

- 節, 21. 特殊循環系, 鯉淵典之 (群馬大), 栗原 敏監
 訳. イラストレイテッド生理学: リッピンコットシ
 リーズ, 東京: 丸善出版, 2014. p.275-306.
- 2) 南沢 享訳, 第IV編: 心血管系 19. 血液と血管系,
 鯉淵典之 (群馬大), 栗原 敏監訳. イラストレイテ
 ッド生理学: リッピンコットシリーズ, 東京: 丸善出版,
 2014. p.255-74.
- 3) 福田紀男訳, 第IV編: 心血管系 17. 心臓の興奮,
 18. 心臓力学, 鯉淵典之 (群馬大), 栗原 敏監訳. イ
 ラストレイテッド生理学: リッピンコットシリーズ,
 東京: 丸善出版, 2014. p.227-54.

生 化 学 講 座

教 授: 吉田 清嗣 分子腫瘍学, 病態医化学
 准教授: 朝倉 正 がんの生化学, 病態医化学

教育・研究概要

I. 乳癌幹細胞の発生・維持に機能する新規制御因 子の探索

癌幹細胞は, 自身が持つ分化能・造腫瘍能, 薬剤耐性能により, しばしば癌の再発の原因となることから, 癌の根治には, この癌幹細胞を根絶することが重要である。2003年に乳癌における癌幹細胞の存在が明らかとなったが, この乳癌幹細胞が腫瘍内でどのようにして発生・維持されているかについては未だ解明には至っていない。

我々は, 乳癌の中でも従来の治療標的分子であるホルモン受容体や HER2 を発現せず, 進行・転移が早く予後不良とされるトリプルネガティブ乳癌に着目した。本年は, 当該細胞株を用いて, 乳癌幹細胞の発生・維持に機能する新規制御因子を探索することを試みた。癌幹細胞と非癌幹細胞間の網羅的遺伝子発現解析を行うため, まず初めに主要乳癌幹細胞マーカー (CD44⁺/CD24⁻, ALDH 活性陽性) を用いて, トリプルネガティブ乳癌細胞株6種における癌幹細胞の割合を調べた。その結果, 各細胞株において CD44⁺/CD24⁻細胞集団と ALDH 活性陽性の割合に著しく相違が見られ, マーカー間での相関関係は全く認められなかった。そこで, 癌幹細胞を培養・増殖できる *in vitro* スフェア培養条件下で6種細胞株を培養し, スフェア (癌幹細胞集団) を作製する。その後, 一定サイズ以上のスフェアのみを単離した後, マイクロアレイにより網羅的遺伝子発現解析を行う予定である。

加えて現在, DYRK2 が上皮間葉転換および乳癌幹細胞の存在に影響を及ぼすという実験結果を元に, DYRK2 による乳癌幹細胞の制御に焦点をあて, 癌幹細胞の発生の分子機構の解明に取り組んでいる。DYRK2 低発現の乳癌細胞では転写因子 KLF4 の発現が上昇し CD44^{high}/CD24^{low} で標識される癌幹細胞の割合が増加した。また DYRK2 の発現量に依存してスフェア形成能・ヌードマウスにおける腫瘍形成能がともに変化した。今後は臨床検体におけるこれらの相関性の検討を進めていく。

II. 乳癌幹細胞株 iCSCL10A の転移機構の解析

iCSCL10A 細胞は, 梁 明秀教授 (横浜市立大学)

によりリプログラミング因子 (OCT4, SOX2, Klf4, c-Myc) を乳腺上皮細胞株 MCF-10A に導入することによって樹立された人工乳癌幹細胞株である。本細胞株は、自己再生能や多分化能などの癌幹細胞の性質を保持し、免疫不全マウスに移植すると高率で腫瘍形成を認めるが、その転移能についてはわかっていない。

そこで我々は、親株 MCF10A 細胞と共に iCS-CL10A 細胞に赤色蛍光タンパク質 E2-rimson を発現させることにより蛍光ラベルし、それを免疫不全マウスに移植した後、in vivo 蛍光イメージングにより転移の有無を調べた。その結果、MCF10A 細胞を移植したコントロールマウスでは、移植 6 週間後において転移は認められなかったが、iCSCL10A 細胞を移植したマウスでは、移植 3 ~ 6 週間後に高率で腰椎や大腿骨・脛骨への転移を認めた。現在、転移巣から移植した iCSCL10A 細胞を単離し、転移機構の解析を行っている。

