

論文の内容の要旨

論文題目 新規ストレス応答性チェックポイントキナーゼ MARK3 の同定と高異型度卵巣漿液性がんにおける機能異常に関する研究

氏名 町野 英徳

序文

高異型度卵巣漿液性がんは、卵巣がんによる死亡者数の 70–80% を占める最も悪性度の高い組織型である。この組織型の内、約半数の相同組み換え修復異常を有するサブタイプにはプラチナ製剤や PARP 阻害剤が奏功するが、残りの半数の相同組み換え修復異常を有さないサブタイプは高頻度に化学療法抵抗性を示すため、新しい治療法の開発が求められている。

高異型度卵巣漿液性がんには、ほぼ全例に *TP53* の不活性化型変異と約 2/3 に RB1 経路の機能異常が認められ、化学療法抵抗性を示すサブタイプには高頻度に *CCNE1* 増幅が発生する。これらのゲノム異常は細胞周期の G1/S 期チェックポイントを破綻させ、高異型度卵巣漿液性がんの活発な細胞増殖を可能にしていると考えられる。一方で、*TP53* 変異をもつがん細胞は代償的に ATR-CHEK1 経路による DNA 損傷応答性 G2/M 期チェックポイントを活性化させていると考えられており、このような状況で高異型度卵巣漿液性がんが G2/M 期チェックポイントを回避している分子機構は十分には解明されていない。

LKB1 は Peutz-Jeghers 症候群の原因遺伝子として知られるがん抑制遺伝子であり、AMPK と AMPK-related kinase を活性化する機能をもつ。MARK3 は AMPK-related kinase に分類され、CDC25C のリン酸化を介して G2/M 期停止を誘導するとされる。LKB1-MARK3 経路による細胞周期制御の機序について検討した報告は非常に限られており、がん細胞における役割も不明である。本研究では、高異型度卵巣漿液性がん LKB1-MARK3 経路の分子が発現抑制されていることを示し、その臨床的意義を検討したい。

方法

公的データベースを利用して、高異型度卵巣漿液性がんと正常卵巣組織の遺伝子発現データを含む複数のコホート GSE18521、GSE26712、TCGA、GTEx の統合解析を実施した。東京大学医学部附属病院および国立がん研究センターで手術により採取された高異型度卵巣漿液性がんの腫瘍検体を用いて RT-qPCR、免疫組織化学染色を行った。Western blotting で蛋白発現解析を行った。MARK3 を Doxycycline (DOX) 誘導性に強制発現あるいは knockout する細胞株を作成し機能解析に用いた。Colony formation assay と Cell viability assay で *in vitro* における MARK3 の腫瘍増殖抑制効果を評価した。RNA-seq 解析を行い、卵巣がん細胞株 OVCAR3 に MARK3 を強制発現させた際の発現変動遺伝子を抽出し、KEGG pathway 解析、Gene ontology (GO) 解析、Ingenuity pathways analysis

(IPA) を実施した。リン酸化モチーフ解析を行い、MARK3 の新規基質候補を同定した。リコンビナントの MARK3 と CDC25B を用いて *in vitro* kinase assay を実施した。EGFP タグ付加 CDC25B 野生型と S323A 変異型の発現ベクターを作成し、MARK3 強制発現による CDC25B の細胞局在の変化を評価した。MARK3 DOX-inducible OVCAR3 を用いてマウス皮下移植実験を行い、*in vivo* における MARK3 の腫瘍増殖抑制効果、血管新生阻害効果を評価した。

結果

(1) 遺伝子発現解析による高異型度卵巣漿液性がん関連遺伝子 *MARK3* の同定

高異型度卵巣漿液性がんが低点突然変異と高コピー数変化のゲノムプロファイルをもつことに着目し、遺伝子発現解析による新規がん関連遺伝子のスクリーニングを実施した。Human ovarian surface epithelium (HOSE) と High-grade serous ovarian carcinoma (HGSOC) のマイクロアレイデータを保有する二つの独立したコホート GSE18521 (HOSE 10 検体、HGSOC 53 検体)、GSE26712 (HOSE 10 検体、HGSOC 185 検体) を解析に使用した。二つのデータセット間で重複して出現する発現変動遺伝子の内、TCGA コホートで遺伝子発現量と臨床予後の間に有意な相関が認められる遺伝子を抽出したところ、*BNC1* と *MARK3* が同定された。

