

論文内容の要旨

論文題目：

Identification and functional analysis of RQCD1, as a novel molecular target candidate in breast cancer therapy.

乳癌における新規治療標的候補分子 RQCD1 の同定および機能解析

氏名： 網代将彦

研究背景

2002年度の癌部位別の国際的統計では、乳癌の罹患率は全癌種を通して最も高く、死亡率は五番目に位置する。近年、乳癌の罹患率は上昇傾向にある一方で、死亡率は減少傾向にある。その主な原因としては、マンモグラフィによる乳癌の早期発見率の向上と乳癌における有効な分子標的治療薬の開発が挙げられる。乳癌に対する代表的な分子標的治療薬としては、エストロゲン受容体に対するエストロゲンの競合的阻害薬であるタモキシフェン、エストロゲン生合成に関わるアロマターゼの酵素活性を阻害するアロマターゼ阻害薬、HER2/ErbB2に対するヒト化抗体であるトラスツズマブが挙げられるが、これらの薬剤の開発により従来の化学療法主体の治療法は大きく変化した。これらの分子標的治療薬は、標的細胞の特異性が低い従来の化学療法とは異なり癌細胞の増殖に重要な機能を有する特定の分子を標的とすることにより癌細胞を効率的に障害し且つ副作用が少ないという性質を有する。しかしその一方で標的分子であるエストロゲン受容体、HER2/ErbB2の発現が確認されない症例、或いはこれらの分子標的治療薬に対して耐性を示す症例の場合は依然として従来の化学療法が唯一の治療法であることや、タモキシフェンの長期投与に起因する子宮内膜癌リスクの上昇、アロマターゼ阻害薬による骨量低下、トラスツズマブによる心毒性副作用等の有害事象が問題点

となっている。このような現状から、乳癌においてより副作用のリスクが低い新規の分子標的治療薬の開発が強く求められている。本研究では cDNA マイクロアレイによる乳癌臨床検体の遺伝子発現解析から乳癌細胞において特異的に発現が亢進する遺伝子として *Required for cell differentiation 1 homolog (RQCD1)* を同定し、新規治療標的候補分子としての可能性の検討を行った。

1. cDNA マイクロアレイ解析による RQCD1 の同定

臨床検体における乳癌細胞で特異的に発現が亢進している遺伝子を抽出するため乳癌臨床検体 81 症例および 29 種類のヒト正常臓器に対して cDNA マイクロアレイによる遺伝子発現解析を行った。乳癌組織からのサンプル調整に関しては間質細胞、炎症細胞、血管内皮細胞等のコンタミネーションを排除して遺伝子発現情報の特異性を高める目的から、レーザーマイクロビームマイクロダイセクションを施行し乳癌細胞、およびその発生母地である正常乳管上皮細胞を選択的に採取した。cDNA マイクロアレイによる発現解析において 30%以上の症例で 3 倍以上の発現亢進が確認され、正常臓器群における発現量が低い遺伝子を標的候補遺伝子として抽出したところ、そのような基準を満たす候補遺伝子の一つとして *RQCD1* が同定された。

乳癌臨床検体における *RQCD1* の発現亢進は半定量的 RT-PCR によって確認を行った。乳癌細胞株および 17 種類のヒト正常臓器由来 mRNA に対するノザンブロット解析では、いずれの乳癌細胞株においても *RQCD1* の発現が確認された一方で、正常臓器群においては精巣のみで発現が確認された。このことから *RQCD1* は新規の癌精巣抗原であることが明らかになった。次に *RQCD1* 全長の組み換えタンパク質を調整し、それを抗原として抗 *RQCD1* ポリクローナル抗体を作製した。作製した抗 *RQCD1* ポリクローナル抗体を用いてウエスタンブロットを施行しタンパク質レベルの発現量解析を行ったところノザンブロット解析の結果と同様に乳癌細胞特異的な発現が確認された。

このように *RQCD1* は乳癌細胞および精巣に特異的な発現パターンを示すタンパク質であることが明らかになった。正常臓器において発現が認められないことから、*RQCD1* を治療標的とした場合、正常細胞に対する障害に起因する副作用のリスクが低いことが期待出来る。さらに近年開発が進みつつある癌ワクチン療法の抗原タンパク質候補としても有望であると考えられる。

2. 乳癌細胞の細胞増殖における RQCD1 の関与

RQCD1 は乳癌細胞に特異的な発現を示すが、実際に治療標的分子となる為には *RQCD1* の機能が乳癌細胞の細胞増殖に重要であるということが望まれる。そのため、次に *RQCD1* と乳癌

細胞の細胞増殖との関連について検討した。乳癌細胞株において RQCD1 の発現を抑制した場合に細胞増殖がどのような影響を受けるかに関して small hairpin RNA (shRNA) 発現ベクターの導入による発現抑制実験を施行した。RQCD1 の mRNA 配列に特異的な 19 塩基の配列 2 種類に対して U6 promoter 制御による shRNA 発現ベクターを作製した。これらの shRNA 発現ベクターを乳癌細胞株 BT-549 および HCC-1937 に導入したところ、いずれの shRNA を導入した場合も、RQCD1 の発現が効果的に抑制されることを半定量的 RT-PCR およびウエスタンブロットにより確認した。また、RQCD1 の発現を抑制した場合、いずれの乳癌細胞株に対しても顕著な細胞増殖抑制効果を示すことが確認された。これらのことから RQCD1 は乳癌細胞株の細胞増殖において必須な役割を担っていることが明らかとなった。一方、RQCD1 を導入した際の細胞増殖に与える影響に関して検討するため、HEK293 を用いて RQCD1 安定発現株を樹立した。細胞増殖に関して検討したところ、RQCD1 安定発現株群において対照群と比較して有意な細胞増殖促進効果が確認された。これらの解析から RQCD1 は細胞増殖に関して重要な分子であり、その機能を阻害することにより乳癌細胞の増殖を抑制出来る可能性が示唆された。

