査腹腔鏡が行われることがある。

がんの進行度は、病期（ステージ）として分類される。病期にはローマ数字が使われ、胃癌では、早期から進行につれて I 期（IA, IB）、II 期（IIA, IIB）、III 期（IIIA, IIIB, IIIC）、IV 期に分類される。胃癌の病期の分類は、T カテゴリー（深達度）、N カテゴリー（リンパ節転移の有無）、M カテゴリー（遠隔転移の有無）の 3 種のカテゴリーの組み合わせで決められる。T カテゴリーは、癌の深さの程度を示しており、Fig. 1 に示すように T1 から T4b まで分類される。癌の深さが粘膜および粘膜下層にとどまるものを早期胃癌、粘膜下層より深いもの

を進行胃癌という。N カテゴリーは、リンパ節への転移の有無、M カテゴリーは、遠くの臓器への転移（遠隔転移）の有無である。



「胃癌」国立がん研究センター がん情報サービスより引用

Fig. 1 胃癌の深達度

臨床分類と病理分類では、胃癌の病期の決め方に違いがある。臨床分類は、画像診断や生検、審査腹腔鏡などの結果に基づいて、癌の広がりを推定し、治療方針を決めるときに Table 1 のように分類する。また、病理分類は、手術で切除した病変を病理診断し、実際の癌の広がりを評価した分類である。病理分類は病気の見通しを立てたり、術後補助化学療法が必要かどうかを判断したりするときなどに使われる (Table 2)。

Table 1 臨床分類による胃癌の病期の決定

| 遠隔転移 (Mカテゴリー) | なし (M0) | | あり (M1) |
|---------------------------------------|------------|------------|------------|
| | なし (N0) | あり (N+) | 有無に関わらず |
| リンパ節転移 (Nカテゴリー) 深達度 (Tカテゴリー) | | | |
| T1a/T1b, T2 | I | II A | IV B |
| T3, T4a | II B | III | |
| T4b | IV A | | |

日本胃癌学会編「胃癌取扱い規約第 15 版 (2017 年 10 月)」(金原出版) を参考に改変

Table 2 病理分類による胃癌の病期の決定

| 遠隔転移 (Mカテゴリー) | なし (M0) | | | | | あり (M1) |
|--|------------|--------------|--------------|----------------|----------------|-------------|
| | なし (N0) | 1~2個 (N1) | 3~6個 (N2) | 7~15個 (N3a) | 16個以上 (N3b) | 有無に関わ らず |
| リンパ節転移の個数 (Nカテゴリー) 深達度 (Tカテゴリー) | | | | | | |
| T1a, T1b | I A | I B | II A | II B | III B | IV |
| T2 | I B | II A | II B | III A | III B | |
| T3 | II A | II B | III A | III B | III C | |
| T4a | II B | III A | III A | III B | III C | |
| T4b | III A | III B | III B | III C | III C | |

日本胃癌学会編「胃癌取扱い規約第15版(2017年10月)」(金原出版)を参考に改変

胃癌の治療法には、内視鏡治療、手術、薬物療法などがあり、治療法は、標準治療に基づいて、患者の体の状態や年齢、希望なども含めて検討し、担当医師と共に決めていくことになる。内視鏡治療(内視鏡的切除)は、胃内視鏡を使って胃の内側から癌を切除する方法である。癌が粘膜層にとどまっており、原則リンパ節転移の可能性がごく低い早期の癌で、一度に切除できると考えられる場合に行われる。手術に比べると、体に対する負担が少なく、また、癌の切除後も胃が残るため、食生活に対する影響が少ない方法である。合併症として、出血や穿

孔が起こることがある。手術（外科治療）は、遠隔転移がない胃癌で、内視鏡治療による切除が難しい場合に行われる治療である。手術では、癌と胃の一部または全てを取り除く。同時に胃の周囲のリンパ節を取り除くリンパ節郭清や、食物の通り道をつくり直す再建手術（消化管再建）も行われる。腹部を 20 cm ほど切開する開腹手術と、小さい穴を開けて専用の器具で手術を行う腹腔鏡下手術がある。薬物療法（化学療法）は、がんや全身の状態によって、様々な薬を単独または組み合わせて使う。胃癌の薬物療法には、細胞傷害性抗がん薬、分子標的薬そして免疫チェックポイント阻害薬が使われる^[3]。

胃癌は世界で4番目に多いがんであり、がんの死因の第2位を占めている^[4,5]。胃癌の発症は減少しつつあるが、胃癌治療を発展させることは医療において未だ取り組むべき課題となっている。それゆえ、胃癌の薬剤感受性に影響を及ぼし、腫瘍の増殖を抑制する新たな因子を同定することは医療において極めて重要である。

1-4 癌抑制因子 P53

遺伝子産物 P53 の機能やその周辺の分子機構を含めた P53 経路の細胞生物学的な役割が次第に明らかになる一方、がん患者由来の腫瘍組織を用いた膨大な研究成果が蓄積しており P53 癌抑制タンパク質経路の破綻ががんの進展に重要

な役割を担っていることが判明している。*TP53* 癌抑制遺伝子は 393 アミノ酸からなる核内タンパク質 P53 をコードする。P53 の主な分子機能は転写活性因子であり、DNA 傷害などの各種細胞ストレスや癌遺伝子シグナルなどによりリン酸化、アセチル化などの翻訳後修飾により活性化された後、複数の下流遺伝子の転写調節領域内に存在する特異的塩基配列 [(5'-PuPuPuC(A/T)(T/A)GPyPyPy-3')]×2 に結合し転写を活性化する^[6]。P53 は塩基配列特異的 DNA 結合に重要な P53 タンパク質の中心部第 100-300 残基を占めるコア・ドメイン (DNA 結合ドメイン)、その N 末端側と C 末端側にはそれぞれ転写活性化ドメイン、四量体形成ドメインの他、リン酸化やアセチル化残基、多くのタンパク質結合部位があり、P53 の機能調節に重要な部位と考えられている^[7-14]。

TP53 癌抑制遺伝子の変異はヒトがんの中で最も高頻度に見られる遺伝子異常である。これまでに多くのヒトがんにおいて *TP53* 遺伝子変異が報告され、腫瘍の種類によるがヒトがん全体の約 50% に *TP53* 遺伝子変異がある^[15,16]。*TP53* 遺伝子変異の多くは、DNA-binding domain 内の 1 塩基置換であり、これらの変異は、主に 2 つに分けられ、DNA との接触に関与するアミノ酸残基の置換 (DNA contact mutant) と、P53 コアの構造変化を引き起こすような残基の置換 (structural mutant) がある。前者には、ヒト大腸癌細胞株である SW460 細胞な

どに見られる R273H (273 番目のアルギニンがヒスチジンに置換) や、ヒト肺腺癌細胞株である CL1-5 細胞などに見られる R248W (248 番目のアルギニンがトリプトファンに置換)、後者では ヒト平滑筋肉腫である SK-UT-1 細胞などで見られる R175H (175 番目のアルギニンがヒスチジンに置換) や、ヒト乳がん細胞株である BT-549 細胞などに見られる R249S (249 番目のアルギニンがセリンに置換) が挙げられるが、その種類は非常に膨大である^[17]。今回の研究で用いた変異型 *TP53* を持つ癌細胞は、前者の DNA との接触に関与するアミノ酸残基が置き換わったものが使われている。また、遺伝子増幅による MDM2 過剰発現^[18,19] やヒト・パピローマウイルス感染による HPV E6 発現^[20] も含めて、P53 のユビキチン化とプロテアソームでの分解亢進^[21-23] によって P53 機能が破綻する腫瘍も存在する。このため *TP53* は、発がんやその進展過程を抑える最も重要な遺伝子であると考えられている。P53 は DNA 傷害、低酸素などの細胞ストレスや癌遺伝子などにより活性化され、細胞周期の停止に関わる *P21* や、アポトーシスの誘導に関わる *FAS*、DNA 修復に関わる *GADD45*、血管新生の抑制に関わる *TSP1* など様々な標的遺伝子の転写を促すことが知られている^[8-14] (Fig. 2)。変異型の P53 タンパク質は、塩基配列特異的 DNA 結合能を失うため、標的遺伝子を活性化することができない。

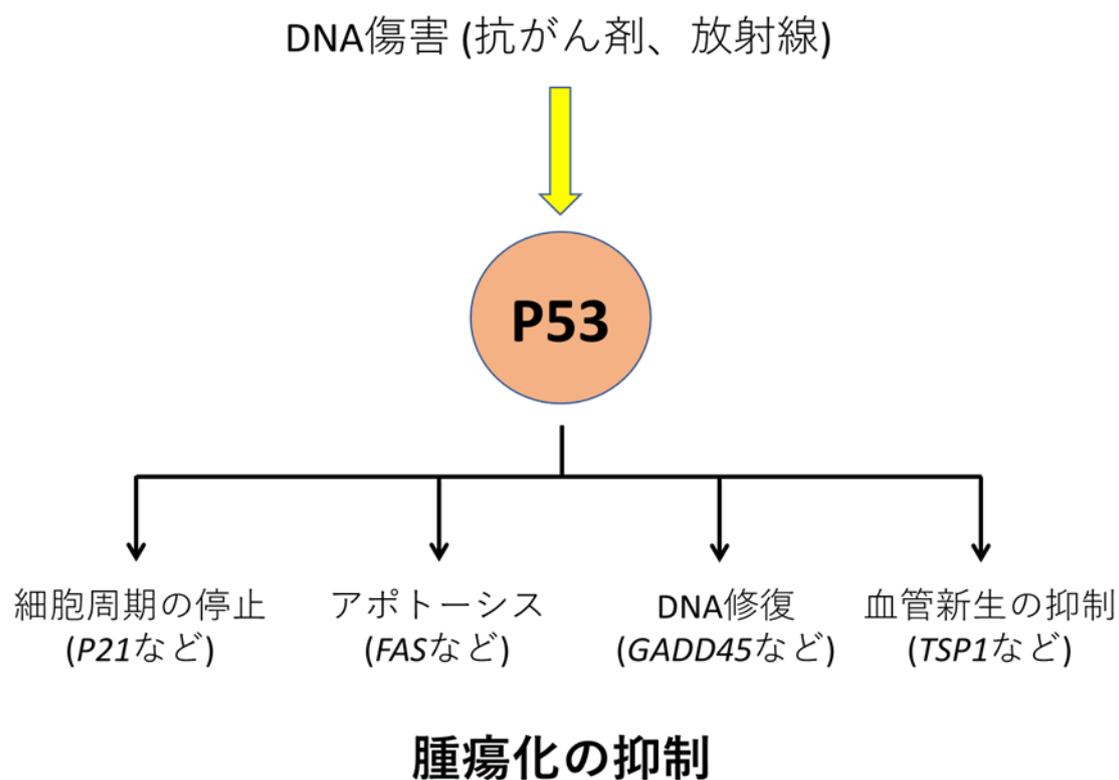


Fig. 2 癌抑制因子 P53 による腫瘍化の抑制

1-5 リボソーム蛋白質による P53 の活性化メカニズム

リボソーム蛋白質 (RP) はリボソームを構成する因子であり、リボソーム蛋白質と rRNA の複合体である大小 2 つのサブユニットからリボソームが形成される。近年、50 種類以上あるリボソーム蛋白質の中で大サブユニットのリボソーム蛋白質である RPL5 や RPL11、RPL23 などを仲介して、核小体ストレス (rRNA 合成の阻害、rRNA プロセッシングの阻害、およびリボソームサブユニッ

トの会合阻害) による癌抑制因子 P53 の活性化が誘導されることが分かってきた。

核小体ストレスが与えられると、核小体が分散し、核小体内に局在していた RPL5 や RPL11、RPL23 が核質へと放出される。そこで、それらのリボソーム蛋白質は P53 を分解する働きを促進する働きを持つ E3 ユビキチンリガーゼ MDM2 と結合し、MDM2 の働きを抑制する。その結果、P53 が安定化・活性化することで、細胞の増殖が抑制される^[24-30] (Fig. 3)。

