

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)

横浜国立大学大学院 工学府 機能発現工学専攻

物質とエネルギーの創生工学コース

医工学研究室（渡邊研究室） 10SA602 栗岡 大輔

目次

略語

第一章 序論

1.1 がん抑制遺伝子 <i>p53</i>	1
1.2 遺伝子発現を調節する小分子 microRNAs (miRNAs)	3
1.3 細胞外に放出される miRNAs (exosomal miRNAs)	4
1.4 本研究の目的	5

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

2.1 <i>miR-22</i> 標的スクリーニング	6
2.2 NEK9 mRNA が <i>miR-22</i> の直接標的遺伝子であることの確認	12

第三章 NEK9 は p53 機能損失がん細胞の細胞増殖に必須

3.1 p53 MUT がん細胞においてのみ NEK9 KD すると増殖が抑制される	15
3.2 p53 WT を発現抑制すると、NEK9 KD により細胞増殖が抑制される	16
3.3 p53 null の細胞に p53 MUT を発現させると、NEK9 KD により細胞増殖	

が抑制される	18
3.4 p53 変異がん細胞において siNEK9 と pHalo-NEK9 を共発現させると細胞増殖率の低下を回復する	20
3.5 p53 変異がん細胞において NEK9 KD によりコロニー形成能が低下する	22
3.6 p53 変異がん細胞において NEK9 KD すると増殖が抑制される (<i>in vivo</i>)	24
第四章 NEK9 KD による細胞増殖抑制に関わる分子機構	
4.1 p53 機能欠損がん細胞において NEK9 KD は G1-arrest を誘導する	26
4.2 NEK9 KD により p53 変異がん細胞は細胞老化様の表現型を獲得する	29
4.3 p53 変異がん細胞の NEK9 KD によって変化するシグナル経路について	31
第五章 p53 と NEK9 が共染色されるヒト肺がん臨床検体の予後解析	37
第六章 結論	44
実験方法	49
参考文献	64
謝辞	

略語

miRNAs :	microRNAs
mRNA :	messenger RNA
MUT :	Mutant type、変異型
WT :	Wild type、野生型
KD :	Knock down
APC :	Adenomatous polyposis coli、がん抑制遺伝子の一つ
RISC :	RNA induced silencing complex
KO :	Knock out
FC :	Fold change
SHC1 :	Src homology 2 domain containing transforming protein 1
NEK :	NIMA-related kinase
NIMA :	Never in mitosis <i>A</i>
ORF :	Open reading frame
UTR :	Un-translated region
shRNA :	Short hairpin RNA
IARC ;	International Agency for Research on Cancer
NC :	Negative control
DMEM :	Dulbecco's Modified Eagle Medium
CDKN1A :	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A
MAPK :	Mitogen-activated protein kinase
ADC :	Adenocarcinoma
SQC :	Squamous cell carcinoma
LCNEC :	Large cell neuroendocrine carcinoma
SCLC :	Small cell lung cancer
OS :	Overall survival、全生存期間
TCGA :	The Cancer Genome Atlas
RPKM :	Reads per kilobase of exon model per million mapped reads
HDAC :	Histone deacetylase
PLK :	Polo-like kinase
CDK :	Cyclin-dependent kinase
FACT :	Facilitates chromosome transcription
ATCC :	the American Type Culture Collection
FBS :	Fetal bovine serum
RPMI :	Roswell Park Memorial Institute
cDNA :	Complementary DNA

第一章 序論

1.1 がん抑制遺伝子 *p53*

がん発生原因の一つとして、がん細胞は、正常な細胞が遺伝子変異を蓄積することで生じると考えられている(1)。例えば、大腸がんの場合、1991年に提唱された多段階発がんモデルを提唱しており、その概略図を図 1.1 に示す。この図から、比較的初期の段階で正常な細胞が、がん抑制遺伝子 *Adenomatous polyposis coli (APC)* の変異を獲得し、がん細胞になる比較的后期に、がん抑制遺伝子 *p53* の変異を獲得する事が理解できる(2)。

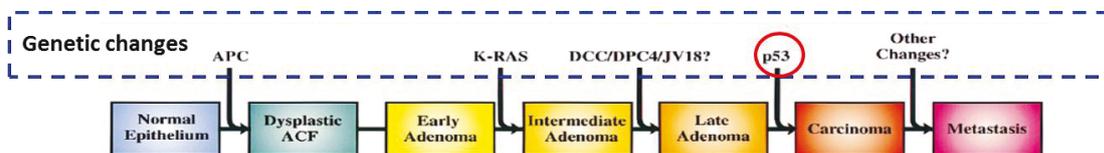


図 1.1 大腸多段階発がんモデルの概略図

p53 遺伝子が関与するシグナル経路は、正常な細胞が、ストレスなどの様々な刺激によってがん形質を獲得する上で、最も重要な細胞内ネットワークであると考えられている(1)。細胞外からがん促進的なストレスが生じると、*p53* が活性化し、細胞周期の停止を誘導する。その後、*p53* の下流遺伝子が活性化することで、損傷した DNA を修復、あるいは細胞死を誘導し、ダメージを受けた細胞の除去を行う(3)。

これまでにゲノムシーケンス解析によって、p53 タンパク質をコードする遺伝子はヒトのがんにおいて最も高頻度に変異が生じていることが報告されている(4,5)。従って、p53 遺伝子が関与するシグナル経路の異常がほとんど全てのがんにおいて、異常な細胞増殖及び腫瘍形成を誘発していると考えられる(図1.2)(1,3)。実際に、p53 の機能損失に伴い、がん細胞の増殖が促進されることが示唆されている。近年では、p53 の遺伝子変異は、単純に機能損失型 (loss of wild-type tumor-suppressor functions) 変異だけでなく、がん細胞の機能獲得型 (gain-of-function) 変異、つまり細胞周期の促進や運動能の増加を積極的に促す変異タイプの両方が存在する事が知られている(1,3)。この概念を応用することで、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(6,7)。

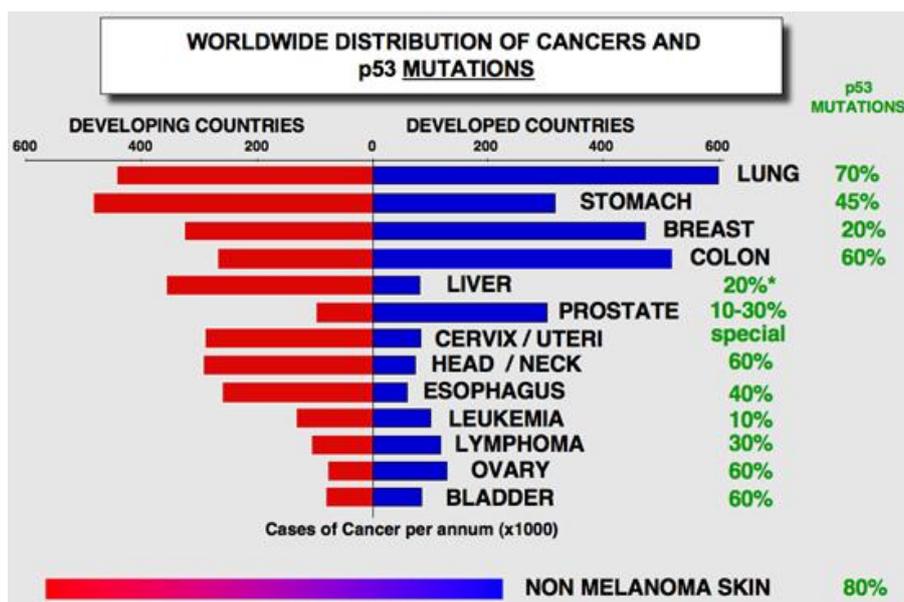


図 1.2 がんの臓器別 p53 変異頻度 (IARC TP53 Database)

1.2 遺伝子発現を調節する小分子 microRNAs (miRNAs)

RNA は、タンパク質をコードする RNA と、タンパク質をコードしない RNA (non-coding RNAs) に大別する事ができる。Non-coding RNAs の中で、非常に小さい分子の一つとして、約 22 塩基長の microRNAs (miRNAs) が挙げられる。miRNAs の機能は、RNA-induced silencing complex (RISC) と呼ばれるタンパク質群と相互作用して、遺伝子発現を調節する事が知られている(8-10)。また、miRNAs は細胞分化、細胞死、細胞増殖など様々な細胞に影響を及ぼす過程に関与している(11-13)。さらに、miRNAs の発現異常が、がんを含む様々なヒト疾患の病態誘発に関与していることが報告されている(14,15)。

miRNAs の主たる機能は、RISC と相互作用して mRNA の分解あるいは翻訳阻害を促進することにより、遺伝子発現を負に制御することである(8)。その際、miRNAs が標的とする mRNA は、miRNAs の 22 塩基中に存在する seed sequence (約 8 base) と相補的な配列を有するため、一つの miRNA に対し、複数の標的 mRNA が存在する(16)。そして、その標的となる mRNA は細胞の表現型に依存していると考えられている。例として、miRNAs の一つである *miR-22* の様々ながんにおけるこれまでに報告されてきた標的遺伝子をまとめると、組織によって異なり、時には正反対の役割を示していることが、図 1.3 から判る。

Target genes of *miR-22*

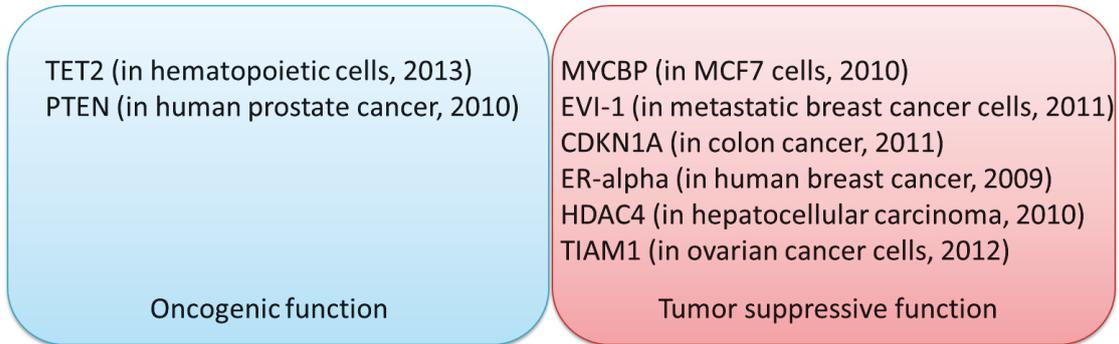


図 1.3 がん組織における *miR-22* 標的遺伝子

1.3 細胞外に放出される miRNAs (exosomal miRNAs)

近年、細胞内で合成され、機能する miRNAs (endogenous miRNAs) とは別に、細胞外に分泌される miRNAs (exosomal miRNAs) が存在する事が明らかとなった。この exosomal miRNAs が生成される機構や分泌された exosomal miRNAs の役割など、その詳細に関してはほとんど明らかとなっていないが、がん細胞が積極的に分泌する exosomal miRNAs が存在する事が報告されている(17)。当研究室では、健常者と大腸がん患者の血清中から exosomal miRNAs を単離しマイクロアレイ解析及び Real-time PCR を行った結果、大腸がん患者由来の組織で積極的に分泌する 7 つの exosomal miRNAs (*let-7a*, *miR-1229*, *miR-1246*, *miR-150*, *miR-21*, *miR-223*, *miR-23a*) を見出した(18)。従って、これら 7 つの exosomal miRNAs は、今後大腸がんの診断マーカーとして応用できる可能性がある。

1.4 本研究の目的

私は、これまでにがん抑制的に働く miRNAs に着目し、それらを同定・機能解析を行ってきた。がん抑制的に働く miRNAs の一つである *miR-22* は、*p53* の遺伝子変異に依存して異なる表現型を示すことを見出した(19)。つまり、*miR-22* は *p53* 活性の有無によらず増殖抑制的に働くが、得られる表現型が *p53* の遺伝子変異に依存的であることから、この現象を応用することで *p53* の機能欠損したがん細胞の細胞増殖に必須となる遺伝子を同定する可能性を考え、その遺伝子を単離、解析することを本研究の目的とした。

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

子の候補として NEK9 を同定

2.1 *miR-22* 標的スクリーニング

これまで私は、がん抑制的に働く miRNA の一つとして *miR-22* を同定し、機能解析を行ってきた。その結果、非常に興味深いことに、*miR-22* は *p53* の遺伝子変異に依存して異なる表現型を示すことを発見した。具体的には、大腸がん細胞株 HCT116 (*p53* wild type; WT) に *miR-22* を遺伝子導入すると、サイクリン依存性キナーゼ阻害因子の一つである p21 の発現上昇に伴う細胞死 apoptosis が誘導されるが、大腸がん細胞株 SW480 (*p53* mutant; MUT) 及び HCT116 *p53*^{-/-} (*p53* knock out; KO) に *miR-22* を遺伝子導入すると、apoptosis は誘導されず、細胞増殖が抑制されることを示した。すなわち、*miR-22* は *p53* のステータスによらず、増殖抑制的に働くが、得られる表現型が *p53* のステータスに依存的である。この現象を応用することで *p53* の機能が欠損したがん細胞の細胞増殖に必須となる遺伝子を同定することができるのではないかと考え、図 2.1 に示す *miR-22* 標的スクリーニングを行った。

まず、HCT116 (*p53* WT)、SW480 (*p53* MUT)、HCT116 *p53*^{-/-} (*p53* KO) 3 種類の大腸がん細胞を用いて、*miR-22* 及び ネガティブコントロール (*miR-NC*) を導入した際の、遺伝子発現プロファイルをマイクロアレイ解析に

より作成した(N=2)。そして、得られた発現プロファイルから目的に見合う遺伝子を見出すため4段階のスクリーニングを行った。

miR-22 を導入した時 SW480 (p53 MUT) 及び HCT116 p53^{-/-} (p53 KO) 細胞において、miR-NC 導入時に対する *miR-22* 導入時のシグナル強度 (Fold change (FC)) が有意に低下している遺伝子を探索した結果、1914 個の遺伝子を見出した(1st selection)。次に、見出した 1914 個の遺伝子に対して、SW480 (p53 MUT) あるいは HCT116 p53^{-/-} (p53 KO) 細胞の FC と HCT116 (p53 WT) 細胞の FC を比較し、HCT116 (p53 WT) 細胞の FC より有意に低下している遺伝子を探索した結果、566 個の遺伝子を見つけた (2nd selection)。*miR-22* を SW480 (p53 MUT) あるいは HCT116 p53^{-/-} (p53 KO) 細胞に導入すると細胞死ではない増殖抑制を示すことから、細胞周期に関連していることが考えられる。そこで Gene Ontology 解析により 566 個の遺伝子のうち細胞周期に関与する遺伝子群を抽出した結果、14 個の遺伝子が見出された (3rd selection、図 2.2、表 1)。miRNA の直接標的となる遺伝子は配列特異的に結合するため、得られた 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 miRWalk と呼ばれるデータベースで探索した。その結果、最終的に 5 個の遺伝子に絞りこむことができた (4th selection、図 2.2 赤字)。

