

# 論文審査の結果の要旨

氏名 金 正元

現在、乳癌は本邦女性の悪性腫瘍罹患率1位であり、死亡者数も増加の一途を辿っている。乳癌の治療としては、タモキシフェンやアロマターゼ阻害剤が再発のリスクを軽減するための術後補助療法や進行・再発乳癌の標準治療法として利用されており、顕著に生存率を向上させてきた。さらに、乳癌症例の約30%に増幅の認められるHER2を標的とした抗体医薬トラスツズマブなどの分子標的薬剤も開発されており、生存率の向上に加えて患者の生活の質も改善されてきた。しかしながら、タモキシフェンの長期投与による子宮内膜癌のリスクの上昇、アロマターゼ阻害剤による骨量減少やトラスツズマブの心毒性といった重篤な副作用もあり、より副作用の少ない新規分子標的治療薬の開発が切望されている。

本研究は、乳癌の新規治療薬の開発およびその発症機構の解明を目的とし、cDNAマイクロアレイ法による乳癌・ヒト正常臓器における遺伝子発現解析を通じて、乳癌において高頻度に発現亢進を認め、ヒト正常臓器では発現の低い2遺伝子(brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange protein 3 (*BIG3*): chromosome 12 open reading frame 32 (*C12orf32*))を抽出し、それらの機能解析を行ったものである。

(*BIG3*)

1. 乳癌臨床検体由来 mRNA を用いた半定量的 RT-PCR の結果、*BIG3* 遺伝子は 12 例中 9 例にて高レベルの発現を認めたが、ヒト正常臓器由来 mRNA を用いたノザン解析では、発現は認めなかった。さらに *BIG3* 特異的ポリクローナル抗体を用いた免疫組織染色では、乳癌組織のみで染色を認め、*BIG3* が乳癌特異的分子であることがわかった。
2. *BIG3* の乳癌細胞増殖への関与を調べるために、*BIG3* の高レベルの発現を認める乳癌細胞株 (SK-BR-3 および BT-474) に *BIG3* 遺伝子特異的 RNA 干渉 (shRNA) 発現ベクターを導入し、この遺伝子発現を抑制した結果、顕著な細胞増殖抑制効果が認められた。以上より、*BIG3* は乳癌細胞増殖に重要な役割を果たすことが示唆された。
3. *BIG3* の乳癌細胞増殖における機能を探るために、*BIG3* 結合蛋白質の探索を行った。*BIG3* 発現ベクターを乳癌細胞株 BT474 細胞に発現導入し、免疫沈降法および質量分析法を行った結果、ER 選択的調節因子 Prohibitin 2/repressor of estrogen receptor activity (PHB2/REA) を同定した。次に、*BIG3* と PHB2/REA の発現ベクターを用いた免疫沈降法および免疫細胞染色により、乳癌細胞での両蛋白質の結合と細胞質での共局在を確認した。
4. PHB2/REA はこれまでにエストロゲン (E2) 存在下で細胞質から核移行してエストロゲン受容体 (ER $\alpha$ ) と結合し、その転写活性を抑制することが報告されている (PNAS. 1999;96:6947)。この事実を踏まえて、以下の実験を試みた。ER $\alpha$  陽性・*BIG3*

高発現乳癌細胞株 MCF7・ZR75-1 に BIG3 特異的 siRNA を導入して *BIG3* 遺伝子発現を抑制したところ、E2 存在下において PHB2/REA の核内移行が確認された。一方、コントロール siRNA (siEGFP) を導入した細胞では、E2 存在下にもかかわらず細胞質に局在が認められた。また、その際のレポーターアッセイでは、BIG3 発現抑制による ER $\alpha$  転写活性抑制も確認された。以上より、BIG3 は細胞質内にて PHB2/REA と結合することにより E2 依存的 PHB2/REA の核移行を阻害し、PHB2/REA の ER 転写活性化抑制能を阻害することで ER $\alpha$  の恒常的活性化を導くことを証明した。

#### (*C12orf32*)

1. 乳癌臨床検体より抽出した mRNA を用いた半定量的 RT-PCR の結果、*C12orf32* 遺伝子は 11 例中 5 例にて高発現を認めた。ノザン解析では、精巣、前立腺、卵巣、胸腺、小腸において弱い発現を認める一方、他の正常臓器では認められなかった。
2. *C12orf32* の乳癌細胞増殖への関与を調べるために、*C12orf32* の高い発現を認める乳癌細胞株 (HBC4 および T47D) に *C12orf32* 遺伝子特異的 shRNA を導入し、この遺伝子発現を抑制した結果、顕著な細胞増殖抑制効果が認められた。またフローサイトメトリ解析より subG1 細胞の増加が確認されたことから、アポトーシス誘導が示唆された。以上より、*C12orf32* も乳癌細胞増殖に必須であることが示唆された。
3. *C12orf32* 特異的ポリクローナル抗体を作製し、ウェスタン解析を行ったところ、ほとんどの乳癌細胞において内在性 *C12orf32* は、予測分子量 (34kDa) よりも小さい (約 16kDa) ことがわかった。さらに内在性 *C12orf32* の細胞内局在を調べたところ、間期では核内に局在し、分裂前期から後期にかけては細胞全体一様に染色を認め、分裂終期では収縮環に局在することがわかった。また各細胞周期における発現を調べた結果、M 期に最も強い発現を認めた。以上、*C12orf32* は乳癌細胞では細胞周期依存的な発現を示すことがわかった。
4. *C12orf32* の細胞周期における役割を検討するために、*C12orf32* 遺伝子発現抑制による細胞周期への影響を調べた。その結果、G1 期細胞の顕著な増加および S 期細胞の減少が認められた。以上より、*C12orf32* は G1-S 期移行に重要であることが示唆された。

本学位論文は、ゲノムワイドな遺伝子発現情報解析を通じて乳癌特異的遺伝子 *BIG3* および *C12orf32* を同定し、それらの機能解析を行ったものである。乳癌治療を考える上では、両遺伝子ともに乳癌特異的で細胞増殖に必須であることから、これらを標的とした抗癌剤の開発は副作用の極めて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。

なお、本論文は、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。