The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	PIH1D1 Interacts with mTOR Complex 1 and Enhances Ribosome RNA Transcription
Author(s)	鎌野, 優弥
Citation	大阪大学, 2015, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/52368
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

PIH1D1 は mTOR 複合体１との相互作用を介して リボソーム RNA の転写を促進する

PIH1D1 Interacts with mTOR Complex 1 and Enhances Ribosome RNA Transcription

大阪大学大学院歯学研究科

顎口腔機能再建学講座

クラウンブリッジ補綴学分野

鎌野　優弥

緒言

近年，我が国における乳癌の罹患患者数の増加は顕著であり，この疾患は 2000 年以降，女性が最も罹患する癌となっている [1]。また，乳癌は原発巣の治療後も 20-30%では転移・再発を認めるため，根治が困難であり，転移・再発のリスクを少なくする治療法が広く研究されている [2,3]。

癌細胞は正常細胞と比較し，様々な特徴を有している。大きな特徴として，いびつな細胞形態やアポトーシスの回避，細胞の浸潤に伴う遠隔組織への転移，異常な細胞増殖が挙げられる [4]。癌の浸潤転移や細胞増殖は非常に複雑な生物学的過程を経ることから，その分子機構の解明は重要である。細胞増殖が行われる際，タンパク質合成は必須の過程であり，タンパク質を合成するためにはリボソーム生合成が重要である [5]。従って，タンパク質合成とリボソーム生合成の関係を分子生物学的に理解することは，癌抑制に有効な手段であると考えられるが，その分子機構は十分に分かっていない。

Mammalian target of rapamycin (mTOR) は様々な生命現象やシグナル伝達に関わっている phosphatidylinositol 3-kinase-related protein kinase (PIKK) family の一分子である [6]。PIKK family には他に ATM (ataxia telangiectasia mutated)，ATR (ATM- and Rad3-related)，DNA-dependent protein kinase catalytic subunit (DNA-PKcs)，suppressor with morphological effect on genitalia 1 (SMG-1)，および TRRAP (trandformatin/transcription domain-associated protein) が含まれている [7]。mTOR は「mTOR 複合体 1」と「mTOR 複合体 2」の 2 つの複合体を構成する [8]。mTOR 複合体 1 は，mTOR，mLST8 (GβL) および mTOR の制御因子である Raptor から構成されている。mTOR 複合体 2 は，mTOR 複合体 1 と同様に mTOR および mLST8 (GβL) を含ん

でいるが，Raptor は含まれておらず，その代わりに rapamycin の標的因子である Rictor が含まれている。mTOR 複合体 1 は S6 kinase (S6K) のリン酸化に関与し, 細胞の成長やタンパク質合成に関与する [9]。これに対し, mTOR 複合体 2 は Akt のリン酸化に関与し, 細胞死の調節を行っている [9]。

Tel2 (telomere maintenance 2) は, DNA 複製チェックポイントや細胞増殖, 寿命などに関与しており，真核生物に広く保存されたタンパク質である [10]。近年，Tel2 が哺乳動物の PIKK family に結合し，その安定化に必須の因子であることが報告された [11]。また，Tel2 は R2TP 複合体と協調して，mTOR を含む PIKK family の安定化に関わっている [6,12]。

R2TP 複合体は，系統的解析，プロテオーム解析，遺伝子解析により酵母から同定されたタンパク質複合体で [13], Hsp90 のマルチサブユニットに Rvb1，Rvb2 (ヒトではそれぞれ Pontin および Reptin)，Tah1 (ヒトでは RPAP3) そして Pih (ヒトでは PIH1D1) が結合することにより構成されている [13-16]。また, R2TP 複合体に結合するタンパク質に Monad があり, その R2TP 複合体との相互作用は癌細胞のアポトーシスを制御している [17-23]。

R2TP 複合体の構成成分である PIH1D1 は, rRNA 遺伝子の発現に関与する因子であり [24]，不安定なタンパク質として知られている [15,16,22]。また，PIH1D1 は Tel2 との結合領域を有していることから [6]，PIH1D1 は R2TP 複合体の主要な制御因子である可能性が示唆されている [25]。また，PIH1D1 は骨肉腫細胞株である U2OS 細胞においてアポトーシスを抑制し，細胞を生存させる働きがあることが報告されている [20]

PIH1D1 以外の R2TP 複合体の構成成分である Pontin および Reptin は, 多くの生物で高度に保存された AAA+ATPase である [26]。Pontin および

Reptin は，肝細胞癌や結腸癌，膀胱癌，悪性黒色腫などの癌細胞において高発現していることから，癌治療の有効な標的として考えられている [27-31]。以上の知見から，PIH1D1 は癌の転移，再発に何らかの影響を与えていると考えられるが，PIH1D1 の癌細胞における役割に関しては未だ不明な点が多く残されている。

癌治療における有効な手段として，異常な細胞増殖の抑制が挙げられる [32]。細胞増殖が行われる際，タンパク質合成は必須の過程である。また，mTOR 複合体 1 は rRNA の転写およびプロセシング，タンパク質の合成など，リボソーム内で行われる様々な機能を調節している [33]。RNA polymerase (Pol) I は rRNA の前駆体である 47S rRNA を 18S，5.8S および 28S rRNA に翻訳する。Mayer らは，mTOR-S6K 経路が tripartile motif-containing protein-24 を活性化し，Pol I と pre-rRNA との結合を促進することにより rRNA の発現を促進することを報告した [34]。一方で，mTOR-S6K 経路の活性化は，selectivity factor 1 (SL1) の rDNA 遺伝子プロモーター領域への結合を促進し，Pol I を活性化させることにより，rRNA の発現を調節することが報告されている [35]。また近年，PIH1D1 が rRNA の転写に関わっていることが報告された [24]。

以上を背景に，本研究では PIH1D1 が mTOR を介した rRNA 転写に関わっている可能性について着目し，mTOR の調節における PIH1D1 の働きを明らかにすることを目的に実験を行った。

材料と方法

薬剤および抗体

Rapamycin は Calbiochem (553210，La Jolla，CA) より購入した。

抗 PIH1D1 抗体 (C-9) は Santa Cruz Biotechnology (sc-390810，Dallas，USA) より購入した。抗 mTOR 抗体 (2972S)，抗 GβL 抗体 (3227S)，抗 Raptor 抗体 (24C12) (2280S)，抗 Rictor 抗体 (D16H9) (2140S)，抗 p70 S6 kinase (S6K) 抗体(9202S)，抗 Phospho-S6K (Thr389) 抗体 (9205S)，抗 Akt 抗体 (9272S) および抗 Phospho-Akt (Ser473) 抗体 (9271S) は Cell Signaling Technology (Danvers，USA) より購入した。抗 GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) 抗体は Chemicon (MAB374，Temecula，CA) より購入した。抗 Tel2 抗体は Rockefeller 大学の Dr. T. de Lange および Dr. H. Takai より譲渡して頂いた。抗 Flag (M2) 抗体は Sigma Aldrich (F3040，St. Louis，MO) より購入した。

細胞培養

1) 乳癌細胞株

乳癌細胞株 (MDA-MB-231，SKBr，BT549，MDA-MB-231，T47 および MCF-7) は American Type Culture Collection (Manassas, USA) より購入した。培養は Dulbecco’s modified Eagle’s medium (DMEM: 1.0 g/l Glucose，L-グルタミン，ピルビン酸含有，Sigma Aldrich，D6046) に 10% Fetal Bovine Serum (FBS：ジャパン・バイオシーラム，広島) および抗生物質 (100 μg/ml streptomycin，100 units/ml penicillin，250 ng/ml amphotericin B，Life Technologies，15240-06，California，USA) を添加した培地を用いて 37℃，

5%CO_2 気層下で行った。

2) HEK293 細胞

HEK293 細胞は DMEM (Sigma Aldrich) に 10% FBS (ジャパン・バイオシーラム) および抗生物質 (100 μg/ml streptomycin，100 units/ml penicillin, 250 ng/ml amphotericin B, Life Technologies) を添加した培地を用いて 37℃, 5%CO_2 気層下で培養した。

3) 正常ヒト乳腺上皮細胞

正常ヒト乳腺上皮細胞 (HMEC: Normal Human Mammary Epithelial cells) は Lonza (CC-2551，Walkersville，USA) より購入し，乳腺上皮細胞基本培地 (Lonza，CC-3151) および乳腺上皮細胞添加因子セット (Lonza，CC-4136) を用いて 37℃，5%CO_2 気層下で培養した。

<u>遺伝子導入</u>

HEK293 細胞を 60 mm の細胞培養皿 (Iwaki，13-002-004，千葉) に播種し 24 時間培養した。Flag-mTOR vector (東京大学 Dr. N. Mizushima より供与) [36] を，Lipofectamin 2000 (Life Technologies，12566014) を用いて HEK293 細胞に導入した。遺伝子導入 4 時間後に通常の細胞培養液に交換し，48 時間培養を続けた。

<u>タンパク質抽出</u>

培養後の細胞を細胞溶解バッファー (0.3% CHAPS, 120 mM NaCl, 5 mM EDTA，10% glycerol および 20 mM Tris，pH7.4) に protease inhibitor cocktail

(Roche，05892791001,Basel，Switzerland) を添加し，細胞を溶解した。10,000×g で 20 分間遠心分離し，上清のみを集めタンパク質抽出液を作製した。得られたタンパク質抽出液中の総タンパク質濃度はクマーシーブルーを使用したブラッドフォード法 [37] により定量した。