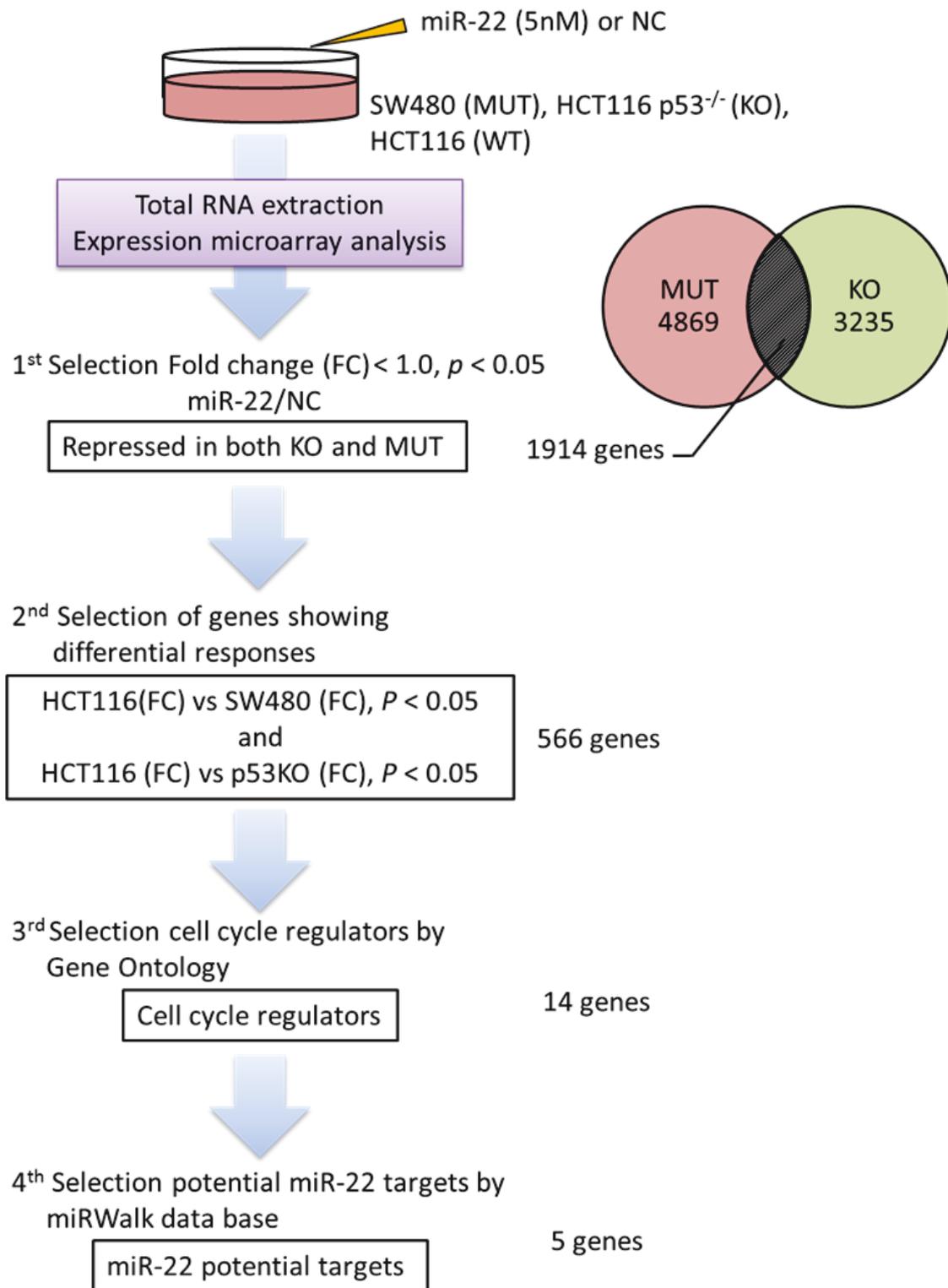


図 2.1 *miR-22* 標的スクリーニングの概略図 ^{A)}

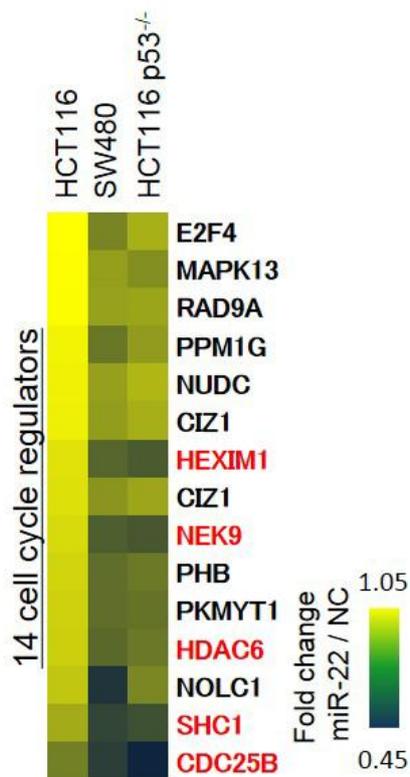


図 2.2 5つの *miR-22* 標的候補遺伝子 (赤字)^{A)}

表 1 *p53* 機能欠損がん細胞においてのみ抑制される細胞周期関連遺伝子^{A)}

Gene Symbol	Accession Number	HCT116		SW480		HCT116 <i>p53</i> ^{-/-}	
		fold change (<i>miR-22</i> / NC)	<i>p</i>	fold change (<i>miR-22</i> / NC)	<i>p</i>	fold change (<i>miR-22</i> / NC)	<i>p</i>
<i>CDC25B</i>	NM_021873	0.70	0.322	0.52	0.001	0.45	0.002
<i>CIZ1</i>	NM_012127	1.01	0.963	0.75	0.016	0.80	0.011
<i>E2F4</i>	NM_001950	1.05	0.895	0.71	0.004	0.83	0.031
<i>HDAC6</i>	NM_006044	0.92	0.667	0.63	0.003	0.68	0.014
<i>HEXIM1</i>	NM_006460	0.97	0.937	0.63	0.032	0.60	0.028
<i>MAPK13</i>	NM_002754	1.04	0.940	0.78	0.019	0.74	0.040
<i>NEK9</i>	NM_033116	0.95	0.906	0.60	0.001	0.59	0.017
<i>NOLC1</i>	NM_004741	0.87	0.765	0.44	0.001	0.67	0.006
<i>NUDC</i>	NM_006600	1.01	0.976	0.79	0.016	0.85	0.006
<i>PHB</i>	NM_002634	0.95	0.826	0.65	0.001	0.68	0.006
<i>PKMYT1</i>	NM_004203	0.92	0.817	0.65	0.006	0.66	0.037
<i>PPM1G</i>	NM_177983	1.02	0.898	0.67	0.008	0.77	0.043
<i>RAD9A</i>	NM_004584	1.04	0.906	0.79	0.036	0.80	0.003
<i>SHC1</i>	NM_003029	0.83	0.205	0.54	0.009	0.57	0.005

次に、がん細胞株に *miR-22* を導入した際、先のスクリーニングで得た 5 個の候補遺伝子の発現量の変化を Real time PCR 及び Western Blot 法で確認した。mRNA レベルでは、5 つの遺伝子全てにおいて、HCT116 (p53 WT) の細胞株より SW480 (p53 MUT) あるいは HCT116 p53^{-/-} (p53 KO) の細胞株において発現が低下する事が認められた (図 2.3)。この時、内在性のコントロールとして *GAPDH* を測定した。タンパク質レベルにおいては、SHC1 と NEK9 においてのみ、HCT116 (p53 WT) 細胞では発現量の変化が認められず、SW480 (p53 MUT) と HCT116 p53^{-/-} (p53 KO) の細胞株において大幅に減少する結果が得られた (図 2.4)。

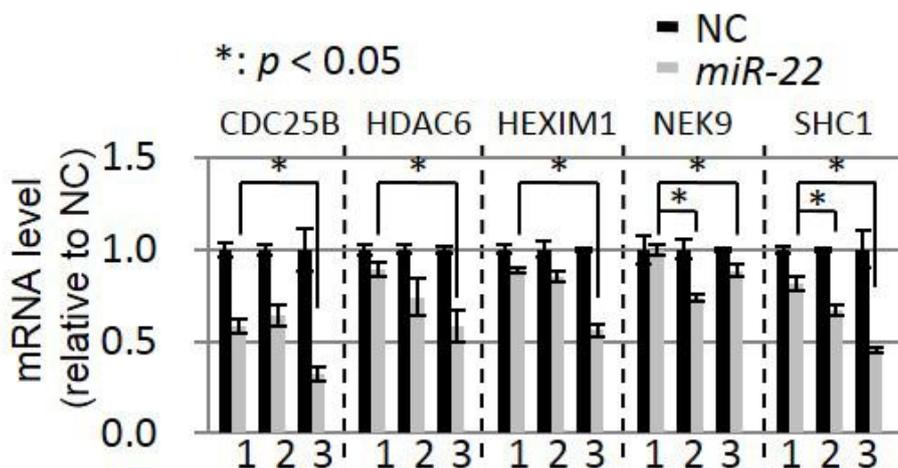


図 2.3 *miR-22* 導入時の遺伝子発現量の変化 (mRNA) ^{A)}

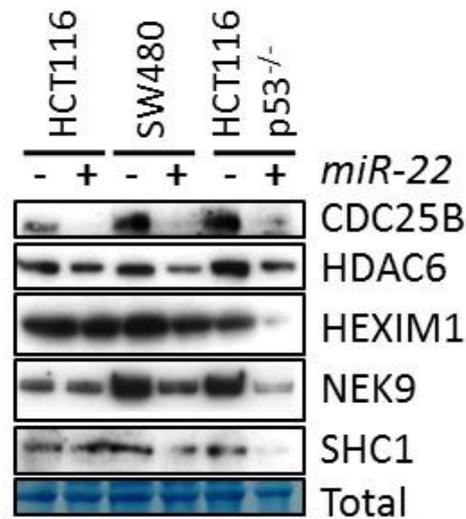


図 2.4 *miR-22* 導入時の遺伝子発現量の変化 (Protein) ^{A)}

次に、5 個の候補遺伝子のうち、p53 の機能が欠損したがん細胞の細胞増殖に必要不可欠となる因子が存在することを確認するために、5 つの遺伝子に対し、発現を特異的に阻害する siRNA を 2 種類合成し、各遺伝子を抑制 (Knock Down (KD)) した際の細胞数の変化を測定した。HCT116 (p53 WT) と SW480 (p53 MUT) に各 siRNA を導入した結果、NEK9 KD においてのみ特徴的な変化を示した。つまり、HCT116 (p53 WT) は NEK9 KD による細胞増殖率は変化しなかったが、SW480 (p53 MUT) において NEK9 KD を行うと、細胞増殖率が有意に低下する事が示された (図 2.5)。以上の結果から、NEK9 は p53 機能欠損したがん細胞においてのみ、*miR-22* によりその発現が抑制されることがわかった。さらに、本研究の目的である p53 の機能欠損がん細胞の細胞増殖に必須となる遺伝子として、NEK9 が可能性として考えられた。

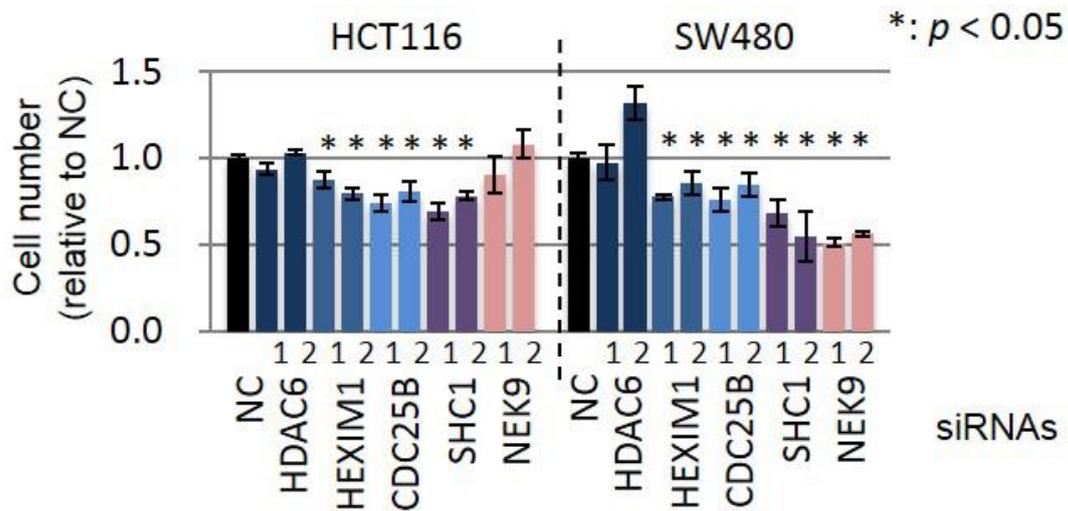


図 2.5 各遺伝子の siRNA 導入時における細胞増殖率の変化^{A)}

2.2 NEK9 mRNA が *miR-22* の直接標的となることの確認

miR-22 の標的スクリーニングによって、NEK9 を p53 の機能欠損がん細胞の細胞増殖に必須となる候補遺伝子として見出した。次に、実際に NEK9 が *miR-22* の直接標的遺伝子となることを確認するために、レポーター遺伝子を用いた実験を行った。

まず、*NEK9* mRNA の模式図を図 2.6 に示す。*NEK9* mRNA は約 3 kb のコーディング領域 (図 2.6 ORF : Open Reading Frame) と、約 2 kb の 3' UTR (un-translational region) を有し、3' UTR 内に 4 箇所の *miR-22* binding site が存在する (Site 1-4)。

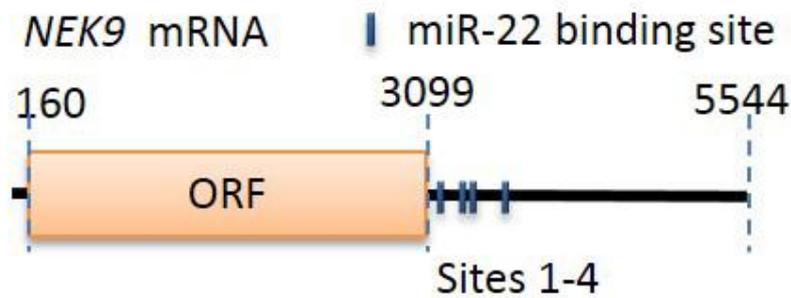


図 2.6 *NEK9* mRNA の模式図 ^{A)}

そこで、まず *NEK9* mRNA 3'UTR を組み込んだ pmirGLO-*NEK9* 3'UTR を遺伝子組み換え技術により作製した。さらに、*NEK9* 3'UTR 内にある 4 つの *miR-22* binding site のうち、どこで *miR-22* と直接結合しているかを確認するために、pmirGLO-*NEK9* 3'UTR を鋳型とし、各種プライマーを用いて、7 種類の遺伝子変異を導入したレポータープラスミドを作製した。

作製したレポータープラスミドを用いて、SW480 (p53 MUT) 及び HCT116 p53^{-/-} (p53 KO) 細胞に *miR-22* を導入後、Luciferase 活性を測定した。その結果、*miR-22* を導入した細胞に pmirGLO-*NEK9* 3'UTR を加えると、両方の細胞株において Luciferase 活性の低下が認められた (図 2.7)。この結果から、SW480 (p53 MUT) 及び HCT116 p53^{-/-} (p53 KO) 両細胞内で、*NEK9* は *miR-22* によって直接制御されていることが考えられる。さらに、*miR-22* binding site の 1 箇所に変異を加えても、Luciferase 活性に変化は認められなかったが、*miR-22* binding site の 1 と 4、2 箇所に変異を入れた場合、Luciferase

活性が上昇する事が確認できた (図 2.7)。従って *miR-22* は *NEK9* mRNA の 3'UTR に存在する *miR-22* binding site 1 and 4 に結合し、*NEK9* の遺伝子発現を直接制御していると考えられる。

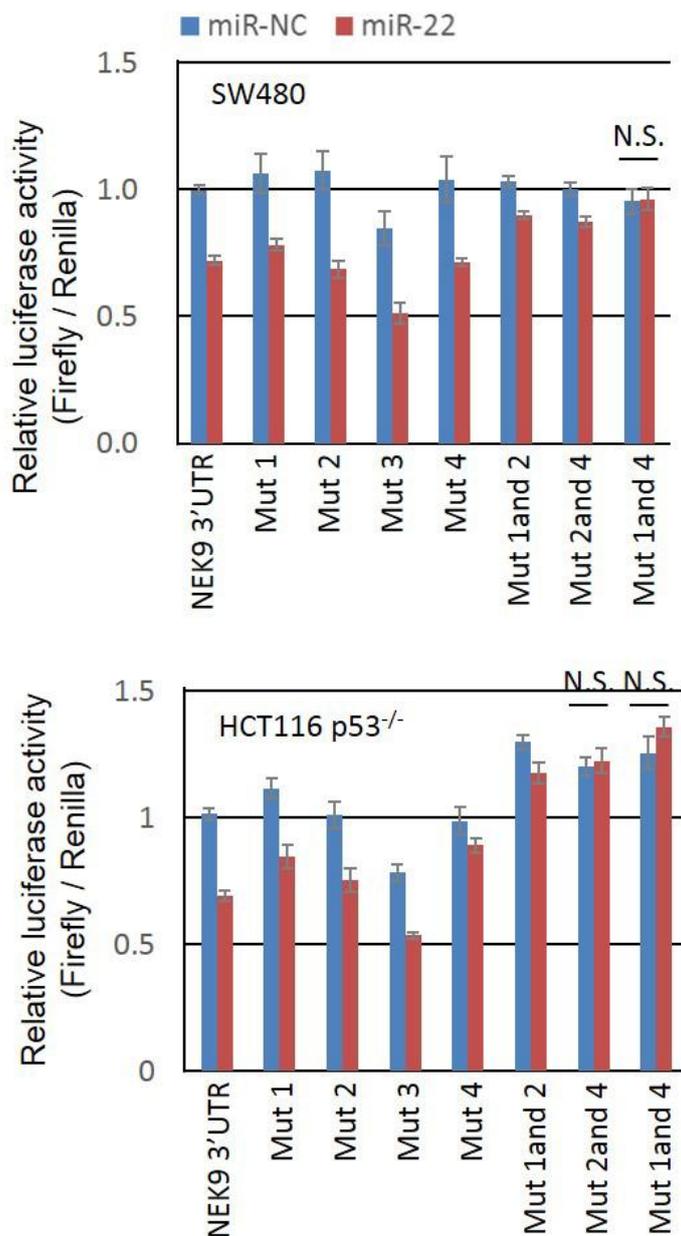


図 2.7 *miR-22* による *NEK9* 3'UTR の binding site を介した直接制御^{A)}

第三章 NEK9 は p53 機能損失がん細胞の細胞増殖に必須

miR-22 標的スクリーニングによって見出した NEK9 が、実際に p53 の機能欠損がん細胞の細胞増殖に必須となりうることを以下に示す実験で確認した。

3.1 p53 MUT がん細胞においてのみ NEK9 KD すると増殖が抑制される

まず、p53 WT がん細胞株及び、p53 MUT がん細胞株を各 3 種類用意し、NEK9 の発現を抑制した時の細胞数の変化を確認した。その結果、予想通り p53 MUT のがん細胞のみ細胞増殖率の低下を示し、p53 WT のがん細胞では有意な変化が認められなかった (図 3.1)。NEK9 の発現抑制については、Western Blot 法によって確認した (図 3.2)。

