

審査の結果の要旨

氏名 朴 在 賢

本研究は、女性の悪性腫瘍罹患率 1 位である乳癌に対する新規の分子標的治療薬開発を目的として 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。

1. 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、癌精巣抗原であることが示唆された。
2. 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 の局在を調べた結果、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。さらに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。
3. 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。
4. 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

5. 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新規乳癌標的遺伝子 PBK/TOPK が細胞増殖に重要な役割を担う分子であること、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をはじめ明らかにしたものである。本研究は、PBK/TOPK の発現パターンより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 を標的とした抗癌剤の開発は、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十分に期待される。以上より、本論文は、学位の授与に値するものと考えられる。