

論文要旨

Expression of DNA damage response proteins in gastric cancer: Comprehensive protein profiling and histological analysis

胃癌における DNA 損傷応答関連蛋白質の発現：網羅的蛋白質発現解析と病理組織学的検討

胃癌は、日本の癌の第3の主要死因である。内視鏡や手術、化学療法の進歩とともに胃癌の予後はよくなってきているが、進行胃癌の予後はいまだ不良である。胃癌において、蛋白質、DNA、RNA および代謝物の網羅的な発現解析が行われており、胃癌の病態の理解と治療法の開発に有用な情報と考えられる。実際これらの研究により、胃癌は4つのサブタイプに分けられることが明らかにされたが、治療に有用な分子の同定には至っていない。そこで本研究では、胃癌の新規治療法の開発を見据え、網羅的蛋白質発現解析によって胃癌の病態病理に関与する分子を同定することを目的とした。

網羅的蛋白質発現解析は、17例の胃癌手術症例のホルマリン固定パラフィン包埋標本を用い、癌部をマニュアルダイセクションで選択採取し、抽出した蛋白質を液体クロマトグラフィー - タンデム質量分析法によって分析した。その結果、5338の蛋白質が胃癌で発現していることが明らかにされた。これらの蛋白質の中で、17例すべての胃癌に発現が見られる483の蛋白質を抽出し、蛋白質の発現パターンが似ているサンプルごとにグループ分類(階層クラスター解析)を行ったところ、胃癌は大きく2つのクラスターに分けられた。この2つのクラスターに分ける上で影響の大きい蛋白質を特定するために、Orthogonal partial least squares-discriminant analysis (OPLS-DA)とIngenuity pathway analysis (IPA)で蛋白質の機能経路の解析を行った。その結果、リボ核タンパク質、ヘテロ核リボ核タンパク質、インターロイキン結合因子2 (ILF2)、KU70 (X-ray repair cross-complementing protein 6)およびKU80 (X-ray repair cross-complementing protein 5)などのDNA損傷応答に関連する蛋白質が同定され、胃癌の病態においてDNA損傷応答が重要な役割を果たし

ていることが推察された。

そこで、42 例の胃癌手術症例の病理組織標本を用いて、DNA 損傷応答において重要な役割を果たす KU70、ILF2、CHK1 (Checkpoint kinase 1) および CHK2 (Checkpoint kinase 2) の発現およびリン酸化を、免疫染色により検討した。DNA 損傷のセンサー蛋白質である KU70 は胃癌のすべての症例で発現が見られた。しかしながら 1 例において KU70 のリン酸化が減弱していた。DNA 損傷応答の経路の安定化に関わる ILF2 およびシグナルのトランスデューサーの 1 つである CHK1 は、すべての症例において発現しており、発現とリン酸化に差を認めなかった。一方、トランスデューサーで最も重要な CHK2 は、42 例中 2 例において CHK2 の発現とリン酸化が認められず、4 例では CHK2 の発現があったにもかかわらずリン酸化が見られなかった。以上のことから胃癌はリン酸化の異常といった DNA 損傷応答の障害をきたしていると考えられた。これら DNA 損傷応答の蛋白質の異常を伴う 7 例のうち 2 例 (29%) には再発を認め、1 例は死亡していた。一方、DNA 損傷応答の蛋白質の発現の保たれた 35 例では 2 例 (6%) に再発を認め、DNA 損傷応答の蛋白質の発現や機能異常を伴う胃癌の予後は不良と思われた。

次に 4 種の胃癌培養細胞株を用いて DNA 損傷応答の分子病態と細胞死の関連について検討した。細胞株における KU70、ILF2、CHK1、CHK2 および TP53 の発現をウェスタンブロットで検討したところ、異常 CHK2 の発現と TP53 の発現異常が 3 種の細胞株で見られた。細胞株に 40 J/m² の紫外線を曝露して DNA の損傷を惹起し、これらの分子の発現変化とリン酸化を検討したところ、DNA の損傷に伴う KU70、CHK1、CHK2 のリン酸化、そして TP53 の発現増強は 1 種の細胞株のみで観察され、この細胞株ではアポトーシスとなる細胞が非曝露培養細胞と比較して増加していた。他の 3 種の細胞株では CHK2 のリン酸化の欠落または TP53 の発現異常が見られ、またアポトーシスの増加は明らかではなかった。

このことから胃癌の腫瘍細胞における DNA 損傷応答と TP53 の機能の維持は、DNA 損傷におけるアポトーシスの誘導といった腫瘍細胞の運命決定に必要と考えられ、この破綻はア

ポトースの誘導を減弱させて腫瘍を生存させ、さらにヒト胃癌における予後不良に関連している可能性が考えられた。以上のことから、DNA 損傷応答は胃癌の病態病理において重要な役割を果たしていると考えられた。