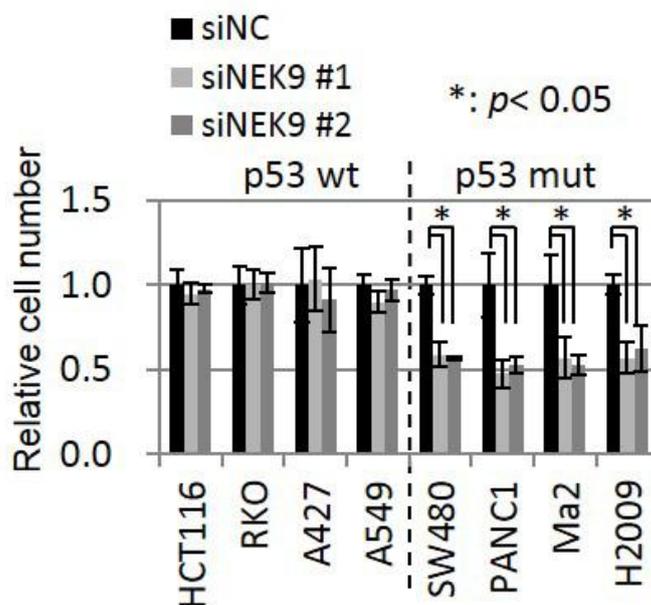


図 3.1 p53 MUT がん細胞の細胞増殖は NEK9 に依存^{A)}

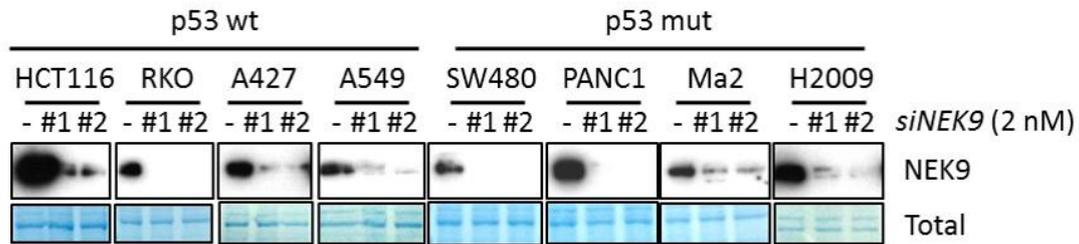


図 3.2 *siNEK9* による遺伝子発現抑制の確認 ^{A)}

3.2 p53 WT を発現抑制すると、NEK9 KD により細胞増殖が抑制される

次に、p53 WT がん細胞における、p53 発現 抑制時の NEK9 KD の影響を確認するために、p53 を恒常的に抑制する HCT116 shp53 細胞株を樹立した。同樹立細胞株を用いて、NEK9 KD 時における細胞増殖アッセイを行った。*siNEK9* 導入後 3 日目に細胞数を測定した結果、p53 を抑制した細胞株、HCT116 shp53 においてのみ細胞増殖の有意な低下を示した(図 3.3)。この時、p53 及び NEK9 の発現は Western Blot 法にて確認した(図 3.4)。この実験結果から、NEK9 KD による細胞増殖の低下は、p53 の機能欠損と密接に関係していることが示唆された。

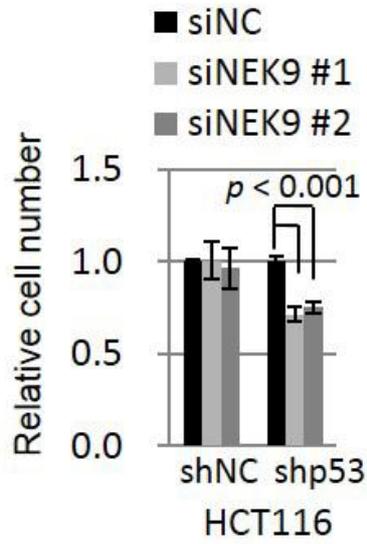


図 3.3 HCT116 shp53 細胞のみ NEK9 KD によって細胞増殖が低下^{A)}

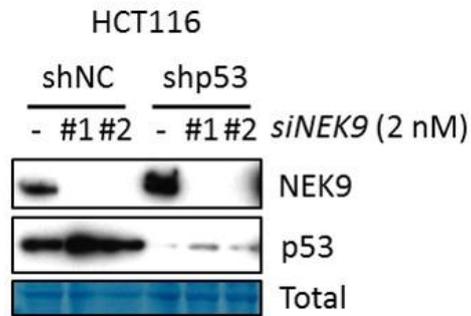


図 3.4 p53 の発現と siNEK9 による遺伝子発現抑制の確認^{A)}

3.3 p53 null の細胞に p53 MUT を発現させると、NEK9 KD により細胞増殖が抑制される

ヒト非小細胞肺癌由来の p53 が発現していない H1299 (p53 null) 細胞を用いて、p53 WT あるいは p53 MUT を恒常的に発現する細胞を樹立し、NEK9 KD による細胞増殖への影響を確かめた。まず、Add gene から購入したレンチウイルスベクター5種 (pLenti6/V5-p53_wt、_R175H、_R249S、_R273H、_R280K) を使用して、恒常的に p53 WT あるいは4種類の p53 MUT を発現する H1299 細胞を樹立した。4種類の p53 MUT のうち、p53_R175H、_R249S、_R273H は、p53 のホットスポットと呼ばれるアミノ酸部位に相当し、ヒトのがん細胞において非常に多く変異が見つかっている領域である (IARC p53 database, <http://p53.iarc.fr/>)。そして、ホットスポットより変異頻度の低い p53 MUT として p53_R280K を選択した。これら5つの樹立した細胞株に対し、NEK9 KD を行った結果、予想通り p53 MUT を発現させた4種類の細胞株全て、細胞増殖の低下が示され、p53 WT のみ細胞増殖に有意な変化が認められなかった (図 3.5、図 3.6)。この結果から、NEK9 KD による細胞増殖抑制は、p53 の機能欠損に依存していることに加え、p53 遺伝子変異の場合、変異箇所には依存しないことが示唆された。

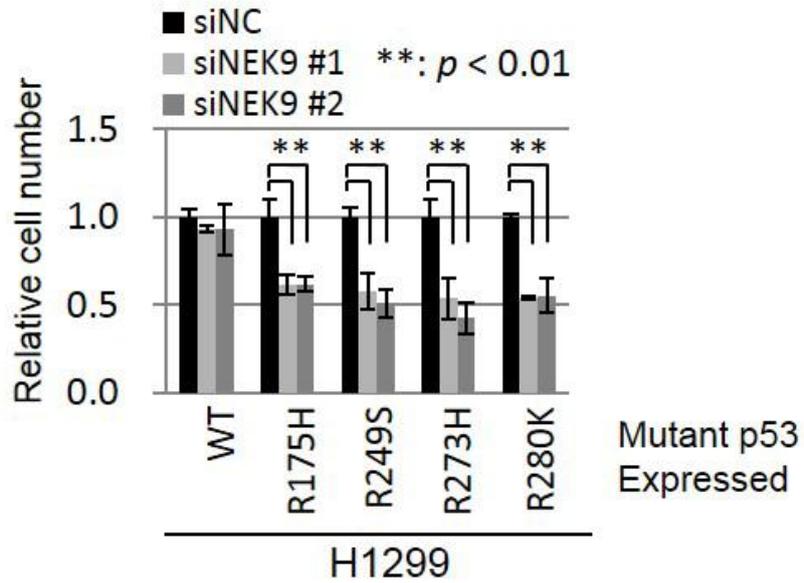


図 3.5 MUT p53 発現 H1299 細胞は NEK9 KD によって細胞増殖が低下^{A)}

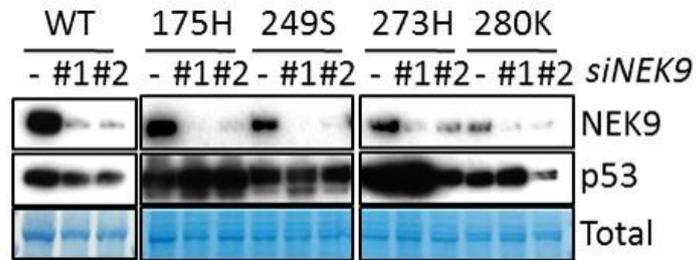


図 3.6 H1299 細胞の p53 発現と siNEK9 による遺伝子発現抑制の確認^{A)}

3.4 p53 変異がん細胞において *siNEK9* と pHalo-NEK9 を共発現させると細胞増殖率の低下を回復する

NEK9 KD による p53 変異がん細胞の増殖抑制が、NEK9 の発現低下による影響であることを確かめるために、NEK9 KD した p53 MUT 細胞に、NEK9 を過剰発現させた時の細胞増殖変化を調べた。これまでの実験に用いた *siNEK9* #1 及び#2 は、*NEK9* の Open Reading Frame (ORF) 内に存在する塩基配列を標的とするため、本実験においてのみ、*NEK9* mRNA の 3'UTR 部分を標的とする *siNEK9* #3 及び#4 を Sigma から購入した。購入した siRNA を用いて実験を行った結果、nc (pFN21A-Halo tag only) を導入した SW480 (p53 MUT) 細胞は、これまでの結果と同様に NEK9 KD によって細胞増殖が抑制された。一方、wt (pHalo-NEK9 (ORF)) と *siNEK9* を同時に導入した SW480 (p53 MUT) 細胞は、nc (pFN21A-Halo tag only) 導入時と比較して、細胞増殖率の抑制効果が解消される結果が示された (図 3.7, 図 3.8)。さらに、NEK9 の自己リン酸化に必要とされる(20)、210 番のスレオニンをアラニンに置換した pHalo-NEK9 (T210A) を作製し、*siNEK9* #3 あるいは#4 と同時に SW480 (p53 MUT) 細胞に導入すると、wt (pHalo-NEK9 (ORF)) の場合と同様に細胞増殖率の抑制効果が解消される結果が示された (図 3.7, 図 3.8)。従って、NEK9 KD が p53 変異がん細胞に対し細胞増殖抑制を促す際、NEK9 の有するキナー

ゼ活性の有無ではなく、NEK9 の発現量が低下することで細胞増殖抑制効果を誘導することが示唆された。

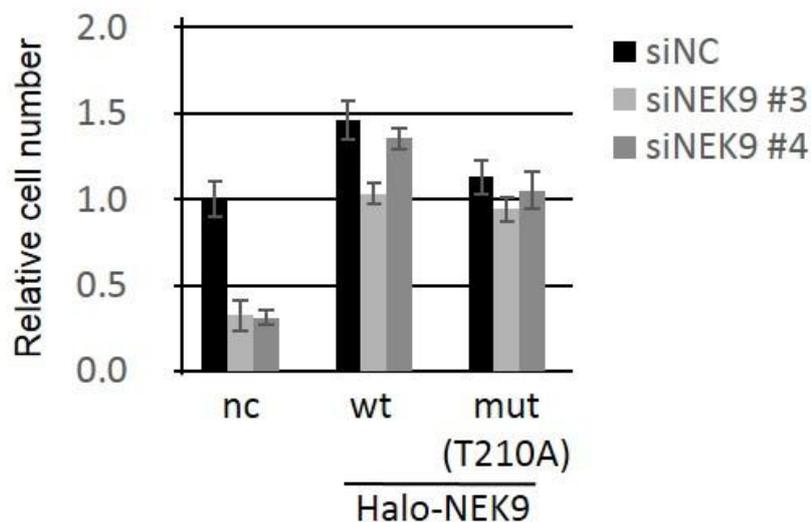


図 3.7 pHalo-NEK9 により、NEK9 KD に起因する細胞増殖抑制効果の回復^{A)}

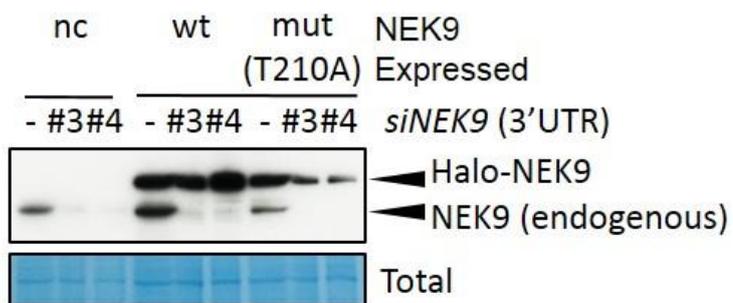


図 3.8 pHalo-NEK9 及び *siNEK9* 導入時における NEK9 の発現変化^{A)}

3.5 p53 変異がん細胞において NEK9 KD によりコロニー形成能が低下する

これまでの実験結果から NEK9 KD は p53 変異がん細胞の増殖を特異的に抑制する可能性が示唆された。さらに、NEK9 と p53 変異がん細胞の増殖がより密接に関係していることを確かめるために、NEK9 KD したときのコロニー形成能を調べた。2 nM の siRNA を導入した RKO (p53 WT) 及び SW480 (p53 MUT) 細胞を 200 cells/well の濃度で播種し、9 日間培養を行った結果、予想通り、SW480 (p53 MUT) 細胞においてのみ、コロニー数が減少し、RKO (p53 WT) 細胞のコロニー数は、変化が認められなかった (図 3.9)。p53 変異がん細胞における NEK9 KD の細胞増殖抑制には、コロニー形成能の低下が関与していることが示された。

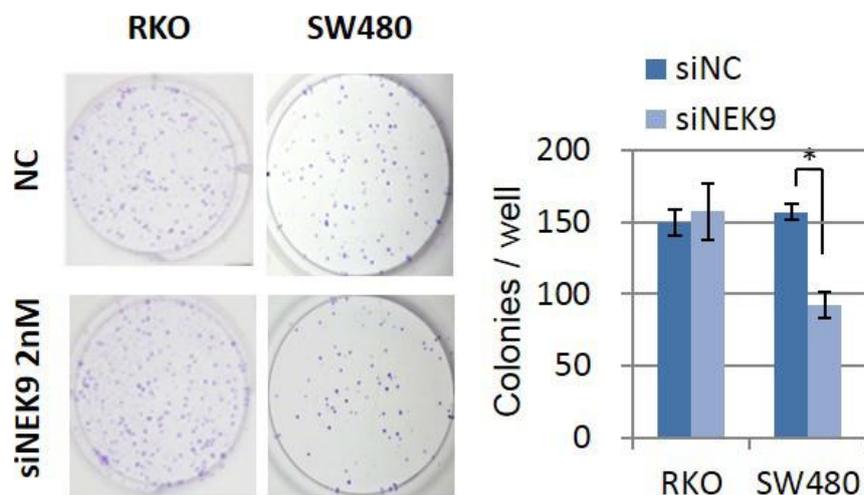


図 3.9 NEK9 KD により SW480 細胞由来のコロニーが減少 (2 次元) ^{A)}

次に、p53 変異がん細胞の 3 次元培養における NEK9 KD したときのコロニー形成能を調べた。NEK9 KD した SW480 (p53 MUT) 細胞を 0.6% のアガロースを含む DMEM 培地に懸濁し、播種後 10 日間培養した。目視できる大きさにまで形成されたコロニーを染色し観察した結果、やはり 2 次元培養時と同様に、SW480 (p53 MUT) がん細胞に対し NEK9 KD を行うと、コロニー数の減少が確認された (図 3.10)。この結果から、NEK9 KD によって、p53 MUT がん細胞の細胞増殖及びコロニー形成を特異的に阻害することができると考えられる。

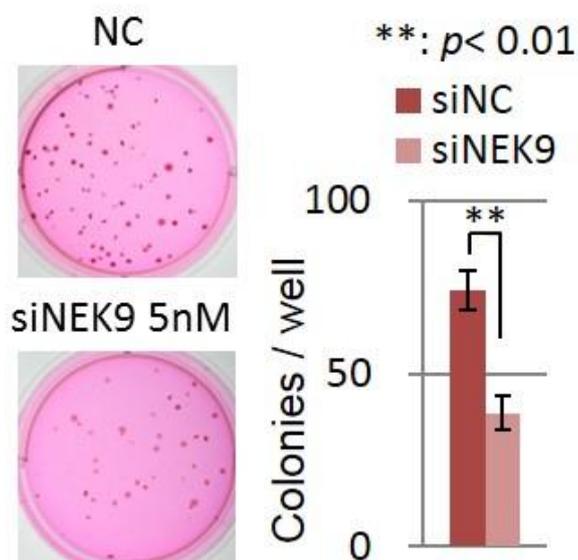


図 3.10 NEK9 KD により SW480 細胞由来のコロニーが減少 (3 次元)^{A)}

3.6 p53 変異がん細胞において NEK9 KD すると増殖が抑制される (*in vivo*)

miR-22 標的スクリーニングによって見出した NEK9 が、p53 の機能欠損がん細胞の細胞増殖に必須であることを、複数の *in vitro* 実験によって明らかにした。次に、NEK9 KD による p53 変異がん細胞の増殖抑制が、*in vivo* 実験において生じるかどうかを確かめるために、ヒトがん細胞をヌードマウスに移植し腫瘍を形成後（異種移植片：Tumor xenograft）、図 7.4 に示す Time schedule で *siNEK9* を腫瘍に直接投与し、腫瘍塊の経時変化を測定した。その結果、*in vitro* で示した実験結果と同様に、SW480 (p53 MUT) がん細胞由来の腫瘍においてのみ、体積の減少が認められた（図 3.11、図 3.12、図 3.13）。