SDS-PAGE

総タンパク質にサンプル溶液 [0.25 mol/l Tris-HCl (pH 6.8)，8% (w/v) SDS，40% (w/v) Glycerol，0.02% (w/v) BPB，20% (v/v) 2-Mercaptoethanol] を加え，95℃で 5 分間熱処理を行った。7.5～12%のポリアクリルアミドゲルにタンパク質溶液を填入したの後，20 mA の電流を加えることによりタンパク質を泳動した [18]。

Western Blotting

SDS-PAGE により分離したタンパク質を，100 V の電圧を 1 時間加えることにより Polyvinylidene Difluoride Membrane (PVDF；Millipore, Billerica, USA) に転写した。一次抗体と反応させた後，化学発光法 (ECL および ECL plus，Amersham，UK) により検出した [38]。

免疫沈降法

免疫沈降法を通法に従って行った [39]。前述のタンパク質抽出法に従いタンパク質抽出液を作製した。各タンパク質抽出液の試料についてタンパク質濃度を揃え，目的のタンパク質の抗体もしくは mouse (sc-2025) および rabbit (sc-2027) の normal IgG (Santa Cruz Biotechnology) によりコートされた A/G アガロースビーズ (Pierce, 20421, Rockford, USA) を加え，4℃

で 6 時間撹拌し反応させた。反応後，200×g で 2 分間遠心分離して上清を取り除き，上記の細胞溶解バッファーで 3 回洗浄した後，ラムリー溶液を加えて 95℃，5 分間熱処理を行ない，アガロースビーズに結合しているタンパク質を分離した。タンパク質の検出には前述の SDS-PAGE および Western blotting を用いた。

siRNA による遺伝子のノックダウン

Tel2 および PIH1D1 の siRNA は Qiagen (Hilden，Germany) より購入した。それぞれのターゲット配列を以下に示す。

5′-CAGGGCACGGGCTCTCAGAAA-3′ (Tel2-siRNA 1)

5′-CCTACGACGTAGCTGTCAATT-3′ (Tel2-siRNA 2)

5′-CCCGCTGCAGATCAACTCTCA-3′ (PIH1D1-siRNA)

これら siRNA を，Lipofectamine RNAiMAX (Life Technologies，13778150) および Opti-Mem Reduced-Serum Medium (Life technologies，31985) と混合し，室温にて 20 分間反応させ，DNA-リポソーム複合体を形成後に細胞を含む培養液に添加し，37℃ 5%CO_2 気層下にて培養した。コントロールとして，AllStars Negative Control siRNA (Qiagen，SI03650318) を用いた [18]。

テトラサイクリン調節性 PIH1D1 高発現株の樹立

レンチウイルスベクターを用いて定常発現株の作製を行った。PIH1D1 遺伝子をエントリーベクターである pENTR/D TOPO に導入した後，Gateway system (Invitrogen) を用いて発現ベクターである pLenti6.3/V5-DEST に組み込み，PIH1D1 遺伝子を含有するレンチウイルスベクターを作製した。作製したベクターおよび pLenti3.3/TR を ViraPower

packaging mix (Invitrogen) を用いて 293FT 細胞に導入し，目的の遺伝子が含まれるレンチウイルスを作製した。MCF-7 細胞に作製した pLenti3.3/TR を含むウイルスを感染させ，geneticin (pLenti3.3/TR)により薬剤選択をした後， pLenti6.3/V5-DEST を含むウイルスに感染させ，blasticidin を用いた薬剤選択により定常発現株の作製を行った [40]。

Pre-rRNA に対する定量性 RT-PCR 法

定量性 RT-PCR (RT-qPCR) を通法に従って行った [39]。cDNA の増幅には Murayama らの報告 [41] に従い以下のプライマーを用いた。

pre-rRNA

Forward: 5’-GAACGG TGGTGTGTCGTTC-3’

Reverse： 5’-GCGTCTCGTCTCGTCTCACT-3’

β アクチン

Forward： 5’-ATCGTCCACCGCAAATGCTTCTA-3’

Reverse: 5’-AGCCATGCCAATCTCATCTTGTT-3’

検出した結果は, ABI PRISM 7900 ソフトウェア (Applied Biosystems) を用いて，pre-rRNA の遺伝子発現量を β アクチンで補正した Normalized Quantity を比較解析した。

統計解析

実験結果は平均値±標準偏差で表し, 各試料間群における有意差検定を, 一元配置分散分析 (ANOVA) 後に Tukey 法を用いて行った。分析ソフトには Graph Pad Instat (Graph pad Software inc，San Diego，USA) を用いて，有意水準は α=0.05 に設定した。

結果

乳癌細胞株における **PIH1D1** の発現

各ヒト乳癌細胞株における PIH1D1 の発現量を，Western blotting 法により検討した結果，すべて (6 株) のヒト乳癌細胞株において PIH1D1 の発現を認めた。特に, MDA-MB-231, SKBr, MDA-MB-231, T47 および MCF-7 では PIH1D1 の高い発現を認めた。これに対してヒト正常乳腺上皮細胞 (HMEC) およびヒト乳癌細胞株の一つである BT549 では PIH1D1 の発現量は低かった (**Fig. 1**)。

乳癌細胞株における **RPAP3** の発現

R2TP 複合体の構成成分である RPAP3 の発現量を，Western blotting 法により検討した結果，ヒト乳癌細胞株およびヒト正常乳腺上皮細胞において，RPAP3 の発現量に有意な差を認めなかった (**Fig. 1**)。

細胞溶解バッファーの決定

mTOR は Raptor および Rictor と複合体を形成している [8]。これらの複合体は 1% Triton X-100 を含有する細胞溶解バッファーを用いると細胞溶解バッファー中で容易に解離されるが，0.3% CHAPS を含有する細胞溶解バッファーであれば解離されないことが報告されている [42]。

免疫沈降法に使用する細胞溶解バッファーを決定する目的で，HEK293 細胞に Flag-mTOR vector を遺伝子導入後，CHAPS あるいは Triton X-100 含有の細胞溶解バッファーを用いてタンパク質を抽出し，PIH1D1 と mTOR の結合を検出した。その結果，CHAPS 含有の細胞溶解バッファー

を用いた群では PIH1D1 と mTOR の結合が確認されたが，Triton X-100 含有の細胞溶解バッファーを用いた群では結合が確認されなかった (**Fig. 2**)。以上の結果から，以下の実験では CHAPS 含有の細胞溶解バッファーを用いた。

PIH1D1 の mTOR 複合体への結合

乳癌細胞株である MCF-7 内における PIH1D1 と mTOR の結合を免疫沈降法により検討した結果，PIH1D1 と mTOR は内因性に結合していることが明らかとなった (**Fig. 3A**)。

mTOR は，Raptor を含む mTOR 複合体 1 と Rictor を含む mTOR 複合体 2 を構成している [8]。MCF-7 細胞内において PIH1D1 がこれら複合体のどちらか，もしくは両方と結合するかを検討する目的で，抗 PIH1D1 抗体を用いた免疫沈降を行った後に，抗 Raptor 抗体および抗 Rictor 抗体を用いた Western Blotting 解析を行った。その結果, PIH1D1 は Raptor に結合し，Rictor に結合しないことが確認された (**Fig.3B**)。また，抗 Raptor 抗体および抗 Rictor 抗体を用いて免疫沈降を行った後，抗 PIH1D1 抗体および抗 mTOR 抗体を用いて Weseten Blotting 解析を行ったところ，同様の結果が得られた (**Fig. 3C**)。

Tel2 と mTOR 複合体との結合

PIH1D1 は RT2P 複合体の構成成分であるが，RT2P 複合体は Tel2 と結合することにより mTOR を活性化させる [6]。また，Tel2 は mTOR 複合体 1 および mTOR 複合体 2 の両方と結合する [11]。

乳癌細胞株において Tel2 が mTOR 複合体と結合するかを確認する目的で，MCF-7 細胞を用いて Tel2 と mTOR 複合体の結合を抗 Raptor 抗体および抗 Rictor 抗体を用いて免疫沈降を行った後に，抗 Tel2 抗体用いた Weseten Blotting 解析を行った。その結果，Tel2 は乳癌細胞株においても Raptor および Rictor の両方と結合することが示された (**Fig. 4**)。

PIH1D1 の mTOR 複合体に対する作用

mTOR 複合体 1 は S6K のリン酸化に関与し，mTOR 複合体 2 は AKT のリン酸化に関与している [8]。PIH1D1 がこれら mTOR 複合体の機能に関与しているかを検討する目的で，PIH1D1 の Small interfering RNA (siRNA) を用いた遺伝子のノックダウン実験を行った。

設計した siRNA が乳癌細胞株に作用するかを確認する目的で，MCF-7 細胞に PIH1D1 の siRNA を導入し, 抗 PIH1D1 抗体を用いた Western Blotting 解析により PIH1D1 の発現量を検討した。その結果, siRNA の作用により，MCF-7 細胞内の PIH1D1 の発現量は検出限界以下まで抑制された (**Fig. 5**)。しかしながら，PIH1D1 の siRNA は，mTOR の発現量には影響を及ぼさなかった (**Fig. 5**)。また，PIH1D1 の抑制に伴い，S6K のリン酸化は S6K の総量に影響せずに抑制された (**Fig. 5**)。