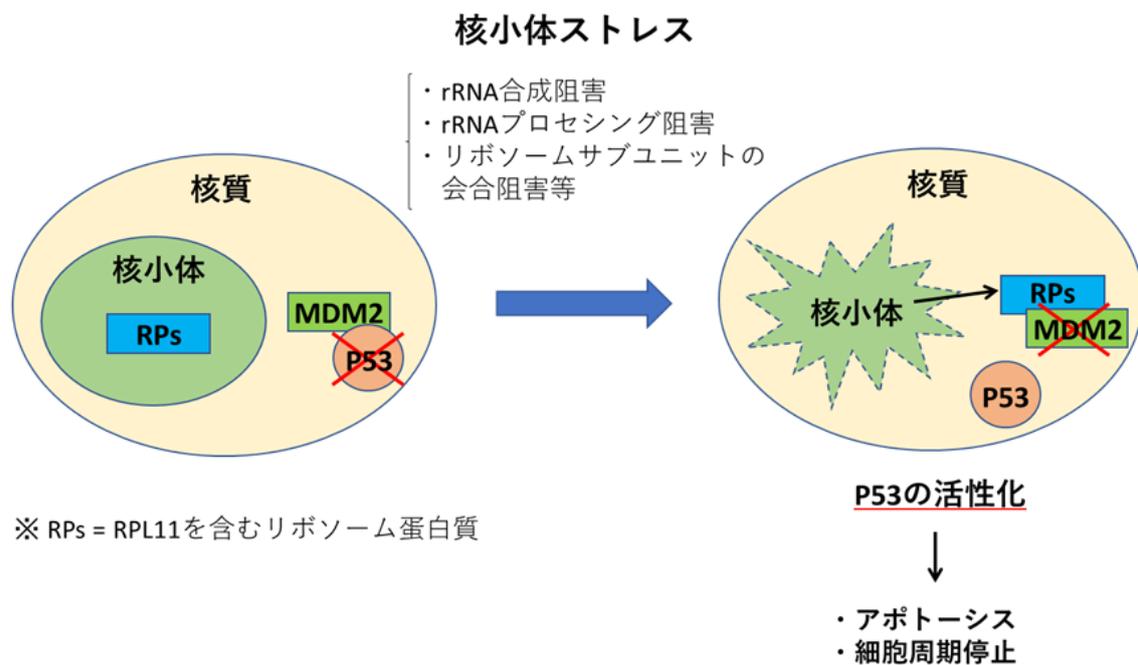


Fig. 3 核小体ストレス応答による細胞増殖抑制メカニズム

1-6 抗癌剤 5-Fluorouracil (5-FU) による細胞増殖抑制メカニズム

5-FU は、大腸癌や胃癌などの消化器癌に用いられる最も代表的な抗癌剤であり、その他、乳癌、肺癌など様々な種類の癌に対して使用されている^[31]。食道癌、肺癌、頭頸部癌に対しては、注射剤と他の抗癌剤または放射線との併用で使用が認められている。抗癌剤の種類としては、ピリミジン系代謝拮抗剤に分類される。剤型によって差はあるが、注射剤や経口剤などの投与による一般的な副作用として、食欲不振や下痢、悪心・嘔吐などの消化器症状や全身倦怠感などが比較的多く起こる。また、出血性腸炎などの重い腸炎や激しい下痢とそれに伴う脱水症状などの重篤な副作用が起こる可能性もある^[32]。

5-FU は DNA 合成や RNA プロセッシングを阻害することによって細胞の増殖を抑制する (Fig. 4)。5-FU は細胞内で 5-fluorodeoxyuridine monophosphate (FdUMP) に変換される。FdUMP は deoxyuridine monophosphate (dUMP) から deoxythymidine monophosphate (dTMP) への反応を触媒する酵素 thymidylate synthase (TS) のヌクレオチド結合部位に結合し、その酵素活性を阻害する。結果、細胞内のデオキシヌクレオチドプールの枯渇や、チミジル酸と他のデオキシヌクレオチドの不均衡が引き起こされる^[33]。また、FdUMP は 5-fluorodeoxyuridine triphosphate (FdUTP) に変換され、それ自身が DNA ポリメラーゼの基質となり、DNA に誤って取り込まれる^[34]。結果的に、5-FU は DNA

の合成および修復を阻害し、DNA 損傷を引き起こす^[31]。加えて、5-FU は細胞内で 5-fluorouridine triphosphate (FUTP) にも変換され、RNA 分子、特にリボソーム RNA (rRNA) に誤って取り込まれる。その結果、rRNA プロセッシングが阻害され、細胞の増殖が抑制される^[35-37]。

5-FU は、ヒトの胃癌細胞株や食道腺癌細胞株、胚線維芽細胞株において P53 の発現量を増加させ、細胞の増殖を抑制することが報告されている^[38,39]。変異した P53 タンパク質を発現、もしくは P53 タンパク質を発現しない胃癌細胞株および食道腺癌細胞株は、5-FU の細胞増殖抑制効果に耐性を示すこと^[38]、P53 機能の欠損により細胞周期制御を失った胚線維芽細胞は 5-FU に対して薬剤耐性を示すことが分かっている^[39]。これに加え、Osaki らは野生型 *TP53* の遺伝子を持つ胃癌細胞株において、1 mM の 5-FU、72 時間処理によって MKN74 細胞 (*TP53* 野生型) は約 14%、MKN45 細胞 (*TP53* 野生型) は約 12%、MKN28 細胞 (*TP53* 変異型) は約 3%、KATO-III 細胞 (*TP53* 欠損型) は約 0.5% アポトーシスが誘導されることを報告している^[40]。この結果は *TP53* の変異の有無が 5-FU の効果に強く影響していることを示唆している。

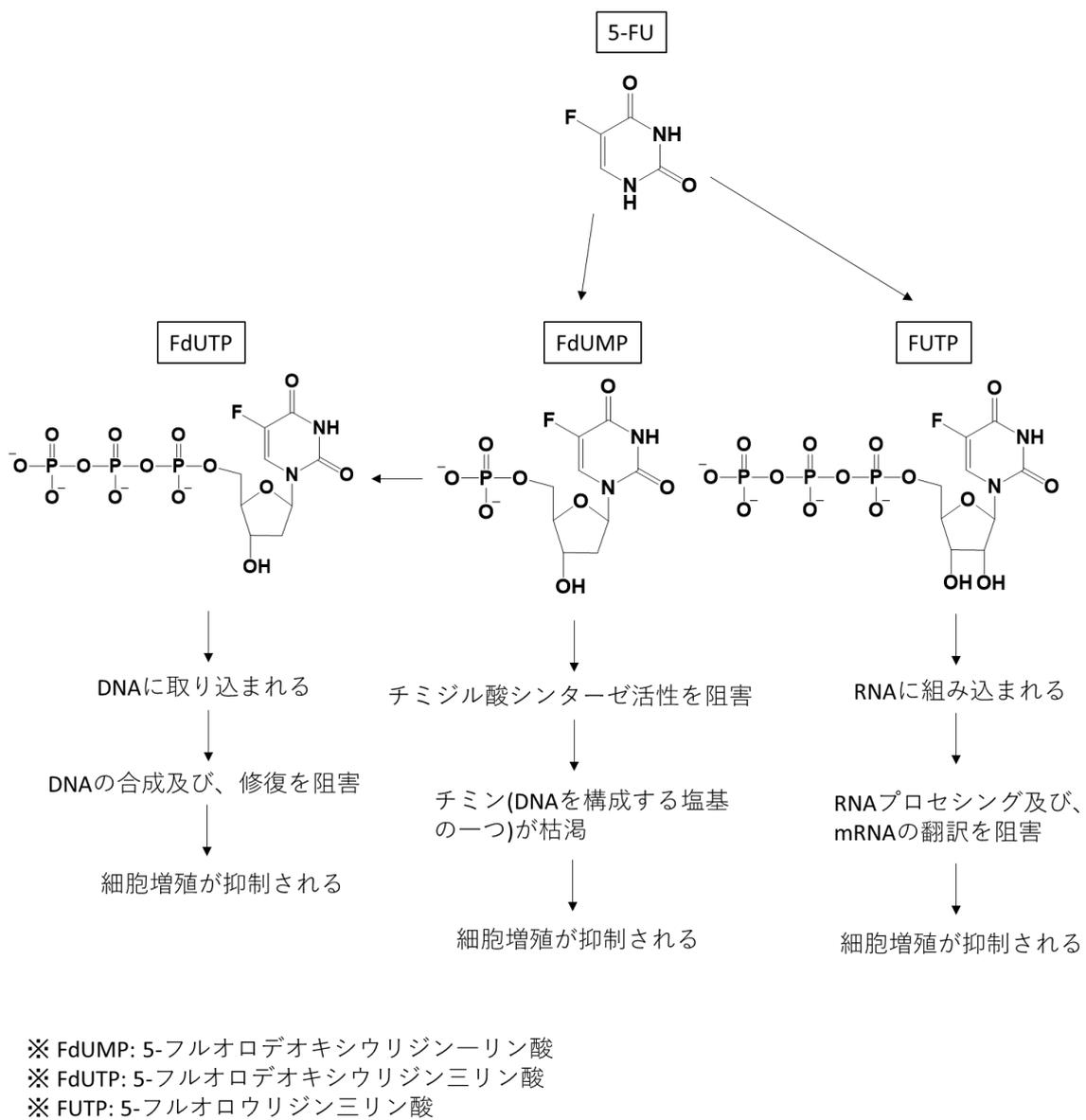


Fig. 4 5-Fluorouracil (5-FU) の細胞増殖抑制メカニズム

1 - 7 5-FU はリボソーム蛋白質を介した P53 の活性化を通して、
 骨肉腫細胞の増殖を抑制する

近年、骨肉腫細胞において 5-FU はリボソーム蛋白質を介した P53 の活性化を通して細胞の増殖を抑制していることが報告された。作用機序としては、5-FU が細胞内で代謝されて FUTP となり、FUTP が rRNA プロセッシングを阻害する。続いて、RPL5 や RPL11、RPL23 が核質へ放出され、これらのリボソーム蛋白質が MDM2 タンパク質と結合することで MDM2 の機能を阻害する。結果、P53 が活性化し、細胞の増殖を抑制することが示されている^[41]。

1-8 本研究の目的

1-7 にて、骨肉腫細胞における 5-FU の細胞増殖抑制のメカニズムとして、リボソーム蛋白質が関与していることが報告されている。しかしながら、胃癌細胞における 5-FU の作用メカニズムは未だ分かっていない。

胃癌は「上皮性腫瘍」と呼ばれる上皮を構成する細胞（上皮細胞）から発生する癌であり、骨肉腫は「肉腫」と呼ばれる骨や筋肉などの非上皮性細胞から発生する癌である。このように、胃癌と骨肉腫は、それぞれ発生部位の異なる癌として分類されるため、胃癌での 5-FU の作用は大きく異なっている可能性がある。また、5-FU の細胞増殖抑制メカニズムには、5-FU の代謝産物である FdUMP によるチミジル酸シンターゼ活性阻害を介する細胞増殖抑制経路や、FdUTP による DNA 合成および修復阻害を介する細胞増殖抑制経路が存在する

[33,34]。そのため、5-FU を投与した胃癌細胞では、これらの経路が、リボソーム蛋白質を介した細胞増殖抑制経路よりも優勢に働いている可能性が考えられる。5-FU は、実際に胃癌の薬物療法として使用されていることから、胃癌細胞における 5-FU の作用メカニズムを解明することは非常に重要な取り組むべき課題である。

本研究の目的は、骨肉腫細胞の作用メカニズムを参考にしつつ、5-FU を投与した胃癌細胞において、どのような作用メカニズムで細胞増殖が抑制されているのかを検証し、胃癌患者への新たな治療戦略を提示することである。

本論では本研究によって得られた知見について記述する。

第2章：胃癌患者への5-FU投与療法での生存率に おける *RPL11* の発現量の影響

2-1 序

胃癌の治療法には、内視鏡治療、手術、薬物療法などがあり、癌の進行の程度（ステージ）や、患者の体の状態、年齢、希望などを含めて検討し、治療法を決めていくことになる。一般的に、ステージの進んだ胃癌の治療ではフルオロピリミジン系薬剤である5-FU、S-1、カペシタビンなど、プラチナ系薬剤（シスプラチン、オキサリプラチン）、タキサン系薬剤（パクリタキセル、ドセタキセル）、塩酸イリノテカン、ラムシルマブなどの抗癌剤を単独または組み合わせて使用する。また、胃癌は約10～20%にHER2という細胞増殖に関わるタンパク質が多く発現していることが知られていることから、HER2の働きを抑える分子標的療法を薬物療法と併用して行うことがある。遠隔転移が見られない胃癌では手術を行い、手術後、病理分類により経過観察、術後補助化学療法、薬物療法などの中から治療方針を決定する。これまで骨肉腫において、*RPL11*の低発現が5-FUによる細胞増殖抑制効果に耐性を示すことは分かっているが、胃癌における5-FUの作用に*RPL11*が関わっているかどうかは分かっていない。そこで、Kaplan-Meier plotterを用いて、5-FUをベースとした薬物療法を受けた胃癌患