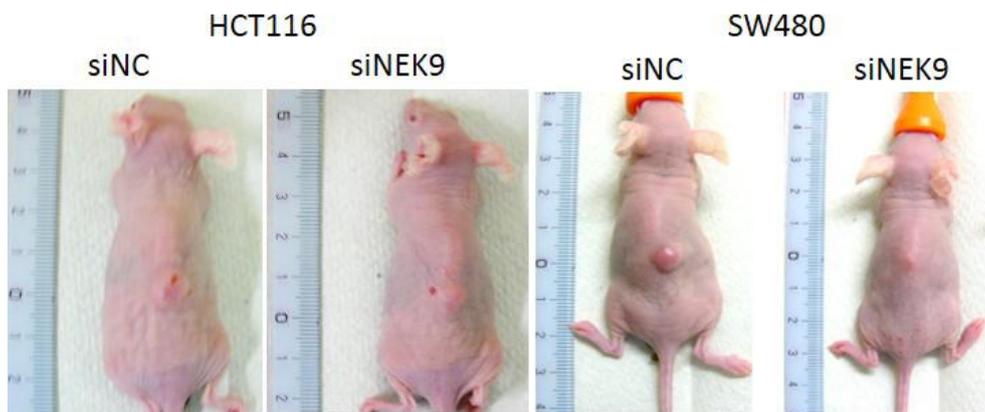


図 3.11 腫瘍の大きさ（ヌードマウス、Day 18）^{A)}



図 3.12 腫瘍の大きさ (Day 18) ^{A)}

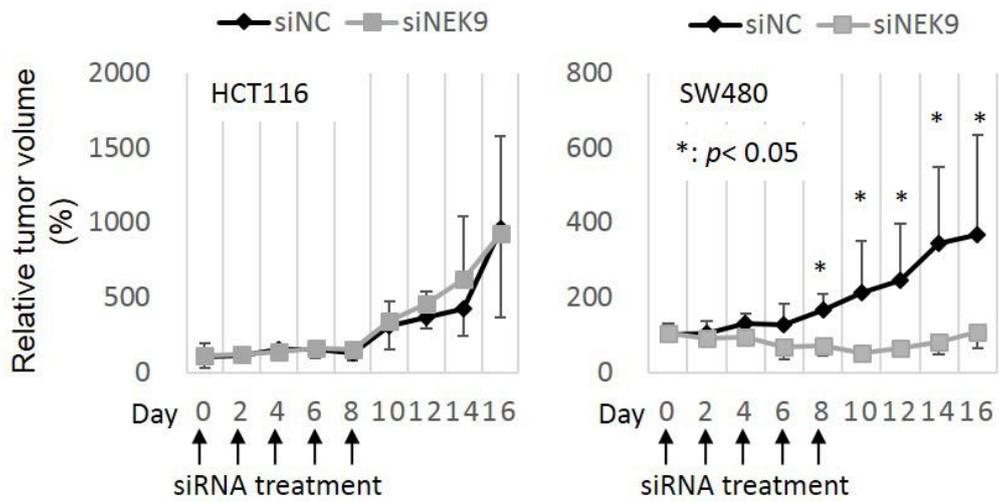


図 3.13 腫瘍体積の経時変化 ^{A)}

従って、*in vitro*、*in vivo* 両実験において、p53 機能欠損がん細胞の細胞増殖は NEK9 の発現に依存していることを明らかにした。

第四章 NEK9 KD による細胞増殖抑制に関わる分子機構

4.1 p53 機能欠損がん細胞において NEK9 KD は G1-arrest を誘導する

p53 機能欠損がん細胞は NEK9 KD によって細胞増殖抑制が誘導されることから、どのような分子機構によって生じているかを次に検討した。*miR-22* を導入した SW480 (p53 MUT) 及び HCT116 p53^{-/-} (p53 KO) 細胞は、細胞周期の停止が認められたことから、NEK9 KD 時における細胞周期を調べた。

まず、3 種類の SW480 (p53 MUT)、PANC1 (p53 MUT)、RKO (p53 WT) ががん細胞に対して、NEK9 KD を行ったときに生じる細胞周期変化をフローサイトメトリーによって調べた。その結果、2 種類の p53 MUT 細胞に NEK9 KD すると、G1 期細胞集団の増加及び S 期細胞集団の減少が有意に認められ、G2-M 期細胞集団はあまり変化しなかった (図 4.1)。このとき、p53 WT 細胞の細胞周期は、NEK9 KD による有意な細胞周期変化を示さなかった。

次に、細胞増殖アッセイに使用した p53 を恒常的に抑制する HCT116 shp53 細胞株において、NEK9 KD による細胞周期への影響を上述と同じ条件下で調べた。その結果、HCT116 shp53 細胞のみ細胞周期の停止が確認でき、p53 MUT 細胞と同様に、G1-S 移行期で細胞周期停止が生じることが示された (図 4.2)。

さらに、ヒト非小細胞肺癌由来の H1299 (p53 null) 細胞から樹立した、恒常的に p53 WT あるいは 4 種類の p53 MUT を発現する細胞について、NEK9

KD による細胞周期への影響を調べた。その結果、予想通り p53 WT 以外の 4 種類の p53 MUT 細胞において、先ほどと同様の細胞周期停止 (G1-S arrest) が確認され、p53 WT 細胞は有意な細胞周期変化を生じないことが認められた (図 4.3)。これら 3 種の実験結果から、p53 の機能欠損したがん細胞は、NEK9 を KD することで、G1 期が増加し、S 期が減少する細胞周期停止により、細胞増殖の抑制が誘導される分子機構が存在すると考えられた。

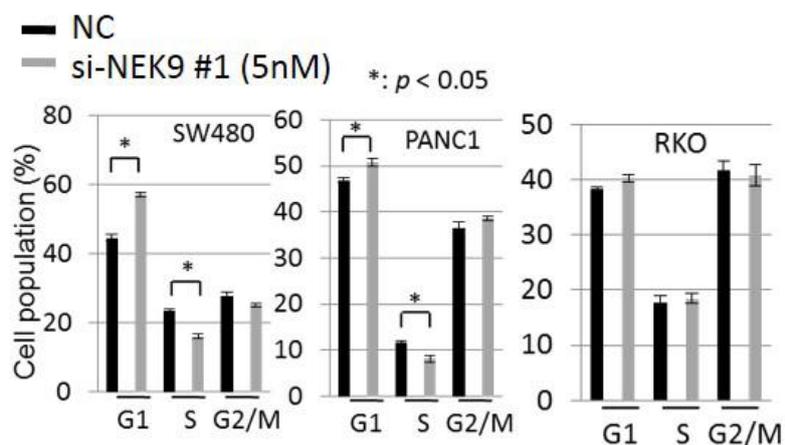


図 4.1 NEK9 KD による各種がん細胞の細胞周期変化 ^{A)}

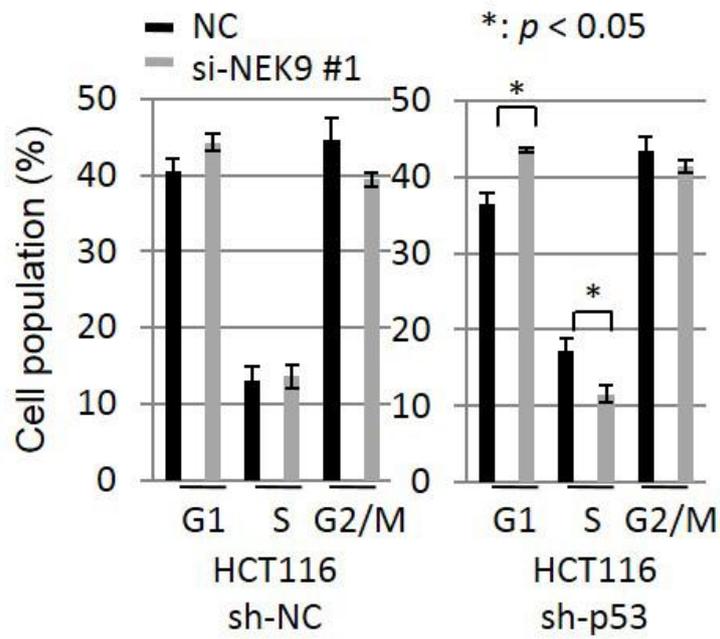


図 4.2 NEK9 KD による HCT116 sh-p53 細胞の細胞周期変化^{A)}

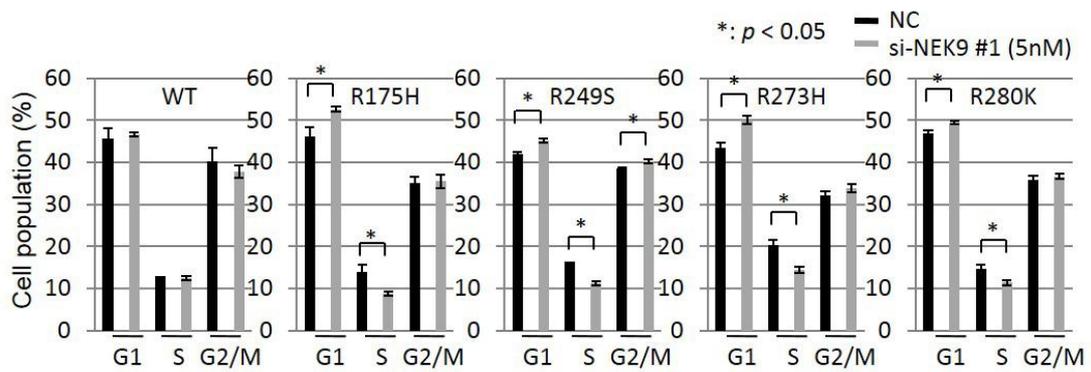


図 4.3 NEK9 KD による p53 過剰発現させたがん細胞の細胞周期変化^{A)}

4.2 NEK9 KD により p53 変異がん細胞は細胞老化様の表現型を獲得する

NEK9 KD が、p53 機能欠損細胞に対し G1-S arrest を誘導することが明らかとなったので、そのときの細胞形態変化について調べた。顕微鏡で確認した結果、SW480 (p53 MUT) 細胞は NEK9 を KD すると、*siNC* 導入時と比較して細胞の肥大化が観察された。細胞老化の特徴として、細胞の肥大化が挙げられる。そこで、SW480 (p53 MUT) 細胞は、細胞老化に酷似した形態変化を示すのではないかという仮説に基づき以下の実験を行った。

細胞老化を調べる最も簡易的な方法として、SA- β -galactosidase 染色法がある。そこで、この方法を用いて、NEK9 KD した SW480 (p53 MUT) 細胞が、染色されるかどうかを調べた。その結果、図 4.4 に示したように、NEK9 KD された SW480 (p53 MUT) 細胞においてのみ、青緑色の染色が認められた。

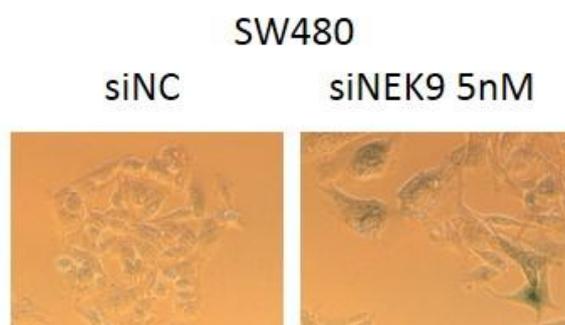


図 4.4 NEK9 KD した SW480 細胞の SA- β -galactosidase 染色像 ^{A)}

この SA- β -galactosidase 陽性細胞を定量化するために、 C_{12} FDG という β -galactosidase 特異的に反応する基質を用いて、フローサイトメトリー解析を行った(21)。その結果、細胞の体積が増加かつ C_{12} FDG 蛍光ポジティブを示す細胞集団が、NEK9 KD した SW480 (p53 MUT) 細胞において 4.65%→33.99% に増加することが示された (図 4.5)。また、p53 WT である RKO 細胞は 1.53% →4.65% にしか増加しなかったことより、p53 MUT がん細胞においてのみ NEK9 KD すると細胞老化に酷似した形態変化を示すことが示唆された。

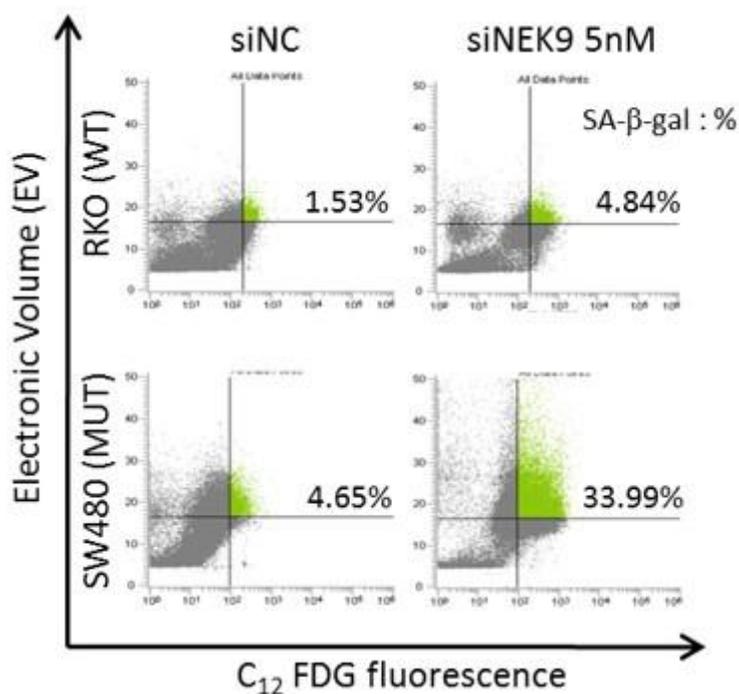


図 4.5 SA- β -galactosidase 染色後、フローサイトメトリーによる定量化 ^{A)}

4.3 p53 変異がん細胞の NEK9 KD によって変化するシグナル経路について

p53 MUT がん細胞において、NEK9 KD を行うと細胞老化様の形態変化を示すことから、細胞内のシグナル経路はどのように変化するのかが確認した。

その方法として、NEK9 KD した SW480 の total RNA を用いて、マイクロアレイ解析を実行した。アレイ上に配置されている 32,078 遺伝子のヒートマップを図 4.6 に示す。この結果から、NEK9 遺伝子一つを抑制するだけで、非常に多くの遺伝子発現に影響を及ぼすことが認められた。

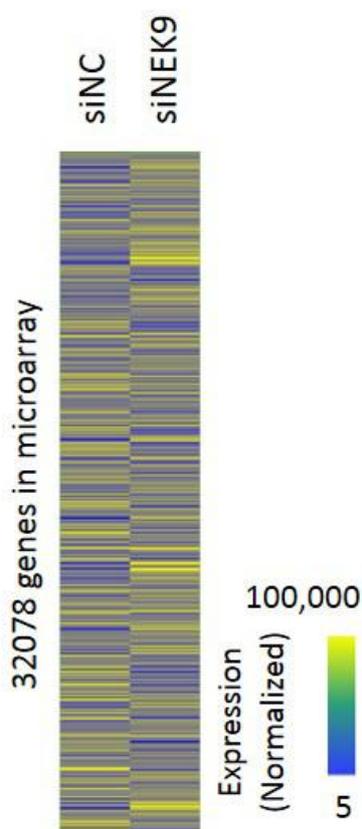


図 4.6 SW480 細胞の NEK9 KD による遺伝子変化 ^{A)}

NEK9 KD による細胞形態変化にどのような遺伝子が関与しているか探索するために、NEK9 KD した SW480 細胞から total RNA を抽出し、マイクロアレイ解析によって mRNA 発現プロファイルを作成後、図 4.7 に示すストラテジーで関連遺伝子を抽出した。まず、*miR-22* 標的スクリーニング (図 2.1、図 2.2) で利用したマイクロアレイ解析結果から、p53 WT と比較して、p53 MUT 及び p53 KO の細胞において発現が上昇する 4971 遺伝子 (青円) と、NEK9 KD した SW480 細胞でコントロールと比較して発現が有意に減少する 5910 遺伝子 (橙円) の共通遺伝子 1109 種類 (図 4.7 左側 網掛) を抽出した。次に、p53 WT より p53 MUT 及び p53 KO 両細胞で発現低下を示す 6772 遺伝子 (紫円) と、NEK9 KD した SW480 細胞でコントロールより発現が有意に増加する 7339 遺伝子 (灰円) の共通する 1983 遺伝子 (図 4.7 右側 網掛) を抽出した。以上の結果から、1109 遺伝子に 1983 遺伝子を加えた 3092 遺伝子が NEK9 KD によって発現が変化した遺伝子群であると考えられる。このことから、NEK9 は p53 機能損失がん細胞の細胞増殖に関して、非常に幅広いシグナル経路の制御に関与していることが示唆された。

そこで、具体的にどのようなシグナル経路が変動しているかを調べるために、先ほど得た NEK9 KD によって発現変動する 3092 遺伝子を用いて、ネットワーク解析を Wiki Pathways (<http://wikipathways.org/>) で実行し、変動の大き

さを示す p 値の低い順に並べた (表 2、表 3)。この結果から、NEK9 KD は、レセプターシグナル経路や mRNA のプロセッシング、そして細胞周期の調節に深く関わっていることが示された。また、マイクロアレイのシグナル値から、NEK9 KD により p53 WT がん細胞には影響を与えず、p53 機能欠損細胞においてのみ発現量の変化を示す細胞周期関連遺伝子として、p21 (*CDKN1A* をコードする) が最も有意に上昇し MAPK14 (別名 p38 α) が最も有意に減少する結果が示唆されたため、タンパク質レベルで同様の現象が認められることを確かめた (図 4.8)。これら 2 つの遺伝子は p53 変異の有無によらず細胞周期の調節に関与していることが知られている(22-26)。しかし、本研究においては、p53 機能損失したがん細胞においてのみ、両遺伝子は発現量に変化し、細胞老化に酷似した細胞周期停止を誘導することが認められた。以上の結果から、NEK9 による p53 変異がん細胞の細胞増殖に関わる分子機構の一部が明らかとなった。

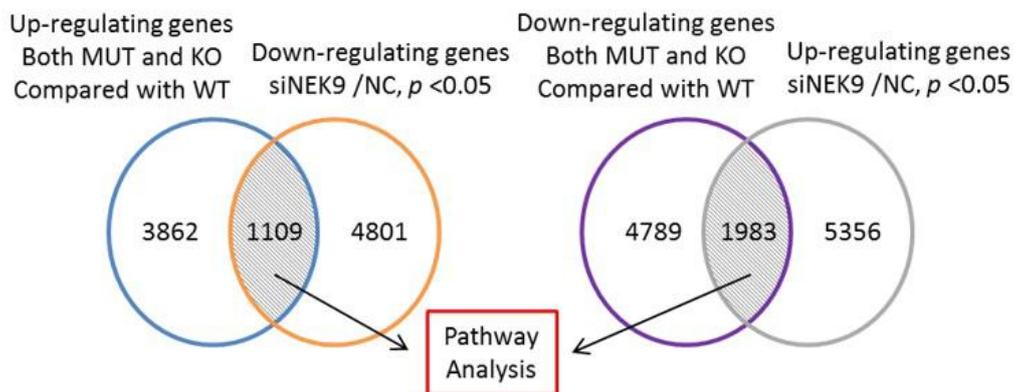


図 4.7 Pathway 解析に用いた遺伝子群の抽出 A)

