







学位論文審査の結果の要旨

審査区分 課・論	第 573 号	氏名	平下有香
審査委員会委員	主査氏名	花田 礼子	
	副査氏名	横山 繁雄	
	副査氏名	白石 憲男	
論文題目 Reduced phosphorylation of ribosomal protein S6 is associated with sensitivity to MEK inhibition in gastric cancer cells (胃癌細胞株において、MEK 阻害剤の感受性は S6 タンパクのリン酸化の低下と相関する)			
論文掲載雑誌名 Cancer Science			
論文要旨 本研究は進行胃癌における RTK/KRAS 異常に着目し、その下流で活性制御を受けるシグナルの重要性に焦点を当てて、分子標的薬・MEK 阻害剤(PD0325901)の胃癌における有効性の検討、および感受性の予測因子の探索を目的とした研究である。まず、胃癌細胞株 48 株について、ゲノムコピー数異常ならびに RTK/KRAS 下流に存在するシグナル因子のリン酸化レベルの解析を行い、その結果をもとにそれぞれの細胞株にて MEK 阻害剤感受性を比較することで有効性を評価し、感受性に関わる因子を抽出した結果、MEK 阻害剤(PD0325901)への高感受性株 22 株が存在することが判明した。当初、RTK/KRAS 異常を持つ株に MEK 阻害剤が有効であるとの仮説を立てて実験を遂行していたが、RTK/KRAS 異常を有する細胞株中でも MEK 阻害剤の効果が低い細胞株が存在し、逆に RTK/KRAS 異常が検出されない株の一部に高感受性株が存在することが明らかとなり、MEK 阻害剤への感受性の予測は RKT/KRAS 異常のみにて判定することは不可能であることが明らかとなった。次に RTK/KRAS の下流に存在するシグナル因子のリン酸化レベルを BioPlex 法で測定したところ、MEK 阻害剤への高感受性株では mTORC1 の活性を示す S6K、4EBP1、S6 のリン酸化レベルが有意に低下していることが明らかとなった。特に S6 タンパク質のリン酸化レベルの低下率に関しては腫瘍細胞の増殖抑制効果と非常に高い相関を示した。さらに <i>in vivo</i> 実験として異種移植実験を行い、MEK 阻害剤の感受性の高い細胞株と低い細胞株の 2 種の腫瘍細胞を移植し、腫瘍径の変化や ERK ならびに mTORC1 活性の指標となる S6 のリン酸化レベルを免疫染色にて検証したところ、MEK 阻害剤への感受性が高い細胞の移植においては MEK 阻害剤の投与にて腫瘍径が有意に短く、S6 タンパク質のリン酸化レベルも明らかに低下していることが判明した。一方で、MEK 阻害剤への感受性が低い細胞の移植においてはコントロール群と MEK 阻害剤の投与群間で腫瘍径に有意差はなく、S6 タンパク質のリン酸化レベルに関しても差異は認めなかった。 本研究は、進行胃癌細胞において、臨床応用検討中である MEK 阻害剤(PD0325901)の有効性を検討した研究であり、MEK 阻害剤への感受性は RTK/KRAS 異常とは相関が見られないことが判明した。一方で、興味深いことに、MEK 阻害により mTORC1 活性低下を示し、MEK 阻害剤の感受性と mTORC1 活性の変化とは高い相関を示し、この相関は早期から検出可能であることも判明した。今回は <i>in vitro</i> の解析の知見から <i>in vivo</i> での検証を経た一連の研究結果であり、本研究の知見をもとに、将来、MEK 阻害剤の胃癌における病態薬理学的メカニズムの解明や臨床応用へつながることが期待される。よって、審査員の合議により本論文は学位論文に値するものと判定した。			

最終試験
の結果の要旨
~~学力の確認~~

審査区分 課・論	第573号	氏名	平下有香
審査委員会委員	主査氏名	花田 礼子	
	副査氏名	横山 繁史	
	副査氏名	白石 憲男	
<p>学位申請者は本論文の公開発表を行い、各審査委員から本研究の目的、方法、結果、考察について下記の質問を受けた。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 抗癌剤の感受性のマーカーとして、これまでにリン酸化に着目した報告はあるか？ 2. 「RAF/MEK/ERK」系と「P13K/AKT/mTORC1」系の両経路の相互作用に関する報告はあるか？ 3. これまでにシグナル伝達に対する分子標的薬剤の耐性機序として、どのようなことが報告されているか？ 4. MEK阻害剤 PD0325901 に対する感受性と細胞株の組織型との間に関連はないか？ 5. 今回使用した MEK 阻害剤は、最近、日本で承認された MEK 阻害剤とどのように異なっているか？ 6. 実際の胃癌検体を用いて mTOR の免疫染色は行ったか？ 7. 抗 pS6 抗体による免疫染色において、腫瘍内の染色性は均一だったか？ 8. mTOR 阻害剤 PF04691502 が、MEK の下流に影響を与えるということはないか？ 9. MEK 阻害剤 PD0325901 が、今回、検討されたリン酸化タンパクの合成に影響を与えた可能性はないか？ 10. MEK阻害剤の作用機序について、論文中に記載されていないので、説明せよ。 11. 使用されたMEK阻害剤は何癌の治療に使われるのか。 12. K-RASにはRaf/MEK/ERKとPI3K/AKT/mTORがあるが、一方の経路に拘わるMEK阻害剤がmTORの経路にどのような影響を与えるのか。 13. Fig. 5で、感受性株は分化型、耐性株は低分化腺癌であるが、MEK阻害剤の感受性に癌の分化度は全く関係しないのか？ 14. Fig. 5で、感受性株と耐性株のコントロール群で、pS6の染色性に差はあるのか？ 15. 胃癌の生検標本で、免疫染色による pS6 発現を検討したか。 16. 胃癌におけるRTK/KRAS変異の割合はどれくらいか？ 17. KRAS変異 G12V やG12Dにより、KRASタンパク質の構造や機能はどのように変化するか？ 18. 各種MEK阻害剤の作用の違いや効果の違いについてはどのように報告されているか？ 19. vivo実験におけるMEK阻害剤の血中動態はどのように変化するか？ 20. MEK阻害剤の感受性を 1 μMとした根拠はなぜか？ 21. NOD-SCIDマウスとはどのようなマウスか？ 22. 異種移植実験での長期間での検証結果はどうだったか？ (MEK阻害剤に対する耐性について) 23. mTORC1の中の分子動態について直接的な検証は行ったか？ 24. Fig. 3にてリン酸化のwestern blottingでの適正化に各タンパクのtotal 量ではなく、GAPDHを使用したのはなぜか？ 25. MEK阻害剤がmTORC1の下流のシグナルに影響を及ぼした機序について現時点でのメカニズムの可能性を説明せよ。 <p>これらの質問に対して、申請者は概ね適切に回答した。よって、審査委員の合議の結果、申請者は学位取得有資格者と認定した。</p>			

(注) 不要の文字は2本線で抹消すること。