

学位論文題名

Activation of CDCA1-KNTC2, Members of Centromere Protein Complex, Involved in Pulmonary Carcinogenesis

(非小細胞肺癌の悪性化に関与する
CDCA1-KNTC2 Centromere 複合体の機能解析)

学位論文内容の要旨

【緒言】

肺癌は本邦における癌死の第1位を占めており、あらゆる集学的治療に対して難治性で、新規の画期的な治療薬の開発は急務であると考えられる。そこで我々は肺癌の80%を占める非小細胞肺癌において、高頻度に発現が増加している新規遺伝子を同定し、その機能解析により新規治療法につながる分子標的を見出すことを本研究の目的とした。新規分子標的抽出のため、我々は27,648遺伝子からなるcDNAマイクロアレイを利用して非小細胞肺癌の網羅的遺伝子発現情報解析を行い、肺癌組織において高頻度に高いレベルで発現している遺伝子を抽出した。さらに、siRNAをもちいた遺伝子発現阻害実験とともに約300症例の肺癌組織アレイをもちいた免疫組織学的検討を行うことにより、新規治療薬開発へ向けた標的遺伝子抽出のためのhigh-throughput screeningを行った。その結果、正常臓器組織では精巣においてのみ発現し、癌発症に重要な働きをしていると考えられるCDCA1およびその相互作用する蛋白KNTC2を同定した。

CDCA1 と KNTC2 は Spindle checkpoint に関与する Ndc80 complex の member として酵母において同定された遺伝子である。その後、ヒトにおける homologue が同定されたが、これまで癌での報告はなされていない。そこで今回我々は、CDCA1-KNTC2 複合体の新規肺癌治療のための機能解析を行った。

【対象と方法】

肺癌組織 sample: 北海道大学病院腫瘍外科およびその関連病院においてインフォームドコンセントの得られた非小細胞肺癌患者から手術切除された癌組織 282 症例とそれぞれの症例に対応した非癌部組織を対象として、免疫組織学的検討を行った。同様にしてインフォームドコンセントの得られた非小細胞肺癌患者由来の sample を用いて全 RNA を抽出し、逆転写反応を行うことにより得られた cDNA を用いて半定量的 RT-PCR を行った。

免疫組織学的検討: 抗体は rabbit に免疫した anti CDCA1 polyclonal 抗体と市販の anti KNTC2 抗体(abcam)をもちいた。肺癌組織アレイの判定は3名の臨床情報未知の医師の判定により行い StatView statistical program (SaS)により log rank test を用いて p value 0.05 以下を優位差ありと判定した。

細胞膜透過性 peptide: CDCA1 の KNTC2 に対する結合部位を含む 19 あるいは 20 アミノ酸と、その N 末端側に 11 個のアルギニン配列を付加した peptide を合成した。HPLC 法により精製し純度 95%以上であることを確認した後、検討を行った。

【結果】

マイクロアレイデータより抽出した Cell division associated1(CDCA1)-kinetochore associated2(KNTC2)は正常肺で全く発現を認めず、癌組織において mRNA 及び蛋白レベルで連動して癌部で高いレベルで発現している分子であることが肺癌臨床検体をもちいた半定量的 RT-PCR、肺癌細胞株での Western blotting により示された。Multiple tissue northern 法により、この2つの分子は正常臓器においては精巣においてのみ発現しており、癌-精巣抗原であることが示された。

LC319 をもちいて siRNA による発現阻害実験を施行したところ、knock down 効果を認めたこの二つの遺伝子に対する siRNA の導入により、それぞれ細胞増殖抑制効果を認めた。

また、282 症例の肺癌組織アレイで免疫組織染色による検討では、肺癌組織において連動してこれらの蛋白が発現しており、さらにこれらの蛋白を高いレベルで発現する症例の予後は有意に不良であることが示された。以上より、この複合体が肺癌細胞の悪性化に関与し、かつ有望な治療標的であると考えられた。

そこで、肺癌治療のための機能解析のため、9つの CDCA1 の deletion mutant を作製し、KNTC2 との結合に重要な部位の同定を行った。検討の結果、368-416 番の 49 アミノ酸が結合に非常に重要であることが示された。

この検討で明らかとした 49 アミノ酸からなる配列を基に、この複合体の結合を特異的に阻害する 4つの細胞膜透過性 PEPTID を作製した。LC319 に 398-416 番の配列を基に作製した peptide(CDCA1 peptide)の導入を行ったところ、CDCA1-KNTC2 の結合は効果的に阻害され、その結果、非投与、或いは control の scramble peptide 投与と比べ、dose dependant な細胞増殖抑制効果が認められた。一方、この複合体の低発現株であるヒト繊維芽細胞由来株 MRC5 においては増殖抑制効果は認められなかった。