表 2 NEK9 によって制御を受ける pathway^{A)}

Pathway	p-value
Hs_Androgen_receptor_signaling_pathway_WP138_47971	8.05E-12
Hs_EGF-EGFR_Signaling_Pathway_WP437_47973	4.09E-10
Hs_Regulation_of_Actin_Cytoskeleton_WP51_45278	4.62E-08
Hs_Leukocyte_TarBase_WP2003_44886	7.15E-08
Hs_mRNA_processing_WP411_45374	2.24E-07
Hs_Cell_cycle_WP179_45137	2.27E-07
Hs_TGF_beta_Signaling_Pathway_WP366_47976	2.44E-07
Hs_TSH_signaling_pathway_WP2032_44635	5.54E-07
Hs_Interferon_type_I_WP585_47017	4.61E-06
Hs_Notch_Signaling_Pathway_WP61_47972	5.08E-06
Hs_G1_to_S_cell_cycle_control_WP45_45301	5.29E-06
Hs_DNA_damage_response_WP707_45196	5.29E-06
Hs_G13_Signaling_Pathway_WP524_45304	7.08E-06
Hs_miRNAs_involved_in_DDR_WP1545_45378	1.03E-05
Hs_miRNA_regulation_of_DNA_Damage_Response_WP1530_45379	1.21E-05
Hs_Processing_of_Capped_Intron-Containing_Pre-mRNA_WP1889_42105	1.41E-05
Hs_Eukaryotic_Transcription_Initiation_WP405_41116	2.30E-05
Hs_Integrin-mediated_cell_adhesion_WP185_44862	2.57E-05
Hs_Diurnally_regulated_genes_with_circadian_orthologs_WP410_45194	2.66E-05
Hs_G_Protein_Signaling_Pathways_WP35_45294	2.93E-05
Hs_IL-7_signaling_pathway_WP205_48440	3.92E-05
Hs_DNA_damage_response_(only_ATM_dependent)_WP710_46091	4.02E-05
Hs_Electron_Transport_Chain_WP111_45239	4.66E-05
Hs_Prolactin_Signaling_Pathway_WP2037_48450	8.10E-05
Hs_Energy_Metabolism_WP1541_45242	1.01E-04
Hs_Neural_Crest_Differentiation_WP2064_47071	1.11E-04
Hs_Kit_receptor_signaling_pathway_WP304_47975	1.24E-04
Hs_IL-6_signaling_pathway_WP364_48439	1.53E-04
Hs_Unfolded_Protein_Response_WP1939_45018	1.61E-04
Hs_Endochondral_Ossification_WP474_45241	1.67E-04
Hs_Adipogenesis_WP236_44941	1.71E-04
Hs_Senescence_and_Autophagy_WP615_47912	2.16E-04
Hs_Type_II_interferon_signaling_(IFNG)_WP619_45027	2.29E-04
Hs_B_Cell_Receptor_Signaling_Pathway_WP23_47980	3.13E-04
Hs_Wnt_Signaling_Pathway_WP363_47977	3.63E-04
Hs_EPO_Receptor_Signaling_WP581_41162	3.68E-04
Hs_Oxidative_phosphorylation_WP623_46087	3.72E-04
Hs_Leptin_signaling_pathway_WP2034_48444	3.72E-04
Hs_TNF_alpha_Signaling_Pathway_WP231_47978	4.28E-04
Hs_Calcium_Regulation_in_the_Cardiac_Cell_WP536_44983	4.89E-04
Hs_angiogenesis_overview_WP1993_44954	6.06E-04
Hs_Proteasome_Degradation_WP183_45274	6.06E-04
Hs_IL-9_signaling_pathway_WP22_48441	6.22E-04
Hs_Wnt_Signaling_Pathway_and_Pluripotency_WP399_45007	6.70E-04
Hs_IL-2_Signaling_pathway_WP49_48400	8.42E-04
Hs_MicroRNAs_in_cardiomyocyte_hypertrophy_WP1544_45381	8.76E-04

表 3 NEK9 によって制御を受ける細胞周期関連遺伝子 A)

Gene Symbol	Accession Number	SW480	
		fold change (<i>siNEK9</i> / NC)	<i>p</i> value
<i>CDKN1A</i>	NM_078467	1.96	6.29E-05
<i>CCNE2</i>	NM_057749	1.73	5.05E-06
<i>CCL3</i>	NM_002983	1.60	8.83E-07
<i>IRF5</i>	NM_001098627	1.54	3.08E-06
<i>BRAF</i>	NM_004333	1.53	2.02E-06
<i>GSN</i>	NM_001127663	1.53	4.21E-07
<i>HDAC4</i>	NM_006037	1.49	2.95E-04
<i>ULK1</i>	NM_003565	1.44	4.51E-05
<i>CCNE1</i>	NM_001238	1.38	2.49E-04
<i>E2F3</i>	NM_001949	1.37	5.18E-05
<i>CCNG2</i>	NM_004354	1.37	4.51E-04
<i>MDM2</i>	NM_002392	1.36	5.93E-05
<i>ATF6B</i>	NM_004381	1.30	4.89E-04
<i>HDAC8</i>	NM_001166419	1.24	3.41E-04
<i>HDAC2</i>	NM_001527	1.23	1.37E-03
<i>TFDP2</i>	NM_001178138	1.20	1.23E-03
<i>PIK3C3</i>	NM_002647	1.20	2.94E-04
<i>E2F2</i>	NM_004091	1.17	4.31E-03
<i>HDAC3</i>	NM_003883	1.12	6.82E-03
<i>HDAC1</i>	NM_004964	1.12	3.62E-02
<i>CD44</i>	NM_000610	1.10	6.04E-03
<i>ORC5</i>	NM_002553	1.09	1.08E-02
<i>BECN1</i>	NM_003766	0.91	3.69E-03
<i>CCND1</i>	NM_053056	0.87	9.31E-03
<i>MCM8</i>	NM_182802	0.87	8.72E-04
<i>MAP2K1</i>	NM_002755	0.86	8.73E-03
<i>PLK1</i>	NM_005030	0.86	3.00E-02
<i>ARF1</i>	NM_001024227	0.85	2.31E-03
<i>SLC39A3</i>	NM_144564	0.82	1.70E-03
<i>ATG5</i>	NM_004849	0.81	2.04E-04
<i>YWHAG</i>	NM_012479	0.80	7.21E-04
<i>IGF1R</i>	NM_000875	0.79	5.86E-06
<i>CCND3</i>	NM_001760	0.78	2.00E-03
<i>UVRAG</i>	NM_003369	0.78	8.56E-05
<i>CDKN1B</i>	NM_004064	0.74	9.27E-04
<i>E2F6</i>	NM_198256	0.74	1.55E-04
<i>ATM</i>	NM_000051	0.71	1.29E-06
<i>CDK4</i>	NM_000075	0.69	5.03E-05
<i>MAPK14</i>	NM_139013	0.66	2.06E-05



図 4.8 NEK9 KD した際の発現量 (p21、MAPK14) ^{A)}

第五章 p53 と NEK9 の共染色されるヒト肺がん臨床検体の予後解析

ヒトの腫瘍におけるがん細胞の NEK9 増殖依存性の意義を探るために、ヒトの組織に対して、NEK9 及び変異 p53 の免疫組織化学的染色を行った。免疫組織化学的染色において、p53 変異タンパク質は、p53 野生型と比較して安定であることから染色される。つまり、p53 陽性は、p53 変異タンパク質が存在することを意味する (27)。EPITOMICS 社から購入した Anti-NEK9 rabbit monoclonal antibody (EP7361) が、本実験系に問題なく使用できることを、SW480 及び NEK9 KD された SW480 細胞で確認した (図 5.1)。細胞染色において、SW480 細胞において、NEK9 は、核内ではなく主に細胞質で染色されるという興味深い結果が得られた。これまで NEK9 は、細胞分裂時、核内の生物学的機能しか報告されていない。従って、この染色像から NEK9 に新たな機能が存在することが推察できる。

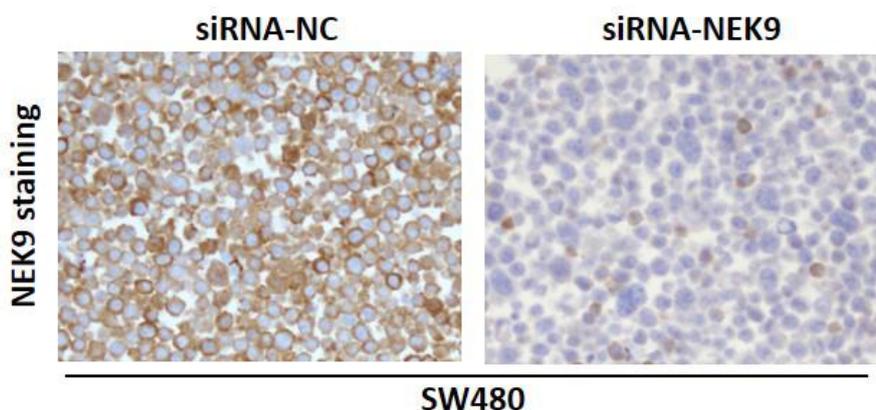


図 5.1 NEK9 抗体(EP7361) による SW480 細胞の免疫染色像 ^{A)}

この NEK9 抗体 (EP7361) と p53 抗体 (mouse monoclonal antibody, DO-7, Dako) を用いて、ヒト正常肺及び肺がん組織の免疫組織化学的染色を行った。その結果、ヒト正常肺組織においては、NEK9 染色は陰性であった (図 5.2)。一方で、複数の肺がん組織において、NEK9 の染色が非常に高い確率で陽性となり、NEK9 は正常では発現せず、がん組織で高発現が示された (図 5.3)。具体的には、肺腺がん (adenocarcinoma: ADC) では 33/57 (57.9%)、肺扁平上皮がん (squamous cell carcinoma: SQC) では 54/56 (96.4%)、肺大細胞神経内分泌がん (large cell neuroendocrine carcinoma: LCNEC) では 23/23 (100%) そして小細胞肺がん (small cell lung cancer: SCLC) でも 22/22 (100%) の割合で陽性を示した。また、ADC や SQC の検体において、NEK9 の染色は分化度や p53 の変異有無と相関を示さなかった。しかしながら、ADC の半数 13/26、SQC の大部分 28/30、そして全ての LCNEC 及び SCLC において、p53 陽性の検体は NEK9 も陽性を示したことから (図 5.4)、SQC や LCNEC、及び SCLC の p53 変異症例は、NEK9 依存的な可能性が考えられる。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 OS (全生存率期間) が短くなり、統計的にも有意な差が生じることから (図 5.5)、p53 変異を有する ADC にとって NEK9 が、がん細胞の増殖に優位にそして重要な働きをすることから、予後不良となったと考

えられた。

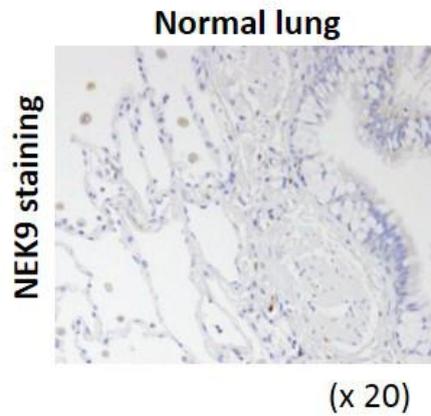


図 5.2 ヒト正常肺組織の免疫染色像 ^{A)}

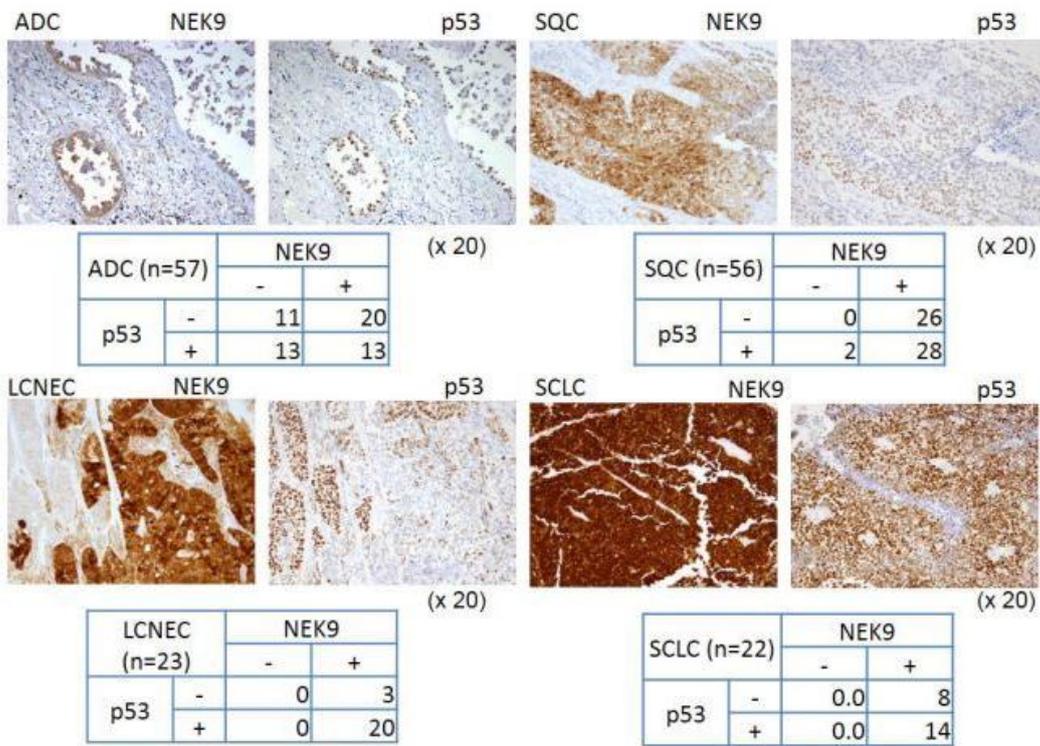


図 5.3 各種肺がん組織における染色像及び染色された割合 ^{A)}

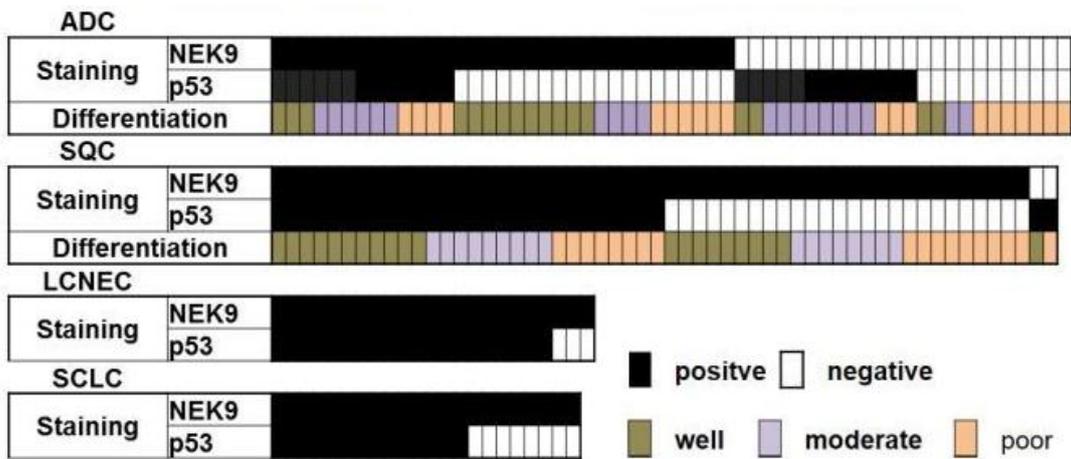


図 5.4 NEK9 及び p53 ポジティブと予後の関係^{A)}

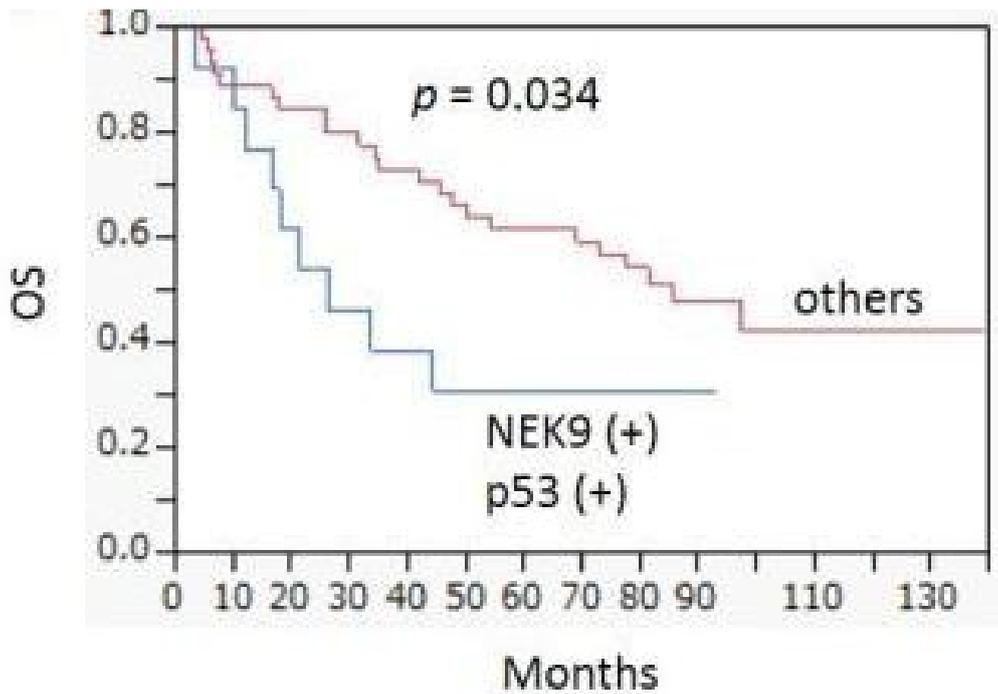


図 5.5 ADC における Kaplan-Meier 解析結果^{A)}

* OS : Overall Survival (全生存率期間)

