

第94回日本生理学会大会. 浜松, 3月.

- 16) 田代倫子¹⁾, 小比類巻生, 井上 華¹⁾, 田井 忍¹⁾, 福田紀男, 小林 了¹⁾, 小西真人¹⁾ (1東京医科大). (ポスター) ラット心室筋細胞のNa⁺依存性Mg²⁺汲み出し機構におけるSLC41A1. 第94回日本生理学会大会. 浜松, 3月.

V. その他

- 1) 南沢 享. 動脈管平滑筋細胞, 内皮細胞から分泌される血管リモデリング因子の同定. 平成23年度~平成27年度文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業「安定同位体医学応用研究基盤拠点 (SI医学応用研究基盤拠点) の形成」研究成果報告書 2016; 113-6.
- 2) 草刈洋一郎. SI医学応用による心筋線維化バイオマーカーの検索. 平成23年度~平成27年度文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業「安定同位体医学応用研究基盤拠点 (SI医学応用研究基盤拠点) の形成」研究成果報告書 2016; 105-7.
- 3) 赤池 徹. 心筋の発達・分化における心筋線維芽細胞の役割の解明. 平成23年度~平成27年度文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業「安定同位体医学応用研究基盤拠点 (SI医学応用研究基盤拠点) の形成」研究成果報告書 2016; 108-10.
- 4) 中邨智之 (関西医科大), 南沢 享, 青木浩樹 (久留米大), 横山詩子 (横浜市立大). 動脈弾性板の形成・破壊の分子機構とその動脈疾患における役割. がん・心臓病の基礎的・先駆的研究事業報告書 (平成27年度公益財団法人車両競技公益資金記念財団) 2016; 23-35.

生 化 学 講 座

教授: 吉田 清嗣 分子腫瘍学

教育・研究概要

I. 乳癌幹細胞株 iCSCL10A の転移機構の解析

乳癌幹細胞株 iCSCL-10A は, 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, 多分化能, 薬剤耐性能, 造腫瘍能などの癌幹細胞の性質を保持しているが, その転移能については不明である。そこで, 近赤外蛍光タンパク質 iRFP を iCSCL-10A 細胞に安定発現させ, 免疫不全マウスに心腔内投与し, *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, 親株 MCF-10A 細胞を移植したマウスでは全く転移は認められなかったが, iCSCL-10A 細胞を移植したマウスでは, 移植4週間後から高率に大腿骨・脛骨転移を認めた。次に, iCSCL-10A 細胞の骨転移に関与する遺伝子を探索するため, セルソーターを用いて骨転移巣から iCSCL-10A 細胞を単離し, マイクロアレイ解析により移入前後での遺伝子発現の変化を調べた。その結果, 細胞接着, シグナル伝達, 代謝などに関係する遺伝子において発現変化が認められた。現在, これら遺伝子の骨転移への関与について解析中である。

II. DYRK2 の機能に重要なアミノ酸残基の同定

DYRK2 は真核生物において進化的に保存された CMGC ファミリーに属するリン酸化酵素である。したがって CMGC ファミリー間で保存されているアミノ酸残基は, DYRK2 においても, その構造や機能に重要であると考えられる。そこで我々は, CMGC ファミリーの機能発現に重要な活性化ループに注目して一連の DYRK2 変異体を作製し, それらの解析を行った。作製した変異体は緑色蛍光タンパク質 (GFP) との融合タンパク質として細胞内で発現される。DYRK2 の活性化ループに存在する 382 番目のチロシン残基 (Y382) は自己リン酸化を受けることが知られており, このリン酸化によって DYRK2 はキナーゼ活性を発揮する。まず, 野生型の DYRK2 を COS7 細胞で強制発現させたところ, 細胞は上皮細胞様に進展した状態から球状に変化した。一方, Y382 がリン酸化されない変異体 (Y382F) を細胞で発現させたところ, COS7 細胞の形態は上

皮細胞様のままであり、GFP-DYRK2は細胞質に局在していた。DYRK2の活性化ループ領域に存在するアミノ酸残基のうち、Y382以外にリン酸化を受ける可能性があるものとしてY380, T381, S385が挙げられる。そこで我々はこれらのアミノ酸残基に対する変異体(Y380F, T381A, S385A)を作製し、COS7細胞内で発現させた。その結果、Y380FとT381Aの表現型は野生型のDYRK2を発現させた場合と同様であり、COS7細胞は球状に変化した。したがって、DYRK2の活性化ループ内に存在する380番目のチロシンと381番目のスレオニンは機能的に重要ではないことが示唆される。一方、385番目のセリンをアラニンに置換した変異体(S385A)をCOS7細胞に発現させると、細胞はY382Fを発現させた場合と同様の形態を示した。さらに、このセリン残基を酸性アミノ酸に置換することでリン酸化セリン残基に模倣させた場合(S385EとS385E)においても、その形態はY382FやS385Aと同様に伸展した上皮細胞様のままであった。これらの結果から、活性化ループ内に存在する385番目のセリン残基はDYRK2の機能に重要であると考えられる。