BNC1 と *MARK3* はいずれも高異型度卵巣漿液性がんが発現抑制されていた。*BNC1* が主にプロモーター領域の DNA メチル化によって発現抑制されているのに対し、*MARK3* はコピー数減少とヒストン脱アセチル化酵素を介したエピジェネティック制御によって発現抑制されていると考えられた。*MARK3* の発現低下は無増悪生存期間の短縮、プラチナ抵抗性の獲得と相関しており、がんの高悪性度に寄与している可能性があるため、以後の研究では *MARK3* の詳細な機能解析を実施することに決定した。

最初に、*in silico* 解析の再現性を検証した。正常組織 (卵管、卵巣) と腫瘍組織を用いて RT-qPCR と免疫組織化学染色を行い、*MARK3* が正常組織と比較して腫瘍組織で発現低下していることを確認した。多くの卵巣がん細胞株でも *MARK3* の遺伝子発現量、蛋白発現量は低下していた。

(2) 高異型度卵巣漿液性がんにおける *MARK3* の抗腫瘍効果

MARK3 の腫瘍増殖抑制効果を評価するため Colony formation assay と Cell viability assay を行った。*MARK3* DOX-inducible OVCAR3 と *MARK3* DOX-inducible CaOV3 では、*MARK3* の強制発現に応じて腫瘍増殖が有意に抑制された。

MARK3 が卵巣がん細胞に与える影響を網羅的に解析するため、RNA-seq 解析を行い、OVCAR3 に *MARK3* を強制発現させた際の発現変動遺伝子 (発現上昇 1687 個、発現低下 1885 個) を抽出した。発現低下遺伝子群の解析では、KEGG pathway 解析で Cell cycle 経路が、GO 解析では cell-cell adhesion、cell proliferation 等の機能が抽出された。発現上昇遺伝子群の解析では、KEGG pathway 解析で Lysosome 経路が、GO 解析では extracellular matrix organization、translational initiation 等の機能が抽出された。以後

の研究では、MARK3 がこれらの経路や機能に影響する機序を探索することにした。

(3) MARK3 の新規基質の発見とストレス応答の証明

MARK3 の新規基質を同定するために、MARK3 の既知基質のアミノ酸配列情報を利用してリン酸化モチーフ解析を行い、11 種類の未報告の基質候補を同定した。MARK3 は CDC25C をリン酸化してその核内移行を阻害することが知られていたが、今回の解析では CDC25C (serine 216) に加えて CDC25B (serine 323) が新規基質候補として抽出された。MARK3 は CDC25B と CDC25C の両方を阻害することで G2/M 期移行を全般的に制御している可能性があるため、MARK3 による CDC25B の制御について機能解析を行うことにした。

リコンビナントの MARK3 と CDC25B を用いて *in vitro* kinase assay を実施したところ、MARK3 のキナーゼ活性依存的に CDC25B serine 323 のリン酸化が増強した。また、MARK3 を強制発現させた細胞内環境でも CDC25B serine 323 のリン酸化が増強した。EGFP タグ付加 CDC25B 野生型と S323A 変異型の発現ベクターを作成し、MARK3 DOX-inducible 293T にトランスフェクションして、MARK3 の強制発現による CDC25B の細胞局在の変化を評価したところ、CDC25B 野生型では MARK3 の強制発現によって核内局在が減少し、細胞質局在が増加したが、CDC25B S323A 変異型ではこの変化は認められなかった。MARK3 自体は主に細胞質に局在しているため、MARK3 は CDC25B serine 323 をリン酸化して CDC25B の核内移行を阻害する機能をもつと考えられた。

次に、各種のストレス誘導物質 (DNA 損傷、蛋白合成阻害、小胞体ストレス、酸化ストレス、サイトカイン) を用いたスクリーニングを行い、ストレスに対する MARK3 の活性化機序を探索したところ、蛋白合成阻害剤 Anisomycin と小胞体ストレス誘導物質 Thapsigargin に反応して MARK3 が活性化することが明らかになった。MARK3 を活性化させる上流因子を同定するために、ストレス応答性キナーゼの阻害実験を行ったところ、MARK3 の直接的な活性化キナーゼ LKB1 またはストレス応答性キナーゼ p38 を阻害した場合に、Anisomycin に応答する MARK3 の活性化が生じなくなった。MARK3 の knockout は卵巣がん細胞に対する Anisomycin と Thapsigargin による抗腫瘍効果を増強した。以上の結果から、MARK3 は蛋白翻訳制御の異常に関わるストレスに応答して p38 によるシグナル伝達と LKB1 依存的に活性化するチェックポイントキナーゼであると考えられた。