PIH1D1 の抑制による mTOR 複合体 2 への作用を確認する目的で，MCF-7 細胞の AKT のリン酸化を検討した結果，PIH1D1 の発現抑制による AKT のリン酸化への関与は認めなかった (**Fig. 5**)。これらの結果から，PIH1D1 は mTOR 複合体 2 の活性化には重要でないことが示唆された。

Tel2 の mTOR 複合体に対する作用

Tel2 は S6K および Akt の両方のリン酸化に関与している [11]。乳癌細胞において Tel2 が mTOR 複合体の機能に関与しているかを検討する目的で，Tel2 の siRNA を用いた遺伝子のノックダウン実験を行った。その結果，乳癌細胞においても Tel2 は S6K および Akt の両方のリン酸化に関与していることが示された (**Fig. 6**)。また，Tel2 の発現抑制により mTOR の発現量は低下した (**Fig. 6**)。

PIH1D1 遺伝子ノックダウンによる mTOR 活性抑制のレスキュー実験

siRNA が PIH1D1 以外の部位に作用し，S6K のリン酸化に関与している可能性を否定する目的で，PIH1D1 遺伝子ノックダウンによる mTOR 活性抑制のレスキュー実験を行った。はじめに，MCF-7 細胞を用いてテトラサイクリン調節性 PIH1D1 高発現株を作製した (**Fig. 7A**)。

この PIH1D1 高発現株に siRNA を添加した結果，PIH1D1 の発現は抑制され，それに伴い S6K のリン酸化も抑制された (**Fig. 7B**)。ドキシサイクリンの添加により PIH1D1 の発現は回復し，それに伴い S6K のリン酸化も回復した (**Fig. 7B**)。

PIH1D1 による mTOR 複合体 1 活性化のメカニズム

PIH1D1 遺伝子をノックダウンした MCF-7 細胞内における mTOR 複合体の状態を免疫沈降法により検討した。PIH1D1 遺伝子のノックダウンにより MCF-7 における GβL および Raptor の発現量は変化しなかった (**Fig. 8A**)。しかしながら，抗 Raptor 抗体を用いた免疫沈降の結果，GβL の量は有意に減少した (**Fig. 8B**)。それに対し，抗 Rictor 抗体を用いた免疫沈降の結果，GβL の量は変化がなかった (**Fig. 8C**)。これらの結果から，PIH1D1

の発現が抑制された細胞における mTOR 複合体の部分的な解離は, mTOR 複合体 2 ではなく, mTOR 複合体 1 において起こっていることが示唆された (**Fig. 8D**)。

PIH1D1 の発現抑制が rRNA の転写に及ぼす影響

乳癌細胞株において PIH1D1 が rRNA の転写に及ぼす影響を検討する目的で, MCF-7 の pre-rRNA を RT-qPCR を用いて検出した。はじめに, siRNA により PIH1D1 遺伝子の発現を抑制した場合に, pre-rRNA 量が減少するか否かを検討した。その結果, PIH1D1 遺伝子の発現抑制により pre-rRNA 量は有意に減少した (**Fig. 9**)。このことから PIH1D1 が rRNA 転写調節に関与していることが確認された。次に mTOR の阻害薬である Rapamycin (20 nM) を添加し, pre-rRNA 量が減少するか否かを検討した。Rapamycin の添加により, コントロール siRNA 群で pre-rRNA 量は著明に減少した (**Fig. 9**)。このことから, mTOR の抑制が rRNA 転写調節に関与していることが確認された。最後に Rapamycin により mTOR を抑制したうえで, siRNA により PIH1D1 遺伝子の発現を抑制した。その結果, コントロール siRNA 群および PIH1D1 siRNA 群の間に有意差を認めなかった (**Fig. 9**)。このことから, PIH1D1 は mTOR 依存的に rRNA の転写を調節することが示された。

考察

タンパク質合成の異常な活性化や細胞増殖は, 腫瘍形成の重要な因子となる [4]。一般的な正常細胞と比較して，腫瘍細胞は形態や核が大きくなっている [4]。これらの腫瘍細胞の表現型は，腫瘍細胞内においてリボソーム生合成が促進していることを示唆している [43,44]。mTOR 複合体 1 のシグナル伝達物質は多くの癌因子や癌抑制因子を含んでおり, 癌において重要な働きを有している [8]。また，種々の癌細胞では mTOR 複合体 1 が活性化されている [45]。mTOR 複合体 1 はリボソーム生合成におけるタンパク質合成および rRNA 合成の両方に関与している [33-35]。これらの報告から, mTOR 複合体 1 を介したリボソーム生合成の制御機構の解明は, 腫瘍形成を制御する技術に繋がることが期待される。

本研究において，乳癌細胞には不安定なタンパク質である PIH1D1 [16] が高発現していることが示された (**Fig. 1**)。PIH1D1 は，R2TP 複合体の構成成分である RPAP3 によって安定化されていることが報告されている [22]。しかしながら，乳癌細胞において RPAP3 の高発現は認めなかった (**Fig. 1**)。これらのことから，乳癌細胞において RPAP3 以外にも PIH1D1 を安定化させる因子が存在している可能性が示唆される。また，本研究では乳癌細胞 (MCF-7 細胞株) を用いて PIH1D1 が mTOR と結合することを明らかにした。このことから，乳癌細胞では PIH1D1 は mTOR に対して何らかの作用を有していることが示唆される。本研究では乳癌細胞株に着目して実験を進めたが, mTOR 複合体 1 は乳癌以外の種々の癌にも高発現していることから [45], 口腔に発生する主要な癌である扁平上皮癌においても mTOR 複合体 1 が高発現している可能性がある。今後，口腔の扁平上

皮癌におけるmTOR複合体1およびPIH1D1の発現を検討していくことは歯学研究の観点からも興味深い。

mTORを含むPIKK familyは，Tel2とR2TP複合体が協調することにより安定化されているが [6,12]，その詳細なメカニズムは明らかになっていない。そこで，PIH1D1がmTOR複合体1あるいはmTOR複合体2のどちらに，もしくは両方に結合しているか否かを検討した。抗 Raptor 抗体を用いた免疫沈降の結果，PIH1D1は検出されたが，抗Rictor抗体を用いた場合にはPIH1D1は検出されなかった。また，抗PIH1D1抗体を用いた免疫沈降では，RaptorおよびmTORは検出されたものの，Rictorは検出されなかった。これらの結果から，乳癌細胞では PIH1D1 は mTOR 複合体 1 のみと結合していることが示唆された。また，本実験でTel2はRaptorおよびRictorと結合した (Fig. 4)。HeLa細胞およびHEK293T細胞でも同様の報告があることから [11]，乳癌細胞株を含む細胞株において Tel2 は mTOR 複合体 1 および mTOR 複合体 2 の両方に結合していることが示唆される。

本実験において，PIH1D1 は mTOR 複合体 1 を活性化させたものの，mTOR 複合体 2 には影響を与えなかった。mTOR 複合体 2 は mTOR 複合体 1 による負のフィードバックを受けていることが報告されている [8]。rapamycin を用いて乳癌細胞内の mTOR 複合体 1 の発現を抑制した結果，過去の報告と同様に [8] Akt の発現は促進した (data not shown)。これらのことから, PIH1D1 による mTOR 複合体 1 への作用は mTOR 複合体 2 への負のフィードバックを打ち消していることが示唆される。興味深いことに，近年 Fernandez らによって骨髄腫細胞を用いた同様の現象が報告されており [46]，今後の詳細なメカニズムの解明が期待される。

PIH1D1 遺伝子のノックダウンにより mTOR の総量に影響せず mTOR 複合体 1 の活性が有意に低下した (**Fig. 5**)。遺伝子ノックダウンの実験に使用した siRNA が PIH1D1 以外の部位に作用し, S6K のリン酸化に関与している可能性を否定する目的で，テトラサイクリン調節性 PIH1D1 高発現株を作製した。この細胞では通常，テトラサイクリンリプレッサーが作用しているため，PIH1D1 遺伝子の発現は通常の MCF-7 細胞と変わらない。一方, テトラサイクリン系抗生物質の一種であるドキシサイクリンを添加することにより，テトラサイクリンリプレッサーの働きが阻害され PIH1D1 遺伝子が高発現する。siRNA により一旦抑制された PIH1D1 遺伝子の発現は, ドキシサイクリンの添加により PIH1D1 遺伝子が強制発現され, siRNA の作用を打ち消すことが可能となる。本研究では，実際に siRNA の作用によりドキシサイクリンを添加していない細胞では PIH1D1 遺伝子の発現は検出限界以下まで抑制されており，それに伴う S6K のリン酸化も抑制された (**Fig. 7B**)。しかしながら，ドキシサイクリンによる PIH1D1 遺伝子の強制発現により siRNA による PIH1D1 遺伝子の抑制は打ち消され, それに伴う S6K のリン酸化も回復した (**Fig. 7B**)。このことから siRNA による PIH1D1 遺伝子の抑制が S6K のリン酸化を抑制していることが確認された。この知見に加え，Tel2-R2TP 複合体が mTOR の安定化を行っていること [6,12]，乳癌細胞においても Tel2 が mTOR を安定化させていることから (**Fig. 6**), 乳癌細胞において PIH1D1 が mTOR の安定化以外のメカニズムを介して mTOR 複合体 1 の活性を制御している可能性が示唆された。MCF-7 細胞内で PIH1D1 遺伝子の発現を抑制することにより，mTOR 複合体 1 の部分的な解離が生じたことから (**Fig. 8**) ，PIH1D1 は mTOR 複合体の複合