III. DYRK2 ノックアウトマウスの作製

我々は、これまでにリン酸化酵素 dual specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase 2 (DYRK2) が、癌抑制遺伝子 p53 や細胞周期の主要転写因子 c-Jun や c-Myc のリン酸化を担う重要な分子であり、その発現低下は腫瘍形成能を亢進させることを見出してきている。しかしながら、DYRK2 の in vivo 解析の知見については未解明のままであった。

そこで本年は、畑田出穂教授 (群馬大学) との共同研究により、CRISPR/Cas9 ゲノム編集システムを用いて DYRK2 遺伝子改変マウスの作製を行った。CRISPR/Cas9 ゲノム編集システムとは、従来技術と比較して迅速かつ簡便に、遺伝子特異的なノックアウト・ノックインなどを行うことができる新しい遺伝子改変技術である。この技術を用いて、まず最初に DYRK2 遺伝子中の標的配列を含むガイド RNA と DNA 切断酵素 Cas9 の合成 RNA を作製し、マウス受精卵に注入した。その後、生存した受精卵のみを仮親マウスへ移植し、13匹の仔マウスを得た。これらマウスの遺伝子型を調べたところ、両側アレルで DYRK2 を欠損しているホモ個体は得られなかったが、片側アレルでのみ挿入欠失変異を起こし、フレームシフトによりナンセンス変異を起こしているヘテロ個体を得た。現在、DYRK2 ヘテロノックアウトマウス同士を交配し、ホモノックアウトマウスを作出中である。

IV. Dyrk2 遺伝子ターゲティング ES 細胞の作製

培養細胞株を用いた研究から、DYRK2 はがん抑制的な機能を有していることが明らかになっている。しかしながら、生物個体における DYRK2 の生理的意義やその機能欠損とがん発症との関連性などは明らかになっていない。そこで我々は Dyrk2 ノックアウトマウスの作製を目指し、Dyrk2 遺伝子ターゲティング ES 細胞を作製した。Dyrk2 遺伝子に対するターゲティングベクターは国際的なノックアウトマウス作製プロジェクトである KOMP から入手し、複数の制限酵素と PCR を用いてベクターの品質を確認した後、線状化したベクターを電気穿孔法で ES 細胞へ導入した。薬剤選択後に得られた ES 細胞クローンからゲノム DNA を抽出し、long-range PCR と Southern blotting を用いて正しく Dyrk2 遺伝子座にベクターが挿入されているクローンを選択した。得られたクローンは 6 種類であり、それらはいずれも knockout-first allele (tmla) である。このタイプの対立遺伝子を有する ES 細胞は Cre および Flp recombinases を介した組換え反応を利用して、全身性のノックアウトだけでなく、組織特異的なノックアウトマウスの作製に利用可能である。

V. DYRK2 低発現の乳癌に対する治療法の探索

これまでに我々は癌細胞におけるリン酸化酵素 DYRK2 の働きについて研究を進めてきた。DYRK2 は乳癌・卵巣癌において発現が減少しており、低発現の癌では抗癌剤耐性を獲得し予後不良である。そのような乳癌に対して特異的に作用する治療法の探索を現在行っている。DYRK2 を恒常的にノックダウンした細胞株において mTOR pathway が活性化していることが、マイクロアレイを用いた解析により明らかとなった。mTOR 阻害剤であるエベロリムスを添加すると DYRK2 低発現の乳癌細胞ではコントロールと比較し感受性が増加した。Xenograft model における検討では、DYRK2 ノックダウン細胞は細胞障害性抗癌剤よりもエベロリムスでの腫瘍増殖抑制効果が高かった。これらの結果より、DYRK2 の発現が低い乳癌ではエベロリムスが特異的に作用することが示唆された。

VI. Mps1 による分裂期染色体制御の分子機構

遺伝情報そのものである染色体の適切な制御はあらゆる生物の生存に必須である。染色体は分裂期に凝縮し、細胞分裂の際に 2 つの娘細胞へと均等に分配されていく。分裂期での染色体制御異常は、細胞

