

論文の内容の要旨

論文題目 Identification and characterization of PBK/TOPK as a novel
molecular target gene for breast cancer therapy

和訳 乳癌治療新規分子標的候補遺伝子 PBK/TOPK の同定及びその機能解析

指導教員 中村 祐輔 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成16年 4月 入学

医学博士課程

病因・病理学専攻

氏名 朴 在賢

乳癌は1996年以来本邦においても女性の悪性腫瘍罹患率1位となり、死亡者数も増加の一途を辿っている。現在の乳癌治療としては主に外科療法、放射線療法、ホルモン療法、化学療法などを組み合わせた集学的治療が行われているが、未だ十分な有効性が認められていないのが現状である。近年、ヒト型抗ErbB2抗体 Trastuzumab が分子標的治療薬として開発され、臨床応用されているが、対象が約20%の転移性乳癌患者のみであり、また副作用として重篤な心毒性があることから、新規の分子標的治療薬開発が急務である。さらに既存の抗がん剤の多くは、細胞毒性による抗がん作用を期待する薬剤であり、その作用機序から正常細胞、特に細胞周期の短い骨髄細胞などに強い副作用を示す。その結果、がん患者に強い侵襲を与えることが治療効果を妨げる大きな要因となっている。この問題を克服するためには、正常臓器では発現を認めず、癌細胞特異的に発現を認め、さらに細胞増殖に重要な役割を担う分子を標的する薬剤開発が重要である。本研究は、乳癌の新規治療薬の開発およびその発症・進展のメカニズムを分子レベルで解明すること目的に、当研究室で構築している

約 36000 の遺伝子または EST よりなる cDNA マイクロアレイを用いた乳癌とヒト正常臓器における網羅的遺伝子発現情報解析により、乳癌細胞において高頻度に発現亢進を認め、さらに正常臓器での発現が低いセリンスレオニンキナーゼ PBK/TOPK (PDZ-binding kinase/T-LAK cell-originated protein kinase) を治療標的分子として着目して機能解析を行ったものであり、下記の結果を得ている。

乳癌臨床検体より抽出した mRNA を用いた半定量的 RT-PCR 法および乳癌細胞株とヒト正常臓器由来 mRNA を用いたノザン解析の結果、PBK/TOPK 遺伝子は、調べた 10 種類の乳癌細胞株全ておよび乳癌臨床検体において高発現を示す一方、副作用の低い治療薬開発のために重要な観点である正常臓器での発現では、精巣以外の臓器において認められないことから、癌精巣抗原であると考えられた。次に、PBK/TOPK 特異的モノクローナル抗体を用いた細胞免疫染色により、複数の乳癌細胞株における内在性 PBK/TOPK の局在を調べたところ、いずれの細胞株においても主に細胞質に局在することが認められた。乳癌組織および正常組織を用いた免疫組織染色によって、PBK/TOPK は乳頭腺癌・充実腺管癌・硬癌のいずれにも組織型においても強い染色を認めたのに対し、正常臓器ではノザン解析で発現の認められた精巣では染色を認めるものの、正常乳管細胞および生命維持に重要な重要臓器（心臓・肝臓・腎臓・肺）では全く染色を認めなかった。以上の結果より、PBK/TOPK は、mRNA レベルだけでなくタンパク質レベルにおいても乳癌において高発現することがわかった。

PBK/TOPK 遺伝子の乳癌の細胞増殖への関与を調べるために、PBK/TOPK の高発現を認める 2 種類の乳癌細胞株 (T47D および BT-20) に PBK/TOPK 遺伝子特異的 small-interfering RNA (siRNA) 発現ベクターを導入した結果、この遺伝子の発現が転写およびタンパク質レベルともに効果的に抑制され、顕著なアポトーシスが引き起こされることによって細胞増殖抑制効果が認められた。また興味深いことに、PBK/TOPK の発現抑制された細胞では細胞質分裂の異常

が認められた。このことより、PBK/TOPK は乳癌細胞の増殖に重要な役割を果たし、特に細胞分裂時に重要な分子であることを証明した。

PBK/TOPK は分裂期キナーゼであることが報告されていることから、乳癌細胞における内在性 PBK/TOPK の各細胞周期における局在を調べたところ、間期には細胞質に局在していたが、その後 G2/M 期に核内に局在変化した。また、発現レベルの変化も同時に調べたところ、G2/M 期に最も高い発現を示し、さらに M 期においてリン酸化がおきて活性化され、特に M 期中期には染色体の周囲に局在することもわかった。

分裂期キナーゼ PBK/TOPK の活性化が、どのような生理的条件下の刺激によって起こるか調べたところ、セリンスレオニンキナーゼの脱リン酸化酵素の阻害剤であるオカダ酸で処理した際にリン酸化されることを証明した。分裂期キナーゼである PBK/TOPK が M 期中期には染色体上に局在することから、PBK/TOPK キナーゼの基質としてヒストンを候補として考えて、*in vitro*, *in vivo* リン酸化および結合を調べたところ、ヒストン H3 と結合し、その 10 番目のセリン残基をリン酸化することを証明し、このことが染色体の安定性に関与していることが示唆された。

以上、本論文は、ゲノムワイドな遺伝子発現情報解析を通じて同定した乳癌標的遺伝子 PBK/TOPK は細胞増殖に重要な役割を担う分子であり、特に分裂期においてヒストン H3 をリン酸化することによって染色体の安定性に関与していることもはじめて明らかにした。また治療を考える上で、PBK/TOPK は、正常臓器での発現が極めて低い癌精巢抗原であることから、PBK/TOPK を標的としたキナーゼ活性阻害剤などの抗がん剤の開発は、従来の抗がん剤で認められるような重篤な副作用が少ないことが期待される。以上より、本研究は、乳癌新規分子標的治療薬の開発および乳癌発症機構の解明に重要な貢献をなすと考えられる。