【考察】

我々は新規分子標的治療薬開発のためのマイクロアレイシステムを用いて、癌-精巣抗原、CDCA1 と相互作用する蛋白、KNTC2 を同定した。CDCA1 と KNTC2 は細胞分裂の制御に関与する遺伝子であることがこれまで示されているが、癌組織においては細胞周期に関与する多数の分子の発現異常があり、これらの一部は新規分子標的として創薬の対象となっている。すなわち、Aurora kinase 阻害剤の ZM447439、Hesperadin、VX-680 などである。肺癌組織アレイをもちいた検討ではこれらの分子が癌部において連動して発現しており、これらを高いレベルで発現する症例の予後は有意に不良であることが示された。さらに、siRNA による検討でこれらの転写産物の減少と一致して癌細胞の増殖抑制がみられたことから、この二つの分子が協調して肺癌の悪性化に関与していることが類推された。

肺癌治療において、強力な効腫瘍活性とともに最小限の副作用にとどまる新たな治療薬の開発が望まれているが、我々は細胞周期を制御する CDCA1-KNTC2 complex が新規肺癌治療標的として有望と考え、さらなる機能解析を行った。CDCA1 の dominant negative 体及び細胞膜透過性 peptide を肺癌細胞に導入することすなわちこの複合体の結合阻害によりその増殖が抑制されることを初めて明らかとした。細胞膜透過性 peptide の導入により 24 時間後に G2/M arrest が誘導され、120 時間後に sub-G1 fraction の増加が見られた。このことから細胞膜透過性 peptide の導入により肺癌細胞に分裂停止とそれ引き続いた apoptosis が惹起されたものと考えられた。今日まで、kinesin inhibitor や taxane 投与により、分裂期停止に引き続いて apoptosis を惹起する pathway が報告されている。しかしながら、その詳細は未だ明らかとなっておらず、CDCA1-KNTC2 の結合阻害が癌細胞に apoptosis を誘導する系の解析は、新規肺癌治療薬開発の上で、非常に重要であろう。

最後に、細胞膜透過性 peptide について。細胞膜透過性 peptide は 20 アミノ酸前後の標的となる peptide 配列に細胞膜透過性ドメインとして polyarginine repeat を付加した peptide で、効果的に細胞膜を通過し、細胞内に取り込まれることが報告されている。癌細胞選択的殺傷と正常細胞への無毒及び非作用性は癌治療薬とし

て最も望ましいが、我々が行ったCDCA1由来の細胞膜透過性peptideをもちいた検討では、CDCA1-KNTC2複合体の結合を効果的に阻害し、正常細胞にまったく影響を与えずに癌細胞の増殖を抑制した。従って、このCDCA1-KNTC2複合体を標的とした阻害剤は、新規肺癌治療薬として理想的な阻害剤になりうると考えられた。

【結語】

CDCA1-KNTC2複合体は正常組織では精巣にのみ発現している癌精巣抗原である。この複合体は肺癌細胞の増殖、生存に極めて重要であると考えられた。今回の研究でCDCA1-KNTC2を標的とした低分子化合物、及び細胞膜透過性peptideは新規肺癌治療薬開発に有望であることが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 秋 田 弘 俊
副 査 教 授 今 村 雅 寛
副 査 教 授 近 藤 哲

学 位 論 文 題 名

Activation of CDCA1-KNTC2, Members of Centromere Protein Complex, Involved in Pulmonary Carcinogenesis

(非小細胞肺癌の悪性化に関与する
CDCA1-KNTC2 Centromere 複合体の機能解析)

肺癌は本邦における癌死の第1位を占めており、あらゆる集学的治療に対して難治性で、新規の画期的な治療薬の開発は急務であると考えられる。新規治療法につながる分子標的を見出すことを目的として、27,648遺伝子からなるcDNAマイクロアレイを利用して非小細胞肺癌の網羅的遺伝子発現情報解析を行い、肺癌組織において高頻度に高いレベルで発現している遺伝子を抽出した。さらに、siRNAをもちいた遺伝子発現阻害実験とともに約300症例の肺癌組織アレイをもちいた免疫組織学的検討を行うことにより、新規治療薬開発へ向けた標的遺伝子抽出のためのhigh-throughput screeningを行った。その結果、正常臓器組織では精巣においてのみ発現し、癌発症に重要な働きをしていると考えられるCDCA1およびこれに相互作用する蛋白KNTC2を同定した。

CDCA1 と KNTC2 は Spindle checkpoint に関与する Ndc80 complex の member として酵母において同定された遺伝子である。その後、ヒトにおける homologue が同定されたが、これまで癌での報告はなされていない。そこで今回我々は、CDCA1-KNTC2 複合体の新規肺癌治療のための機能解析を行った。

北海道大学病院腫瘍外科およびその関連病院においてインフォームドコンセントの得られた非小細胞肺癌患者から手術切除された癌組織 282 症例とそれぞれの症例に対応した非癌部組織を対象として、免疫組織学的検討を行った。同様にインフォームドコンセントの得られた非小細胞肺癌患者由来の sample を用いて全 RNA を抽出し、逆転写反応を行うことにより得られた cDNA を用いて半定量的 RT-PCR を行った。

