

学位論文及び審査結果の要旨

氏名 栗岡大輔

学位の種類 博士(工学)

学位記番号 工府博甲第439号

学位授与年月日 平成26年12月31日

学位授与の根拠 学位規則(昭和28年4月1日文部省令第9号)第4条第1項及び横浜国立大学学位規則第5条第1項

学府・専攻名 工学府 機能発現工学 専攻

学位論文題目 microRNA標的遺伝子スクリーニングによるp53変異がん細胞の増殖抑制因子NEK9の同定
(MicroRNA target screen identifies NIMA-related kinase 9 as a factor essential for cell proliferation in p53 mutant cancers)

論文審査委員 主査 横浜国立大学 教授 渡邊昌俊
横浜国立大学 教授 上ノ山周
横浜国立大学 教授 栗原靖之
横浜国立大学 准教授 鈴木敦
横浜市立大学 教授 青木一郎

論文及び審査結果の要旨

がんの約半数以上で、がん抑制遺伝子 p53 シグナル経路が正常に機能していない。従って、不活性化された p53 を有するがん細胞のみを選択的に排除する事が、副作用の少ない理想的ながん治療戦略である。本研究では、microRNA 標的スクリーニングを遂行し、不活性化された p53 がん細胞の細胞増殖に必須となる遺伝子として NIMA-related kinase 9 (NEK9) を同定した。実際に、複数の *in vitro* 及び *in vivo* の実験系において、不活性化された p53 がん細胞の細胞増殖は、NEK9 依存的であることが認められ、NEK9 Knock Down (KD)すると、細胞周期を G1-S 期で停止及び細胞老化と酷似した形態変化が誘導されることが示された。また、肺がんの臨床検体を用いて、NEK9 と p53 の免疫組織化学的染色を行った結果、p53 に変異を有しかつ NEK9 ポジティブを示す臨床検体サンプルは、それ以外のサンプルと比較して予後不良であることが統計的に示された。以上の結果から、NEK9 は p53 不活性型がん細胞においてのみ、細胞増殖に必須となるネットワークを構築している可能性が考えられる。本論文は 6 章から構成されており、

各章の概要は以下の通りである。

第一章 序論

ゲノムシーケンス解析によって、p53 遺伝子変異はヒトのがんにおいて最も高頻度に生じていることが報告されている。従って、変異型 p53 は幅広い種類のがんに対する直接的な治療標的になりうる魅力的な分子であると考えられる。近年、遺伝子発現を調節する小分子として microRNAs (miRNAs) の機能解析が数多く行われてきた。miRNAs の中には、p53 の直接標的となる miRNAs (miR-34a など) や、細胞外に分泌する miRNAs (exosomal miRNAs) で、がんの浸潤転移に関与する miRNAs (miR-1246 など) あるいは、将来がんの診断マーカーとしての応用が期待できる miRNAs (let-7a, miR-1229, miR-1246, miR-150, miR-21, miR-223, miR-23a) が見出されており、miRNAs は、発がん過程の広範囲で影響を及ぼすことが示唆されている。そこで、miRNAs をスクリーニングのツールとした解析を行い、p53 機能損失細胞の細胞増殖に必須となる遺伝子を同定すれば、従来の方法では見つからなかった、がんの新たな治療標的を見出す実験系として示すことができると考え、以下に示す実験を行った。

第二章 miRNA 標的スクリーニングによって p53 変異細胞の増殖必須遺伝子候補として NEK9 を同定

本研究は、がん抑制的に働く miR-22 をスクリーニングのツールとして応用することで、p53 不活性型がん細胞の細胞増殖に必要な不可欠な遺伝子の単離を試みた。まず、3 種の大腸がん細胞株 HCT116 (p53 Wild Type: p53 WT)、SW480 (p53 Mutation: p53 MUT)、p53 Knock Out (KO)した HCT116、それぞれから total RNA を回収し、マイクロアレイ解析を行った。その結果 p53 WT 細胞と比較して、p53 MUT 及び KO 細胞で miR-22 によって発現量が低下する遺伝子 566 個を見出した。miR-22 を導入した p53 MUT 及び KO 細胞は細胞死ではない細胞増殖低下を示すことから、細胞周期に関与していると考え、566 個の遺伝子のうち細胞周期関連遺伝子を Gene Ontology によって調べた結果、14 個の遺伝子が見つかった。これら 14 個の遺伝子のうち、miR-22 の直接標的となりうる遺伝子を data base で検索した結果 5 個に絞り込むことができた。そして、p53 WT 細胞の細胞増殖に影響を及ぼさず、p53 MUT 細胞において細胞増殖抑制を促す遺伝子を、siRNA を利用して調べた結果、NEK9 を見出した。

