

# 論文審査の結果の要旨

氏名 網代 将彦

本論文は、乳癌の網羅的発現情報解析データを用いた新規分子標的候補 *Required for cell differentiation 1 homolog (RQCD1)* の同定からその発癌における機能解析および分子標的としての有用性について述べられている。

本研究は、国際的に罹患率が全癌種を通して最も高い乳癌の新たな分子標的治療薬の開発基盤となる新規分子標的候補の同定と機能的検証を目的に行った。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 *RQCD1* を同定し、新規治療標的候補分子としての可能性を示した。

## 1. *RQCD1* の同定

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。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候補遺伝子として *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製し、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。

## 2. 乳癌増殖における *RQCD1* の関与

次に *RQCD1* と乳癌細胞増殖との関連について 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て、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、*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、HEK293 を用いて *RQCD1* 安定発現株を樹立して、*RQCD1* 安定発現株群が対照群と比較して有意に細胞増殖能が高いことを確認した。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、その機能阻害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 相互作用分子の同定

細胞増殖に関する RQCD1 の機能の解明を目的に乳癌細胞株 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。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) を同定した。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ことを免疫沈降により確認した。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 シグナルの制御に関与する可能性を次に検討した。

### 4. 乳癌細胞における RQCD1 による PI3K/Akt 活性の制御

次に 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。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 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。さらに相互作用分子である GIGYF1、GIGYF2 または Grb10 に関しても 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 siRNA により RQCD1 を発現を抑制した場合の 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したところ、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寄与し、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された。以上、本研究において、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示唆された。

なお、本論文は、共同研究であるが、論文提出者が主体となって分析および検証をおこなったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって、博士（生命科学）の学位を授与できると認める。