の染色体数の変化の直接的な原因と成り、癌をはじめとした多くの疾患と密接な関係があると考えられている。本研究では分裂期での染色体制御の詳細を明らかにすることを目的とし、Mps1というリン酸化酵素に注目した解析を行った。質量分析法によりMps1と会合する蛋白質の探索を行った結果、新規Mps1会合蛋白質としてcondensin IIを同定した。condensin IIはCAP-H2, CAP-G2, CAP-D3, SMC2, SMC4から成る蛋白質複合体であり、分裂期での染色体の凝縮とその構造維持に機能することが知られている。そこで、分裂期でのMps1によるcondensin IIの制御機構について解析を行った結果、Mps1は分裂期においてCAP-H2をリン酸化することを明らかとした。また、そのリン酸化部位としてSer492を同定した。更なる機能解析の結果、Mps1によるCAP-H2のリン酸化はcondensin IIが染色体上へ局在するために必須であることが確認された。また、細胞内のMps1の除去、或いはCAP-H2-Ser492のリン酸化の抑制は分裂期での染色体凝縮の異常につながる事が明らかとなった。以上の結果から、分裂期においてMps1はCAP-H2-Ser492のリン酸化を介してcondensin IIの染色体への局在を促し、染色体の凝縮制御に寄与していることが明らかとなった。

Ⅶ. 新規がん関連タンパク質 TRIP13

出芽酵母のpachytene checkpoint 2 (Pch2)は減数分裂時のシナプトネマ複合体の形成や組換え、DNA二本鎖切断修復などに関与すると考えられている。Tyroid hormone receptor interacting protein 13 (TRIP13)は哺乳類におけるPch2のオルソログであり、ヒトやマウスにおいて、精巣で高発現している一方で、様々ながん種における発現も報告されている。そこで我々は12種類のがん細胞株と2種類の不死化細胞株を用いて、TRIP13の発現レベルをウエスタンブロッティングで解析した。その結果、全ての細胞株でTRIP13が高いレベルで発現していることが明らかになった。興味深いことに、肺由来の線維芽細胞を不死化した細胞株(WI-38 VA13 subline 2RA)ではその親株である正常線維芽細胞(WI-38)と比較して、TRIP13の発現が亢進していた。また、ノコダゾールでM期に同調させたHeLa細胞においてTRIP13のリン酸化が観察され、リン酸化による何らかの制御を受けている可能性が示唆された。以上より、TRIP13は細胞増殖やがんの進展に寄与している可能性があると考えられる。

「点検・評価」

1. 研究

2012年度より講座担当教授として吉田清嗣が着任し、発癌機構の解明と癌治療への応用を主たる研究テーマとする講座へとリニューアルされた。2014年度生化学講座の研究活動において特記すべき事項としては、まずMps1による分裂期染色体制御の分子機構について、その詳細な分子機構の一端を明らかにした。またDNA損傷において中心的な役割を果たしているがん抑制因子p53がどのように細胞死誘導を制御しているかについて、その新規調節機構を解明した。さらにDNA損傷で活性化されアポトーシスを誘導するDYRK2キナーゼの機能解析から、新たな癌の浸潤・進展機構が解明され、癌治療の標的分子となる可能性を提示することができた。これから当講座の柱となると期待される新しい研究テーマである癌幹細胞の分離と機能解析にも着手した。

2. 教育

主に医学科2年生、3年生、及び看護学科2年生の教育に携わっている。2年生前期の基礎医科学I「分子から生命へ」では、講義・演習・実習を分子生物学講座と密接に連携しながら担当している。演習や実習では、少人数による「議論を通じて考えて理解する」能動的な学習を促すよう周到な準備のもと実施しており、多大な教員の負担はあるものの、充分それに見合う教育効果が得られていると考えている。

研究業績

I. 原著論文

- 1) Dashzeveg N, Taira N, Lu ZG¹⁾, Kimura J¹⁾ (¹Tokyo Medical and Dental Univ), Yoshida K. Palmdelphin, a novel target of p53 with Ser46 phosphorylation, controls cell death in response to DNA damage. *Cell Death Dis* 2014; 5: e1222.
- 2) Kagami Y, Nihira K (Tokyo Medical and Dental Univ), Wada S, Ono M (National Cancer Center Research Institute), Honda M, Yoshida K. Mps1 phosphorylation of condensin II controls chromosome condensation at the onset of mitosis. *J Cell Biol* 2014; 205(6): 781-90.
- 3) Nakazawa K, Dashzeveg N, Yoshida K. Tumor suppressor p53 induces miR-1915 processing to inhibit Bcl-2 in the apoptotic response to DNA damage. *FEBS J* 2014; 281(13): 2937-44.
- 4) Matsumoto M, Matsuura T, Aoki K, Maehashi H,

Iwamoto T, Ohkawa K, Yoshida K, Yanaga K, Takeda K. An efficient system for secretory production of fibrinogen using a hepatocellular carcinoma cell line. *Hepatol Res* 2015; 45(3): 315-25.