者において、RPL11 の発現レベルが治療効果に影響を与えるか検討を行った。

Kaplan-Meier plotter は、調べたい遺伝子やタンパク質の発現量が個々の癌種の治療に影響を及ぼすかどうかを検証できるツールであり、乳癌 ($n = 6,234$) や卵巣癌 ($n = 2,190$)、肺癌 ($n = 3,452$)、胃癌 ($n = 1,440$) を含む患者の遺伝子発現、生存期間などのデータを統合したデータセットを保有している。この Kaplan-Meier plotter を用いて、5-FU をベースとした薬物療法もしくは手術を受けた胃癌患者における RPL11 の発現量と全生存期間の関係について調べた。また、上述したように薬物療法は、ステージの進んだ胃癌患者に用いられる治療法であるため、条件を合わせるために、手術を受けた胃癌患者の中から病期の進んだステージIV (遠隔転移あり) の患者に絞っても検討を行った。

2-2 方法

2-2-1 Kaplan-Meier plotter を用いた生存時間解析

胃癌における *RPL11* の mRNA 発現量をもとにした予後および治療感受性の判定は、遺伝子発現データおよび臨床データ (GSE14210, GSE15459, GSE22377, GSE29272, GSE51105, GSE62254) を含んでいる Kaplan-Meier plotter オンラインデータベース (<http://kmplot.com/analysis/index.php?p=service&cancer=gastric>) を用いて評価した。Kaplan-Meier plotter オンラインデータベースは、自動的に胃癌患者を *RPL11* の mRNA 発現量が高いグループと *RPL11* の mRNA 発現量が低いグループに分割した。生存曲線、ログランク検定の P 値、ハザード比は、95%信頼区間でコンピューターによって算出した。P<0.05 を統計的に有意差ありと定義した。

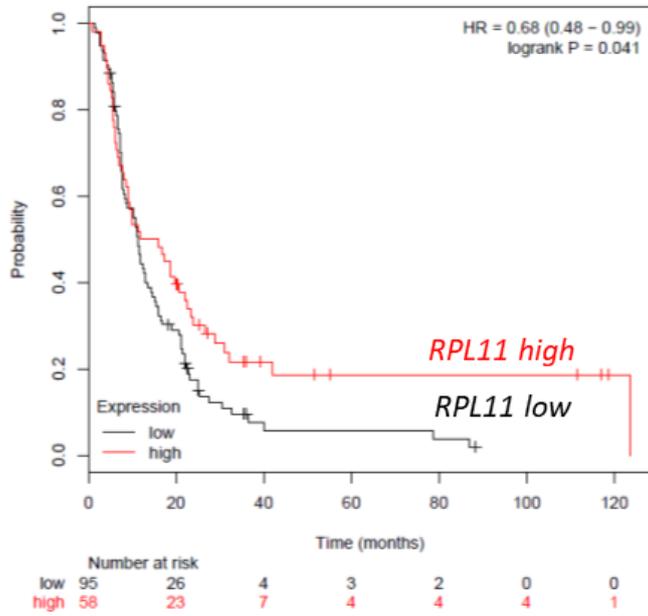
2-3 結果

2-3-1 5-FU をベースとした薬物療法、もしくは手術のみを受けた胃癌患者の生存時間解析

5-FU をベースとした薬物療法を受けた胃癌患者において腫瘍組織の *RPL11* の発現レベルが全生存期間に影響を及ぼすか Kaplan-Meier plotter を用いて検討した。解析に用いられた患者数は 153 人であり、その内 58 人が *RPL11* の発現量が高いグループ、95 人が *RPL11* の発現量が低いグループに自動的に分割された。結果、5-FU をベースとした薬物治療を受けた胃癌患者において、*RPL11* の発現量が高いグループは、*RPL11* の発現量が低いグループに比べて予後が良好であることが明らかとなった ($P=0.041$; Fig. 5A)。このことから、*RPL11* の発現は、胃癌の 5-FU に対する治療感受性に関与する可能性が考えられた。次に、手術のみを受けた胃癌患者において *RPL11* の発現レベルが全生存期間に影響を及ぼすかどうかを調べた。解析に用いられた患者数は 380 人であり、その内 248 人が *RPL11* の発現量が高いグループ、132 人が *RPL11* の発現量が低いグループに自動的に分割された。結果、手術のみを受けた胃癌患者については、*RPL11* の発現量が高いグループと *RPL11* の発現量が低いグループの間で、生存期間に有意な差は認められなかった ($P=0.11$; Fig. 5B)。5-FU をベースとし

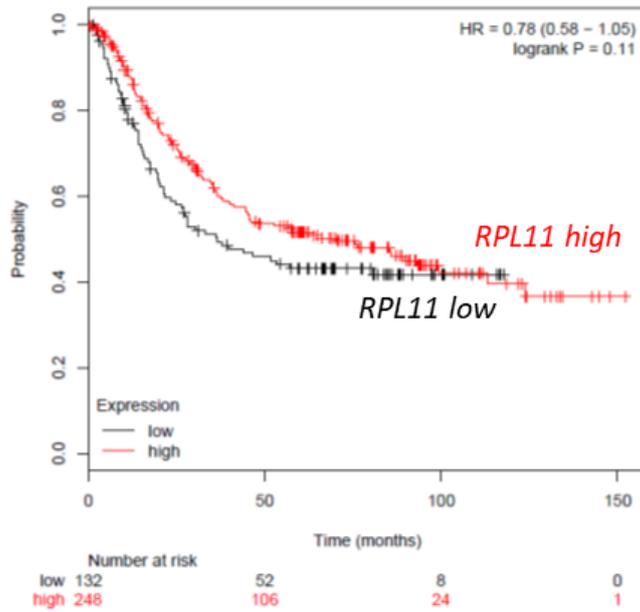
た薬物療法は、遠隔転移が見られるステージの進んだ胃癌に施される治療法であることから、手術のみを受けた胃癌患者の内、ステージIVの患者に絞った解析も行った。解析に用いられた患者数は86人であり、その内62人が *RPL11* の発現量が高いグループ、24人が *RPL11* の発現量が低いグループに自動的に分割された。結果、ステージIVの患者に絞った検討においても *RPL11* の発現量が高いグループと *RPL11* の発現量が低いグループの間で有意な差は認められなかった (P=0.19; Fig. 5C)。このことから、手術のみを受けた胃癌患者においては、ステージの進行度に関わらず、*RPL11* の発現は、治療感受性に影響を及ぼさないことが分かった。以上により、*RPL11* は5-FUをベースとした薬物療法を受けた胃癌患者の生存予後に影響を及ぼす重要な因子であることが示された。

A

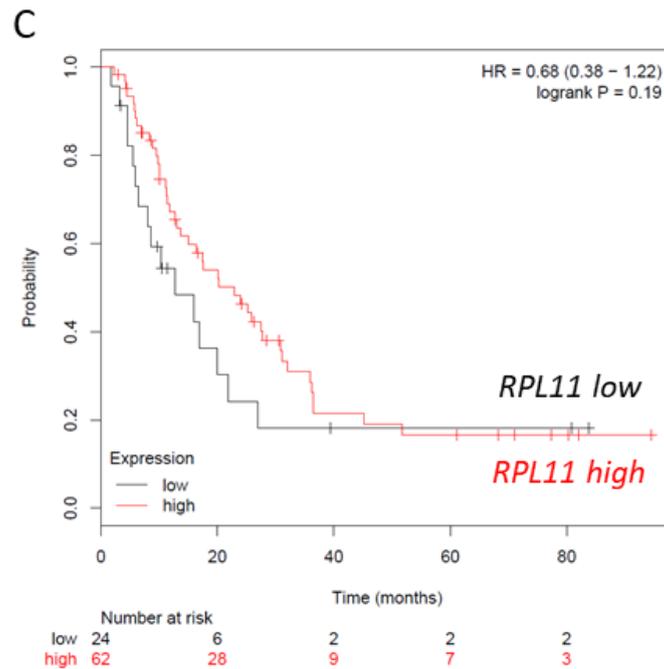


5-FU based adjuvant therapy

B



Surgery alone



Surgery alone (stage IV)

Fig. 5 胃癌患者の *RPL11* 発現量と全生存期間の関連性を示す Kaplan-Meier 解析 (A) 5-FU をベースとした薬物療法を受けた胃癌患者の *RPL11* 発現量と全生存期間の関連性を示す Kaplan-Meier 解析 (ログランク検定を P 値の計算に用いた)。P = 0.0041 vs. *RPL11* 高発現グループ。(B) 手術のみを受けた胃癌患者の *RPL11* 発現量と全生存期間の関連性を示す Kaplan-Meier 解析 (ログランク検定を P 値の計算に用いた)。P = 有意差なし。(C) 手術のみを受けたステージ IV の胃癌患者の *RPL11* 発現量と全生存期間の関連性を示す Kaplan-Meier 解析 (ログランク検定を P 値の計算に用いた)。P = 有意差なし。

第3章：胃癌細胞株は、5-FU 投与により RPL11 を介した P53 の活性化によって細胞増殖が抑制される

3-1 序

前章より、*RPL11* を高発現する胃癌患者の 5-FU 治療の予後が良好であることが分かり、5-FU の作用機序に *RPL11* が深く関与していることが分かった。本章では、更に *RPL11* が P53 の活性化を介した細胞増殖の抑制に関与しているのかどうかについて調べるための実験を行った。本実験のために、4 種類の胃癌細胞株、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) を用いて MTT アッセイを行った。MTT アッセイは、細胞増殖や細胞死を測定する方法の一つで、テトラゾリウム塩の一種である 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium Bromide Thiazolyl Blue (MTT) の還元に伴う不溶性ホルマゼン色素 (赤紫色) の呈色反応を利用したものである。MTT の還元は、ミトコンドリアの還元酵素である succinate-tetrazolium reductase によって起こる。生細胞ではこの酵素活性が高く、呈色が認められるが、細胞死が起こると呈色がなくなる。この呈色をマイクロプレートリーダーで測定することによって細胞の生存率を測定することが出来る。また、small interfering RNA (siRNA) を用い

た RNA 干渉により、*RPL11* や *TP53* をノックダウンさせ、それぞれのタンパク質の影響を調べた。siRNA とは、21-23 塩基対から成る低分子二本鎖 RNA であり、mRNA の破壊によって配列特異的に遺伝子の発現を抑制することができる。以下に具体的な方法ならびに結果を示す。

まず、野生型 *TP53* を持つ胃癌細胞株について siRNA による *RPL11* の発現を抑制させ、5-FU に対する感受性に影響を及ぼすかを MTT アッセイによって調べた。次に、変異型 *TP53* を持つ胃癌細胞株を用いて同様の実験を行った。変異型 *TP53* を持つ細胞の P53 タンパク質は塩基配列特異的 DNA 結合能を失い、下流遺伝子を活性化することができないため、細胞周期の停止やアポトーシスの誘導といった機能を発揮できない。

さらに、胃癌細胞株における 5-FU の細胞増殖抑制効果が *RPL11* を介した P53 の活性化によるものかをより明確にするため、野生型 *TP53* を持つ胃癌細胞株で *RPL11* のノックダウンと *TP53* のノックダウンを組み合わせる MTT アッセイを行い、検討した。

3-2 方法

3-2-1 細胞培養と試薬

4種類の胃癌細胞株、MKN45細胞株、NUGC4細胞株、MKN7細胞株（JCRB Cell Bank 由来）、KE39細胞株（RIKEN Cell Bank 由来）を本実験で用いた。MKN45細胞は、62歳の女性の胃から採取された腺癌であり、NUGC4細胞は、35歳の女性のリンパ節から採取された腺癌、MKN7細胞は、年齢・性別不詳のヒトから採取された管状腺癌、KE39細胞は、77歳の日本人男性のリンパ節から採取された胃癌である。