免疫組織学的検討の抗体は rabbit に免疫した anti CDCA1 polyclonal 抗体と市販の anti KNTC2 抗体(abcam)をもちいた。肺癌組織アレイの判定は3名の臨床情報未知の医師の判定により行い StatView statistical program (SaS)により log rank test を用いて p value 0.05 以下を優位差ありと判定した。

CDCA1 の KNTC2 に対する結合部位を含む 19 あるいは 20 アミノ酸と、その N 末端側に 11 個のアルギニン配列を付加した細胞膜透過性 peptide を合成した。HPLC 法により精製し純度 95%以上であることを確認した後、検討を行った。

マイクロアレイデータより抽出した Cell division associated1(CDCA1)-kinetochore associated2(KNTC2)は正常肺で全く発現を認めず、癌組織において mRNA 及び蛋白レベルで連動して癌部で高いレベルで発現している分子であることが肺癌臨床検体をもちいた半定量的 RT-PCR、肺癌細胞株での Western blotting により示

された。Multiple tissue Northern 法により、この2つの分子は正常臓器においては精巣においてのみ発現しており、癌-精巣抗原であることが示された。

LC319 をもちいて siRNA による発現阻害実験を施行したところ、knock down 効果を認めたこの二つの遺伝子に対する siRNA の導入により、それぞれ細胞増殖抑制効果を認めた。

また、282 症例の肺癌組織アレイで免疫組織染色による検討では、肺癌組織において連動してこれらの蛋白が発現しており、さらにこれらの蛋白を高いレベルで発現する症例の予後は有意に不良であることが示された。以上より、この複合体が肺癌細胞の悪性化に関与し、かつ有望な治療標的であると考えられた。

そこで、肺癌治療のための機能解析のため、9つの CDCA1 の deletion mutant を作製し、KNTC2 との結合に重要な部位の同定を行った。検討の結果、368-416 番の 49 アミノ酸が結合に非常に重要であることが示された。

この検討で明らかとした 49 アミノ酸からなる配列を基に、この複合体の結合を特異的に阻害する 4 つの細胞膜透過性 peptide を作製した。LC319 に 398-416 番の配列を基に作製した peptide の導入を行ったところ、CDCA1-KNTC2 の結合は効果的に阻害され、その結果、非投与、或いは control の scramble peptide 投与と比べ、dose dependent な細胞増殖抑制効果が認められた。一方、この複合体の低発現株であるヒト線維芽細胞由来株 MRC5 においては増殖抑制効果は認められなかった。細胞膜透過性 peptide の導入により 24 時間後に G2/M arrest が誘導され、120 時間後に sub-G1 fraction の増加が見られた。このことから細胞膜透過性 peptide の導入により肺癌細胞に分裂停止とそれ引き続いた apoptosis が惹起されたものと考えられた。今日まで、kinesin inhibitor や taxane 投与により、分裂期停止に引き続いて apoptosis を惹起する passway が報告されている。しかしながら、その詳細は未だ明らかとなつてはならず、CDCA1-KNTC2 の結合阻害が癌細胞に apoptosis を誘導する系の解析は、新規肺癌治療薬開発の上で、非常に重要であろう。

また、CDCA1 由来の細胞膜透過性 peptide をもちいた検討では、CDCA1-KNTC2 複合体の結合を効果的に阻害し、正常細胞にまったく影響を与えずに癌細胞の増殖を抑制した。従って、この CDCA1-KNTC2 複合体を標的とした阻害剤は、新規肺癌治療薬として理想的な阻害剤になりうると考えられた。

口頭発表に続いて副査近藤教授より、CDCA1-KNTC2 の結合阻害に 11R のような細胞膜透過性 domain が必要な理由、骨髄における KNTC2 のわずかな発現が臨床応用の際に副作用として問題になることはないか、肺癌組織アレイにおいてこの二つの蛋白の発現が 100% 一致しない理由について質問があった。続いて副査今村教授より、正常で精巣に発現している二つの分子が肺癌で高発現している理由、細胞周期に関連した遺伝子が高発現した際に apoptosis に対する抵抗性など悪性化に与える具体的影響、細胞膜透過性 peptide について in vivo での検討、全身投与での効果と毒性について質問があった。最後に主査秋田教授より、非小細胞肺癌以外の癌種における CDCA1-KNTC2 の発現と治療応用の可能性、CDCA1-KNTC2 の細胞内局在、point mutation の有無、これらの分子に対する免疫治療の可能性について、質問があった。いずれの質問に対しても、申請者は主旨をよく理解し自らの研究データと文献的考察を混じえて適切に解答した。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士 (医学) の学位を受けるのに十分な資格を有すると判定した。