体形成を制御することにより，mTOR 複合体 1 の活性を制御していると考えられる。

mTOR は少なくとも 2 つの経路でリボソーム生合成を調節している。そのうちの 1 つがリボソームタンパク質の mRNA 発現量を促進する経路であり，もう 1 つが rRNA 合成を促進する経路である。PIH1 が rRNA 遺伝子を促進していること [24]，および mTOR 複合体 1 がリボソーム生合成やタンパク質合成において主要な役割を担っていること [9] に加えて，本研究において PIH1D1 の発現抑制により S6K のリン酸化が有意に抑制されたことから，PIH1D1 は rRNA の転写を制御している可能性に着目した。

実際に，MCF-7 細胞における pre-rRNA の発現量は，PIH1D1 によって mTOR 依存的に制御されていることが示された (**Fig. 9**)。しかしながら，乳癌細胞において PIH1D1 の mTOR 調節機構は PIH1D1 が直接的に mTOR 複合体 1 に作用する経路に加えて，PIH1D1 を含む R2TP 複合体が Tel2 と協調して mTOR 複合体に作用する経路が存在する可能性が考えられる (Fig .5，6) 。しかしながら，本実験系 (**Fig. 9**) では，Tel2 を介した mTOR による rRNA 転写調節の可能性は考慮されていない。mTOR 依存的な rRNA の転写調節に関して，PIH1D1 の直接的な作用，もしくは Tel2-R2TP 複合体を介した作用のどちらがより重要であるかを明らかにするためには更なる検討が必要である。

Zhai らは nucleolar remodeling complex (NoRC) のサイレンシングに注目し，NoRC による rRNA 遺伝子サイレンシングの抑制を解除する因子として PIH1D1 を発見した [24]。本研究により，pre-rRNA の転写は mTOR により促進されることが示されたため，PIH1D1 による pre-rRNA の転写は mTOR 依存的であると考えられる (**Fig. 10**)。Proud らは，mTOR は核小体

に存在し，pre-rRNA のプロセシングは mTOR 依存的であることを報告した [47]。PIH1D1 および Pontin は核小体に存在する [48,49]。一方で Houry らは, R2TP 複合体が直接的に pre-rRNA のプロセシングを促進することを報告している [16]。

Kim らは Cancer Genome Atlas のデータセットを用いたメタ分析を行い, R2TP 複合体の mRNA 量が正常細胞と比較して乳癌細胞で有意に高いことを報告した [50]。彼らは R2TP 複合体の高発現が mTOR 複合体 1 のシグナルや代謝を活性化し, 腫瘍の細胞増殖に重要であることを示唆している。mTOR 複合体 1 はリボソーム生合成や代謝に重要であるだけでなく, 細胞死にも関わっている [9]。Choi らは MVF-7 細胞において S6K の阻害が, 糖の欠乏に伴う細胞死を惹起することを報告した [51]。本実験において, MCF-7 細胞における PIH1D1 遺伝子のノックダウンは, 細胞の生存を制御する Akt に影響を与えず (**Fig. 5**)，細胞生存率にも影響を与えなかった (data not shown)。これらの結果から，乳癌細胞では PIH1D1 は細胞生存機構を制御する主要な因子ではないことが考えられる。今後，R2TP 複合体および PIH1D1 の細胞生存機構における役割について，更なる検討が必要と考える。

本研究の結果，および近年報告されている Tel2-R2TP 複合体の mTOR 複合体 1 に対する役割，つまり Pontin や Reptin が Tel2 の活性を制御し, mTOR に働きかけること [52-54] を考慮すると, mTOR 複合体 1 は PIH1D1 の直接的な標的因子であると考えられる。mTOR 複合体は，癌治療において効果的な標的因子であり [8], R2TP 複合体を阻害することによる mTOR の抑制が, 抗癌作用をおよぼすことが報告されている [23]。しかしながら, R2TP 複合体の構成成分には正常細胞に含まれている因子もあるため,

R2TP 複合体そのものを標的とした治療法では副作用が大きくなってしまう可能性がある。PIH1D1 は正常細胞での発現が低いため (**Fig .1**), PIH1D1 を選択的に阻害し, mTOR 複合体 1 の作用であるリボソーム生合成を抑制することにより，副作用の少ない治療技術が可能になるかもしれない (**Fig. 11**)。今後の研究の進展が，PIH1D1 と mTOR 複合体 1 の関係をより明らかにし，新たな乳癌の治療技術の開発に繋がることが期待される。

文献

[1] Matsuda, A., Matsuda, T., Shibata, A., Katanoda, K., Sobue, T., Nishimoto, H. and The-Japan-Cancer-Surveillance-Research-Group. (2013). National estimates of cancer incidence based on cancer registries in Japan (1975-2010). Japanese Journal of Clinical Oncology 44, 388-396.

[2] Schassburger, K.U., Lofgren, L., Lagerstedt, U., Leifland, K., Thorneman, K., Sandstedt, B., Auer, G. and Wiksell, H. (2014). Minimally-invasive treatment of early stage breast cancer: a feasibility study using radiofrequency ablation under local anesthesia. Breast 23, 152-8.

[3] Sylvester, P.W. and Ayoub, N.M. (2013). Tocotrienols target PI3K/Akt signaling in anti-breast cancer therapy. Anticancer Agents Med Chem 13, 1039-47.

[4] Hanahan, D. and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. Cell 144, 646-74.

[5] Elliott, S.G., Warner, J.R. and McLaughlin, C.S. (1979). Synthesis of ribosomal proteins during the cell cycle of the yeast Saccharomyces cerevisiae. J Bacteriol 137, 1048-50.

[6] Horejsi, Z. et al. (2010). CK2 phospho-dependent binding of R2TP complex to TEL2 is essential for mTOR and SMG1 stability. Mol Cell 39, 839-50.

[7] Bakkenist, C.J. and Kastan, M.B. (2004). Initiating cellular stress responses. Cell 118, 9-17.

[8] Sabatini, D.M. (2006). mTOR and cancer: insights into a complex relationship. Nat Rev Cancer 6, 729-34.

[9] Zhou, H. and Huang, S. (2010). The complexes of mammalian target of rapamycin. Curr Protein Pept Sci 11, 409-24.

[10] Rothman, J.H. (2002). Aging: from radiant youth to an abrupt end. Curr Biol 12, R239-41.

[11] Kaizuka, T. et al. (2010). Tti1 and Tel2 are critical factors in mammalian target of rapamycin complex assembly. J Biol Chem 285, 20109-16.

[12] Izumi, N. et al. (2010). AAA+ proteins RUVBL1 and RUVBL2 coordinate PIKK activity and function in nonsense-mediated mRNA decay. Sci Signal 3, ra27.

[13] Zhao, R. et al. (2005). Navigating the chaperone network: an integrative map of physical and genetic interactions mediated by the hsp90 chaperone. Cell 120, 715-27.

[14] Boulon, S. et al. (2008). The Hsp90 chaperone controls the biogenesis of L7Ae RNPs

through conserved machinery. J Cell Biol 180, 579-95.

[15] Jimenez, B., Ugwu, F., Zhao, R., Orti, L., Makhnevych, T., Pineda-Lucena, A. and Houry, W.A. (2012). Structure of minimal tetratricopeptide repeat domain protein Tah1 reveals mechanism of its interaction with Pih1 and Hsp90. J Biol Chem 287, 5698-709.

[16] Zhao, R. et al. (2008). Molecular chaperone Hsp90 stabilizes Pih1/Nop17 to maintain R2TP complex activity that regulates snoRNA accumulation. J Cell Biol 180, 563-78.

[17] Saeki, M., Irie, Y., Ni, L., Yoshida, M., Itsuki, Y. and Kamisaki, Y. (2006). Monad, a WD40 repeat protein, promotes apoptosis induced by TNF-alpha. Biochem Biophys Res Commun 342, 568-72.

[18] Itsuki, Y. et al. (2008). Molecular cloning of novel Monad binding protein containing tetratricopeptide repeat domains. FEBS Lett 582, 2365-70.

[19] Ni, L., Saeki, M., Xu, L., Nakahara, H., Saijo, M., Tanaka, K. and Kamisaki, Y. (2009). RPAP3 interacts with Reptin to regulate UV-induced phosphorylation of H2AX and DNA damage. J Cell Biochem 106, 920-8.

[20] Inoue, M., Saeki, M., Egusa, H., Niwa, H. and Kamisaki, Y. (2010). PIH1D1, a subunit of R2TP complex, inhibits doxorubicin-induced apoptosis. Biochem Biophys Res Commun 403, 340-4.

[21] Shimada, K., Saeki, M., Egusa, H., Fukuyasu, S., Yura, Y., Iwai, K. and Kamisaki, Y. (2011). RPAP3 enhances cytotoxicity of doxorubicin by impairing NF-kappa B pathway. Biochem Biophys Res Commun 404, 910-4.

[22] Yoshida, M. et al. (2013). RPAP3 splicing variant isoform 1 interacts with PIH1D1 to compose R2TP complex for cell survival. Biochem Biophys Res Commun 430, 320-4.

[23] Saeki, M., Egusa, H., Kamano, Y., Kakihara, Y., Houry, W.A., Yatani, H., Noguchi, S. and Kamisaki, Y. (2013). Exosome-bound WD repeat protein Monad inhibits breast cancer cell invasion by degrading amphiregulin mRNA. PLoS One 8, e67326.

[24] Zhai, N. et al. (2012). Human PIH1 associates with histone H4 to mediate the glucose-dependent enhancement of pre-rRNA synthesis. J Mol Cell Biol 4, 231-41.