すべての細胞株は10%のウシ胎児血清と100 U/mLのペニシリンを添加したRPMI-1640培地（Nissui Pharmaceutical Co. Ltd., Tokyo, Japan）で、37°C、5%のCO₂濃度で培養した。

5-FUは、FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Osaka, Japanから購入したものを使用した。3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium Bromide Thiazolyl Blue (MTT) は、Nakalai Tesque, Kyoto, Japanから購入したものを使用した。

3-2-2 RNA 干渉

siRNA の細胞への導入は、Lipofectamine RNAiMAX Transfection Reagent (Life Technologies; Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA) を用いて行った。血清なしの培地 10 μ L に siRNA を 6 pmol 加えたものと、血清なしの培地 10 μ L に Lipofectamine RNAiMAX を 0.3 μ L 加えたものを混合し、室温で 10 分間インキュベートした。この混合液を、細胞を培養している 96 ウェルプレートの各ウェル (100 μ L) に対し 20 μ L 加えて、37°C、5%の CO₂ 濃度で 24 時間培養した。

siRNA はすべて FASMAC で合成したものを使用した。siRNA の配列を以下に記載する。siRPL11#1, 5'-GGUGCGGGAGUAUGAGUUA-3' と siRPL11#2, 5'-AAGGUGCGGGAGUAUGAGUUA-3'については、RPL11 の mRNA のそれぞれ、5'-UAACUCAUACUCCCGCACC-3' と 5'-UAACUCAUACUCCCGCACCUU-3'の塩基配列に対するアンチセンスであり、siP53, 5' -CGGCGCACAGAGGAAGAGAAU-3' については、P53 の 5'-AUUCUCUUCCUCUGUGCGCCG-3' の塩基配列のアンチセンスである (siRNA を用いた P53 のノックダウンについては以前記述している^[42,43])。また、コントロールとして、哺乳動物細胞の RNA 配列に相補しないという特徴をもつ siRNA である siScramble, 5'-UUCUCCGAACGUGUCACGU-3'を用いた。

3-2-3 MTT アッセイ

96 ウェルプレート各ウェルに、7,000 個の細胞を播種し、それぞれの siRNA (siScramble, siRPL11#1, siRPL11#2, siP53) で 24 時間処理した。siRNA の導入後、細胞を 3 日間異なる濃度 (0 μ M, 1 μ M, 3 μ M, 10 μ M, 30 μ M, 100 μ M, 300 μ M, 1000 μ M, 3000 μ M, 10000 μ M) の 5-FU に暴露した。その後、MTT 溶液を各ウェルに加え、細胞を 4 時間培養した。続いて、培地を取り除き、100 μ L の DMSO を各ウェルに加え、ホルマザン結晶を溶解した。各ウェルは、マイクロプレートリーダー (Sunrise Remote; Tecan Japan Co. Ltd., Kanagawa, Japan) を用いて吸光度 570 nm で測定し、以下の計算に適用した: 細胞生存率 = 薬剤で処理された細胞の吸光度 A / 溶媒で処理された細胞の吸光度 A。

3-2-4 統計解析

データは、平均 \pm 標準偏差で示した。多群間の比較は、一元配置分散分析 (one-way ANOVA) およびダネットの検定を用いて行った。解析は、GraphPad Prism ソフトウェア (version 8.1.1; GraphPad software Inc., La Jolla, CA, USA) を用いて行った。P<0.05 を統計的に有意差ありと定義した。

3-3 結果

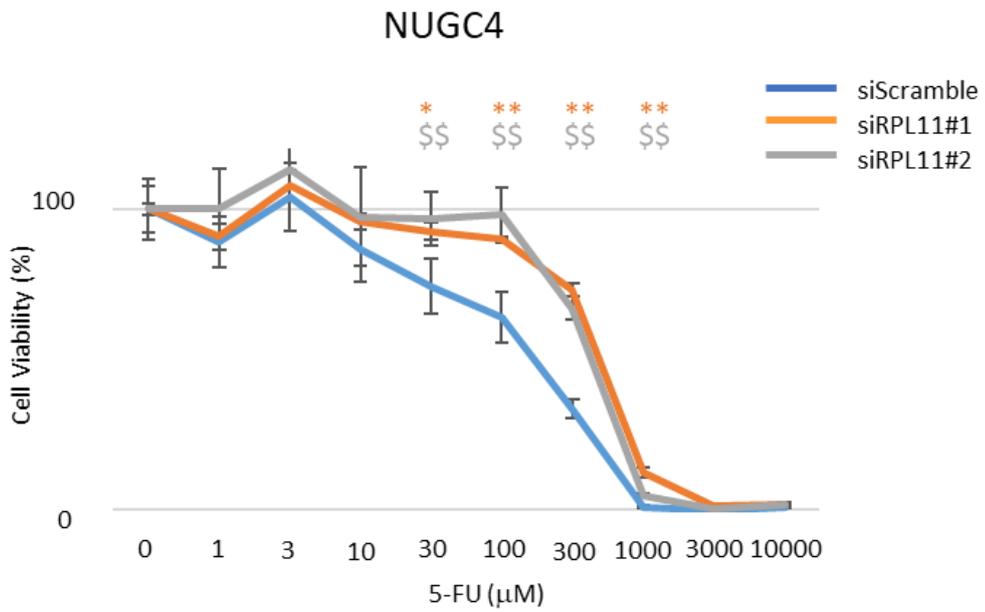
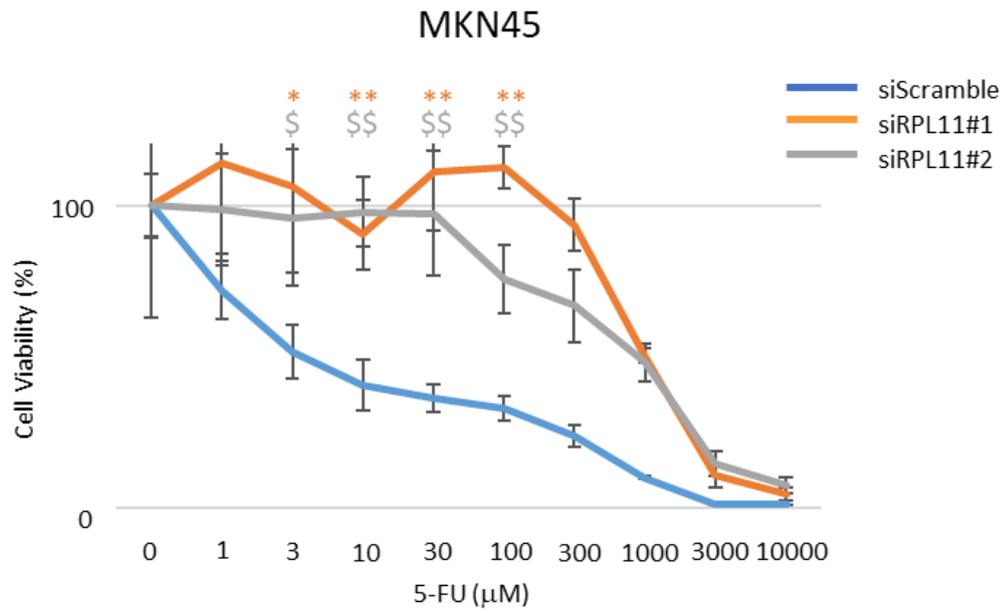
3-3-1 *RPL11*と*TP53*の両方、またはいずれか一方の発現を抑制した胃癌細胞株の細胞増殖アッセイ

野生型 *TP53* を持つ 2 種類の胃癌細胞株、MKN45 細胞株、NUGC4 細胞株を用いて MTT アッセイを行い、*RPL11* の発現は 5-FU による細胞増殖抑制効果に影響を及ぼすかどうかを検討した。その結果、哺乳動物細胞の RNA 配列に相補しないコントロール siRNA (siScramble) を導入した細胞群では、5-FU 投与により、細胞増殖が抑制されることが分かった (Fig. 6A)。しかし、同細胞株に siRPL11 (#1 および #2) を用いて *RPL11* の発現をノックダウンさせたところ、5-FU による細胞増殖抑制効果が減弱した。このことから、胃癌細胞における 5-FU の作用に *RPL11* の発現が関与していることが分かった。一方、変異型 *TP53* を持つ 2 種類の胃癌細胞株、MKN7 細胞株、KE39 細胞株においては、siScramble を導入した細胞群と siRPL11 (#1 および #2) を用いて *RPL11* の発現をノックダウンした細胞群の間で、5-FU による増殖抑制に差がほとんどないことが分かった (Fig. 6B)。このことから、*RPL11* の細胞増殖抑制の機能は P53 に依存していることが明らかとなった。野生型 *TP53* を持つ胃癌細胞株、MKN45 細胞株、NUGC4 細胞株において、siRPL11 (#1) と siP53 を用いてダブルノックダウン

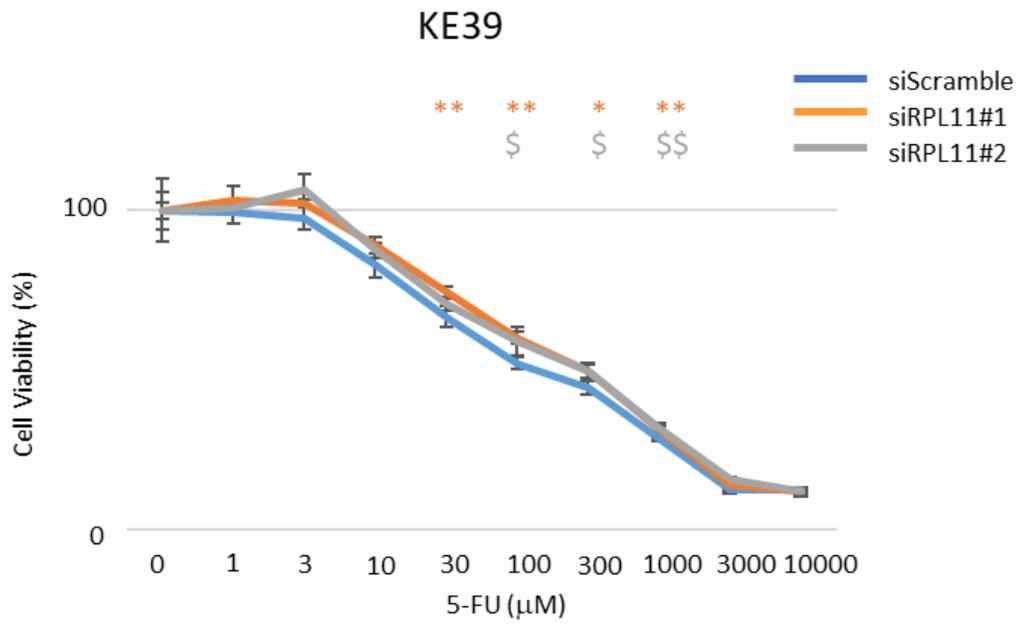
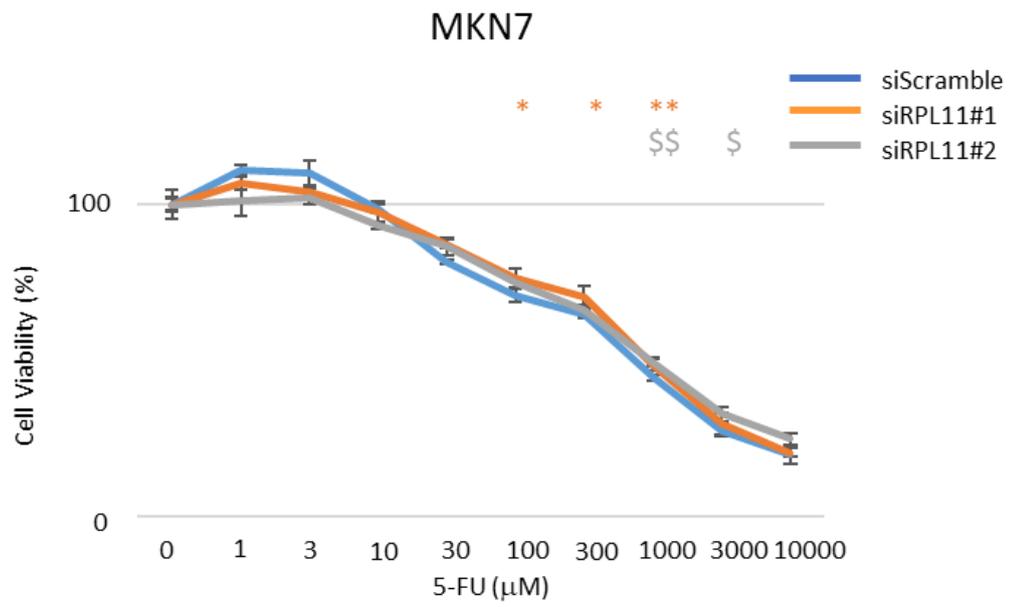
した細胞群と *RPL11* もしくは *TP53* のいずれか一方のみをノックダウンした細胞群の間でも、5-FU による細胞増殖抑制効果にほとんど差がないことから、*RPL11* を介した細胞増殖抑制はほぼ *P53* の機能で説明できると考えられた (Fig. 6C)。