これらの結果を検証するために、別の ADC 検体 76 サンプルを用いて、*NEK9* mRNA の発現量をマイクロアレイで解析し、*p53* の遺伝子変異をエキゾームシーケンスで解析した結果、*p53* 変異を有する ADC 検体で、*NEK9* mRNA の発現が高い傾向がみられたが、有意な差は認められなかった (図 5.6、表 4)。

また、ヒト肺癌組織以外では、*NEK9* mRNA 発現量を測定するために、The Cancer Genome Atlas (TCGA) に登録されているデータ(28) を用いて、解析した。その結果、大腸、胃、重篤な卵巣がん組織において *NEK9* mRNA の発現量は、*p53* 変異の有無によらず、肺癌の ADC や SQC と同程度であることが確認された (図 5.7)。

以上の結果から、*p53* 変異を有するヒト腫瘍の増殖において、*NEK9* 依存性を有する可能性があると考えられる。

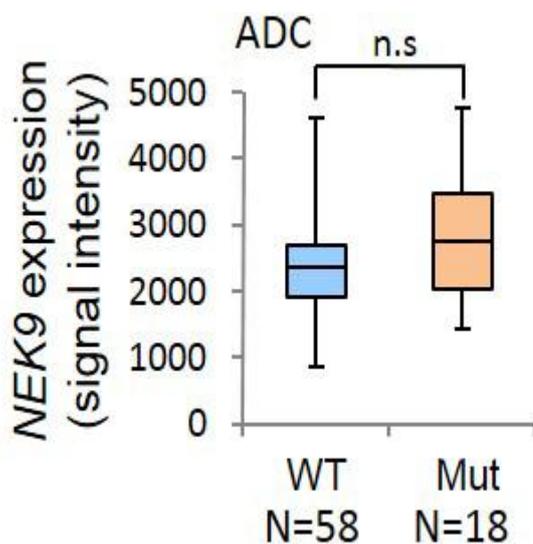


図 5.6 ADC 検体の *NEK9* mRNA 発現は *p53* status に非依存的 ^{A)}

表 4 肺がん臨床検体の *TP53* 変異情報 A)

Clinical sample number	Mutation site	Mutant p53 status
1		
2		
3		
4	A245G	p.H82R
5		
6		
7		
8		
9		
10		
11	G248T	p.S83I
12		
13		
14	G317A	p.C106Y
15		
16		
17	T188A	p.I63N
18	G77T	p.R26L
19		
20	C190T	p.R64 Stop
21		
22	G121A	p.V41M
23		
24		
25		
26		
27	G128A	p.R43H
28		
29		
30		
31		
32		
33		
34		
35	A319G	p.N107D
36		
37		
38	C448T	p.R150W
39		
40		
41	T188C	p.I63T
42		
43		
44		
45	G614T	p.R205L
46		
47		
48		
49		
50		
51		
52		
53		
54		
55	G121T	p.V41L
56		
57		
58		
59		
60	C181T	p.H61Y
61	T185G	p.L62R
62	G274T	p.E92 Stop
63		
64		
65		
66		
67		
68	G329A	p.C110Y
69		
70		
71		
72		
73		
74	C241T	p.R81 Stop
75		
76		

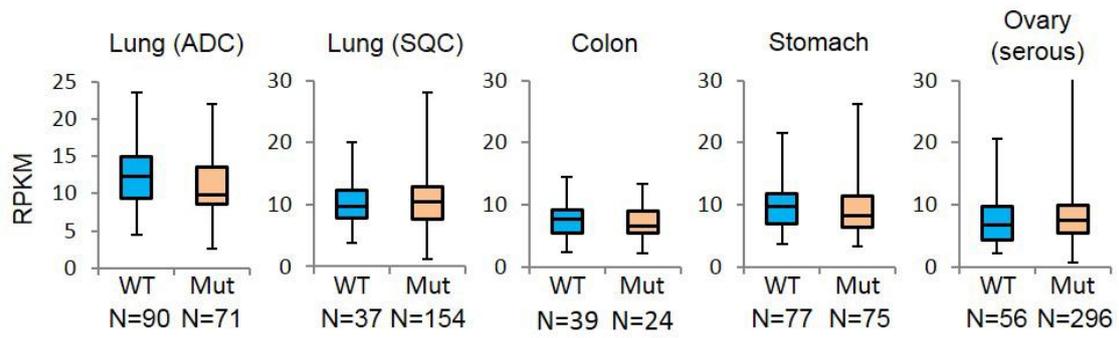


図 5.7 TCGA data を用いた *NEK9* mRNA 発現解析^{A)}

*RPKM : ノーマライズした発現量

第六章 結論

本研究は、*miR-22* 標的スクリーニングにより、p53 機能欠損細胞の細胞増殖に必須となる遺伝子として NEK9 を同定した。miRNA 標的スクリーニングは、miRNA の特徴を利用した方法である。miRNA の標的となる mRNA は、細胞の種類に依存しているということである。当研究グループは以前、*miR-22* が p53 WT がん細胞に導入すると細胞死 (apoptosis) を誘導し、p53 MUT あるいは p53 KO がん細胞に導入すると、細胞周期停止が誘導されることを報告した。この細胞周期停止は、細胞内で発現している細胞周期関連因子 CDK や HDAC などが、*miR-22* 標的遺伝子候補として見出したため、これら細胞周期関連因子が *miR-22* によって抑制されることで生じる表現型であると予想された(19)。従って、*miR-22* の標的となりうる細胞周期関連因子を特定することができれば、p53 機能欠損細胞の細胞増殖に必須因子を同定する事ができると考えた。この発想に基づいたスクリーニングアッセイを行うことで、p53 機能欠損細胞の細胞周期に深く関与している遺伝子として NEK9 を同定することに成功した。

NEK9 は NEK ファミリーの1つで、他の NEK ファミリー、NEK6 や NEK7 をリン酸化することで細胞周期の M 期を制御している(29-34)。また、NEK9 は、PLK1 や CDK1 によって連続的に活性化され、M 期の紡錘体形成を制御して

いることが報告されている(35-37)。PLK1 は、以前 p53 KO がん細胞の細胞生存に必須因子であることが同定されている(38)。しかし、本実験結果では、NEK9 の発現抑制により G2/M 期細胞集団の割合はあまり変化しないことから、p53 機能欠損細胞における NEK9 の細胞周期に関与する分子機構は、これまでに報告されている PLK1 や NEK6、NEK7 が関与する分子機構と異なる可能性が高い。実際、NEK6、NEK7 を siRNA によって発現抑制した結果、p53 遺伝子変異に依存的な増殖抑制を示さなかった (図 6.1、図 6.2)。

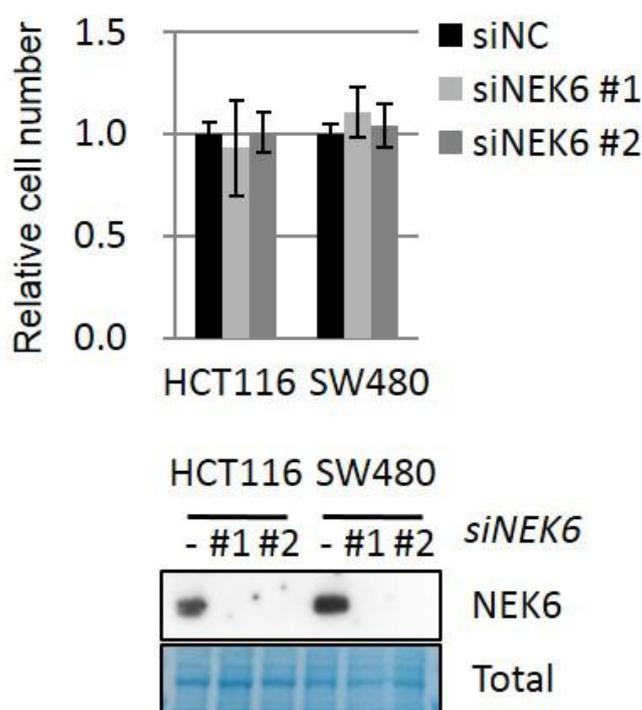


図 6.1 NEK6 KD による細胞増殖変化 ^{A)}

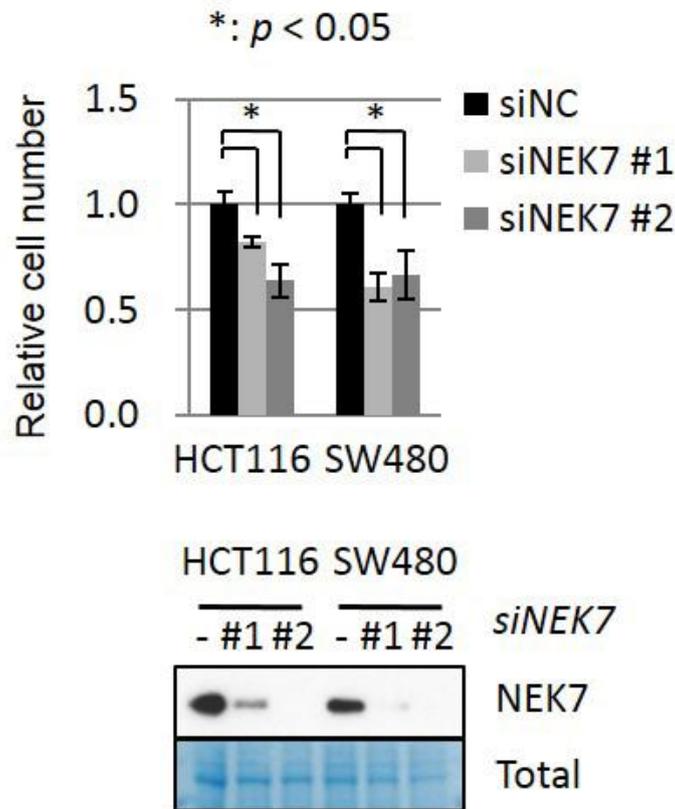


図 6.2 NEK7 KD による細胞増殖変化 ^{A)}

ウイルス由来タンパク質によって p53 機能が阻害されているヒト子宮頸がん由来がん細胞株 HeLa 細胞において、NEK9 は FACT (Facilitates chromosome transcription) 複合体と相互作用しており、FACT 複合体の発現を抑制すると、G1-S 移行期で細胞周期が停止する事が報告されている(39)。この G1-S 移行期における細胞周期停止は、本研究で示した p53 機能欠損がん細胞において、NEK9 KD を行うと生じる G1-S 期での細胞周期停止及び大きく発現プロファイルの変化が生じる事と重ね合わせて考慮すると、類似した分子機構が存在する可能性がある。また、NEK9 と FACT の相互作用には、NEK9 のスレオニ

ン残基 210 (NEK9 の自己リン酸化に必須) がリン酸化され、活性化状態にあることが必要とされている(20)。しかし、本実験結果は、スレオニン残基 210 をアラニンに置換した変異体を、NEK9 KD した p53 変異がん細胞に導入すると、細胞増殖率がコントロールに近い値まで戻ったことから、NEK9 の G1-S 移行期に関与する細胞周期制御は、キナーゼ活性に非依存的であることが示唆された (図 2.15)。従って、これまでの報告と総合して考えると、NEK9 スレオニン 210 番のリン酸化及び NEK9 のキナーゼ活性は、G2/M 期においてのみ検出され、G2 期の細胞周期進行に必要であると考えられる(20)。

近年、がん細胞において、p53 の遺伝子変異が細胞周期の進行や転移活性に関与していることが報告されている(40)。そこで、本実験結果と照合すると、NEK9 は p53 変異がんの促進的な機能を助長しているという仮説を立てることができる。しかし、免疫沈降法では、NEK9 と変異型 p53 の直接的な相互作用は認められなかった (*data not shown*)。さらに、p53 KO (*data not shown*) あるいは KD (図 2.10) したがん細胞において、NEK9 KD は細胞増殖を阻害する結果を得ている。従って、NEK9 の細胞周期制御は、p53 正常機能の有無に依存しているが、p53 と NEK9 は直接相互作用しているわけではないことが示唆される。現在、NEK9、変異型 p53、そして NEK9 の下流に位置する遺伝子との関係性は、まったく明らかになっていない。そこで、今後 p53 機能欠損

したヒトがん細胞における NEK9 のより詳細な機能解析を行うべきである。

変異型 p53 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。この考えに基づいた、いくつかのアプローチが考えられる。例えば、変異型 p53 タンパク質に小分子を作用させることで、野生型の p53 活性を再現させる方法などがある(41, 42)。NEK9 タンパク質の阻害は p53 機能欠損しているがん細胞を治療標的とする正攻法のアプローチとなる可能性がある。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。

実験方法

1.1 本研究で用いたがん細胞株及び培養条件

本研究で用いた下記を除く全てのがん細胞株は、the American Type Culture Collection (ATCC) から購入した。HCT116 p53^{-/-} 細胞は Dr. Bert Vogelstein (The Johns Hopkins University, Baltimore, MD) に提供していただいた。大腸がん細胞株 (HCT116、SW480、HCT116 p53^{-/-}、RKO) 及びすい臓がん細胞株 (PANC1) の培養には、非動化したウシ胎児血清 (FBS) を 10% 加えた Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) 培地を使用し、肺がん細胞株 (A549、A427、Ma2、H1009、H1299) の培養には、非動化した FBS を 10% 加えた RPMI-1640 培地を使用した。

1.2 レンチウイルスベクターを用いて安定的に発現及び抑制する細胞株の樹立

Add gene から pLenti6/V5 DEST を骨格とするレンチウイルスベクター (図 7.1)、5 種 (pLenti6/V5-p53_{wt} p53、_R175H、_R249S、_R273H、_R280K) を購入した。TP53 を恒常的に抑制するために、pLenti6-V5/DEST_{shp53} を国立がん研究センター研究所・難治がん研究分野の江成政人先生からいただいた。pLenti6-V5/DEST_{ccdB} をネガティブコントロールとして用いた。293FT 細胞に、3 種類のパッケージングプラスミドベクター (図 7.2) 11.75 µg と共に

上述に示したレンチウイルスベクター3.75 μg を Lipofectamine LTX Reagent (Invitrogen) を用いて導入した。24 時間後に培地を high D-glucose medium (GIBCO) に交換し、さらに 48 時間培養した。レンチウイルス粒子が含まれる上清を回収し、1,000 rpm で 5 分遠心後、1 ml 毎に分注し、 -80°C に保存した。

12 well プレートに HCT116 及び H1299 細胞を $1.0\sim 5.0 \times 10^4$ cells/ml 播種し、24 時間後にレンチウイルス溶液に交換、さらに 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の porybrene を加えた。さらに 24 時間培養後、5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の Blasticidin (Invitrogen) を含む DMEM 培地に交換し、ウイルスに感染している細胞の薬剤選択を実行した。