- 5) Asakura T, Yamaguchi N, Ohkawa K, Yoshida K. Proteasome inhibitor-resistant cells caused EMT-induction via suppression of E-cadherin by miR-200 and ZEB1. *Int J Oncol* 2015; 46(5): 2251-60. Epub 2015 Mar 4.

II. 総 説

- 1) Nihira NT, Yoshida K. Engagement of DYRK2 in proper control for cell division. *Cell Cycle* 2015; 14(6): 802-7.

III. 学会発表

- 1) Dashzeveg N, Taira N, Yoshida K. Tumor suppressor p53 with Ser46 phosphorylation controls cell death via palmdelphin in the apoptotic response to DNA damage. 4th International Conference on "Current advances in Microbiology and Immunology". Ulaanbaatar, June.
- 2) 朝倉 正, 山口乃里子, 青木勝彦, 吉田清嗣. プロテアソーム阻害剤体制がん細胞は CD44 高発現によりがん幹細胞化するとともに EMT を誘発する. 第 73 回日本癌学会学術総会. 横浜, 9 月.
- 3) 三本 麗, 井廻良美, 山口乃里子, 仁平直江, 武山浩, 吉田清嗣. RAD001 は化学療法体制 DYRK2 低発現乳癌において有効である. 第 73 回日本癌学会学術総会. 横浜, 9 月.
- 4) ダシゼウエゲヌルマ, 吉田清嗣. P53 は DNA 損傷に应答して miR-1915 の成熟に関わる事で Bcl-2 の発現を抑制しアポトーシスを誘導する. 第 73 回日本癌学会学術総会. 横浜, 9 月.
- 5) 加賀美裕也, 仁平啓史, 尾野雅哉, 吉田清嗣. Mps1/TK は condensin II のリン酸化を介して染色体凝集を制御する. 第 73 回日本癌学会学術総会. 横浜, 9 月.
- 6) 山口乃里子, 三本 麗, 上田 和, 仁平直江, 矢内原臨, 岡本愛光, 吉田清嗣. 卵巣漿液性腺癌における DYRK2 を介した転移・浸潤メカニズムの解明. 第 73 回日本癌学会学術総会. 横浜, 9 月.

分子生物学講座

教授：松藤 千弥 生化学・分子生物学
 講師：小黒 明広 分子生物学
 講師：村井 法之 生化学・分子生物学

教育・研究概要

生理活性物質ポリアミン（プトレッシン，スベルミジン，スベルミン）は全ての細胞中に多量に存在し、主に核酸に結合して、遺伝子発現や細胞の増殖・分化に重要な役割を果たしている。ポリアミンは増殖の盛んな細胞内では増加しているため、がんのバイオマーカーとしても有用である。動物細胞のポリアミン合成は、オルニチン脱炭酸酵素（ODC）の働きによりオルニチンを材料にプトレッシンが合成され、次いでスベルミジン，スベルミンの順で合成される。ODC はアンチザイム（AZ）と結合することにより分解に導かれる。AZ の発現は翻訳フレームシフトで制御されており、その効率は細胞内のポリアミン濃度により規定されている。細胞内ポリアミン量は、この負のフィードバックシステムにより調節されている。AZ は哺乳類では AZ1, 2, 3 の 3 種類が存在し、さらに AZ は 2 種類のアンチザイムインヒビター（Azin1, 2）により機能阻害される。我々はポリアミンの調節系の生物学的意義と分子機構を解明し、さらにそれらを利用した研究および診断ツールの開発を目指している。

I. AZ2 による c-MYC の分解機構とその意義

昨年までに AZ2 が c-MYC と特異的に結合してその分解をユビキチン非依存的に促進することを発見し、AZ2 は c-MYC と核、特に核小体に共局在することを明らかにした。引き続き c-MYC の核小体における分解に及ぼす AZ2 の影響について解析した。c-MYC の核小体局在には NPM1 という核小体タンパク質が重要であることがわかっており、NPM1 を過剰発現させると、c-MYC の核小体局在が増加するとともに分解が促進されることが報告されている。この条件下において、AZ2 のノックダウンおよび強制発現を行ったところ、内在性 c-MYC の分解は、AZ2 のノックダウンでは抑制され、過剰発現では促進された。また、ユビキチン化されない c-MYC の変異体（T58A）は、NPM1 存在下で分解されるが、そこに AZ2 を強制発現させると c-MYC の分解がさらに促進された。以上の結果は、AZ2 が核小体で c-MYC をユビキチン非依存的に