以上により、5-FU 投与により、胃癌細胞は *RPL11* を介して *P53* を活性化し、細胞増殖を抑制することが分かった。

A



B



C

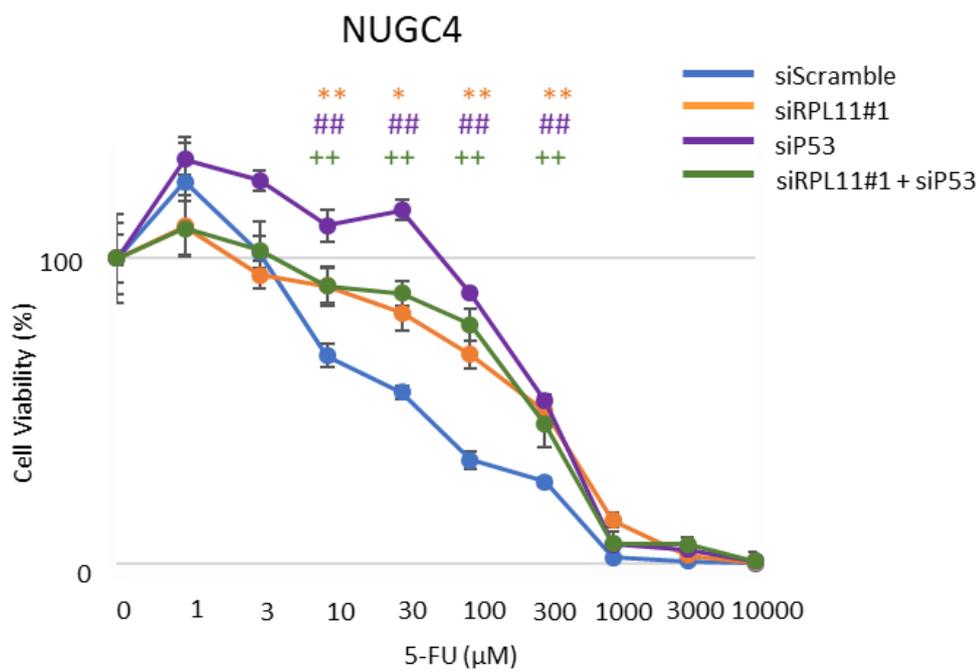
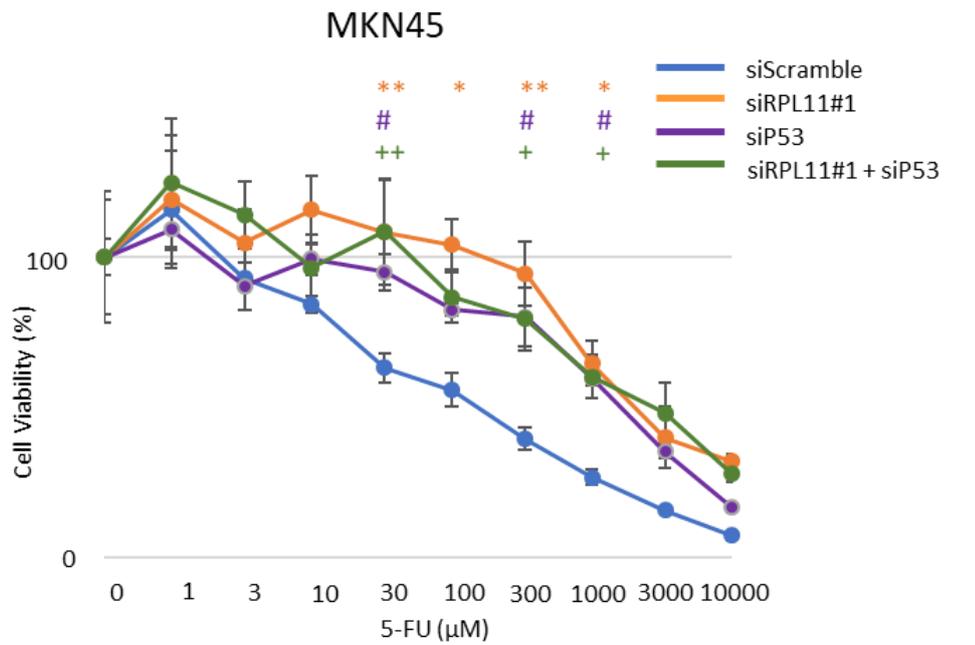


Fig. 6 *RPL11* もしくは *P53* をノックダウンした胃癌細胞株の 5-FU に対する

感受性評価 (A) siScramble または siRPL11#1、siRPL11#2 を導入した MKN45

細胞株、NUGC4 細胞株の生存率は MTT アッセイによって解析を行った。細胞生存率は、図に示している 5-FU の濃度で 72 時間処理した後に測定を行った。

(B) siScramble または siRPL11#1、siRPL11#2 を導入した MKN7 細胞株、KE39

細胞株の生存率は MTT アッセイによって解析を行った。細胞生存率は、図に示している 5-FU の濃度で 72 時間処理した後に測定を行った。(C) siScramble ま

たは siRPL11#1、siP53、siRPL11#1 と siP53 の両方を導入した MKN45 細胞株、

NUGC4 細胞株の生存率は MTT アッセイによって解析を行った。細胞生存率は、図に示している 5-FU の濃度で 72 時間処理した後に測定を行った。

エラーバーは、標準偏差を示している。それぞれ対応している siScramble グループと比較した P 値が以下の通り示されている; * $P < 0.05$ と ** $P < 0.01$ vs siRPL11#1 グループ、\$ $P < 0.05$ と \$\$ $P < 0.01$ vs RPL11#2 グループ、# $P < 0.05$ と ## $P < 0.01$ vs siP53 グループ、+ $P < 0.05$ と ++ $P < 0.01$ vs siRPL11#1 + siP53 グループ。

第4章：胃癌細胞株は、5-FU 投与により、RPL11 を介して P53 経路を活性化する

4-1 序

P53 は細胞周期の停止や、アポトーシスの誘導、DNA 修復の促進、血管新生の抑制など様々な制御に関与していることが知られている^[22-28]。そこで、5-FU を投与した胃癌細胞において、RPL11 を介した P53 の活性化は、細胞周期の停止に関わる因子 P21 や、アポトーシスの誘導に関わる因子 FAS の制御に関与しているかどうかをウェスタンブロット法、および定量的 PCR 法を用いて検討した。

ウェスタンブロット法は、ゲル電気泳動によって分離したタンパク質を膜に転写し、抗体を用いて特定のタンパク質を検出する手法である。原理としては、ポリアクリルアミド電気泳動後のゲルにメンブレンを密着させ、分離したタンパク質を電圧をかけてゲルからメンブレンに移す。次に、タンパク質を移動させたメンブレンに、一次抗体（目的とするタンパク質に対する抗体）を反応させ、洗浄後、HRP（西洋ワサビペルオキシダーゼ）などの酵素で標識した二次抗体を反応させることで、酵素活性を利用した化学発光法もしくは発色法により検出することが出来る。本実験では、4 種類の胃癌細胞株、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) を用いて、*RPL11* の発現が P53 タンパク質および P53 の下流因子である P21 タンパク質の発現量に影響を及ぼすかをウェスタンブロット法によって調べた。

また、定量的 PCR 法は、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 法での増幅産物の増加をモニタリングして解析する技術であり、核酸 (DNA, RNA) の定量のための一般的なツールとなっている。本実験では、上記で示したものと同様の 4 種類の胃癌細胞株を用いて、定量的 PCR 法を行い、P53 の下流因子である *P21* および *FAS* の mRNA 発現レベルが、5-FU 処理や *RPL11* のノックダウンによってどう変化するのかを調べた。

4-2 方法

4-2-1 細胞培養と試薬

4種類の胃癌細胞株、MKN45細胞株、NUGC4細胞株、MKN7細胞株（JCRB Cell Bank 由来）、KE39細胞株（RIKEN Cell Bank 由来）を本実験で用いた（各細胞の詳細については前章を参照）。

すべての細胞株は10%のウシ胎児血清と100 U/mLのペニシリンを添加したRPMI-1640培地（Nissui Pharmaceutical Co. Ltd., Tokyo, Japan）で、37°C、5%のCO₂濃度で培養した。

5-FUは、FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Osaka, Japan から購入したものを使用した。

4-2-2 RNA 干渉

siRNAの細胞への導入は、Lipofectamine RNAiMAX Transfection Reagent（Life Technologies; Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA）を用いて、ノックダウン実験のプロトコルに従って行った。

siRNAはすべてFASMACから購入したものを使用した。siRNAの配列を以下に記載する。siRPL11#1, 5'-GGUGCGGGAGUAUGAGUUA-3'と siRPL11#2,

5'-AAGGUGCGGGAGUAUGAGUUA-3'については、RPL11 の mRNA のそれぞれ、5'-UAACUCAUACUCCCGCACC-3' と 5'-UAACUCAUACUCCCGCACCUU-3'の塩基配列に対するアンチセンスである。また、コントロールとして、哺乳動物細胞の RNA 配列に相補しないという特徴をもつ siRNA である siScramble, 5'-UUCUCCGAACGUGUCACGU-3'を用いた。

4-2-3 ウェスタンブロット法

タンパク質解析のため、細胞をリン酸緩衝食塩水 (PBS) で2度洗い、プロテアーゼインヒビターカクテル (Nakalai Tesque, Kyoto, Japan) を添加した溶解バッファー (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM バナジン酸ナトリウム, 1 mM EDTA, 50 mM NaF, 1% Triton X-100) で溶解した。続いて、超音波処理によって細胞をせん断し、タンパク質を可溶化した。それぞれのサンプルのタンパク質濃度は、Protein Assay CBB 溶液 (Nakalai Tesque, Kyoto, Japan) を用いて、付属のプロトコルに従って決定した。20 µg のタンパク質を含むライゼートを、SDS ポリアクリルアミドゲル上で1枚当たり 0.03 A で約 40 分間電流を流して分離し、タンパク質転写膜イモビロン P (Millipore, Bedford, MA, USA) に 135V、90 分間で転写した。その膜を、ブロッキング溶液 (4%のウシ

血清アルブミンを含む TBST; 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.15 M NaCl, 0.1% Tween-20) で 1 時間、37°C でブロッキングした後、それぞれの一次抗体、Anti-P53 抗体 (500 倍希釈; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)、Anti-P21 抗体 (400 倍希釈; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)、Anti-RPL11 抗体 (1,000 倍希釈; Invitrogen, Camarillo, CA, USA)、Anti-Actin 抗体 (3,000 倍希釈; Bio Matrix Research, Chiba, Japan) で、1 時間、37°C でインキュベートした。続いて、その膜を TBST で 10 分間、3 回洗い、西洋ワサビペルオキシダーゼが結合した抗ウサギもしくは抗マウス IgG 二次抗体 (3,000 倍希釈; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) で 1 時間、37°C でインキュベートした。免疫反応性のバンドは、Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) を用いて増強した化学発光シグナルを X 線フィルムで検出し、可視化した。繰り返し行った実験のうち、代表的な画像をそれぞれの図で示している。