[25] Kakihara, Y. and Houry, W.A. (2012). The R2TP complex: discovery and functions. Biochim Biophys Acta 1823, 101-7.

[26] Grigoletto, A., Lestienne, P. and Rosenbaum, J. (2011). The multifaceted proteins Reptin and Pontin as major players in cancer. Biochim Biophys Acta 1815, 147-57.

[27] Rousseau, B. et al. (2007). Overexpression and role of the ATPase and putative DNA helicase RuvB-like 2 in human hepatocellular carcinoma. Hepatology 46, 1108-18.

[28] Menard, L. et al. (2010). In vivo silencing of Reptin blocks the progression of human hepatocellular carcinoma in xenografts and is associated with replicative senescence.

J Hepatol 52, 681-9.

[29] Haurie, V. et al. (2009). Adenosine triphosphatase pontin is overexpressed in hepatocellular carcinoma and coregulated with reptin through a new posttranslational mechanism. Hepatology 50, 1871-83.

[30] Huber, O., Menard, L., Haurie, V., Nicou, A., Taras, D. and Rosenbaum, J. (2008). Pontin and reptin, two related ATPases with multiple roles in cancer. Cancer Res 68, 6873-6.

[31] Elkaim, J. et al. (2012). First identification of small-molecule inhibitors of Pontin by combining virtual screening and enzymatic assay. Biochem J 443, 549-59.

[32] Oike, T. et al. (2013). A synthetic lethality-based strategy to treat cancers harboring a genetic deficiency in the chromatin remodeling factor BRG1. Cancer Res 73, 5508-18.

[33] Mayer, C. and Grummt, I. (2006). Ribosome biogenesis and cell growth: mTOR coordinates transcription by all three classes of nuclear RNA polymerases. Oncogene 25, 6384-91.

[34] Mayer, C., Zhao, J., Yuan, X. and Grummt, I. (2004). mTOR-dependent activation of the transcription factor TIF-IA links rRNA synthesis to nutrient availability. Genes Dev 18, 423-34.

[35] Hannan, K.M. et al. (2003). mTOR-dependent regulation of ribosomal gene transcription requires S6K1 and is mediated by phosphorylation of the carboxy-terminal activation domain of the nucleolar transcription factor UBF. Mol Cell Biol 23, 8862-77.

[36] Hara, K. et al. (1997). Regulation of eIF-4E BP1 phosphorylation by mTOR. J Biol Chem 272, 26457-63.

[37] Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72, 248-54.

[38] Saeki, M., Maeda, S., Wada, K. and Kamisaki, Y. (2002). Insulin-like growth factor-1 protects peroxynitrite-induced cell death by preventing cytochrome c-induced caspase-3 activation. J Cell Biochem 84, 708-16.

[39] Saeki, M., Irie, Y., Ni, L., Itsuki, Y., Terao, Y., Kawabata, S. and Kamisaki, Y. (2007). Calcineurin potentiates the activation of procaspase-3 by accelerating its proteolytic maturation. J Biol Chem 282, 11786-94.

[40] Gouveia, A.M., Reguenga, C., Oliveira, M.E., Sa-Miranda, C. and Azevedo, J.E. (2000). Characterization of peroxisomal Pex5p from rat liver. Pex5p in the Pex5p-Pex14p membrane complex is a transmembrane protein. J Biol Chem 275,

32444-51.

[41] Murayama, A. et al. (2008). Epigenetic control of rDNA loci in response to intracellular energy status. Cell 133, 627-39.

[42] Sarbassov, D.D., Ali, S.M., Kim, D.H., Guertin, D.A., Latek, R.R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. and Sabatini, D.M. (2004). Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. Curr Biol 14, 1296-302.

[43] Busch, H., Byvoet, P. and Smetana, K. (1963). The nucleolus of the cancer cell: a review. Cancer Res 23, 313-39.

[44] Boisvert, F.M., van Koningsbruggen, S., Navascues, J. and Lamond, A.I. (2007). The multifunctional nucleolus. Nat Rev Mol Cell Biol 8, 574-85.

[45] Nagalingam, A., Arbiser, J.L., Bonner, M.Y., Saxena, N.K. and Sharma, D. (2012). Honokiol activates AMP-activated protein kinase in breast cancer cells via an LKB1-dependent pathway and inhibits breast carcinogenesis. Breast Cancer Res 14, R35.

[46] Fernandez-Saiz, V. et al. (2013). SCFFbxo9 and CK2 direct the cellular response to growth factor withdrawal via Tel2/Tti1 degradation and promote survival in multiple myeloma. Nat Cell Biol 15, 72-81.

[47] Iadevaia, V., Zhang, Z., Jan, E. and Proud, C.G. (2012). mTOR signaling regulates the processing of pre-rRNA in human cells. Nucleic Acids Res 40, 2527-39.

[48] Gonzales, F.A., Zanchin, N.I., Luz, J.S. and Oliveira, C.C. (2005). Characterization of Saccharomyces cerevisiae Nop17p, a novel Nop58p-interacting protein that is involved in Pre-rRNA processing. J Mol Biol 346, 437-55.

[49] Cvackova, Z., Albring, K.F., Koberna, K., Ligasova, A., Huber, O., Raska, I. and Stanek, D. (2008). Pontin is localized in nucleolar fibrillar centers. Chromosoma 117, 487-97.

[50] Kim, S.G. et al. (2013). Metabolic stress controls mTORC1 lysosomal localization and dimerization by regulating the TTT-RUVBL1/2 complex. Mol Cell 49, 172-85.

[51] Choi, H.N. et al. (2013). Inhibition of S6K1 enhances glucose deprivation-induced cell death via downregulation of anti-apoptotic proteins in MCF-7 breast cancer cells. Biochem Biophys Res Commun 432, 123-8.

[52] Rosenbaum, J., Baek, S.H., Dutta, A., Houry, W.A., Huber, O., Hupp, T.R. and Matias, P.M. (2013). The emergence of the conserved AAA+ ATPases Pontin and Reptin on the signaling landscape. Sci Signal 6, mr1.

[53] Izumi, N., Yamashita, A. and Ohno, S. (2012). Integrated regulation of PIKK-mediated stress responses by AAA+ proteins RUVBL1 and RUVBL2. Nucleus

3, 29-43.

[54] Izumi, N., Yamashita, A., Hirano, H. and Ohno, S. (2012). Heat shock protein 90 regulates phosphatidylinositol 3-kinase-related protein kinase family proteins together with the RUVBL1/2 and Tel2-containing co-factor complex. Cancer Sci 103, 50-7.

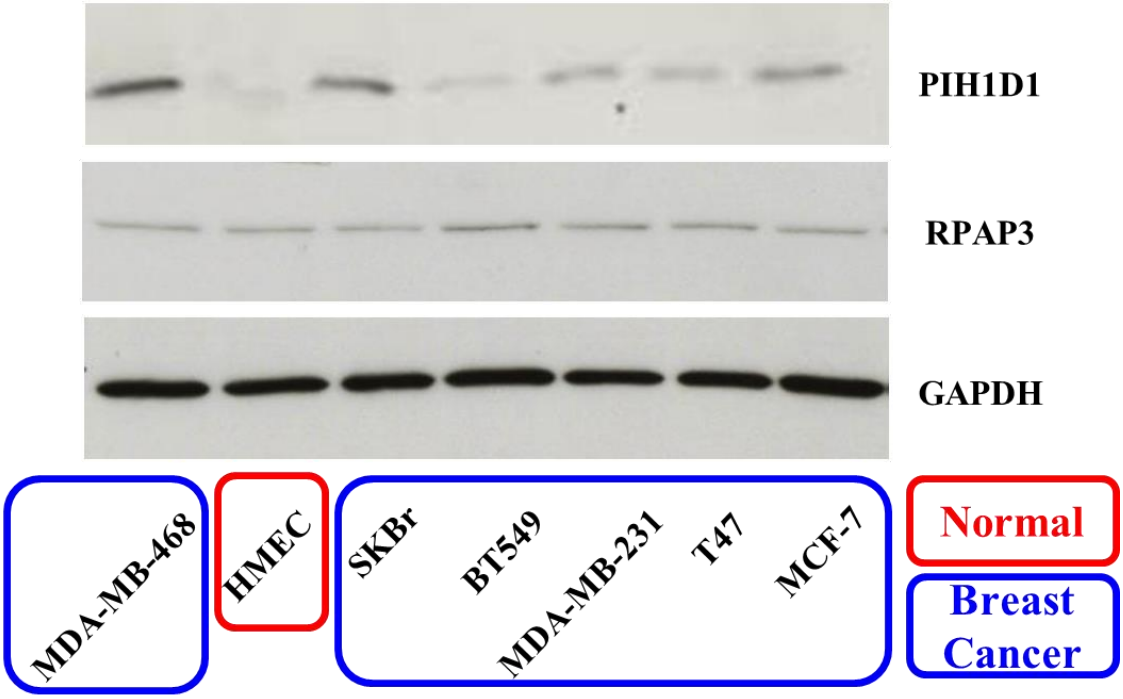

Fig. 1: **ヒト乳癌細胞株における PIH1D1 および RPAP3 の発現**
ヒト正常乳腺上皮細胞（HMEC）およびヒト乳癌細胞株（MDA-MB-231，SKBr，BT549，MDA-MB-231，T47およびMCF-7）におけるPIH1D1およびRPAP3の発現を，Western blotting法により検出した。各試料の内部標準にはGAPDHを用いた（Normal：ヒト正常乳腺上皮細胞，Cancer：ヒト乳癌細胞株）。