Ⅲ. Plk1による分裂期染色体制御機構の解析

多くの癌細胞は染色体不安定性という特徴をもち、染色体の本数が増加した異数性であることが知られている。分裂期における染色体制御の異常は異数性の原因となり、細胞の癌化とその悪性化に寄与すると考えられているが、詳細な分子機構については未だ不明な点が多くある。本研究では、癌での発現亢進が報告されているPlk1というリン酸化酵素に注目した解析を通じて、染色体制御機構の詳細を明らかにすることを目的とした。Plk1阻害剤であるBI2536を用いた解析の結果、Plk1の活性阻害は分裂期においてCAP-H2という蛋白質の発現低下を引き起こすことを見出した。CAP-H2はcondensin IIと呼ばれる蛋白質複合体のサブユニットの一つであり、分裂期での染色体の凝縮と分配に必須な役割を担うことが知られている。Plk1によるCAP-H2発現制御についてさらなる解析を進めた結果、CAP-H2の発現低下はCdc20を介したユビキチンプロテアソーム系による分解であることが明らかとなった。さらにPlk1がCAP-H2を直接リン酸化することを明らかとし、そのリン酸化部位としてSer288を同定した。Ser288は分裂期においてPlk1を介したリン酸化を受け、CAP-H2の発現上昇とcondensin IIの活性化に必要であることを明らかにし

た。以上の結果から、分裂期においてPlk1はCAP-H2の発現量とcondensin IIの機能を制御し、染色体制御に寄与していることが明らかとなった。

Ⅳ. がん幹細胞におけるPim-1の機能解析

がん幹細胞はがん細胞の中で幹細胞様の性質をもつ細胞集団として知られており、自己複製能、高い治療抵抗性をもつ。これら幹細胞様の性質は、浸潤や転移、再発などの原因となると考えられている。がん幹細胞は腫瘍内に極少数の割合で存在していると考えられているが、がん幹細胞に制御に関わる因子や細胞内シグナル伝達経路については不明な点が多い。Pim-1はがん遺伝子と知られるリン酸化酵素であり、様々な基質のリン酸化を介して細胞増殖、生存、アポトーシスを制御することが報告されている。また、Pim-1の高発現が多数のがん種で報告されているが、がん幹細胞での機能については不明である。本研究ではPim-1キナーゼのがん幹細胞内での機能に注目し大腸癌細胞株を用いた解析を行った。過去の報告から、*in vitro*におけるsphere formation assayは自己複製能を有するがん幹細胞を選別する方法であることが明らかとなっていることから、sphere形成細胞でのPim-1の機能について解析を行った。その結果、Pim-1はsphere細胞で高発現していることを見出した。また、Pim-1の機能抑制はsphere形成を抑制した。Pim阻害剤を用いた解析から、Pim-1はsphere細胞においてAkt, mTORの活性を制御することが明らかとなった。これらの結果から、Pim-1はAkt/mTORシグナル伝達経路の活性化を介してがん幹細胞の自己複製能の制御に寄与している可能性が示唆された。

「点検・評価」

1. 研究

発癌機構の解明と癌治療への応用を主たるテーマとして研究活動を展開しており、その成果をコンスタントに発信できるようになってきた。2016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、まず乳癌幹細胞の制御と転移について、モデル細胞を用いた解析からその詳細な分子機構の一端を明らかにした。またがん遺伝子として知られているPim-1キナーゼの解析から、がん幹細胞が集積していると考えられているスフィア形成細胞に高発現していることを見出した。Pim阻害剤を用いた解析から、Pim-1はスフィア形成細胞においてAkt, mTORの活性を制御することが明らかとなった。また多くの癌細胞が有する染色体不安定性について

Plk1 キナーゼとコンデンシンとの協調制御を見出し、その分子機構を明らかにした。

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。医学科2年生前期のコース基礎医科学Iユニット「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) Mimoto R, Imawari Y, Hirooka S, Takeyama H, Yoshida K. Impairment of DYRK2 augments stem-like traits by promoting KLF4 expression in breast cancer. *Oncogene* 2017; 36(13) : 1862-72.
- 2) Mimoto R, Nihira NT, Hirooka S, Takeyama H, Yoshida K. Diminished DYRK2 sensitizes hormone receptor-positive breast cancer to everolimus by the escape from degrading mTOR. *Cancer Lett* 2017; 384 : 27-38.
- 3) Yamamoto T, Nihira NT, Yogosawa S, Aoki K, Takeda H, Sawasaki T, Yoshida K. Interaction between RNF8 and DYRK2 is required for the recruitment of DNA repair molecules to DNA double-strand breaks. *FEBS Lett* 2017; 591(6) : 842-53.

II. 総説

- 1) Dashzeveg N, Yoshida K. Crosstalk between tumor suppressors p53 and PKC δ : execution of the intrinsic apoptotic pathways. *Cancer Lett* 2016; 377(2) : 158-63.
- 2) Kagami Y, Yoshida K. The functional role for condensin in the regulation of chromosomal organization during the cell cycle. *Cell Mol Life Sci* 2016; 73(24) : 4591-8.

III. 学会発表

- 1) 井廻良美, 三本 麗, 山口乃里子, 吉田清嗣. 乳癌細胞株においてDYRK2はKLF4を介して幹細胞性を制御する. 第75回日本癌学会学術総会. 横浜, 10月.
- 2) 伊藤大介, 與五沢里美, 矢永勝彦, 吉田清嗣. 大腸癌においてDYRK2はEMTを介して大腸癌の転移・浸潤を制御する. 第75回日本癌学会学術総会. 横浜, 10月.

3) 加賀美裕也, 尾野雅哉, 吉田清嗣. Plk1によるCAP-H2のリン酸化は分裂期におけるコンデンシンIIの機能を制御する. 第75回日本癌学会学術総会. 横浜, 10月.

4) Yoshida K. Tumor suppressive function of DYRK2. DYRK1A, Related Kinases and Human Disease. Saint Malo, Mar.