4-2-4 定量的 PCR 法

培養細胞由来の全 RNA の単離は、TRIzol 試薬 (Molecular Research Center, Cincinnati, OH, USA) を用いて行った。培養細胞に TRIzol 試薬 1 mL を加え、直接細胞を溶解した。次に、タンパク質を分離するために、室温で 5 分間インキ

ュベートし、クロロホルム 0.2 mL を加えて、15 秒間激しく振り混合した。サンプルを室温で 3 分間インキュベートした後、5°C で 15 分間、12,000 g で遠心し 2 相分離を行った。水相を新しいチューブに移し、イソプロピルアルコール 0.5 mL を加え、室温で 10 分間インキュベートした後、5°C で 10 分間、12,000 g で遠心し、RNA を沈殿させた。続いて、上清を除去し、RNA ペレットを 75%エタノール 1 mL で 1 回洗浄した。洗浄した RNA ペレットを 3 分間乾燥させた後、RNase free の水を加え、ピペッティングで RNA の懸濁を行った。単離した RNA (1 µg) は、ReverTra Ace kit (Toyobo, Osaka, Japan) を用いて逆転写した。

P21、*FAS*、*RPL11* の mRNA 発現量は、GoTaq qPCR Master Mix (Promega, Madison, WI, USA) およびリアルタイム RT-PCR (StepOnePlus Real-Time PCR System; Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を用いて、プロトコルに従い決定した。ヒト GAPDH を標準化のために使用した。標的遺伝子の発現は比較 Ct 法を用いて定量化した。使用したプライマーの配列を以下に記載する。

RPL11 の順方向プライマー、5'-GAAAAGGAGAACCCCATGC-3' と 逆方向プライマー、5'-CATTTCTCCGGATGCCAA-3'; *P21* の順方向プライマー、5'-CTGGACTGTTTTCTCTCGGCTC-3' と 逆方向プライマー、5'-TGTATATTCAGCATTGTGGGAGGA-3'; *FAS* の順方向プライマー、5'-TCTGCCATAAGCCCTGT-3' と 逆方向プライマー、5'-

GTCTGTGTACTCCTTCCCT-3'; *GAPDH* の順方向プライマー, 5'-TGCACCACCAACTGCTTAG-3' と逆方向プライマー, 5'-GAGGCAGGGATGATGTTC-3'。

4-2-5 統計解析

データは、平均±標準偏差で示した。多群間の比較は、一元配置分散分析 (one-way ANOVA) およびダネットの検定を用いて行った。解析は、GraphPad Prism ソフトウェア (version 8.1.1; GraphPad software Inc., La Jolla, CA, USA) を用いて行った。P<0.05 を統計的に有意差ありと定義した。

4-3 結果

4-3-1 *RPL11* の発現を抑制した胃癌細胞株における P53 経路関連タンパク質の発現レベル解析

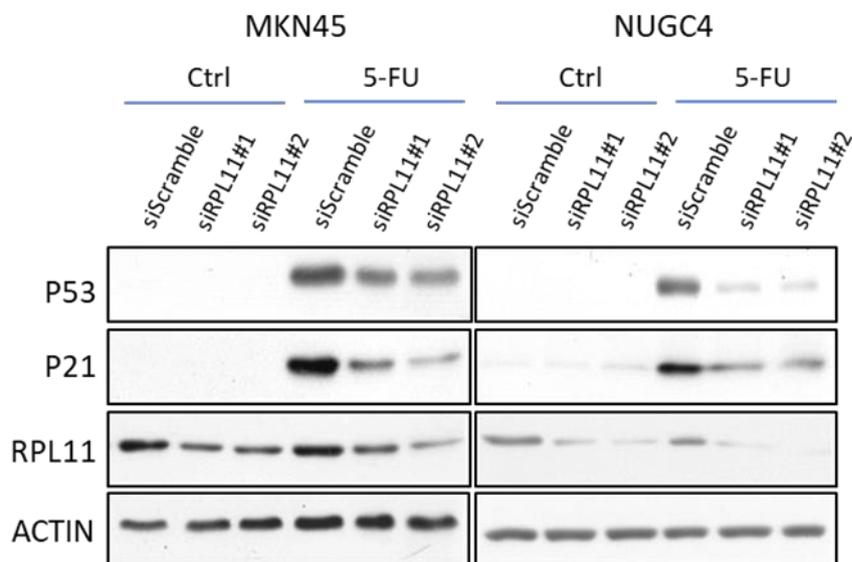
P53 の下流因子である P21 は、サイクリン依存性キナーゼ阻害因子であり、サイクリン-CDK2 もしくはサイクリン-CDK1 複合体に結合および阻害することで、G1 期における細胞周期の進行を阻害する。P21 の発現は、P53 によって厳密に制御されていることから、本実験では P21 の検討を行った。

野生型 *TP53* を持つ 2 種類の胃癌細胞株、MKN45 細胞株および NUGC4 細胞株を用いてウェスタンブロット法を行い、*RPL11* のノックダウンが 5-FU によって引き起こされる P53 タンパク質および P21 タンパク質の発現に影響を及ぼすかどうかを検討した。まず、4 種類の胃癌細胞株、MKN45 細胞株、NUGC4 細胞株、MKN7 細胞株、KE39 細胞株において、siRPL11 を用いた RNA 干渉によって RPL11 のタンパク質発現が抑制されていることを確認した (Fig. 7A and B)。

野生型 *TP53* を持つ MKN45 細胞および NUGC4 細胞において、5-FU は P53 タンパク質ならびにその下流因子であり、細胞周期の停止に関与する P21 のタンパク質発現量を増加させた (Fig. 7A)。このことから、5-FU は P53-P21 経路

を活性化することが分かった。次に、siRPL11 (#1 および#2) により *RPL11* をノックダウンした野生型 *TP53* を持つ胃癌細胞株を用いて、同様の実験を行うことで、P53に加えて、5-FUによるP21の発現増加量を著しく減弱することが分かった。このことから、5-FUによるP53-P21経路の活性化に*RPL11*の発現が関与することが分かった。一方、変異型*TP53*を持つ胃癌細胞株、MKN7細胞株およびKE39細胞株は、5-FU投与後に*RPL11*のノックダウンを行っても、P53およびP21のタンパク質発現量に変化はみられなかった (Fig. 7B)。以上により、5-FU投与により、胃癌細胞株は、RPL11を介してP53-P21経路をタンパク質レベルで活性化することが分かった。

A



B

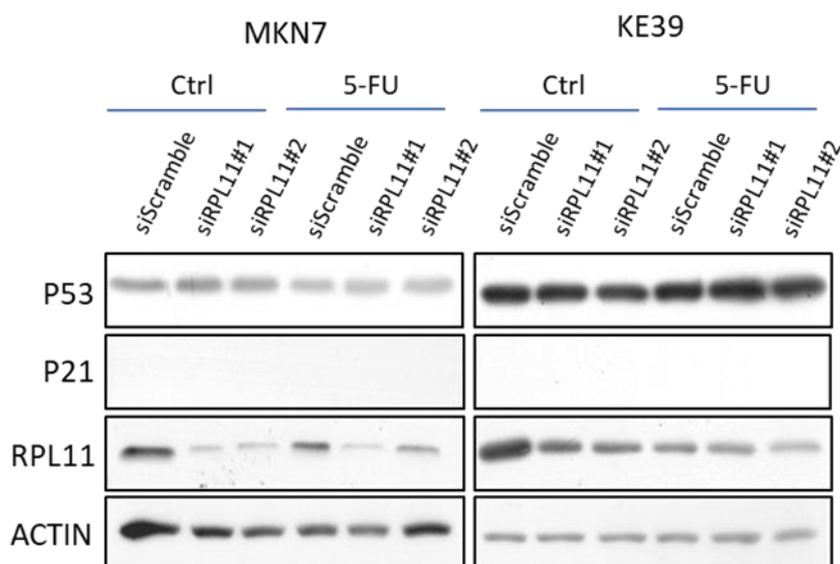


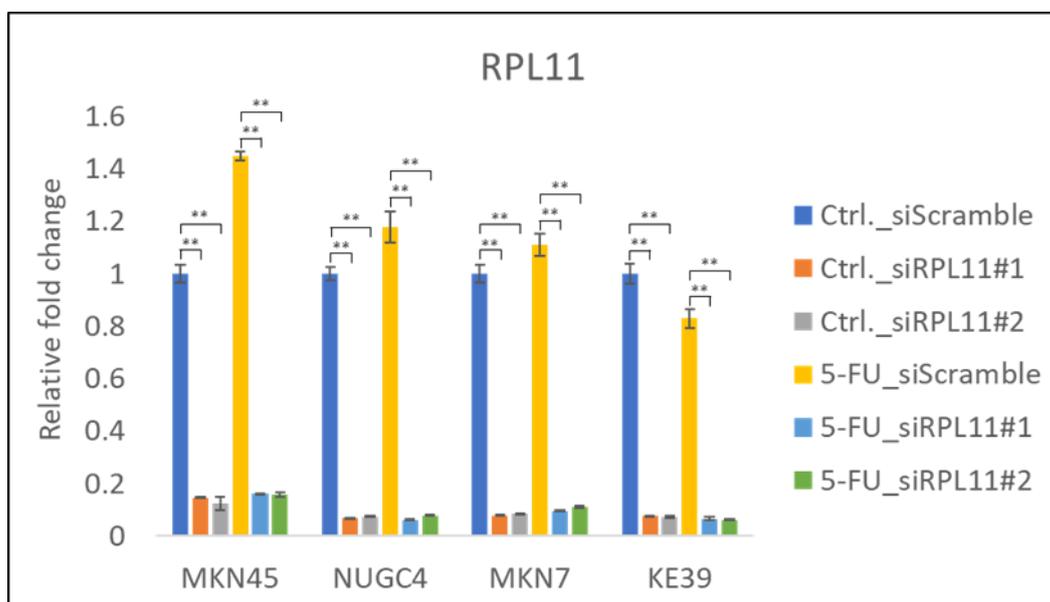
Fig. 7 *RPL11* をノックダウンした胃癌細胞株の 5-FU に対する P53 経路関連タンパク質の発現量解析 (A) siScramble または siRPL11#1、siRPL11#2 を導入した MKN45 細胞株、NUGC4 細胞株を、溶媒のみ (Ctrl) もしくは 300 μ M の 5-FU で 24 時間処理した後、ウェスタンブロット法によってタンパク質発現量の解析を行った。(B) siScramble または siRPL11#1、siRPL11#2 を導入した MKN7 細胞株、KE39 細胞株を、溶媒のみ (Ctrl) もしくは 300 μ M の 5-FU で 24 時間処理した後、ウェスタンブロット法によってタンパク質発現量の解析を行った。MKN7 細胞株および KE39 細胞株における P53 は、P53 変異体のことである。また、P53 変異体は、塩基配列特異的 DNA 結合能を失い、下流遺伝子を活性化することができないため、P21 は発現しない。

4-3-2 *RPL11* の発現を抑制した胃癌細胞株における P53 下流因子の mRNA 発現レベルの解析

5-FU を添加した胃癌細胞株において、*RPL11* が P53 の標的遺伝子の発現制御に関与しているかどうかを検討するため、野生型 *TP53* を持つ 2 種類の胃癌細胞株、MKN45 細胞株および NUGC4 細胞株を用いて定量的 PCR 法を行った。まず、4 種類の胃癌細胞株、MKN45 細胞株、NUGC4 細胞株、MKN7 細胞株、KE39 細胞株において、si*RPL11* を用いた RNA 干渉によって *RPL11* の遺伝子発現レベルが著しく抑制されていることを確認した (Fig. 8)。

外因性アポトーシス因子である *FAS* は、5-FU を投与した癌細胞において、P53 を介したアポトーシスの誘導に関与する重要な因子であることが知られている^[44]。そこで、本実験では P53 の標的遺伝子である *P21* に加え、*FAS* の検討も行った。結果、野生型 *TP53* を持つ MKN45 細胞株および 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 mRNA 発現量を増加させた。このことから、5-FU は、野生型 *TP53* を持つ胃癌細胞株において、P53 の下流因子である *P21* および *FAS* を mRNA レベルで制御することが分かった。次に、si*RPL11* (#1 および#2) により *RPL11* をノックダウンした野生型 *TP53* を持つ胃癌細胞株を用いて、同様の実験を行うことで、*P21* および *FAS* の mRNA 発現量の増加を著しく減弱することが分かった。このことから、5-FU に

