

## 論文内容の要旨

A compensatory role of NF- $\kappa$ B to p53 in response to 5-FU based chemotherapy in vitro  
(5-FU 系抗癌剤への in vitro 反応における NF- $\kappa$ B の p53 に対する補填的役割)

(遠藤史隆, 西塚哲, 石田和茂, 久米浩平, 片桐弘勝, 石田馨, 岩谷岳, 肥田圭介, 若林剛)

(Molecular Cancer Research (投稿審査中))

### I. 研究目的

Stage II, III 胃癌根治術後の 5-FU 系補助化学療法施行群と手術単独群を比較すると, 化学療法群で予後が良いことが証明されている. しかしながら, 化学療法群においても 35% 以上に再発が見られる. 従って治療後再発リスク推定のために, 生物学的根拠に基づいた治療効果予測バイオマーカーの同定が必要である. 最近, 我々は胃癌根治術後の 5-FU 系補助化学療法後の再発予測マーカーの一つとして NF- $\kappa$ B を同定した. 今回, 5-FU 系補助化学療法における NF- $\kappa$ B の生物学的意義を評価するために, 胃癌細胞株を用いて 5-FU 刺激に対して NF- $\kappa$ B が関与する分子レベルでの反応を解析した.

### II. 研究対象ならび方法

ヒト胃癌細胞株を用いて実験を行った. 培養液に 5-FU を添加し, NF- $\kappa$ B の誘導, 局在を western blot, 蛍光免疫染色を用いて観察した. 5-FU により誘導される遺伝子をマイクロアレイで解析した. 同定された遺伝子のプロモーター領域における NF- $\kappa$ B, p53 の結合部位を公開データベースを用いて解析した. RELA (NF- $\kappa$ B サブユニットの p65 をコードする遺伝子), TP53 knockdown による影響, さらに knockdown した状態における 5-FU に対する反応を western blot で解析した. Pro/Pro 多型の場合に NF- $\kappa$ B と p53 が interact する p53 codon72 の多型, p53 の変異について解析し, さらに細胞増殖試験を行い 5-FU 抵抗性との関係を調べた.

### III. 研究結果

- ① 5-FU 刺激により NF- $\kappa$ B は誘導され, 核内に NF- $\kappa$ B が移行した細胞が増加した.
- ② マイクロアレイを用いて 5-FU により誘導される遺伝子を 10 個同定した. そのうち 5 遺伝子が p53 により誘導されることが報告されているものであった.
- ③ 同定された遺伝子のプロモーター内の転写因子の結合部位を解析すると, NF- $\kappa$ B と p53 の結合部位が存在し, 転写活性に関与することを予測できた.
- ④ RELA を knockdown すると, p53 の発現や p53 下流遺伝子のタンパク発現も低下した. 逆に TP53 を knockdown しても p65 の発現には影響はなかった.
- ⑤ RELA を knockdown した状態に 5-FU 刺激を加える実験では, TP53-wild, TP53-mutant どちらの細胞株でも p65 と p53 下流遺伝子の発現は低いままであった. しかし, TP53-wild type の細胞株では 5-FU 刺激により p53 の発現は増加した. TP53 を knockdown した状態に 5-FU 刺激を加える実験でも, RELA を knockdown した時と結果は大きく変わらなかった.

⑥胃癌細胞株の codon72 の多型解析と細胞増殖試験による 5-FU 感受性との関連を調べると, Pro<sup>hom</sup>の MKN45, GSS は 5-FU 感受性が低く, 逆に Arg<sup>hom</sup>の MKN74, KE39 は感受性が高い傾向があった. TP53 変異の検索では, MKN45 は wild type, MKN74, KE39, GSS, KatoIII は mutant type であった.

⑦5-FU 感受性と各胃癌細胞株の NF- $\kappa$ B と p53 の発現量の関連性を調べると, NF- $\kappa$ B の発現が強いほど 5-FU 感受性が低かった. p53 と 5-FU 感受性との明らかな関連性は認められなかった.

#### IV. 結 語

5-FU に対する反応では p53 の転写活性に NF- $\kappa$ B は必須であり, p53 に変異を有する細胞では NF- $\kappa$ B が代償的な機能を果たしていると考えられる. 手術検体を用いた大規模臨床研究を行う必要があるが, TP53 遺伝子変異が高率に認められる胃癌においては, 5-FU の効果予測の観点から NF- $\kappa$ B を 5-FU 抵抗性マーカーとすることは妥当である.

## 論文審査の結果の要旨

論文審査担当者

主査 教授 杉山 徹 (産婦人科学講座)

副査 准教授 久保田 美子 (生化学講座:分子医化学分野)

副査 講師 杉村 淳 (泌尿器科学講座)

最近,胃癌術後に5-FU系補助化学療法後の再発予測マーカーとしてNF- $\kappa$ Bを同定した.今回,胃癌細胞株を用いてNF- $\kappa$ Bの状態と5-FUとの関連を検証し,NF- $\kappa$ Bの再発予測マーカーとしての妥当性を評価した.NF- $\kappa$ Bは5-FU刺激で核内へ誘導されたが,誘導を確認した10遺伝子のうち5つがp53の下流遺伝子であった.*in silico*での遺伝子プロモーター解析で,NF- $\kappa$ Bとp53の両方が5-FUによる誘導に関わっていると予測できた.NF- $\kappa$ B構成因子のp65をノックダウンすると,p53の発現も低下した.NF- $\kappa$ Bのp53結合に重要であるcodon72がPro/Pro多型の場合,5-FU感受性が低い傾向があった.以上から,NF- $\kappa$ Bは5-FUに対する反応ではp53より重要で,p53に変異を有する細胞ではNF- $\kappa$ Bが代償的な機能を果たしていると推察された.従って,NF- $\kappa$ Bを5-FU抵抗性マーカーの一つの候補とすることは妥当である,という結論に至った.

## 試験・試問の結果の要旨

5-FUの作用機序,p53 codon72の多型,薬剤抵抗性,p53 mutation,5-FU刺激に対するNF- $\kappa$ Bの反応,について試問を行い,適切な解答を得た.学位に値する学識を有していると考ええる.

## 参考論文

- 1) 敗血症性ARDSに対するPMX-DHP施行時のIL-18値と肺酸素化能の検討:症例報告(吉川智宏,他16名と共著).  
エンドトキシン血症救命治療研究会誌14巻,1号.
- 2) Molecular Marker Identification for Relapse Prediction in 5-FU-Based Adjuvant Chemotherapy in Gastric and Colorectal Cancers (胃癌・結腸直腸癌における5-FU系抗癌剤の再発予測分子マーカーの同定)(石田和茂,他20名と共著).  
PLOS ONE 2012;7巻,8号.
- 3) 当科における新鮮凍結血漿(FFP)の適正使用に関する検討(遠藤史隆,他2名と共著).  
日本外科系連合学会誌37巻,5号.