

第 8 号様式

論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称	博 士 ( 医学 )	氏名	青木 義朗
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 ①・2 項該当		
<p>論 文 題 目</p> <p>Involvement of ribonucleotide reductase-M1 in 5-fluorouracil-induced DNA damage in esophageal cancer cell lines</p> <p>(食道癌細胞株における 5-フルオロウラシルにより誘導される DNA 障害へのリボヌクレオチドリダクターゼ M1 の関与)</p>			
<p>論文審査担当者</p> <p>主 査 教授 神谷 研二</p> <p>審査委員 教授 田中 信治</p> <p>審査委員 教授 杉山 一彦</p>			
<p>[論文審査の要旨]</p> <p>近年の抗癌剤や分子標的治療薬の発展にも関わらず，食道癌の化学療法領域では 5-fluorouracil (5-FU) と cisplatin (CDDP) の併用療法を凌駕するレジメは開発されていない。ヌクレオチドアナログである 5-FU は，様々な代謝産物に変換され抗腫瘍効果を発揮する。例えば fluorouridine triphosphate (FUTP) に変換されて RNA に取り込まれることで抗癌作用をもたらすことや，thymidylate synthetase (TS) の阻害や DNA への取り込みにより DNA 損傷を誘導する事が明らかになっている。Ribonucleotide reductase-M1 (RRM-1) は 5-FU の代謝酵素の一つであり，fluorouridine diphosphate (FUDP) から fluorodeoxyuridine diphosphate (FdUDP) への代謝の際に必要とされる。さらに FdUDP は，fluorodeoxyuridine triphosphate (FdUTP) に代謝され DNA に取り込まれることによって DNA 二重鎖切断 (DSBs) などの DNA 損傷を誘導すると考えられている。しかし，5-FU が誘導する DNA 損傷や RNA 障害への RRM-1 の関与については，未だ不明な点が多い。一方，CDDP は DSBs などの DNA 損傷を誘導し，DNA 損傷部位ではリン酸化されたヒストン H2AX (<math>\gamma</math>H2AX) や，DSBs の相同組換え修復で重要な役割を果たしている RAD51 がフォーカスを形成することが知られている。しかし，5-FU と CDDP の併用による抗腫瘍効果に，DNA 損傷やその修復機構がどのように寄与しているかは不明な点が多い。そこで，食道癌細胞株における 5-FU</p>			

が誘導する DNA 損傷への RRM-1 の関与を検討するとともに、5-FU/CDDP 併用による感受性増強における RRM-1 の役割を検討した。

食道癌細胞株としては、RRM-1 高発現の TE11 細胞および低発現の TE1 細胞を用いた。両細胞株で 5-FU に対する感受性に差を認めなかった。TE11 では DNA 損傷を持つ  $\gamma$ H2AX フォーカス陽性細胞の増加を認めたのに対し、TE1 では明らかな増加は認められず、RRM-1 の発現が 5-FU による DNA 損傷誘導に関与している可能性が示唆された。そこで、siRNA による RRM-1 の発現抑制を行った TE11 細胞株に 5-FU 処理を行い、 $\gamma$ H2AX フォーカス形成を検討した。その結果、RRM-1 発現抑制により  $\gamma$ H2AX フォーカス陽性細胞の割合は減少したが、感受性の変化は認められなかった。以上より、5-FU 感受性が同等な細胞株においても DNA 損傷が優位な細胞株と RNA 障害が優位なものがあること、および RRM-1 が 5-FU による DNA 損傷誘導に関与している可能性が考えられた。

続いて、5-FU と CDDP の相乗効果への DNA 損傷の関与について検討した。5-FU と CDDP の併用処理では、CDDP と 5-FU の単剤処理と比較して  $\gamma$ H2AX フォーカス陽性 TE11 細胞の割合は相加的な増加を示した。一方、相同組換え修復に関与する RAD51 が形成するフォーカスの陽性細胞は、単剤処理に比べ併用時には著明な増加が認められた。これらの所見から、5-FU と CDDP の相乗効果には、DNA 損傷の増加ではなく、修復機構の調節が関与している可能性が示唆された。

次に、5-FU と CDDP の相乗効果での DNA 修復機構の調節に RRM-1 が関与している可能性を検討した。siRNA による RRM-1 発現抑制を行った TE11 細胞を 5-FU と CDDP で併用処理したところ、対照細胞と比較して有意な感受性の低下を認めた。5-FU、CDDP 単剤で処理した RRM-1 発現抑制 TE11 細胞では感受性に変化を認めなかったことから、RRM-1 は TE11 細胞株における 5-FU と CDDP 併用処理による相乗効果に関与していることが示唆された。そこで、RRM-1 発現抑制 TE11 細胞を 5-FU と CDDP の併用で処理し、 $\gamma$ H2AX フォーカスと RAD51 フォーカスの形成を検討したところ、対照細胞株と比べ  $\gamma$ H2AX のフォーカス形成には変化を認めなかったが、RAD51 フォーカス形成に関しては有意な陽性細胞数の減少を認めた。一方、CDDP 単剤処理では、RRM-1 発現抑制による RAD51 フォーカス形成の抑制は認められなかった。これらの知見から、RRM-1 は DNA 修復機構を調節することで 5-FU と CDDP の相乗効果に関与していることが示唆された。

以上の結果から、本論文は食道癌細胞株において RRM-1 が 5-FU による DNA 損傷の誘導と 5-FU とシスプラチンの併用相乗効果増強に関与しているという新たな知見の発見という点で、非常に意義が高いと考えられる。よって審査委員会委員全員は、本論文が青木義朗に博士（医学）の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。