よる *P21* および *FAS* の mRNA 発現量の増加に *RPL11* の発現が関与することが分かった。一方、変異型 *TP53* を持つ胃癌細胞株、MKN7 細胞株および KE39 細胞株は、5-FU 投与後に *RPL11* のノックダウンを行っても、*P21* および *FAS* の mRNA 発現量にほとんど変化はみられなかった。このことから、*RPL11* は P53 を介して *P21* と *FAS* の mRNA 発現レベルを制御していると考えて矛盾のない結果であった。以上により、5-FU 投与により、胃癌細胞株は、*RPL11* を介して P53 の標的遺伝子、*P21*、*FAS* の発現量を増加させることが分かった。



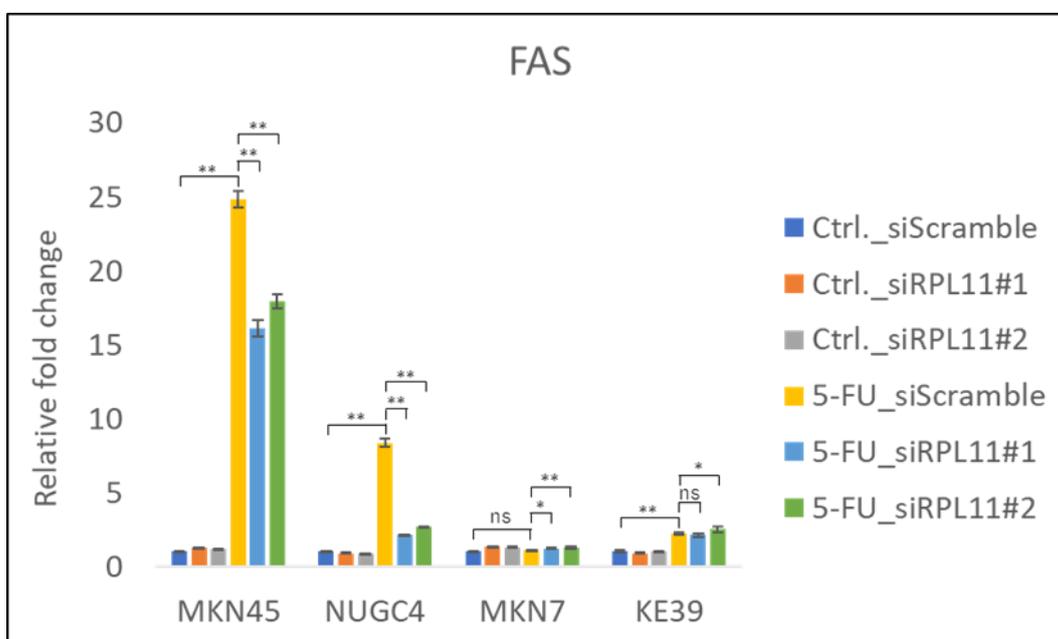
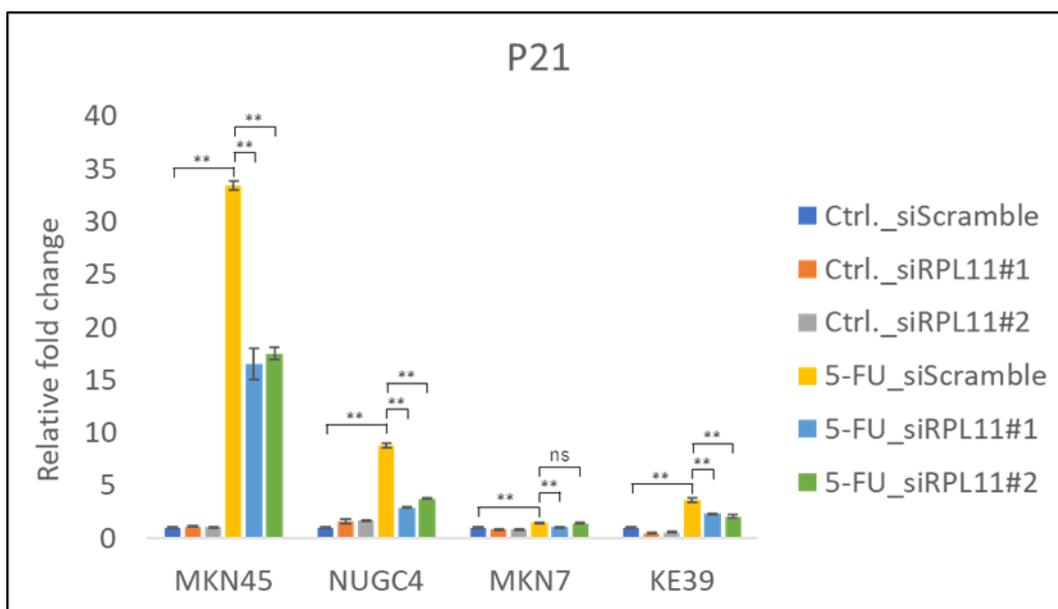


Fig. 8 *RPL11* をノックダウンした胃癌細胞株の 5-FU に対する P53 標的遺伝子の発現量解析 siScramble または siRPL11#1、siRPL11#2 を導入した MKN45

細胞株、NUGC4 細胞株、MKN7 細胞株、KE39 細胞株を、溶媒のみ (Ctrl.) もしくは 300 μ M の 5-FU で 24 時間処理した後、定量的 PCR 法によって *RPL11*、*P21*、*FAS* の mRNA 発現量の解析を行った。エラーバーは、標準偏差を示している。*P<0.05、**P<0.01、ns = not significant (有意差なし)。

第 5 章：総括

本研究にて、胃癌細胞に対する 5-FU の増殖抑制メカニズムを解明した。

第 2 章では、5-FU 治療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。

第 3 章、第 4 章では、野生型 *TP53* を持つ胃癌細胞株において、5-FU は *RPL11* を介した P53 経路の活性化によって細胞の増殖を抑制することが示された。

本研究により、*RPL11* は P53 およびその下流因子である P21 や Fas を活性化することによって腫瘍の増殖を抑制し、胃癌の 5-FU に対する治療感受性に密接に関与することを解明した (Fig. 9)。

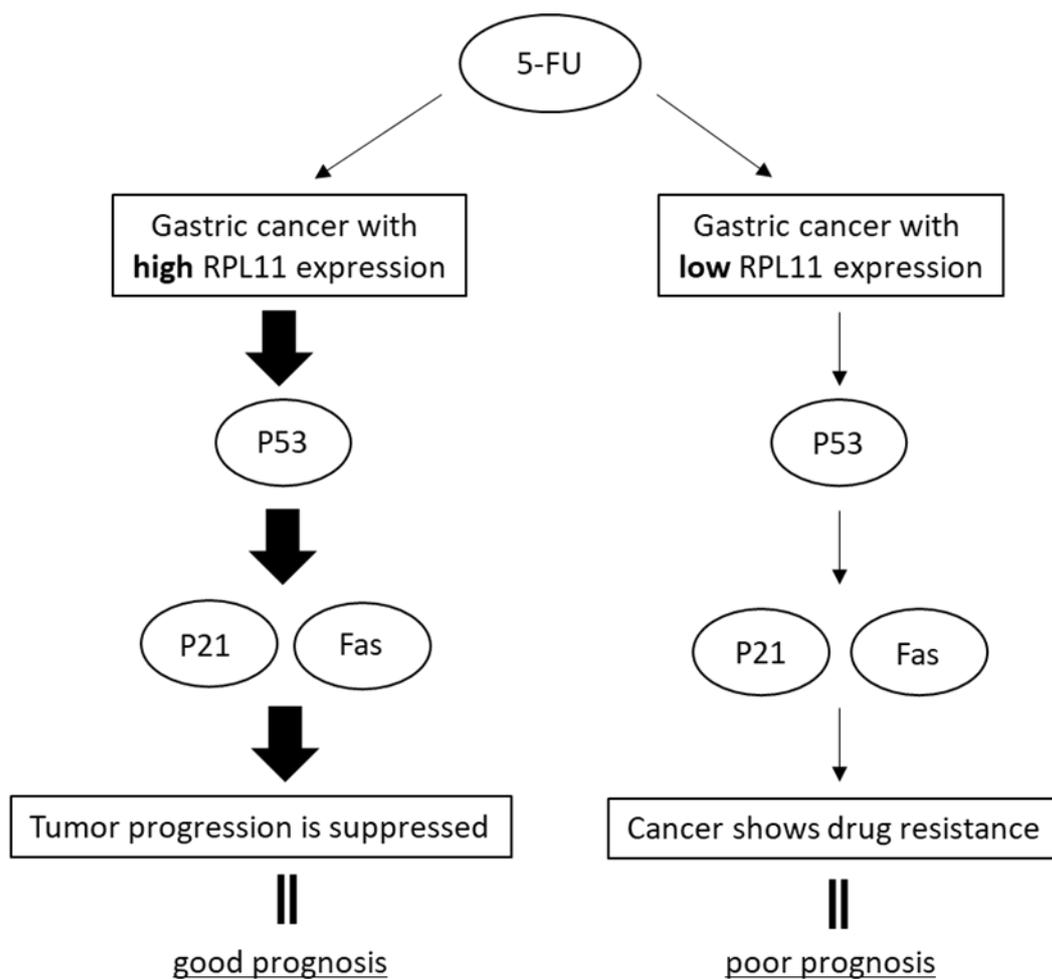


Fig. 9 胃癌における *RPL11* の発現量と 5-FU に対する感受性の関係を示す模式図

5-FU は、抗癌剤として胃癌や乳癌、肺癌など様々なタイプの癌治療に用いられている^[31]。5-FU は胃癌だけに限らず、乳癌や肺癌など他の癌種に対しても、*RPL11*-*P53* シグナル経路を介した腫瘍の増殖抑制効果を発揮するかもしれない。

また、5-FU は DNA 損傷を介して P53 経路を活性化することが知られている^[45]。本研究において、5-FU を投与した胃癌細胞では、*RPL11* の発現が P53 経路を介する細胞増殖抑制に密接に関与していた。しかし、5-FU を投与した他の癌種の細胞株においても、*RPL11* を介した P53 経路の活性化によって細胞増殖が抑制されるかどうかは不明であり、他の癌種の細胞株では DNA 損傷が優勢的に P53 経路を介した細胞増殖抑制に関与しているかもしれない。

加えて、骨肉腫細胞において、5-FU が誘導する rRNA プロセッシング阻害を介した細胞増殖抑制は、*RPL11* だけでなく *RPL5* や *RPL23* も関与していることが知られている^[41]。このことは、5-FU を投与した胃癌細胞において、*RPL5* や *RPL23* も P53 経路を介した細胞増殖抑制に関与している可能性を示唆している。

本研究より、胃癌によって *RPL11* 発現量には差があることが示された。*RPL11* の mRNA 発現量は、転写因子である Myc タンパク質のファミリー、c-Myc や N-Myc に制御されていることが知られている^[46,47]。したがって、胃癌によって異なった Myc の発現レベルあるいは活性化レベルが、このような *RPL11* 発現量の癌で差を生み出しているのかもしれない。

近年、エピジェネティック酵素である enhancer of zeste homolog 2 (*EZH2*) が胃癌の 5-FU 耐性に関与しており、*EZH2* 高発現の胃癌の患者は予後不良を示す

ことが Wang らによって報告された^[48]。さらなる研究が必要ではあるが、高い *RPL11* 発現量と低い *EZH2* 発現量を持つ胃癌患者は、*RPL11* が高発現あるいは *EZH2* が低発現のどちらか一方のみを示す胃癌患者に比べ、5-FU 治療に対してより高い感受性を示すと考えられる。これにより、さらに正確に胃癌の 5-FU に対する感受性を予測することが可能となるかもしれない。

すでに、RPS14 や RPL5、RPL22、RPL41、RPS7、RPS15a、RPS24、RPS27、RPL15 などのリボソーム蛋白質が、腫瘍化や細胞の転移・浸潤に関与していることが報告されている^[49]。しかしながら、リボソーム蛋白質とがんの薬剤感受性の関与はこれまで報告されていない。それゆえ、本研究は *RPL11* が胃癌の薬剤感受性および予後に関与していることを示した初めての論文となる。