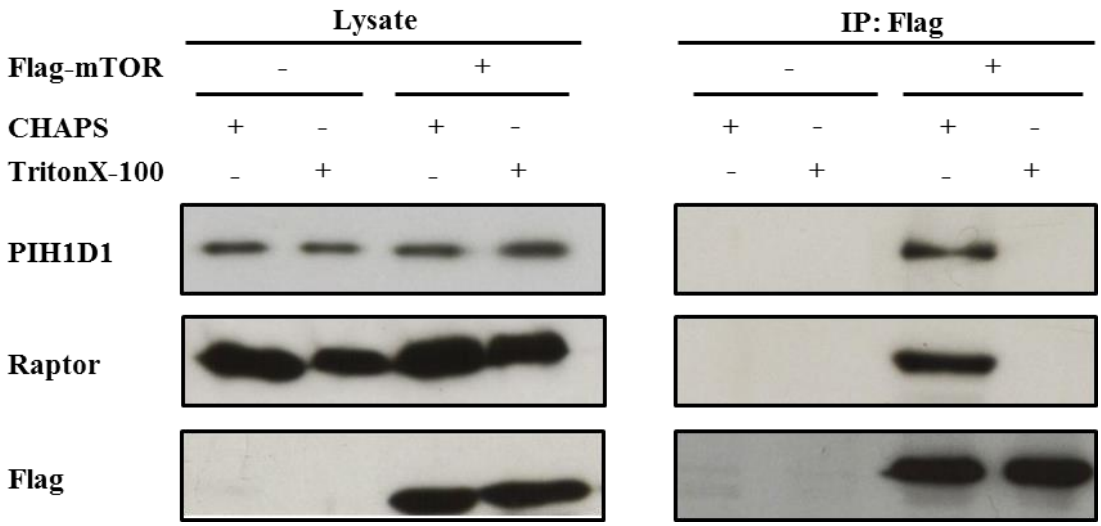

Fig. 2: 細胞溶解バッファーの決定

HEK293 細胞に空 vector もしくは Flag-mTOR vector を遺伝子導入した。導入後 48 時間で細胞を 0.3% CHAPS もしくは 1% Triton X-100 含有の細胞溶解バッファーを用いて溶解した。抗 Flag 抗体を用いて免疫沈降した後, 抗 PIH1D1 抗体, 抗 Raptor 抗体および抗 Flag 抗体を用いて Western blotting を行った。

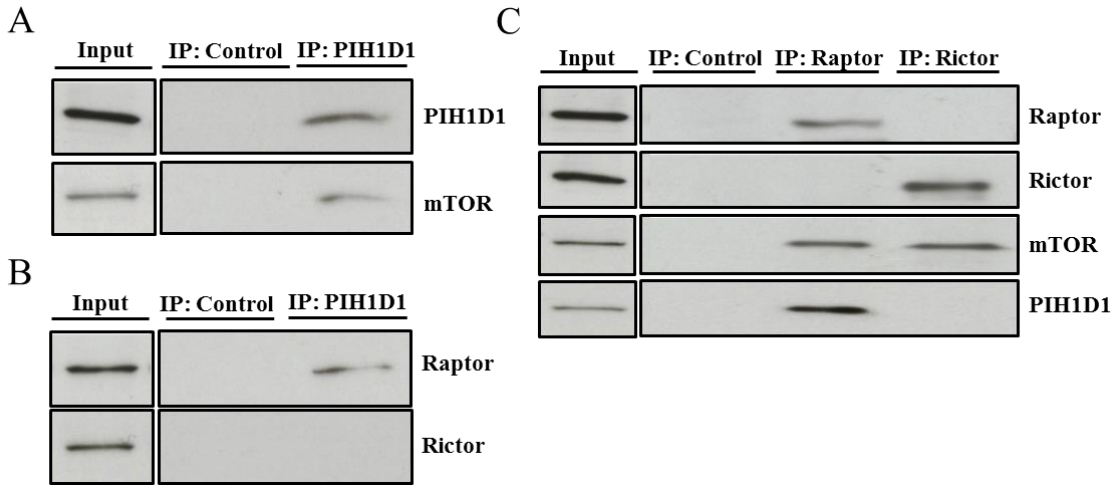

Fig. 3: 乳癌細胞株における PIH1D1 と mTOR の結合
MCF-7 細胞を 0.3%CHAPS 含有の細胞溶解バッファーを用いて溶解した。
(**A**, **B**) 抗 PIH1D1 抗体および normal mouse IgG を用いて免疫沈降を行った後，(**A**) 抗 PIH1D1 抗体および抗 mTOR 抗体，もしくは (**B**) 抗 Raptor 抗体および抗 Rictor 抗体を用いて Western blotting を行った。
(**C**) 抗 Raptor 抗体，抗 Rictor 抗体および normal rabbit IgG を用いて免疫沈降を行った後, 抗 Raptor 抗体, 抗 Rictor 抗体, 抗 mTOR 抗体および抗 PIH1D1 抗体を用いて Western blotting を行った。

Fig. 4: 乳癌細胞株における Tel2 と mTOR 複合体の結合
MCF-7 細胞を 0.3%CHAPS 含有の細胞溶解バッファーを用いて溶解した。抗 Raptor 抗体，抗 Rictor 抗体および normal rabbit IgG を用いて免疫沈降を行った後，抗 Tel2 抗体を用いて Western blotting を行った。

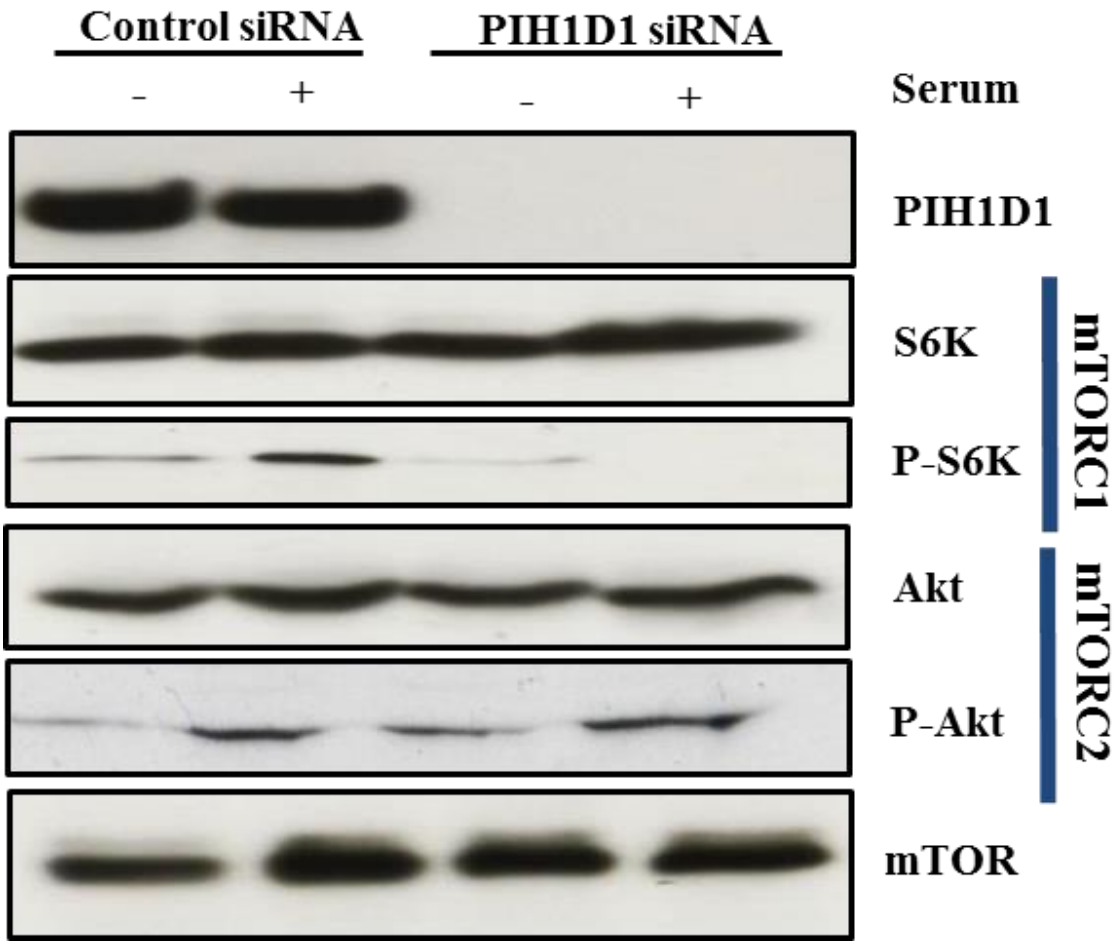

Fig. 5: 乳癌細胞内における PIH1D1 遺伝子に対する siRNA が PIH1D1 の発現に及ぼす影響

MCF-7 細胞に PIH1D1 の siRNA を血清非存在下で 48 時間作用させた後, 2 時間血清による刺激を加えた。刺激後に mTOR 複合体 1 (mTORC1) の活性を示す S6K および mTOR 複合体 2 (mTORC2) の活性を示す Akt のリン酸化を Western blotting 法により検討した。