3. RQCD1 相互作用分子 GIGYF1 および GIGYF2 の同定

RQCD1 の発現抑制および導入時の細胞増殖に関する解析から RQCD1 は乳癌細胞株の細胞増殖に必須の役割を担うことが明らかになったが、一方で細胞増殖に関する RQCD1 の機能は明らかではない。したがって、次に RQCD1 の細胞増殖における機能に関して検討した。乳癌細胞株 BT-549 を用いて GST-pull down assay を施行し RQCD1 の相互作用タンパク質の探索を行った。GST-pull down assay 後のサンプルを SDS-PAGE により分離、銀染色を施行した後 GST 単体の共沈物と比較して GST-RQCD1 の共沈物において特異的に検出されたバンドを切り出し、トリプシン消化後 LC-MS/MS によってそのアミノ酸配列を解析した。その結果、新規の RQCD1 相互作用タンパク質の候補として Grb10-interacting GYF protein 1 (GIGYF1) 及び Grb10-interacting GYF protein 2 (GIGYF2) を同定することに成功した。GIGYF1 および GIGYF2 の RQCD1 に対する相互作用は免疫沈降法によって確認することが出来た。半定量的 RT-PCR による発現解析では GIGYF1 および GIGYF2 は解析を行ったいずれの乳癌細胞株においても発現が確認されたが、正常乳腺では発現は確認されなかった。免疫細胞染色により乳癌細胞株 BT-549 における細胞内局在を検討したところ、GIGYF1、GIGYF2 は共に細胞質領域に発現していた。GIGYF1 および GIGYF2 は Growth factor receptor binding protein 10 (Grb10) と相互作用し Grb10 下流の Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt シグナルの活性化に関与することが報告されている。Grb10 が GIGYF1、GIGYF2 と同様に RQCD1 と相互作用している可能性を免疫沈降により検討したところ、両者の相互作用を検出することが出来た。そのため

RQCD1、GIGYF1、GIGYF2 および Grb10 の複合体が乳癌細胞において下流の PI3K/Akt シグナルの制御に参与する可能性を次に検討した。

4. 乳癌細胞の PI3K/Akt 活性制御に関する RQCD1 の機能解析

Grb10 は C 末端領域の SH2 ドメインを介して種々の受容体チロシンキナーゼのリン酸化チロシン残基と相互作用し、さらに PI3K の p85 regulatory subunit と相互作用することにより PI3K を活性化する機能が知られている。GIGYF1 および GIGYF2 は Grb10 のこのような下流シグナル分子の活性化に促進的に参与していると考えられている。本研究で GIGYF1、GIGYF2 および Grb10 が RQCD1 の相互作用分子として同定されたことから、RQCD1 が PI3K/Akt 経路の活性制御に関わる可能性について検討した。

通常、血清・増殖因子非存在下では Akt の活性は消失するが、RQCD1 高発現乳癌細胞株 BT-549、HBC-5 および HCC-1937 においてはいずれの場合も血清・増殖因子非存在下においても Akt は恒常的に活性化を受けていた。このようなリガンド非依存的な Akt の活性化の機序としては乳癌細胞における受容体チロシンキナーゼの過剰発現、Akt 上流のシグナル分子の活性型変異によって恒常的にシグナルが伝達されていることが原因と推測される。また、PI3K の ATP 結合部位に対する選択的阻害剤 LY294002 の添加により Akt の恒常的活性化が消失したことから、これらの細胞株において Akt の恒常的な活性化は PI3K に依存したものであることが示された。また乳癌細胞株 BT-549、HBC-5 および HCC-1937 に対して RQCD1 に対する small interference RNA (siRNA) を導入し、発現抑制を行ったところ Akt の恒常的活性化が有意に減弱することが確認された。また相互作用分子である GIGYF1、GIGYF2 または Grb10 についても siRNA により発現抑制することにより乳癌細胞株におけるリガンド非依存的な Akt の活性が有意に減弱することが明らかになった。これらのことから RQCD1、GIGYF1、GIGYF2 および Grb10 からなる複合体が PI3K/Akt シグナル経路の恒常的活性化に重要であることが示された。

次に RQCD1 が GIGYF1、GIGYF2 および Grb10 の相互作用にどのような影響を与えているかを検討するため siRNA により RQCD1 を発現抑制した場合の GIGYF1-Grb10 間相互作用、および GIGYF2-Grb10 間相互作用の変化に関して検討を行った。その結果 RQCD1 の発現抑制群においては対照群と比較して有意に GIGYF1、GIGYF2 の Grb10 に対する相互作用が減弱することが確認された。このことから、RQCD1 は GIGYF1、GIGYF2 の Grb10 に対する相互作用の安定化に参与し、下流の PI3K/Akt シグナル経路を活性化させることにより細胞増殖を制御している可能性が示唆された。以上の知見から、RQCD1 を siRNA により発現抑制させる、或いは RQCD1 複合体の機能阻害を標的とすることにより乳癌細胞において特異的に PI3K/Akt 活性を阻害し、腫瘍の増殖を抑制させる分子標的治療薬の開発につながることを期待できる。