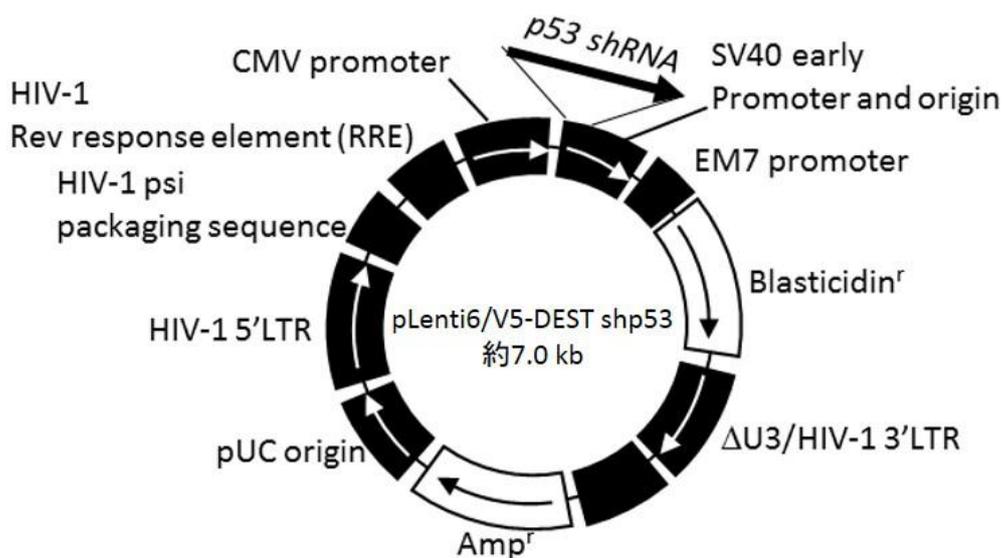


図 7.1 pLenti6/V5-DEST shp53 の概略図

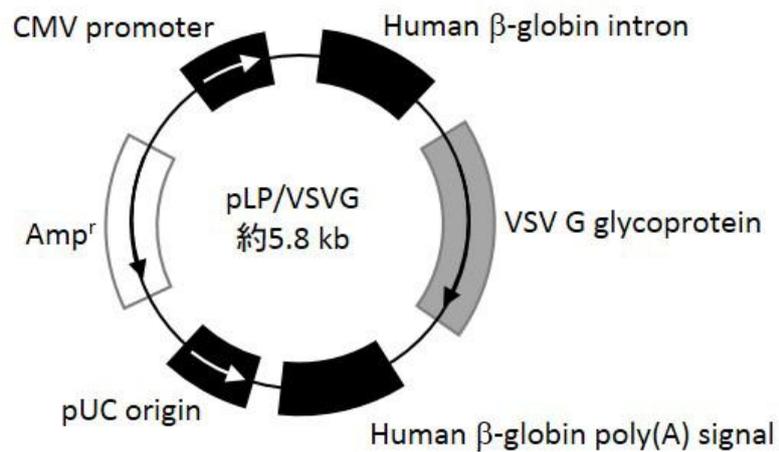
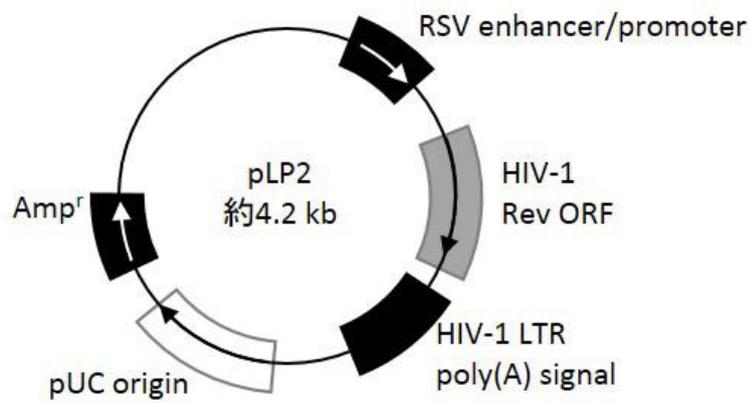
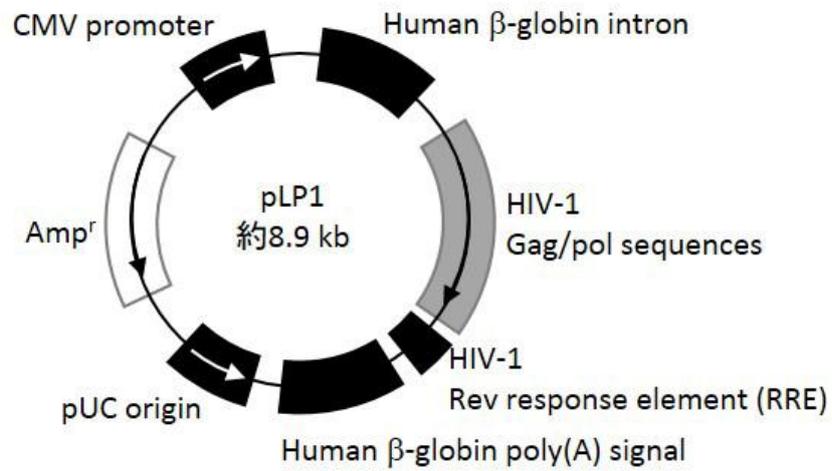


図 7.2 パッケージングプラスミドの概略図

1.3 マイクロアレイ解析

SW480 及び HCT116 p53^{-/-} 細胞を 5.0×10^4 cells/ml 播種し、*miR-22* 及び miR-negative control (Ambion) を最終濃度 5 nM で細胞株に導入後、CO₂ インキュベータ内で 48 時間培養した。導入試薬は Hiperfect Reagent (Qiagen) を用いた。導入した細胞から RNeasy カラム (Qiagen) を用いて Total RNA を回収し、Agilent 社の Cy3 using an mRNA labeling kit を用いてラベル化させ、マイクロアレイ解析を行った。マイクロアレイは Whole human genome oligomicroarray (4×44K v2, Agilent) を使用し、Gene Spring GX 11.5 ソフトウェア (Agilent) を用いて各種データ解析を実行した。HCT116 細胞に *miR-22* を導入した際のアレイ結果は、本研究より前に報告した解析結果を利用した。

SW480 の NEK9 KD による mRNA の発現変化を解析するために、以下に示す実験方法でマイクロアレイ解析を行った。SW480 細胞に NEK9 siRNA を最終濃度 5 nM となるように導入し、48 時間培養を行った。そして、上記と同様の方法で total RNA を回収、さらにマイクロアレイ解析を実行した。ネットワーク解析には、Gene Spring に搭載されている無料のソフトウェア、Wiki Pathways (<http://wikipathways.org/>) を使用した (表 2)。

1.4 siRNA を利用した細胞増殖アッセイ

CDC25B、HDAC6、HEXIM1、NEK9 及び SHC1 遺伝子の発現抑制が、細胞増殖に関与するかどうかを調べるために、以下の実験を行った。HCT116 及び SW480 細胞を 1.0×10^4 cells/ml 播種し、6 時間インキュベータで培養後、各遺伝子を標的とし、かつ配列の異なる 2 種類の siRNA 及び Non-targeting siRNA (Thermo scientific) を最終濃度 2 nM で導入した。48~72 時間後、細胞をトリパンブルーで染色し、生細胞のみを Countess Automated Cell Counter (Invitrogen) で測定した。用いた siRNA の塩基配列は、表 5 に示した。

8 種類のがん細胞株及び樹立した細胞株に対し、NEK9 KD による細胞増殖への影響を確かめるために、以下の実験を行った。24 well プレートに 2.5×10^4 cells/ml 細胞を播種し、6 時間インキュベータで培養後、NEK9 遺伝子に対する 2 種類の siRNA (#1, #2) 及び Non-targeting siRNA (Thermo scientific) を最終濃度 2~5 nM で導入した。48~72 時間後、上述の方法に従い、生細胞数を測定した。

NEK9 KD した SW480 細胞に NEK9 を過剰発現させた際、細胞増殖率がどのように変化するかを調べる実験方法を以下に示す。まず、NEK9 mRNA の 3'UTR 領域に標的配列を有する siRNA、siNEK9 #3 及び #4 を購入した (Sigma、表 5)。そして、siNEK9 #3 及び #4 に阻害されない NEK9 ORF を

コードする cDNA を発現するプラスミド DNA を購入し (Kazusa DNA Res. Inst. 図 7.3)、以下に示す方法で実験を行った。

24 well プレートに 5.0×10^4 cells/ml SW480 細胞を播種し、CO₂ インキュベーターで培養を行った。24 時間後、NEK9 遺伝子の 3'UTR を標的とする 2 種類の siRNA (#3 あるいは#4) もしくは Non-targeting siRNA (Thermo scientific) 最終濃度 5 nM となる量と、pHalo-NEK9 (ORF) もしくは pFN21A-Halo tag only (nc) を最終濃度 100 ng/well で同時に導入した。72 時間後、細胞をトリパンブルーで染色し、生細胞のみを Countess Automated Cell Counter (Invitrogen) で測定した。

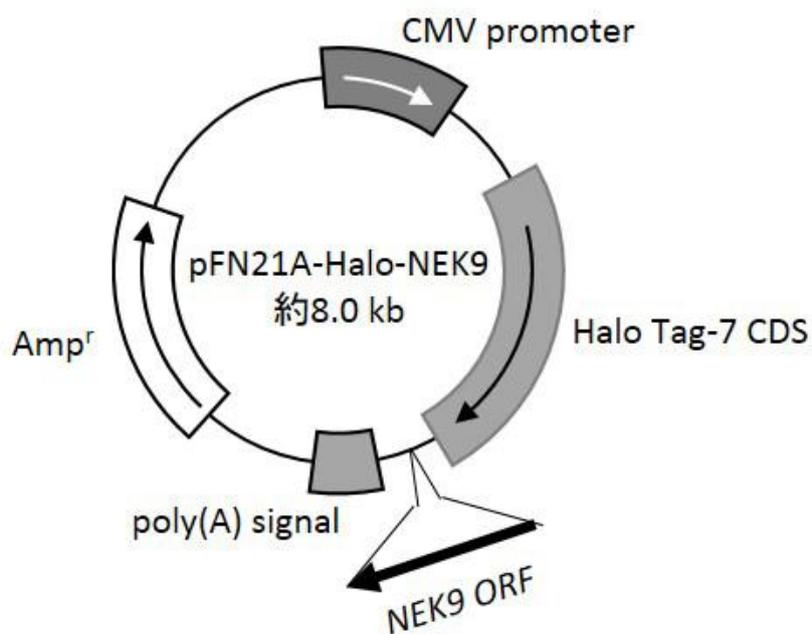


図 7.3 pHalo-NEK9 (ORF) の模式図

1.5 コロニー形成アッセイ

NEK9 KD させたがん細胞を 2 次元で培養した際のコロニー形成能を確かめるために以下の実験を行った。2 nM の NEK9 siRNA を導入した RKO 及び SW480 細胞を 6 well プレートに 200 cells/well 播種し、9 日間培養を行った。生成したコロニーは、0.5%の Crystal violet (Merck) で染色後観察した。

また、3 次元培養時のコロニー形成能を確かめるために、以下の実験を行った。6 well プレートに HCT116 及び SW480 細胞を 1.0×10^5 cells/ml 播種し、最終濃度 5 nM となるよう調整して NEK9 siRNA 及び Non-targeting siRNA (Thermo scientific) を導入した。24 時間後回収した細胞を、0.6%のアガロースを含む DMEM 培地に懸濁し、細胞を接着させないために 0.7%アガロースを含む DMEM 培地敷いた 6well プレートに 200 cells/well の濃度で再度播種した。10 日間培養後、形成されたコロニーを 0.1% Iodonitrotetrazolium chloride - methanol 溶液 (Sigma) で 1 時間染色し、観察した。

1.6 Xenograft を用いた細胞増殖アッセイ

6 週例のヌードマウス、メス (日本クレア) の背中に HCT116 及び SW480 細胞を 1.0×10^6 cells/site となるように移植した。3 日後、腫瘍が目視できる大き

さに成長したことを確認した後、Bonac で合成した siNEK9 を 1.5 nmol/site となるよう調整し、2 日置きに 5 回腫瘍に直接投与した (図 4.4)。siRNA の導入試薬は、in vivo-jet PEI (Polyplus Transfection) を用いた。siRNA を導入しはじめた日を Day 0 とし、Day 16 まで 2 日置きに腫瘍の大きさを計測した。腫瘍の大きさ (Volume: V) は、ノギスで腫瘍の長径 (Length: L) と短径 (Width: W) を計測し、 $V = (L \times W^2) \div 2$ という式で算出した。さらに、Day 0 の腫瘍の大きさを 100 とした場合の相対値としてグラフに示した。本実験プロトコルは、国立がん研究センター研究所の動物倫理委員会による承認のもと、国立がん研究センター研究所のガイドラインに基づいて遂行された。

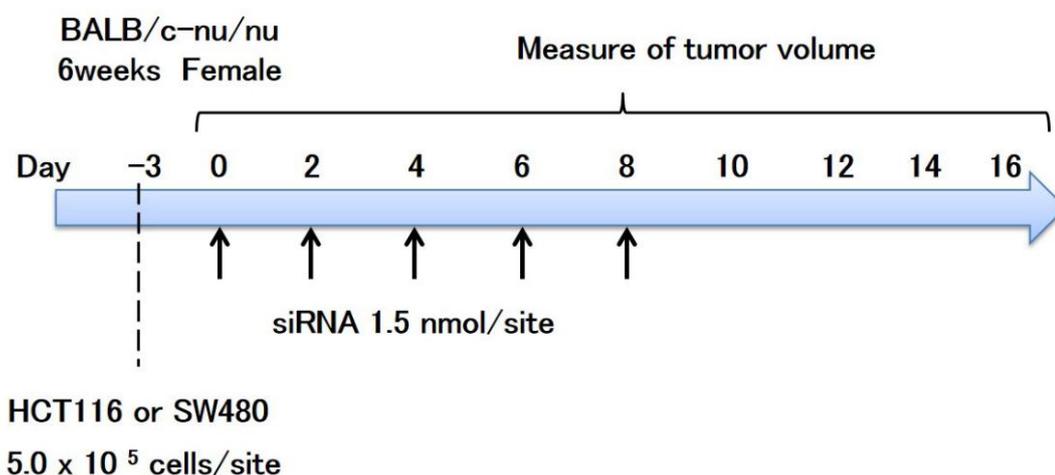


図 7.4 Time Schedule (動物実験) A)

1.7 NEK9 3'UTR を組み込んだベクターの作製及びビルシフェラーゼ活性の測定

SW480 細胞から DNeasy Blood and tissue kit (Qiagen) を用いて genomic DNA を抽出し、Primer3 Input (Ver. 4.0) bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/primer3/ で設計したプライマー (表 5) を用いて、*NEK9* 3'UTR 配列を PCR 法によって増幅させた。増幅産物を pCR2.1 TOPO Vector (Invitrogen) に導入し、シーケンサーによって配列を確認後、制限酵素 Kpn I、Xho I で切り出し、pmirGLO dual luciferase vector (Promega) に組み換え、pmirGLO-*NEK9* 3'UTR を合成した (図 7.5)。*NEK9* 3'UTR 内にある 4 つの *miR-22* binding site のうち、どこで *miR-22* と直接結合しているかを確認するために、pmirGLO-*NEK9* 3'UTR を鋳型とし、各種プライマー及び Prime STAR MAX high-fidelity DNA polymerase (Takara) を用いて、遺伝子変異を導入したレポータープラスミドを作製した。その際生じる塩基配列の変化を図 7.6 に示し、変異導入に使用した各プライマーの塩基配列は表 5 に示した。

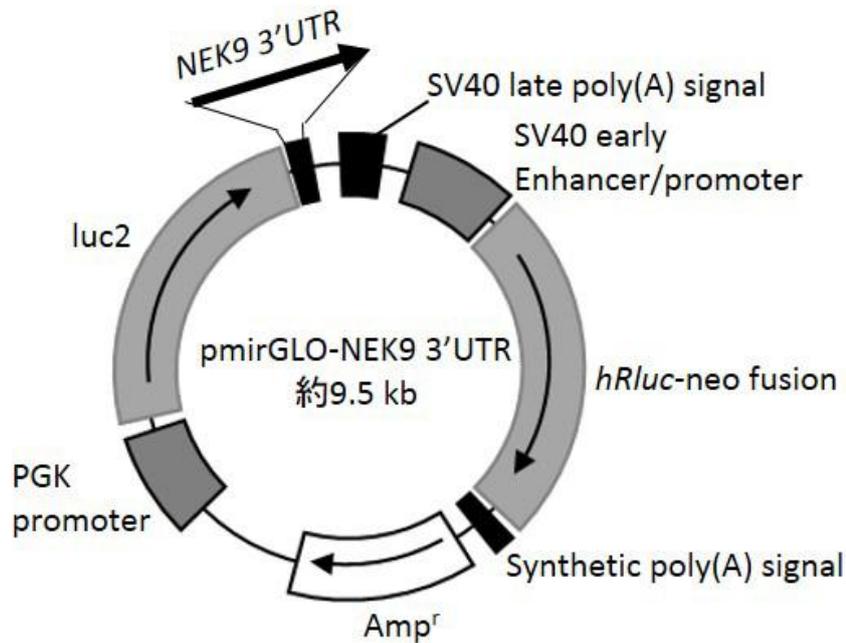


図 7.5 pmirGLO-NEK9 3'UTR の概略図

Site 1	3158	TTACCGAATGCAGAGAGCAGCTTT	3179	NEK9 mRNA
		TGTCAAGAAGTTGACCGTCGAA		miR-22
Mut 1	3158	TTACCGAATGCAGACTcgAGaTTT	3179	NEK9 mRNA
Site 2	3343	GACTGCCATAGCAACAGCAGCTCT	3164	NEK9 mRNA
		TGTCAAGAAGTTGACCGTCGAA		miR-22
Mut 2	3343	GACTGCCATAGCAACAGgAtCcCT	3164	NEK9 mRNA
Site 3	3415	CTTAATTGCGCTGGTAGCAGCTTA	3436	NEK9 mRNA
		TGTCAAGAAGTTGACCGTCGAA		miR-22
Mut 3	3415	CTTAATTGCGCTGGTAGtcGacTA	3436	NEK9 mRNA
Site 4	3666	AGTTCAGTTACTCTGTGCAGCTAA	3687	NEK9 mRNA
		TGTCAAGAAGTTGACCGTCGAA		miR-22
Mut 4	3666	AGTTCAGTTACTCTGTGgtaCcAA	3687	NEK9 mRNA

図 7.6 Mutagenesis による塩基配列の変化^{A)}

作製したベクターを用いて、ルシフェラーゼ活性の測定を以下の手順で行った。24 well プレートに SW480 及び HCT116 p53^{-/-} 細胞を 5.0×10^4 cells/ml で播種し、6 時間後に *miR-22* 及び miR-negative control を最終濃度 5 nM で導入した。48 時間後、lipofectamine 2000 (Invitrogen) 試薬を用いて作製したルシフェラーゼベクター 100 ng/well を細胞に導入し、さらに 24 時間培養した。細胞を passive lysis buffer (Promega) で溶解した後、ルシフェラーゼ活性を Dual luciferase assay kit (Promega) によって測定した。測定値は *Renilla* ルシフェラーゼ活性で補正した。

1.8 定量 RT-PCR

細胞から Total RNA を RNeasy kit (Qiagen) で回収後、Random hexamer primer と Super script III reverse transcriptase (Invitrogen) を用いて逆転写反応を行い、cDNA を合成した。合成した cDNA は、Taqman Universal Master Mix (ABI) 試薬及び各遺伝子に対するプライマープローブ (表 5) を用いて測定し、内在性のコントロールとして GAPDH 遺伝子の発現量を同時に測定した。mRNA の発現量は、相対定量 ($\Delta\Delta$ Ct) 法を用いて評価した。

