

論文審査の結果の要旨

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

日本医科大学大学院医学研究科 消化器外科学分野

大学院生 新井 洋紀

International Journal of Oncology 2018 年掲載予定

進行胃癌は診断・治療の進歩にかかわらず、いまだ予後は不良である。胃癌における蛋白質と RNA の網羅的な解析から、発生機序は解明されつつあるが、病態や治療に結びつく分子は十分解明されていない。そこで申請者らは網羅的蛋白質発現解析により胃癌の病態に関与する分子の同定を目指した。網羅的蛋白質発現解析には、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た。癌組織から蛋白質を抽出し、液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析法で解析し、5338 の蛋白質が同定された。そのうち 17 例すべての胃癌に発現が見られる 483 の蛋白質について解析を進めた。蛋白質の発現パターンが類似した症例をグループ分類する階層的クラスター解析により、胃癌は 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重要な蛋白質を同定する直交部分的最小二乗判別解析を行うとともに、Ingenuity pathway analysis で発現する蛋白質の機能の解析を行った。その結果、リボソーム蛋白質とともに、インターロイキン結合因子 2 (ILF2)、KU70 および KU80 などの蛋白質が同定され、機能解析からこれらの蛋白質は DNA 損傷応答に関連していることが明らかにされた。そこで、42 例の胃癌手術症例の病理組織標本を用いて、DNA 損傷応答に関わる 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。KU70 はすべての症例で発現が見られたが、1 例においてリン酸化が減弱していた。一方、CHK2 は、42 例中 2 例において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、胃癌の 42 例中 7 例 (17%) で DNA 損傷応答に関わる蛋白質の発現やリン酸化の異常を伴うことが明らかとなった。DNA 損傷応答関連蛋白質の異常を伴う 7 例のうち 2 例 (29%)、発現の保たれた 35 例では 2 例 (6%) に再発を認め、DNA 損傷応答関連蛋白質の異常を伴う胃癌の予後は不良と考えられた。

次に 4 種の胃癌培養細胞株における 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。また、紫外線による DNA 損傷を惹起したところ、CHK1、CHK2 のリン酸化、そして TP53 の発現増強といった正常の DNA 損傷応答は 1 種の細胞株のみで見られ、アポトーシスも誘導された。このことから腫瘍細胞においても DNA 損傷応答が細胞の生存と死に重要な役割を果たしていると考えられた。第二次審査では、上記実験内容に加え、階層的クラスター解析の手法、周辺組織の蛋白質発現、ピロリ菌との関係などに関する幅広い質疑が行われたが、いずれも的確な回答がなされた。本研究は胃癌の網羅的蛋白質発現解析から、DNA 損傷応答関連蛋白質を同定し、その発現とリン酸化の異常の予後に及ぼす影響など、胃癌における DNA 損傷応答の重要性を初めて示したもので、胃癌の病態解明に寄与するものと考えられた。以上より、本論文は学位論文として価値あるものと認定した。