(4) MARK3 が Hippo signaling に与える影響の検討

LKB1-MARK3 経路が MST1/2 等のがん抑制遺伝子と相互作用して Hippo signaling に関与することは複数の先行研究が示していたが、その効果として Hippo signaling を促進するのか抑制するのかという点については結論が一致していなかった。本研究で実施した RNA-seq 解析では、卵巣がん細胞に対する MARK3 の強制発現に伴い細胞間接着や細胞外マトリックス等、Hippo signaling と関連が深い経路が影響を受けることを示していた。MARK3 は Hippo signaling の活性化を介して卵巣がん細胞に抗腫瘍効果を及ぼして

いる可能性があり、この仮説を検証することにした。

Hippo signaling によって発現抑制される遺伝子セット Hippo signature genes を公的データベースから取得した。卵巣がん細胞に MARK3 を強制発現した際に出現した発現変動遺伝子群の中で Hippo signature genes の分布を確認すると、Hippo signature genes は上位の発現低下遺伝子群に強く濃縮していることが明らかになった。IPA 解析では、MARK3 の強制発現に伴い MYC の機能的阻害や、Hippo signaling によって不活性化される YAP/TAZ、TEAD 等の機能的阻害が生じていることが示された。Western blotting で検証を行い、MARK3 の強制発現によって YAP の阻害的リン酸化が増強すること、MYC や代表的な Hippo signature genes である CTGF の蛋白発現量が減少することを確認した。MARK3 DOX-inducible OVCAR3 を用いてマウス皮下移植実験を実施し、MARK3 が腫瘍増殖抑制効果と血管新生阻害効果を示すことを確認した。

結論

高異型度卵巣漿液性がんで LKB1-MARK3 経路の分子が発現抑制による機能異常に陥っていることを見出した。

MARK3 は既知基質 CDC25C serine 216 に加えて、新規基質 CDC25B serine 323 をリン酸化して CDC25B の核内移行を阻害することを同定した。MARK3 は蛋白合成阻害剤 Anisomycin によって LKB1 と p38 依存的に活性化し、この他、小胞体ストレス誘導物質 Thapsigargin によっても活性化した。MARK3 の knockout は卵巣がん細胞に対する Anisomycin と Thapsigargin の抗腫瘍効果を増強した。以上から、LKB1-MARK3 経路は蛋白翻訳制御の異常に関わる代謝性ストレス応答性 G2/M 期チェックポイントを構成していると考えられた。

LKB1-MARK3 経路が細胞質で代謝性ストレス応答性に CDC25 family をリン酸化して G2/M 期停止を誘導する機序と、ATR-CHEK1 経路が核内で DNA 損傷ストレス応答性に CDC25C をリン酸化して G2/M 期停止を誘導する機序は対称的である。これらの経路はそれぞれの細胞分画から発生するストレスに対して独立した G2/M 期チェックポイントを構成して、細胞周期制御の効率的な機能分担を行っている可能性がある。

MARK3 は卵巣がん細胞において YAP の核内移行を阻害して CTGF や MYC 等のがん促進因子を含む Hippo signaling の下流遺伝子の発現を抑制した。LKB1-MARK3 経路は Hippo signaling を活性化して生体内で卵巣がんの増殖・血管新生を阻害する可能性がある。

高異型度卵巣漿液性がんに LKB1-MARK3 経路の分子が発現抑制が生じていることは、蛋白翻訳制御の異常に関わる代謝性ストレス応答性 G2/M 期チェックポイントが脆弱化していること、Hippo signaling が不活性化して腫瘍増殖・血管新生が促進されていることを示唆している。LKB1-MARK3 経路に機能異常があるがん細胞に対しては、代謝性ストレスへの脆弱性を標的として合成致死を誘導する治療法や、Hippo signaling の下流遺伝子に対する標的治療の有効性が期待される。