1.9 Immunoblot 解析

細胞を溶解するために、20 mM Tris-HCl (pH 7.5)、150 mM NaCl、2 mM MgCl₂、1 mM DTT、0.5% NP-40、1 x Proteinase inhibitor cocktail (Roche) を加えた Cell lysis buffer を氷上で調製した。この Cell lysis buffer で細胞を溶解した後、Bradford 法でタンパク質を定量した。濃度調製後、細胞溶解液を、10~20% polyacrylamide gradient gel にアプライし、電気泳動を行った。PVDF membrane (Millipore) に転写した後、各種抗体 (表 5) を用いてウェスタンブロット解析を行った。検出試薬は、Super Signal West Dura Extended Duration Substrate (Thermo scientific) を用い、フィルムに現像して解析を行った。

1.10 フローサイトメトリーによる細胞周期解析

100 mm ディッシュに 5.0×10^4 cells/ml 細胞を播種し、最終濃度 5 nM となるように NEK9 siRNA 及び Non-targeting siRNA を導入した。72 時間後、90%のエタノールによって細胞を固定し、2.5 µg/ml の Propidium iodide (Sigma) で 4 °C 下、24 時間細胞の DNA を染色した。染色した細胞を Cell-strainer filter (BD Falcon) に通過させた後、Guava easy Cyte (Millipore) を用いてフローサイトメトリー解析を行った。得られたデータは、FlowJo (TOMY Digital Biology) というソフトウェアで処理した。

1.11 SA- β -galactosidase 染色

SW480 細胞を 35 mm glass base dish (Iwaki) に 1.0×10^4 cells/ml 播種し、最終濃度 5 nM となるよう調整して NEK9 siRNA 及び Non-targeting siRNA (Thermo scientific) を導入した。7 日間培養後、細胞を 2.5% Formaldehyde – PBS で 20 分間固定し、SA- β -galactosidase 染色を行った。また、SA- β -galactosidase 陽性細胞をフローサイトメトリーで定量化した。まず、上述と同様に 7 日間培養した SW480 細胞の培養上清を、最終濃度 33 μ M C₁₂FDG (Invitrogen) を含む培地に交換し、2 時間培養した。その後、細胞を回収し、1 ml の PBS に懸濁後、Cell-strainer filter (BD Falcon) で細胞塊を取り除き、EC800 Analyzer (SONY Biotechnology Inc.) でフローサイトメトリー解析を行った。

1.12 ヒト肺がん臨床検体を用いた解析

本研究で用いたヒト肺がん手術検体は、国立がんセンター中央病院で、インフォームドコンセントを得られた症例からのみ採取された。Whole-exome シーケンス解析は、Sure Select Human All-Exon kit (Agilent) を用いて行い、シーケンス解析は、Illumina HiSeq 2000 platform (Illumina) を使用して得

られた結果を元に、*TP53* の変異状態を評価した。手術検体の遺伝子発現解析には、Whole Genome DNA Microarrays (Agilent) を使用し、NEK9 の発現量を測定した。

免疫組織化学解析には、国立がんセンター中央病院で処置された肺腺がん (adenocarcinoma: ADC)、肺扁平上皮がん (squamous cell carcinoma: SQC)、肺大細胞神経内分泌がん (large cell neuroendocrine carcinoma: LCNEC) という3種の非小細胞肺がん及び小細胞肺がん (small cell lung cancer: SCLC) 由来の手術検体を用いて、tissue microarray 解析を遂行した。免疫染色に用いた抗体は、NEK9 (rabbit monoclonal antibody、EP7361、Epitomics) と p53 (mouse monoclonal antibody、DO-7、Dako) である。本実験は、国立がんセンターの施設内審査委員会に基づき施行された。

1.13 統計解析

本研究で行った実験は、両側 t 検定で統計処理を行った。臨床サンプルの解析に対しては、片側 t 検定を行った。また、本研究では、p 値が 0.05 未満の場合に対し統計的に有意な差があると判断した。

表5 本研究で使用したオリゴヌクレオチドの配列 A)

siRNA	Target nucleotide sequences
siHDAC6_1	5'-CCG GAG GGT CCT TAT CGT AGA-3'
siHDAC6_2	5'-CCG CAT TAT CCT TAT CCT AGA-3'
siHEXIM1_1	5'-CCG AGC CGA GAT GTT CGC CAA-3'
siHEXIM1_2	5'-CCC GAA AGA TAA GAA CTA CGA-3'
siCDC25B_1	5'-CAG GAG GCT GAG GAA CCT AAA-3'
siCDC25B_2	5'-TTG GGT TAA TAC CAG CTT AAA-3'
siSHC1_1	5'-CAC CTG ACC ATC AGT ACT ATA-3'
siSHC1_2	5'-TGG CTG CAT CCC AAC GAC AAA-3'
siNEK9_1	5'-CAG GTG TCA TGT GGT GAT GAT-3'
siNEK9_2	5'-TAC ACT TGG GTG AAC ATG CAA-3'
siRNA	Nucleotide sequences
siNEK6_1	5'-GGC UGU CUG CUG UAC GAG ATT-3', 5'-UCU CGU ACA GCA GAC AGC CCA-3'
siNEK6_2	5'-CAA CUG AAC CAC CCA AAU ATT-3', 5'-UAU UUG GGU GGU UCA GUU GCT-3'
siNEK7_1	5'-GAC CGG AUA UGG GCU AUA ATT-3', 5'-UUA UAG CCC AUA UCC GGU CGT-3'
siNEK7_2	5'-CCA GAA UGA UCA AGC AUU UTT-3', 5'-AAA UGC UUG AUC AUU CUG GAT-3'
siNEK9 #1 (Hs_NEK9_7838_s,7838_as)	5'-GUU AAA GUG UCU GGC UGA ATT-3', 5'-UUC AGC CAG ACA CUU UAA CTT-3'
siNEK9 #2 (Hs_NEK9_7839_s,7839_as)	5'-GAC UGA AGC ACC CAU UGC UTT-3', 5'-AGC AAU GGG UGC UUC AGU CTT-3'
Primer Name	Primer sequences
NEK9 3'UTR Fw	5'-CCA AAG AAC TTC ACA GCA CAC TT-3'
NEK9 3'UTR Rev	5'-ATA TGC TAG AGA AAA TGA CCA CAG C-3'
M13 Fw	5'-GTA AAA CGA CGG CCA G-3'
M13 Rev	5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3'
Mutagenesis NEK9 3' #1 Fw	5'-CAG ACT CGA GAT TTC CTG GCT TTG TTC AC-3'
Mutagenesis NEK9 3' #1 Rev	5'-GAA ATC TCG AGT CTG CAT TCG GTA AGT GT-3'
Mutagenesis NEK9 3' #2 Fw	5'-CAA CAG GAT CCC TGT ACC TCA TCT GTT GA-3'
Mutagenesis NEK9 3' #2 Rev	5'-ACA GGG ATC CTG TTG CTA TGG CAG TCA CT-3'
Mutagenesis NEK9 3' #3 Fw	5'-GGT AGT CGA CTA TAT CCC ATG TAT CAT TT-3'
Mutagenesis NEK9 3' #3 Rev	5'-ATA TAG TCG ACT ACC AGC GCA ATT AAG GT-3'
Mutagenesis NEK9 3' #4 Fw	5'-CTG TGG TAC CAA ATG CTT TAG GAG GAA AG-3'
Mutagenesis NEK9 3' #4 Rev	5'-CAT TTG GTA CCA CAG AGT AAC TGA ACT TT-3'
Gene Name	Probe sets and primers
CDC25B	Hs00244740_m1, (ABI)
HDAC6	Hs00195869_m1, (ABI)
HEXIM1	Hs00538918_s1, (ABI)
NEK9	Hs00929594_m1, (ABI)
SHC1	Hs00427539_m, (ABI)
GAPDH	Hs02758991_g1, (ABI)

参考文献

1. Vousden KH, Prives C. Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. *Cell* **137**, 413-431 (2009).
2. Fearon, E. R. & Vogelstein, B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* **61**, 759-767 (1990).
3. Harris SL, Levine AJ. The p53 pathway: positive and negative feedback loops. *Oncogene* **24**, 2899-2908 (2005).
4. Watson IR, Takahashi K, Futreal PA, Chin L. Emerging patterns of somatic mutations in cancer. *Nat Rev Genet* **14**, 703-18 (2013).
5. Muller PA, Vousden KH. p53 mutations in cancer. *Nat Cell Biol* **15**, 2-8 (2013).
6. Vousden KH, Prives C. P53 and prognosis: new insights and further complexity. *Cell* **120**, 7-10 (2005).
7. Freed-Pastor WA, Prives C. Mutant p53: one name, many proteins. *Genes Dev* **26**, 1268-86 (2012).
8. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* **116**, 281-97 (2004).
9. Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer* **6**, 857-66 (2006).
10. van Kouwenhove M, Kedde M, Agami R. MicroRNA regulation by RNA-binding

- proteins and its implications for cancer. *Nat Rev Cancer* **11**, 644-56 (2011).
11. Hermeking H. MicroRNAs in the p53 network: micromanagement of tumour suppression. *Nat Rev Cancer* **12**, 613-26 (2012).
 12. Lujambio A, Lowe SW. The microcosmos of cancer. *Nature* **482**, 347-55 (2012).
 13. He L, He X, Lim LP, de Stanchina E, Xuan Z, Liang Y, et al. A microRNA component of the p53 tumour suppressor network. *Nature* **447**, 1130-4 (2007).
 14. Raver-Shapira N, Marciano E, Meiri E, Spector Y, Rosenfeld N, Moskovits N, et al. Transcriptional activation of miR-34a contributes to p53-mediated apoptosis. *Mol Cell* **26**, 731-43 (2007).
 15. Tazawa H, Tsuchiya N, Izumiya M, Nakagama H. Tumor-suppressive miR-34a induces senescence-like growth arrest through modulation of the E2F pathway in human colon cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 15472-7 (2007).
 16. Leung, A. K. & Sharp, P. A. MicroRNA functions in stress responses. *Molecular cell* **40**, 205-215 (2010).
 17. Kosaka, N. *et al.* Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells. *J Biol Chem* **285**, 17442-17452 (2010).
 18. Ogata-Kawata, H. *et al.* Circulating exosomal microRNAs as biomarkers of colon cancer. *PloS one* **9**, e92921 (2014).

19. Tsuchiya N, Izumiya M, Ogata-Kawata H, Okamoto K, Fujiwara Y, Nakai M, et al. Tumor suppressor miR-22 determines p53-dependent cellular fate through post-transcriptional regulation of p21. *Cancer Res* **71**, 4628-39 (2011).
20. Tan BC, Lee SC. Nek9, a novel FACT-associated protein, modulates interphase progression. *J Biol Chem* **279**, 9321-30 (2004).
21. Debaq-Chainiaux F, Erusalimsky JD, Campisi J, Toussaint O. Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-beta-gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. *Nat Protoc* **4**, 1798-806 (2009).
22. McDonald ER, 3rd, Wu GS, Waldman T, El-Deiry WS. Repair Defect in p21 WAF1/CIP1 -/- human cancer cells. *Cancer Res* **56**, 2250-5 (1996).
23. Abbas T, Dutta A. p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nat Rev Cancer* **9**, 400-14 (2009).
24. Comes F, Matrone A, Lastella P, Nico B, Susca FC, Bagnulo R, et al. A novel cell type-specific role of p38alpha in the control of autophagy and cell death in colorectal cancer cells. *Cell Death Differ* **14**, 693-702 (2007).
25. Wagner EF, Nebreda AR. Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nat Rev Cancer* **9**, 537-49 (2009).
26. Paillas S, Causse A, Marzi L, de Medina P, Poirot M, Denis V, et al.

- MAPK14/p38alpha confers irinotecan resistance to TP53-defective cells by inducing survival autophagy. *Autophagy* **8**, 1098-112 (2012).
27. Iggo R, Gatter K, Bartek J, Lane D, Harris AL. Increased expression of mutant forms of p53 oncogene in primary lung cancer. *Lancet* **335**, 675-9 (1990).
28. Kandoth C, McLellan MD, Vandin F, Ye K, Niu B, Lu C, et al. Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *Nature* **502**, 333-9 (2013).
29. Belham C, Roig J, Caldwell JA, Aoyama Y, Kemp BE, Comb M, et al. A mitotic cascade of NIMA family kinases. Nercc1/Nek9 activates the Nek6 and Nek7 kinases. *J Biol Chem* **278**, 34897-909 (2003).
30. Richards MW, O'Regan L, Mas-Droux C, Blot JM, Cheung J, Hoelder S, et al. An autoinhibitory tyrosine motif in the cell-cycle-regulated Nek7 kinase is released through binding of Nek9. *Mol Cell* **36**, 560-70 (2009).
31. Sdelci S, Bertran MT, Roig J. Nek9, Nek6, Nek7 and the separation of centrosomes. *Cell cycle* **10**, 3816-7 (2011).
32. Yang SW, Gao C, Chen L, Song YL, Zhu JL, Qi ST, et al. Nek9 regulates spindle organization and cell cycle progression during mouse oocyte meiosis and its location in early embryo mitosis. *Cell cycle* **11**, 4366-77 (2012).
33. Roig J, Mikhailov A, Belham C, Avruch J. Nercc1, a mammalian NIMA-family

- kinase, binds the Ran GTPase and regulates mitotic progression. *Genes Dev* **16**, 1640-58 (2002).
34. O'Regan L, Fry AM. The Nek6 and Nek7 protein kinases are required for robust mitotic spindle formation and cytokinesis. *Mol Cell Biol* **29**, 3975-90 (2009).
35. Rapley J, Nicolas M, Groen A, Regue L, Bertran MT, Caelles C, et al. The NIMA-family kinase Nek6 phosphorylates the kinesin Eg5 at a novel site necessary for mitotic spindle formation. *J Cell Sci* **121**, 3912-21 (2008).
36. Bertran MT, Sdelci S, Regue L, Avruch J, Caelles C, Roig J. Nek9 is a Plk1-activated kinase that controls early centrosome separation through Nek6/7 and Eg5. *EMBO J* **30**, 2634-47 (2011).
37. Sdelci S, Schutz M, Pinyol R, Bertran MT, Regue L, Caelles C, et al. Nek9 phosphorylation of NEDD1/GCP-WD contributes to Plk1 control of gamma-tubulin recruitment to the mitotic centrosome. *Cur Biol* **22**, 1516-23 (2012).
38. Sur S, Pagliarini R, Bunz F, Rago C, Diaz LA, Jr., Kinzler KW, et al. A panel of isogenic human cancer cells suggests a therapeutic approach for cancers with inactivated p53. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 3964-9 (2009).
39. Roig J, Groen A, Caldwell J, Avruch J. Active Nercc1 protein kinase concentrates at centrosomes early in mitosis and is necessary for proper spindle assembly. *Mol Biol*

Cell **16**, 4827-40 (2005).

40. Muller PA, Vousden KH. Mutant p53 in Cancer: New Functions and Therapeutic Opportunities. *Cancer Cell* **25**, 304-17 (2014).

41. Brown CJ, Lain S, Verma CS, Fersht AR, Lane DP. Awakening guardian angels: drugging the p53 pathway. *Nat Rev Cancer* **9**, 862-73 (2009).

42. Cheok CF, Verma CS, Baselga J, Lane DP. Translating p53 into the clinic. *Nat Rev Clin Oncol* **8**, 25-37 (2011).

付記

本論文の内容は、下記に示す投稿論文より構成される。

A) D. Kurioka, F. Takeshita, K. Tsuta, H. Sakamoto, S. Watanabe, et al.

NEK9-dependent proliferation of cancer cells lacking functional p53. *Scientific Reports*

4: 6111, 2014

B) H. Ogata-Kawata, M. Izumiya, D. Kurioka, Y. Honma, Y. Yamada, et al. *Circulating*

Exosomal microRNAs as Biomarkers of Colon Cancer. *PLoS ONE* 9(4):e92921, 2014

謝辞

本論文作成にあたり、終始熱心なご指導ご鞭撻をいただいた横浜国立大学大学院工学府 渡邊昌俊教授に感謝の意を表します。

査読していただいた横浜国立大学大学院工学府 上ノ山 周 教授、栗原 靖之教授、鈴木 敦 准教授、横浜市立大学医学研究科医科学専攻分子病理学の青木 一郎教授に深く感謝しております。

実験を行うにあたり、独立行政法人国立がん研究センター研究所 ゲノム生物学研究分野の土屋直人ユニット長、河野隆志分野長、多段階発がん研究分野横田淳分野長、中釜斉研究所長には、論文の構成や実験結果の解釈など、細部にわたるご指導をいただきました。ここに感謝いたします。

独立行政法人国立がん研究センター研究所 難治がん研究分野の江成政人ユニット長にプラスミドを提供していただきました。

そして、共同研究者である独立行政法人国立がん研究センター研究所、分子細胞治療分野の落谷孝広分野長、竹下文隆研究員、遺伝医学研究分野の坂本裕美ユニット長、独立行政法人国立がん研究センター中央病院 病理部の蔦幸治先生、呼吸器外科の渡辺俊一先生、国立成育医療センター 免疫アレルギー研究部の松本健治先生には技術的な指導をしていただきました。深く感謝いたします。

更に研究生生活において、公私共々お世話になった、国立がん研究センター研究所ゲノム生物学研究分野の方々、発がんシステム研究分野の方々、旧国立がんセンター研究所生化学部の方々、並びに横浜国立大学渡邊昌俊研究室の諸先輩方、後輩諸子に感謝いたします。

最後に、長期間にわたり、経済的にも精神的にも支えてくれた家族に感謝の意を申し上げたいと思います。ありがとうございました。

栗岡 大輔