第三章 NEK9 は p53 機能損失がん細胞の細胞増殖に必須

がん抑制遺伝子 p53 が MUT あるいは KO されたがん細胞の細胞増殖が、NEK9 に依存していることを *in vitro* 及び *in vivo* 実験系で確認している。具体的には、8 種類のがん細胞 (p53 WT: 4 種、p53 MUT: 4 種) に対して NEK9 KD を行うと、p53 MUT 細胞においてのみ細胞増殖が低下した。さらに、p53 WT がん細胞の p53 を KD した細胞、及び p53 null のがん細胞に p53 MUT を恒常的に発現させた細胞において、NEK9 KD を行った場合も、細胞増殖の低下を示した (*in vitro*)。

また、ヌードマウスの背中に、p53 WT あるいは MUT のがん細胞を移植し、腫瘍

(Xenograft) を作製後、デリバリー試薬を用いて siNEK9 を腫瘍に直接投与する実験を行った。その結果、p53 MUT 細胞由来の腫瘍においてのみ、腫瘍の体積が減少する事が示された (*in vivo*)。

第四章 NEK9 KD による細胞増殖抑制に関わる分子機構

p53 MUT がん細胞に対して、NEK9 KD した時、形態及び分子機構がどのように変化するかを調べている。まず、NEK9 KD された p53 MUT がん細胞の形態変化を顕微鏡で観察した結果、NEK9 KD 後 7 日目に細胞が肥大化する (細胞老化と酷似した形態変化) ことが確認された。この時、細胞周期の変化をフローサイトメトリーで調べた結果、NEK9 KD された p53 MUT がん細胞の細胞周期は G1-S 期で停止することが確認された。また、NEK9 KD による遺伝子発現変化をマイクロアレイ解析で調べたところ、幅広い種類の遺伝子、及びシグナル経路が変動することを確認した。特に細胞周期関連遺伝子である p21 の発現増加、及び Mitogen-activated protein kinase 14 (MAPK14) の発現減少が siNEK9 の濃度依存的に生じることを、Western Blot 法で確認している。

第五章 p53 と NEK9 が共に染色されるヒト肺がん臨床検体の予後解析

本研究で見出した、p53 不活性型がん細胞の細胞増殖は、NEK9 の発現と関連している可能性を、国立がん研究センター中央病院から得た複数種の肺がん組織検体に対し、Tissue microarray を行うことで確認している。その結果、NEK9 及び p53 のダブルポジティブとなる検体が、肺腺がん (adenocarcinoma: ADC) の半数、肺扁平上皮がん (squamous cell carcinoma: SQC) の大部分 (28/30)、そして今回調べた全ての肺大細胞神経内分泌がん (large cell neuroendocrine carcinoma: LCNEC) と小細胞肺がん (small cell lung cancer: SCLC) で確認する事ができた。さらに、ADC においては、Kaplan-Meier 解析を行った結果、NEK9/p53 ダブルポジティブのがん罹患者が、その他の罹患者よりも予後不良という結果が得られた。

第六章 結論

p53 変異タンパク質は、古くから非常に魅力的ながんの治療標的になりうると考えられている。本研究結果から、NEK9 タンパク質の阻害は p53 不活性型がん細胞に対する治療標的となる正攻法のアプローチになる可能性が示された。従って、本研究は、将来的ながん治療につながる非常に重要な実験と位置づけられる。

2014 年 10 月 14 日午後 6 時から化学工学・安全工学棟 218 号室において学位論文発表会および、引き続き審査委員全員出席のもとに審査委員会を約 1 時間 30 分にわたり開催した。

その結果、審査委全員一致して、博士学位論文として十分な内容を有しており、合格と判定するとの結論に達した。学位論文の審査における質疑に応答した事から、博士論文に関連する分野の科目について博士 (工学) の学位を得るのに相応しい学力を有するものと判定した。外国語に関しては、筆頭かつ英語で書かれた公表の査読付き論文 2 報があることや国際会議などの発表があることから十分な英語能力を有するものと認めた。また、修

了に必要な単位は取得済みであることを確認した。以上の試験結果から、学位論文申請者は博士（工学）論文として十分な内容の論文を提出しており、かつ十分な学力を有することを審査委員全員一致して認定し、最終試験は合格であると判定した。