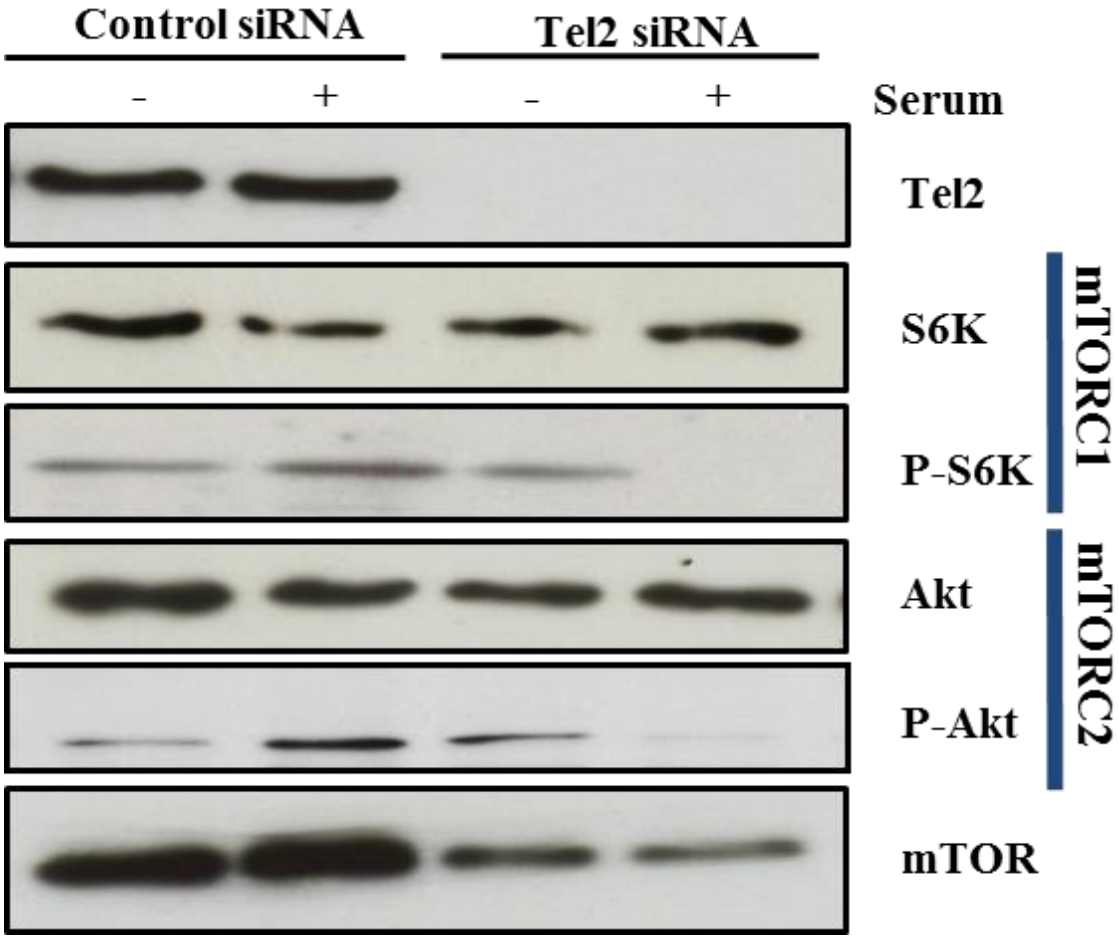

Fig. 6: 乳癌細胞内における Tel2 遺伝子に対する siRNA が mTOR 複合体の活性に及ぼす影響

MCF-7 細胞に Tel2 の siRNA を血清非存在下で 48 時間作用させたのち 2 時間血清による刺激を加えた。刺激後に mTOR 複合体 1 (mTORC1) の活性を示す S6K および mTOR 複合体 2 (mTORC2) の活性を示す Akt のリン酸化を Western blotting 法により検討した。

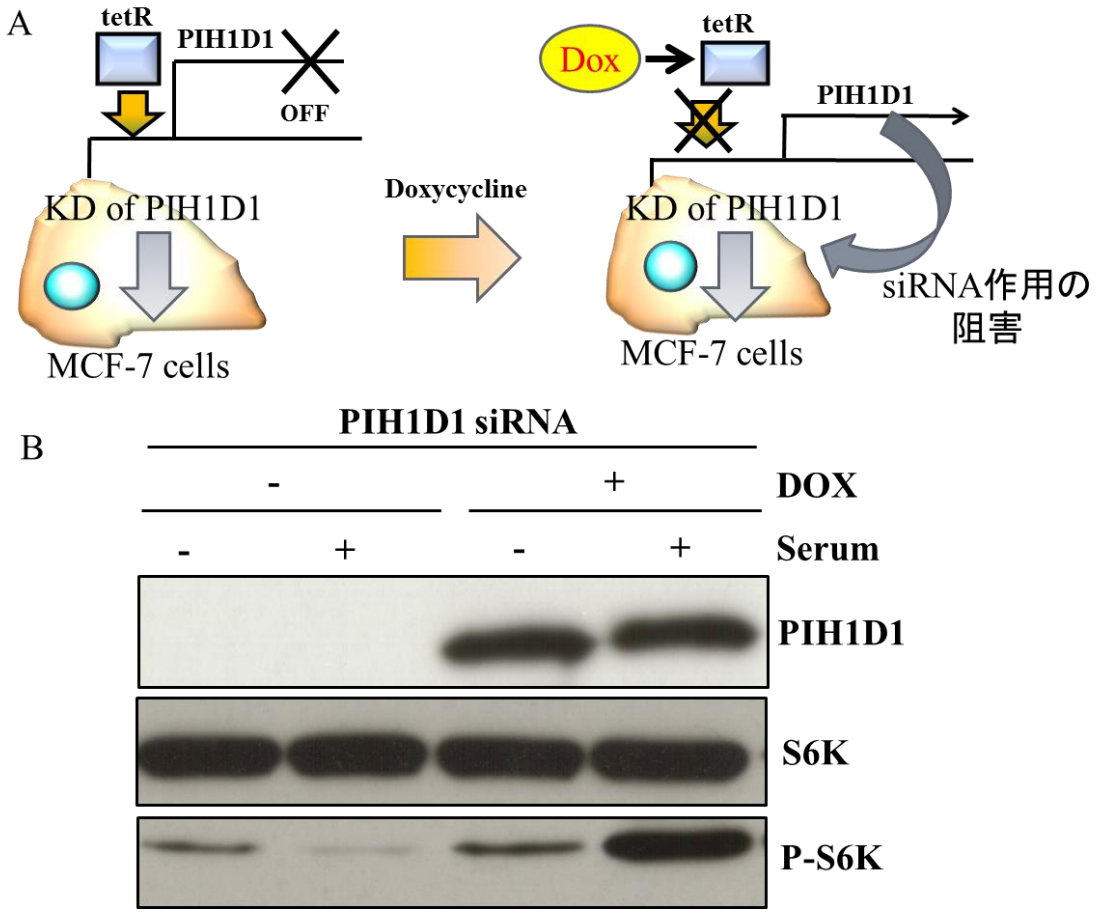

Fig. 7: PIH1D1 遺伝子ノックダウンによる mTOR 活性抑制のレスキュー実験

(A) テトラサイクリン調節性 PIH1D1 高発現株の模式図。

(B) テトラサイクリン調節性 PIH1D1 高発現株に PIH1D1 遺伝子に対する siRNA を血清 (Serum) 非存在下，ドキシサイクリン (DOX) 存在・非存在下で 48 時間作用させたのち 2 時間血清による刺激を加えた。刺激後に S6K のリン酸化を Western blotting 法により検討した。

