

# 論文審査の結果の要旨

氏名 NGUYEN MINH HUE

本論文は1章からなり、肺癌新規治療的分子である CDCA5 の同定とその機能解析について述べられている。

全世界において肺癌死亡数は第1位を占め、毎年約130万の患者が肺癌で亡くなっている。近年の治療法としては主に外科的療法、化学療法、放射線療法の併用によって行われているが、5年生存率は15%に留まっている。本研究は、肺癌組織で特異的に発現し癌の発生・進行に関わる新規癌関連遺伝子の同定と機能解析による癌の未知の分子病態理解を進め、さらにその経路を標的とした医薬品開発をめざす基盤的研究である。

## 1.CDCA5の肺癌と正常組織における発現

我々は臨床肺癌組織と隣接の正常肺組織から cDNA を抽出し、27,684 遺伝子/expressed sequence tags を含む cDNA microarray 解析により、遺伝子の発現プロファイリングから当研究室の Original selection criteria に基づいてスクリーニングした遺伝子の中で、肺癌における高発現 CDCA5 (cell division cycle associated 5) 遺伝子を同定した。Microarray data を再確認するために、肺癌臨床検体である腫瘍組織及び隣接正常肺組織を用いて抽出した cDNA で CDCA5 の発現をチェックしたところ、腫瘍では高発現であり、正常組織では発現を認めなかった。同様に、作製した polyclonal 抗体を用いて、肺癌細胞株でも高発現を検出した。また、CDCA5 タンパク質はヒト重要臓器（心臓、腎臓、肝臓、肺臓）での発現を認めず、精巣と肺癌組織では高発現であると確認した。さらに、Multiple northern blot の結果により、精巣のみにおいて、CDCA5 遺伝子の転写産物 mRNA を検出した。

## 2.CDCA5はNSCLC患者において、予後不良因子である。

次に、作製した CDCA5 抗体を用いて、262 非小細胞肺癌患者の肺癌組織を含む Tissue microarray 解析により、CDCA5 タンパク質の発現は肺癌患者の独立予後因子であると明らかにした。

## 3.CDCA5の細胞増殖促進効果

CDCA5 は細胞の増殖に重要であるかどうかを検討するために、CDCA5 の安定発現細胞株を構築し、CDCA5 の発現レベルに従って、顕著な細胞増殖促進効果を認めた。一方、siRNA による CDCA5 発現抑制をさせることで、細胞増殖抑制効果を2種類の肺癌細胞株で認めたため、CDCA5 は癌細胞の増殖や生存に必須の分子である。

## 4.CDCA5はERKによってリン酸化され、S209-CDCA5は癌細胞増殖に重要である。

癌化過程に関与 **CDCA5** を機能解析するために、癌化シグナリングを制御するタンパク質の修飾の可能性に注目した。**CDCA5** の機能阻害薬の開発を念頭に、*In-silico* アプローチ及びデータベースのスクリーニングにより、細胞増殖・癌化過程に関わる MAPK pathway の下流基質のリン酸化 consensus 配列を複数同定し、*In-vitro* と *In-vivo* で **CDCA5** は MARK (ERK)によって直接にリン酸化されると証明した。次に、QIT-TOF-MS 解析法により MARK 依存的なリン酸化サイトである **Ser79** と **Ser209** を同定し、**Ser209** リン酸化サイトの phospho-mimicking による細胞増殖促進効果を認めた。さらに、治療薬の開発に向けて、**Ser209** を含む 20-amino-acid 配列の膜透過性ペプチドを構築し、この中で **p209-C** 阻害ペプチドは **CDCA5** の高発現癌細胞株におけるリン酸化レベルを減少させると共に、細胞増殖抑制効果を認めた。しかし、**CDCA5** の低発現細胞株では見られなかった。

以上、本論文はこれまでにほとんど機能未知であった **CDCA5** が転写促進で肺癌において高発現であり、肺癌の増殖、悪性化に関与する分子であることを明らかにした。さらに、**ERK** によってリン酸化され、その中で **Ser209** のリン酸化状態が肺癌細胞増殖に重要な役割を担っていると示唆した。また、**Ser209** リン酸化レベルを阻害する 20-amino-acid 配列の膜透過性ペプチドで、**ERK-CDCA5** 分子経路の選択的遮断は癌細胞死を効果的に誘導することができた。これらの成果から、本研究は肺癌の発症機構の解明及び副作用のリスクの低い有望な治療標的分子の開発に重要な貢献をなすと考えられる。

なお本論文は、植田幸嗣、鯉沼潤吉、伊藤智雄、土屋永寿、醍醐弥太郎、中村祐輔との共同研究であるが、論文提出者が主体となって分析及び検証を行ったもので、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）の学を授与できると認める。