

論文審査の結果の要旨

氏名 鄭 秀蓮

本研究は、近年急増している前立腺がんに対する新規治療法開発のための標的分子を同定することと前立腺がん発症と遺伝的要因との関連についての解明を目的としている。本論文は2章からなり、第1章は前立腺がんに対する新規治療薬開発のための標的分子の同定と機能解析、第2章は前立腺がん感受性領域 8q24 上の新規 non-coding RNA の機能解析について述べられている。

第1章では、前立腺がんの中でも進行性・転移性前立腺がんである去勢抵抗性前立腺がんにおいて発現が亢進している遺伝子、PKIB と STYK1 に対する解析結果が前・後半に分けて述べられている。これらの遺伝子は論文提出者が在籍している研究室の先行研究で作成された去勢抵抗性前立腺がんに対する遺伝子発現プロファイルをもとに前立腺がん細胞において高頻度に高発現している遺伝子として同定された。

1. PKIB : RT-PCR 法、ノザンブロット解析法を用いて前立腺がん臨床検体および前立腺がん細胞株での高発現と正常臓器での発現低下を確認している。正常臓器では胎盤での発現が認められているが、その他の重要臓器における発現が極めて低いことから、今後 PKIB をターゲットとした治療薬開発において副作用を最小限に抑えられると考えられる。また、PKIB に対する特異的抗体を作製し、組織免疫染色も行っており、その結果、去勢抵抗性前立腺がんにて発現が亢進していることが認められた。特に前立腺がんの悪性度の指標であるグリーソンスコアと PKIB の発現上昇が相関していることから、前立腺がんの悪性化に関与している可能性が示唆された。さらに、PKIB に対する特異的な siRNA を用いて行った遺伝子発現阻害実験では、PKIB の発現抑制によってがん細胞の細胞周期が停止し増殖が阻害されることが明らかとなった。この結果は、PKIB の発現ががん細胞の増殖・生存に必須であることが示すものである。組織免疫染色において PKIB の発現が前立腺がんの悪性化に関与している可能性が示唆されたことから、細胞浸潤能に与える影響についても検討を行っている。その結果、PKIB の発現を阻害した細胞では浸潤能の低下を認めた。一方、PKIB を過剰発現させた細胞においては、これらの増殖・浸潤能の亢進を確認している。さらに PKIB の活性化が癌化にどの様に関わるかについて解析を進めたところ、PKIB の結合タンパク質である PKA-C が重要な役割を担うことが明らかとなった。In vitro kinase assay 等の検討から、PKIB は PKA-C を活性化し、PKA-C の基質である Akt のリン酸化を亢進することでがん細胞の増殖や浸潤を正に制御することが示された。

2. STYK1 : 発現解析により、前立腺がん細胞での高い発現と正常臓器における低発現を確認している。特異的抗体を作製し行った組織免疫染色の結果では、去勢抵抗性前立腺がんにおいて発現が上昇していることを確認した。また、STYK1 の発現を特異的に阻害

する siRNA を前立腺がん細胞に導入したところ、がん細胞の増殖が抑制された。これは、PKIB と同様前立腺がん細胞の増殖・生存に STYK1 の発現が重要であることを示唆する結果である。STYK1 は *in silico* 予測で一回膜貫通ドメインとキナーゼドメインを持つとされていたため、その局在とキナーゼ活性について検証を行っている。細胞免疫染色や細胞分画を分けたサンプルでのウェスタンブロット解析の結果、STYK1 は細胞内のミクロソームに局在することが明らかになった。さらに STYK1 のリコンビナントタンパク質を精製し、癌細胞株の細胞抽出液を基質として *in vitro* kinase assay を行ったところ、STYK1 がキナーゼとして働く可能性が示唆されている。さらに、キナーゼ活性を消失させた変異体を用いて検討した増殖アッセイの結果から、STYK1 のキナーゼ活性が前立腺がん細胞の増殖促進に関与している可能性が考えられた。

第 2 章では、前立腺がんの感受性領域として同定されている 8q24 内において、アンドロゲン受容体の機能制御を介して前立腺がん発症に関与すると考えられる新規の non-coding RNA の同定と機能解析について述べられている。日本人における全ゲノム関連解析の結果、欧米人を対象に行われた結果とは異なり日本人集団においては 8q24 内の region 2 と定義されている領域が最も強く関連していることが明らかとなった。さらにこの領域が前立腺がん発症においてどのような意義があるのかということを解明するため、遺伝子の探索を行い 13kb にわたる新規の non-coding RNA (PRNCR1) を同定している。前立腺がん臨床検体を用いて行った定量的 RT-PCR 法により、PRNCR1 ががん細胞で発現上昇していることが確認された。また、PRNCR1 特異的な siRNA を前立腺がん細胞に導入したところ、がん細胞の増殖が抑制されることから、PRNCR1 の発現が前立腺がん発症に関与している可能性が示唆された。さらに、前立腺がん細胞の増殖と強く関連するアンドロゲン受容体の活性に与える影響についてレポーターアッセイにて検討した。その結果、PRNCR1 の発現を阻害した細胞ではアンドロゲンに対する反応性の低下が認められ、PRNCR1 がアンドロゲン受容体活性制御に関与している可能性が考えられた。

以上、本論文は去勢抵抗性前立腺がんに対する新規治療標的分子である PKIB と STYK1 の機能解析により、これら分子が前立腺がんの増殖、悪性化に関わることを明らかとした。また前立腺がん発症リスクに関連する遺伝子座の解析によって新規の non-coding RNA を同定、前立腺がん発症に機能的に関与する可能性があることを解明した。これらの結果は、新規治療薬開発のターゲットとしての臨床応用が期待されること、また前立腺がん発症リスク予測による早期発見や発癌メカニズムの解明等に重要な貢献をなすと考えられる。

なお本論文は、中川英刀、久保充明、柏谷琴映、醍醐弥太郎、松田浩一、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。