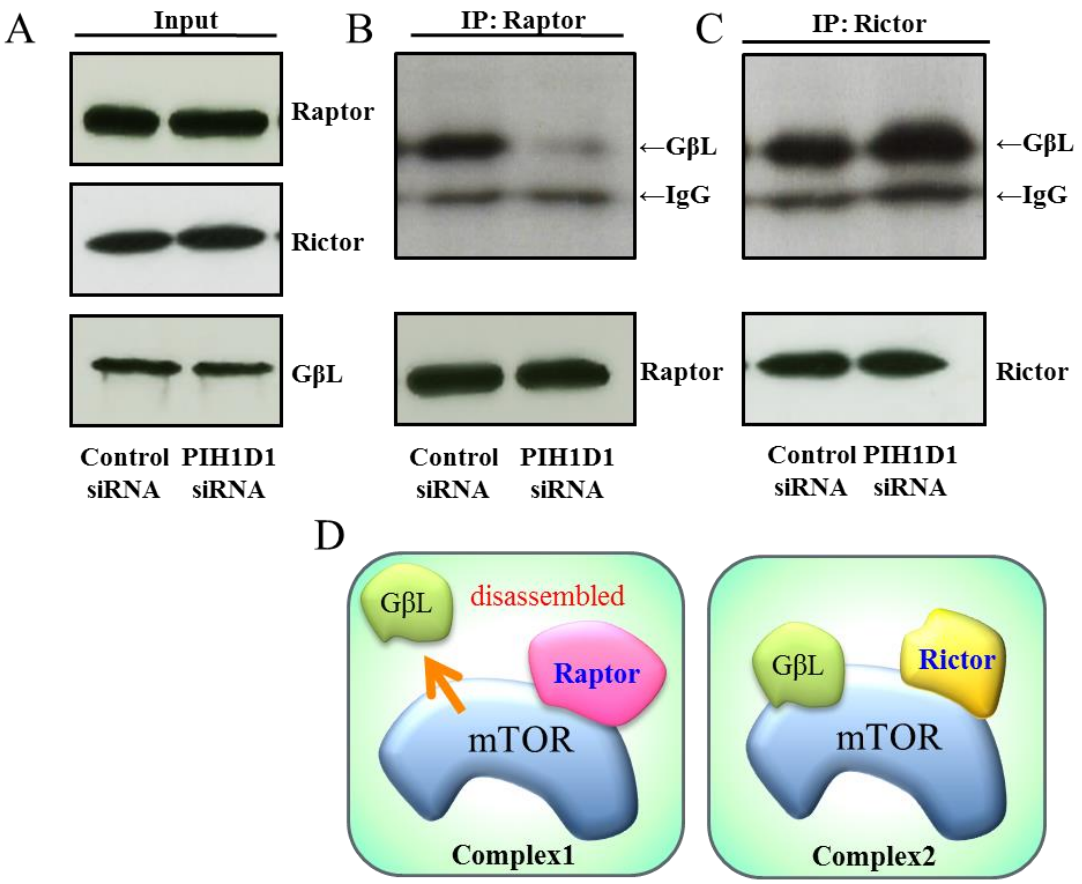

Fig. 8: 乳癌細胞における PIH1D1 遺伝子のノックダウンが mTOR 複合体の構成に及ぼす影響

MCF-7 細胞に PIH1D1 の siRNA を導入した 48 時間後の (**A**) Raptor, Rictor および GβL の発現量 (**B**) mTOR 複合体 1 の構成 (GβL と Raptor の結合) (**C**) mTOR 複合体 2 の構成 (GβL と Rictor の結合) を Western blotting 法により検討した。図中の IgG は抗 GβL 抗体の非特異的な結合を示す。(**D**) PIH1D1 遺伝子をノックダウンした MCF-7 細胞における mTOR 複合体の模式図。

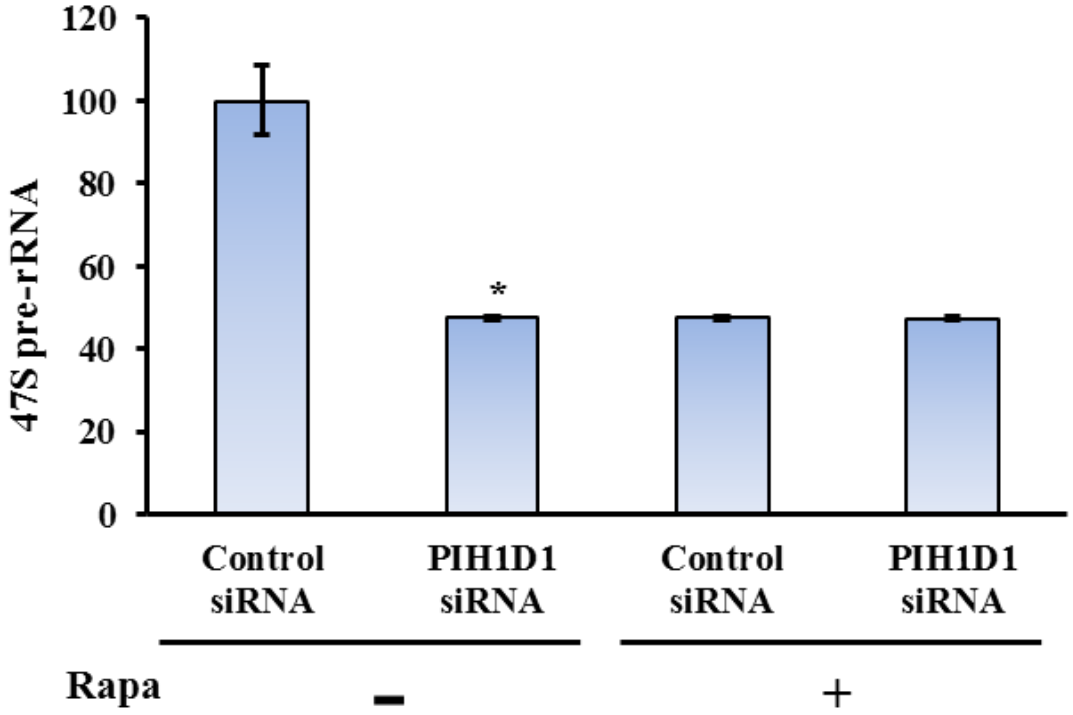

Fig. 9: PIH1D1 の発現抑制が rRNA の転写に及ぼす影響
MCF-7 細胞に Rapamycin (Rapa, 20 nM) 存在, 非存在下で PIH1D1 の siRNA を導入した。導入 48 時間後の pre-rRNA 量を RT-qPCR を用いて測定した。データは β-actin の mRNA 量に従って補正した。グラフの値は平均値および標準偏差を示す (n=4), *:P<0.01 vs. control (Rapa 非存在下) (ANOVA: Tukey test)

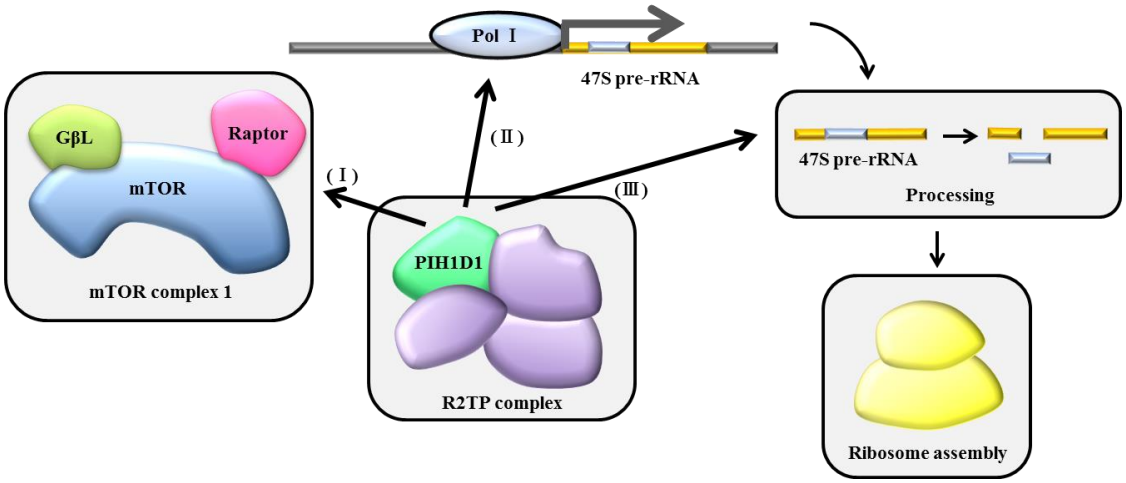

Fig. 10: 乳癌細胞における PIH1D1 の作用
本研究および過去の報告から PIH1D1 はリボソーム生合成の様々なステップに関与している可能性が示唆される。
(I) mTOR 複合体 1 の活性化 (本実験結果より)
(II) rRNA の転写 [24]
(III) rRNA のプロセシング [16]

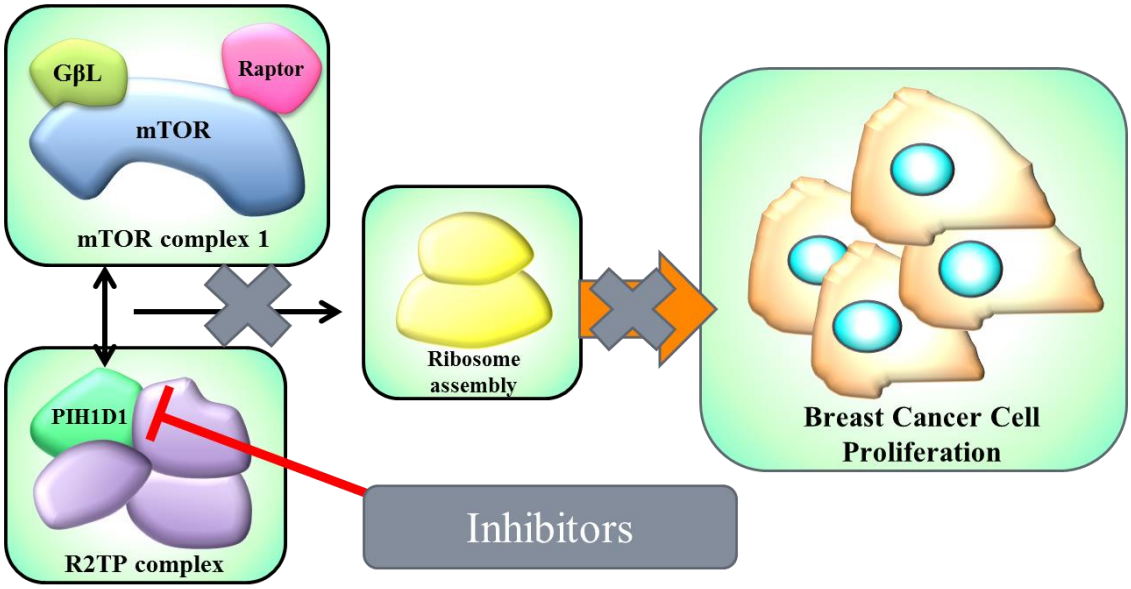

Fig. 11: 今後の展望
PIH1D1 を選択的に阻害し，mTOR 複合体 1 の作用であるリボソーム生合成を抑制することにより，乳癌細胞の細胞増殖を特異的に抑制する技術の開発が期待される。