5-FU 治療は、進行した胃癌を持つ患者において最も頻繁に使用される第一選択治療の一つである^[50,51]。しかしながら、ステージⅢ、Ⅳである胃癌患者の 5 年生存率は未だ低いままである^[52]。したがって、胃癌細胞の 5-FU 耐性の分子メカニズムを特定すること、および新たな治療戦略を見出すことが早急に必要とされている。

本研究にて、*RPL11* の発現が胃癌の 5-FU に対する治療感受性に影響を及ぼす重要な因子であることが示された。このことは、*RPL11* が胃癌の 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唆している。この

RPL11 のバイオマーカーとしての特定は、5-FU 耐性を持つ胃癌患者が 5-FU 治療によって引き起こされる望まれない副作用を避けるのに役立つと考えられる。

RPL11 のバイオマーカーとしての役割に加え、RPL11 は 5-FU に対する感受性を調節するのに機能的に必要であることが明らかとなった。したがって、腫瘍での *RPL11* の発現を高めるような薬剤と 5-FU を組み合わせた治療法は、野生型 *TP53* の遺伝子を持つ胃癌患者の 5-FU 耐性を改善させることが期待できる。これらの発見は、胃癌患者への新たな治療戦略に大きく貢献するだろう。

参考文献

1. 「知っておきたいがんの基礎知識」国立がん研究センター がん情報サービス、2018年9月. https://ganjoho.jp/public/dia_tre/knowledge/basic.html, (参照 2019-12-26)
2. 日本臨床腫瘍学会編、新臨床腫瘍学 改訂第5版、南江堂、2018年.
3. 「胃がん」国立がん研究センター がん情報サービス、2019年4月. <https://ganjoho.jp/public/cancer/stomach/index.html>, (参照 2019-12-26)
4. Wright NA, Poulsom R, Stamp G, Van Noorden S, Sarraf C, Elia G, Ahnen D, Jeffery R, Longcroft J, Pike C, *et al*: Trefoil peptide gene expression in gastrointestinal epithelial cells in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 104: 12–20,1993.
5. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E and Forman D: Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 61: 69–90, 2011.
6. el-Deiry W, Kern S, Pietenpol J, Kinzler K, Vogelstein B: Definition of a consensus binding site for p53. *Nat Genet* 1 : 45-49, 1992.
7. Vogelstein B, Kinzler K: p53 function and dysfunction. *Cell* 70: 523-526, 1992.
8. Lane DP: Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 358: 15-16, 1992.

9. Ko L, Prives C: p53: puzzle and paradigm. *Genes Dev* 10: 1054-1072, 1996.
10. Levine A: p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88: 323-331, 1997.
11. Velculescu VE, El-Deiry WS: Biological and clinical importance of the p53 tumor suppressor gene. *Clin Chem* 42: 858-868, 1996.
12. Vogelstein B, Lane D, Levine AJ: Surfing the p53 network. *Nature* 408: 307-310, 2000.
13. Vousden KH, Lu X: Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer* 2: 594-604, 2002.
14. Lowe SW, Sherr CJ: Tumor suppression by Ink4a-Arf: progress and puzzles. *Curr Opin Genet Dev* 13: 77-83, 2003.
15. Hussain SP, Harris CC: Molecular epidemiology of human cancer: contribution of mutation spectra studies of tumor suppressor genes. *Cancer Res* 58: 4023-4037, 1998.
16. Beroud C, Soussi T: The UMD-p53 database: new mutations and analysis tools. *Hum Mutat* 21: 176-181, 2003.
17. 「腫瘍抑制遺伝子 p53 の変異とその機能回復法」川島大介, 大塚健三 生物機能開発研究所紀要 9: 45-53, 2009.

18. Momand J, Zambetti GP, Olson DC, George D, Levine AJ: The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell* 69: 1237-1245, 1992.
19. Oliner JD, Kinzler KW, Meltzer PS, George DL, Vogelstein B: Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas. *Nature* 358: 80-83, 1992.
20. Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ, Howley PM: The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* 63: 1129-1136, 1990.
21. Maki CG, Huibregtse JM, Howley PM: In vivo ubiquitination and proteasome-mediated degradation of p53. *Cancer Res* 56: 2649-2654, 1996.
22. Honda R, Tanaka H, Yasuda H: Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS Lett* 420: 25-27, 1997.
23. Kubbutat MH, Jones SN, Vousden KH: Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature* 387: 299-303, 1997.
24. Bhat KP, Itahana K, Jin A and Zhang Y: Essential role of ribosomal protein L11 in mediating growth inhibition-induced p53 activation. *EMBO J* 23: 2402-2412, 2004.

25. Dai MS, Zeng SX, Jin Y, Sun XX, David L and Lu H: Ribosomal protein L23 activates p53 by inhibiting MDM2 function in response to ribosomal perturbation but not to translation inhibition. *Mol Cell Biol* 24: 7654–7668, 2004.
26. Dai MS and Lu H: Inhibition of MDM2-mediated p53 ubiquitination and degradation by ribosomal protein L5. *J Biol Chem* 279: 44475–44482, 2004.
27. Dai MS, Shi D, Jin Y, Sun XX, Zhang Y, Grossman SR and Lu H: Regulation of the MDM2-p53 pathway by ribosomal protein L11 involves a post-ubiquitination mechanism. *J Biol Chem* 281: 24304–24313, 2006.
28. Lohrum MA, Ludwig RL, Kubbutat MH, Hanlon M and Vousden KH: Regulation of HDM2 activity by the ribosomal protein L11. *Cancer Cell* 3: 577–587, 2003.
29. Jin A, Itahana K, O'Keefe K and Zhang Y: Inhibition of HDM2 and activation of p53 by ribosomal protein L23. *Mol Cell Biol* 24: 7669–7680, 2004.
30. Zhang Y, Wolf GW, Bhat K, Jin A, Allio T, Burkhardt WA and Xiong Y: Ribosomal protein L11 negatively regulates oncoprotein MDM2 and mediates a p53-dependent ribosomal-stress checkpoint pathway. *Mol Cell Biol* 23: 8902–8912, 2003.

31. Longley DB, Harkin DP and Johnston PG: 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer* 3: 330–338, 2003.
32. 「患者のためのがんの薬事典 5-FU (一般名：フルオロウラシル) 様々ながんに広く適応があり、とくに消化器がんの化学療法における基本的な抗がん剤」がんサポート 癌研有明病院化学療法科部長 畠清彦 監修、2019年7月。
<https://gansupport.jp/article/drug/drug01/3373.html>, (参照 2019-12-26)
33. Houghton JA, Tillman DM and Harwood FG: Ratio of 2'-deoxyadenosine-5'-triphosphate/thymidine-5'-triphosphate influences the commitment of human colon carcinoma cells to thymineless death. *Clin Cancer Res* 1: 723–730, 1995.
34. Sampath D, Rao VA and Plunkett W: Mechanisms of apoptosis induction by nucleoside analogs. *Oncogene* 22: 9063–9074, 2003.
35. Wilkinson DS and Pitot HC: Inhibition of Ribosomal Ribonucleic Acid Maturation in Novikoff Hepatoma Cells by 5-Fluorouracil and 5-Fluorouridine. *J Biol Chem* 248: 63–68, 1973.
36. Kanamaru R, Kakuta H, Sato T, Ishioka C and Wakui A: The inhibitory effects of 5-fluorouracil on the metabolism of preribosomal and ribosomal RNA in L-1210 cells in vitro. *Cancer Chemother Pharmacol* 17: 43–46, 1986.

37. Ghoshal K and Jacob ST: Specific Inhibition of Pre-Ribosomal RNA Processing in Extracts from the Lymphosarcoma Cells Treated with 5-Fluorouracil. *Cancer Res* 54: 632–636, 1994.
38. Nabeya Y, Loganzo F Jr, Maslak P, Lai L, de Oliveira AR, Schwartz GK, Blundell ML, Altorki NK, Kelsen DP and Albino AP: The mutational status of p53 protein in gastric and esophageal adenocarcinoma cell lines predicts sensitivity to chemotherapeutic agents. *Int J Cancer* 64: 37–46, 1995.
39. Pickard M, Dive C and Kinsella AR: Differences in resistance to 5-fluorouracil as a function of cell cycle delay and not apoptosis. *Br J Cancer* 72: 1389–1396, 1995.
40. Osaki M, Tatebe S, Goto A, Hayashi H, Oshimura M and Ito H: 5-Fluorouracil (5-FU) induced apoptosis in gastric cancer cell lines: role of the p53 gene. *Apoptosis* 2: 221–226, 1997.
41. Sun XX, Dai MS, and Lu H: 5-Fluorouracil Activation of p53 Involves an MDM2-Ribosomal Protein Interaction. *J Biol Chem* 282: 8052–8059, 2007.
42. Hong CF, Lin SY, Chou YT, and Wu CW: MicroRNA-7 Compromises p53 Protein-dependent Apoptosis by Controlling the Expression of the Chromatin Remodeling Factor SMARCD1. *J Biol Chem* 291: 1877-1889, 2016.

43. Yang Y, Nakagawa H, Tetreault MP, Billig J, Victor N, Goyal A, Sepulveda AR, Katz JP: Loss of transcription factor KLF5 in the context of p53 ablation drives invasive progression of human squamous cell cancer. *Cancer Res* 71: 6475-6484. 2011.
44. Petak I, Tillman DM, Houghton JA: p53 dependence of Fas induction and acute apoptosis in response to 5-fluorouracil-leucovorin in human colon carcinoma cell lines. *Clin Cancer Res* 6: 4432-4441. 2000.
45. Adamsen BL, Kravik KL and De Angelis PM: DNA damage signaling in response to 5-fluorouracil in three colorectal cancer cell lines with different mismatch repair and TP53 status. *Int J Oncol* 39: 673–682, 2011.
46. Dai MS, Arnold H, Sun XX, Sears R and Lu H: Inhibition of c-Myc activity by ribosomal protein L11. *EMBO J* 26: 3332-3345, 2007.
47. Boon K, Caron HN, Van Asperen R, Valentijn L, Hermus MC, Van Sluis P, Roobeek I, Weis I, Voûte PA, Schwab M, *et al*: N-myc enhances the expression of a large set of genes functioning in ribosome biogenesis and protein synthesis. *EMBO J* 20: 1383-1393, 2001.
48. Wang C, Li X, Zhang J, Ge Z, Chen H and Hu J: EZH2 contributes to 5-FU resistance in gastric cancer by epigenetically suppressing FBXO32 expression.

Onco Targets Ther 11: 7853-7864, 2018.

49. Xu X, Xiong X and Sun Y: The role of ribosomal proteins in the regulation of cell proliferation, tumorigenesis, and genomic integrity. *Sci China Life Sci* 59: 656-672, 2016.
50. Ajani JA: Evolving chemotherapy for advanced gastric cancer. *Oncologist* 10: 49–58, 2005.
51. Zhe W, Feng ZJ and Fang FG: Effect of rhizoma curcumate zedoariae and herbra trifolii repentis on apoptosis of human lung cancer cell line A549. *J Capital Univ Med Sci* 22: 304–305, 2001.
52. Parkin DM, Bray F, Ferlay J and Pisani P: Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 55: 74–108, 2005.

謝辞

博士研究を行うにあたり、数々のご指導ご鞭撻をいただきました鹿児島大学大学院理工学研究科の濱田季之准教授、岡村浩昭教授、横川由紀子講師、鬼束聡明助教、内海俊樹教授、有馬一成准教授、鹿児島大学大学院医歯学総合研究科の河原康一准教授、古川龍彦教授、山本雅達助教、新里能成助教、南謙太郎氏に厚く御礼申し上げます。

本研究の実験を様々な面でサポートしていただきました下川倫子氏、崎山明恵氏、白石岳大氏に深く感謝申し上げます。

また、研究活動を行うにあたり、多くの刺激をいただきました鹿児島大学理学部生命化学科有機生化学講座有機化学研究室および鹿児島大学大学院医歯学総合研究科分子腫瘍学分野のすべての皆様に心よりお礼申し上げます。

最後に、いつも温かく支えてくださいました両親に深く感謝申し上げます。

令和元年 12 月 26 日

鹿児島大学大学院 理工学研究科 総合理工学専攻

博士 3 年 川畑 拓斗